

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**



**ALEXANDRA BOTTCHER**

**EXPRESSÃO DE GENES DA FERRITINA E  
RESPOSTA ANTIOXIDANTE EM DUAS CULTIVARES  
DE *Coffea arabica* EXPOSTAS A FERRO E ALUMÍNIO**

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
para obtenção do Título de Mestre em  
Biologia Vegetal, na área de Fisiologia  
Vegetal.**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
ALEXANDRA BOTTCHER  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera**

**Campinas, 2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**B658e**

Bottcher, Alexandra

Expressão de genes da ferritina e resposta antioxidante em duas cultivares de *Coffea arabica* expostas a ferro e alumínio / Alexandra Bottcher. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Paulo Mazzafera.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ferritina. 2. *Coffea arabica*. 3. Alumínio. I. Mazzafera, Paulo, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

**Título em inglês:** Ferritin gene expression and antioxidant response of two *Coffea arabica* cultivars exposed to iron and aluminium.

**Palavras-chave em inglês:** Ferritin; *Coffea arabica*; Aluminium.

**Área de concentração:** Biologia Vegetal.

**Titulação:** Mestre em Biologia Vegetal.


**Banca examinadora:** Paulo Mazzafera, Luiz Gonzaga Esteves Vieira, Janette Palma Fett.

**Data da defesa:** 10/02/2009.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Vegetal.

## BANCA EXAMINADORA

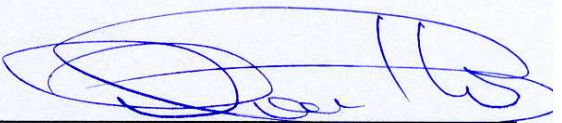
**Prof. Dr. Paulo Mazzafera (Orientador)**



---

Assinatura

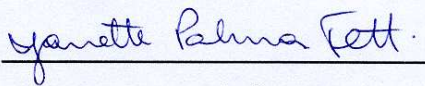
**Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira**



---

Assinatura

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janette Palma Fett**



---

Assinatura

**Dr<sup>a</sup>. Sara Adrián López de Andrade**

---

Assinatura

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlene Aparecida Schiavinato**

---

Assinatura

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico**

**aos meus pais e minha irmã**

**com muito carinho, pelo apoio, amor**

**e todo esforço dedicado a minha formação.**

**Ao Rafael com muito amor,  
pelo incentivo, companheirismo e  
amor, fundamentais para essa conquista.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera, pela orientação, ensinamentos e suporte para a realização desse trabalho.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo (06/57404-2).

À Dulcinéia, Dulce e Milton pela ajuda fundamental nos meus primeiros dias no Departamento de Fisiologia Vegetal.

Aos meus amigos queridos do laboratório (Igor, Juca, Van, Giba, Hellen, Lucas, Prudo, Dri, Milton, Sara, Juzinha...), pelos cafés, almoços, momentos de descontração e alegria durante a rotina de trabalho. Obrigada pela convivência agradabilíssima!

Às amigas Priscilla e Roberta, pelos conselhos, abraços e preocupações dispensadas.

À Paula Nóbile pela colaboração e conhecimento oferecidos, tanto para realização de experimentos como na redação de resumos. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Ricardo A. de Azevedo pela disponibilização de seu laboratório, equipamentos e inclusive de suas alunas. Agradeço em especial a Paula, que esteve sempre de prontidão para me ajudar. Obrigada também a Gicka e Salete.

Ao amigo Fábio Conte pela ajuda nos experimentos finais para fechamento do trabalho.

Aos meus pais (Rui Roberto e Antônia Lizonete) e minha irmã (Roberta), exemplos de honestidade e bom caráter, pela minha formação pessoal e profissional, por tudo que sou hoje. Obrigada pelo amor incondicional, por todo apoio e companheirismo. Amigos sempre ao meu lado.

Ao Rafael, por ter sido meu apoio desde o início de tudo isso. Obrigada pelo amor, companheirismo irrestrito e paciência nos meus piores momentos. Amigo mais querido, que participou de tudo e trabalhou muito nessa dissertação. Esse título de certa forma também é

seu. Agradeço pelos ensinamentos, pelas correções, pela companhia nas viagens, pelas ajudas nos laboratórios (no meu, no seu, em Piracicaba, etc). Obrigada por me incentivar e acreditar em mim, quando eu mesma não acreditava. Todo meu amor a você.

Ao Zeca e Regina, por me acolherem e por todo carinho e amor dispensados.

Aos membros da família que acreditaram em mim e me ajudaram (Cau!).

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

...E especialmente à Deus, pela força e perseverança concedidas para que eu alcançasse esse ideal.

## ÍNDICE

DEDICATÓRIA .....	iv
AGRADECIMENTOS .....	v
ÍNDICE .....	vii
SUMMARY .....	x
RESUMO .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.1. Importância do ferro .....	3
2.2. A ferritina .....	5
2.3. Estresse oxidativo .....	7
2.3.1. Sistema oxidante de resposta .....	8
2.4. Toxicidade ao alumínio .....	13
2.5. Aspectos gerais de <i>Coffea arabica</i> .....	16
3. OBJETIVOS .....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
4.1. Material biológico .....	19
4.2. Obtenção de calos e células em suspensão .....	19
4.3. Indução da biossíntese de ferritina .....	20
4.4. Extração de RNA e produção de primeira fita de cDNA .....	22
4.5. Estudo do banco de EST-Genoma Café .....	21
4.6. Reações de RT-PCR .....	22
4.7. Clonagem .....	23
4.8. Análise da expressão de genes da ferritina .....	23
4.9. Análise de seqüências de ferritina e caracterização <i>in silico</i> .....	27
4.10. Extração e purificação de proteínas .....	28
4.11. SDS-PAGE e Western Blot .....	28
4.12. Atividades de enzimas antioxidantes .....	30
4.12.1. Análise estatística .....	31
5. RESULTADOS .....	32
5.1. Confirmação da seqüência de ferritina <i>CaFer1</i> .....	32
5.2. Análise da expressão de genes da ferritina <i>CaFer1</i> por sqPCR e qPCR .....	32

5.3. Análise de seqüências e caracterização de ferritina <i>in silico</i> .....	37
5.4. Western Blot .....	39
5.5. Atividade da catalase .....	39
5.6. Atividade da superóxido dismutase .....	40
5.7. Atividade da glutathione S-transferase .....	41
5.8. Atividade da glutathione redutase.....	42
5.9. Atividade da guaiacol peroxidase .....	43
6. DISCUSSÃO .....	45
7. CONCLUSÕES .....	55
8. REFERÊNCIAS.....	56



## RESUMO

A ferritina é uma proteína que armazena átomos de ferro (Fe) em uma forma não tóxica, controlando o nível desse metal nas células. Em humanos, a ferritina também é capaz de se ligar ao alumínio (Al), evitando sua toxicidade. Como o cafeeiro consegue crescer adequadamente em solos ácidos, com níveis elevados de Al, e células em suspensão tratadas com esse mesmo metal têm expressão aumentada de genes que codificam para ferritina, há a possibilidade dessa proteína se complexar ao Al também em plantas. Na indução da síntese da ferritina em suspensões celulares de *Coffea arabica* cv. Mundo Novo com 300 e 1.200  $\mu\text{mol/L}$  de sulfato ferroso observou-se um aumento de 8,9 e 18,2 vezes, respectivamente, do RNAm *CaFer1* da ferritina, em relação ao controle. Já o tratamento com 5 mmol/L de sulfato de alumínio-potássio resultou na diminuição de 4,57 vezes na expressão desse gene, em relação ao controle. Para *Coffea arabica* cv. Icatu, todos os tratamentos resultaram na queda da expressão de *CaFer1*, sendo que essa diminuição foi de 29,0 e 6,3 vezes para as células tratadas com 300 e 1.200  $\mu\text{mol/L}$  de sulfato ferroso, respectivamente, e de 98,0 vezes para o tratamento com 5 mmol/L de sulfato de alumínio-potássio, em relação ao controle. Esses mesmos tratamentos não induziram, em ambas as cultivares, expressão diferencial significativa de outro gene da ferritina analisado, o *CaFer2*. Os resultados do Western Blot mostraram certa concordância com esses resultados. Assim como em outras plantas, a ferritina de células em suspensão de cafeeiro responde à presença do Fe, entretanto, devido ao não acúmulo dessa proteína nas células submetidas ao tratamento com 5 mmol/L de sulfato de alumínio-potássio, provavelmente, a ferritina não esteja envolvida na complexação desse metal no cafeeiro ou a concentração utilizada foi elevada, o que pode ter causado danos nos ácidos nucleicos ou impedido a transcrição normal dos genes. Nas análises *in silico* utilizando *CaFer1* e *CaFer2* de *C. arabica* e os genes da ferritina de *C. canephora* e *C. racemosa*, observaram-se alta similaridade entre *CaFer1* e a ferritina de *C. canephora* e entre *CaFer2* e a ferritina de *C. racemosa*. Por fim, os ensaios com as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona S-transferase (GST), glutatona redutase (GR) e guaiacol peroxidase (GPOX) revelaram que as culturas celulares de Mundo Novo foram mais responsivas aos tratamentos aplicados, exceto em relação à GST, que foi a enzima que apresentou atividade mais acentuada para Icatu. Além disso, observou-se que a resposta enzimática foi dose dependente e que as duas cultivares utilizaram vias distintas para defesa celular contra espécies ativas de oxigênio.

Palavras-chave: ferritina, estresse oxidativo, alumínio, *Coffea arabica*

## SUMMARY

Ferritin is a protein capable to store iron (Fe) atoms in a nontoxic form, controlling the level of this metal in the cells. In humans, ferritin is able to accommodate aluminium (Al) atoms, avoiding its toxicity. Considering that *Coffea arabica* plants are able to grow well in acidic soils with high Al and suspension cells treated with this same metal showed high ferritin gene expression, it is possible that this protein is also able to complex Al atoms *in planta*. The induction of ferritin synthesis in suspension cells of *C. arabica* cv. Mundo Novo with 300 and 1.200  $\mu\text{mol/L}$  of ferrous sulphate revealed an increase of 8,9 and 18,2 times, respectively, of transcripts of ferritin gene *CaFer1*, as compared with the control. The treatment with 5 mmol/L of aluminium-potassium sulphate resulted in the reduction of 4,57 times the expression of this gene, as compared with the control. In cells from the Icatu cultivar all treatments resulted in reduction of the expression of *CaFer1*. This decrease was about 29,0 and 6,3 times in cells treated with 300 and 1.200  $\mu\text{mol/L}$  of ferrous sulphate, respectively, and 98,02 times in the treatment with 5 mmol/L of aluminium-potassium sulphate, as compared with the control. For both varieties, these same treatments did not result in significant differential expression of the other ferritin gene analyzed, *CaFer2*. Western Blots data were in agreement with this observation. Therefore, ferritin expression in suspension cells of *Coffea* plants responds to Fe, as shown for other plants, however, on account of the no accumulation of ferritin in both cultivars treated with 5 mmol/L of aluminium-potassium sulphate, possibly this protein is not involved with Al complexation in *C. arabica* plants or the level of Al used was sufficiently high to provoke damages in the nucleic acids or to impair the normal transcription of the genes. An *in silico* analysis carried out with *CaFer1* and *CaFer2* from *C. arabica* and with ferritin genes of the *Coffea canephora* and *Coffea racemosa* revealed high similarity between *CaFer1* and *C. canephora* ferritin, and *CaFer2* with *C. racemosa* ferritin. Finally, assays of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), and guaiacol peroxidase (GPOX) revealed that cell cultures of the Mundo Novo variety are more responsive to the treatments with the metals, except for GST, which was the only enzyme with higher activity in cells from the Icatu cultivar. Furthermore, it was observed that enzymatic response was dose dependent and that Mundo Novo and Icatu used distinct mechanisms to protect cells against reactive oxygen species.



## 1. INTRODUÇÃO

A deficiência de ferro em humanos, resultante de uma dieta inadequada, é um sério problema nutricional em vários países, e a anemia derivada da falta desse nutriente pode causar graves problemas de saúde como o aborto, danos no cérebro de crianças, aumento na susceptibilidade a infecções e a exaustão crônica.

A ferritina é uma proteína encontrada em animais, plantas, bactérias e fungos, e pode ser considerada o principal reservatório de ferro em organismos vivos, uma vez que é capaz de armazenar cerca de 4.500 átomos de ferro por molécula, em uma forma não tóxica. A síntese e o acúmulo da ferritina são estimulados pelo ferro, sendo que, em condições não indutoras a detecção dessa proteína nos tecidos vegetais é bastante baixa.

Em plantas, umas das funções fisiológicas da ferritina é a estocagem de ferro em sua cavidade central, proporcionando proteção às células contra os efeitos tóxicos desse metal em excesso, além de propiciar a sua liberação quando requerido na fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, síntese de DNA e de hormônios vegetais.

A ferritina com sua capacidade de armazenar ferro tem um papel fundamental na proteção contra o estresse oxidativo, o qual é caracterizado pelo desbalanço entre a produção de espécies ativas de oxigênio (EAOs) e a defesa antioxidante. Em condições de estresse, durante a redução do oxigênio à água, pode ocorrer a transferência de um, dois ou três elétrons para o oxigênio, levando à formação respectivamente de radicais superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxilas ( $OH^{\bullet}$ ). O último pode ser gerado a partir da interação entre o radical  $O_2^{\bullet-}$  e o  $H_2O_2$  na presença de íons metálicos. Dessa forma, o ferro, por ser um metal de transição, pode por meio da reação de Fenton participar na geração de radicais  $OH^{\bullet}$ . Uma vez gerados, esses radicais podem causar peroxidação de lipídeos e oxidação de proteínas e DNA, resultando em danos celulares irreversíveis e posterior morte celular.

Para atenuar os danos causados pelos radicais livres e EAOs, as plantas desenvolveram uma série de mecanismos de defesa, os quais incluem a síntese de compostos antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos.

O alumínio também é um metal que pode induzir estresse oxidativo em plantas, embora não seja um metal de transição e não catalise reações de oxi-redução. Apesar de não documentado para plantas, sabe-se que a ferritina de animais é capaz de se complexar ao alumínio presente em alguns tecidos, principalmente tecido nervoso e ósseo, evitando sua toxicidade.

Comparativamente a outras plantas, o cafeeiro consegue crescer adequadamente em concentrações relativamente altas de alumínio no solo. Dada essa característica e o fato de ter sido verificada no banco de ESTs do programa Genoma Café grande expressão de ferritina em uma mesma biblioteca constituída por células em suspensão e raízes de plantas tratadas com alumínio, e que a ferritina se complexa a esse metal em animais, é plausível a hipótese de que a relativa tolerância do cafeeiro ao alumínio seja em parte devido à sua complexação com ferritina ou, no mínimo, uma resposta antioxidativa das células ao alumínio.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Importância do ferro**

A deficiência de ferro em humanos, resultante de uma dieta inadequada, é um sério problema nutricional. A anemia derivada da falta desse mineral pode levar ao aborto, causar danos no cérebro de crianças, aumento na susceptibilidade a infecções e a exaustão crônica (Baynes & Bothwell, 1990).

Estima-se que 30% da população mundial sofra pela carência de ferro, principalmente nos países em desenvolvimento e em locais onde a base da dieta é primariamente vegetal (Goto *et al.*, 1999, 2001). Apesar dos vegetais possuírem os minerais e nutrientes orgânicos essenciais para a nutrição humana, não só sua quantidade como também a forma que se apresenta nas células, afetando portanto sua disponibilidade para ser absorvido, pode fazer com que ele não seja suprido adequadamente (Vasconcelos *et al.*, 2003). Suplementos nutricionais poderiam ser adicionados à dieta ou tomados em forma de cápsulas para prevenir ou controlar a deficiência de ferro, mas esses tratamentos são de difícil implementação devido ao alto custo e ao baixo número de programas de cuidados primários de saúde (Goto *et al.*, 1999, 2001).

Atualmente, para aliviar o severo problema mundial da falta de ferro, um programa internacional de biofortificação foi organizado pela iniciativa global HarvestPlus (<http://www.harvestplus.org>), para desenvolver através de cruzamentos e melhoramento genético variedades de arroz enriquecidas com ferro (Cheng *et al.*, 2007).

Em plantas, a deficiência de ferro induz mudanças morfológicas, como clorose internervuras, que ocorre principalmente nas folhas mais jovens, uma vez que o ferro não é mobilizado das folhas mais velhas e, caso a deficiência seja prolongada, as nervuras também podem se tornar cloróticas e as folhas esbranquiçadas. Esses sintomas de deficiência são

devidos à necessidade desse íon para a síntese de clorofila no cloroplasto (Taiz & Zeiger, 2004).

O mecanismo de absorção de ferro pelas raízes das plantas depende do estado redox desse elemento no solo (Briat *et al.*, 1995). Em solos aeróbicos o ferro está presente principalmente na forma de óxido férrico ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), o qual possui baixa solubilidade e não pode ser prontamente absorvido pelas plantas (Cheng *et al.*, 2007). Para solubilizar e absorver eficientemente o ferro, as plantas superiores desenvolveram duas estratégias. A primeira delas, utilizada por todas as plantas, exceto gramíneas, envolve a proteína de membrana  $\text{Fe}^{3+}$ -quelato redutase, que reduz a forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ), para a forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) que é mais solúvel. Os íons  $\text{Fe}^{2+}$  são então absorvidos por transportadores de membrana (Cheng *et al.*, 2007). A segunda estratégia, utilizada pelas gramíneas, é caracterizada pela exsudação radicular de substâncias quelantes de  $\text{Fe}^{3+}$ , chamadas de fitosideróforos, e a posterior absorção do ferro ligado a essas substâncias por meio de transportadores específicos (Briat *et al.*, 1995; Connolly & Guerinot, 2002; Cheng *et al.*, 2007). Essa estratégia é considerada mais eficiente que a primeira, pois é menos dependente do pH (Guerinot & Yi, 1994).

Em condições redutoras, como em solos encharcados, a presença do íon  $\text{Fe}^{2+}$  é predominante. Nessas condições, o  $\text{Fe}^{2+}$  é prontamente absorvido pelas raízes, via transportadores específicos localizados na membrana plasmática ainda não identificados (Briat *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2007).

Nas plantas, a nutrição mineral é um dos principais fatores para o adequado crescimento e desenvolvimento vegetal (Briat *et al.*, 1995). Entre os elementos minerais essenciais, o ferro tem um importante papel devido ao seu envolvimento em processos fundamentais como a síntese de clorofila, a fotossíntese (o ferro está presente no centro ativo de muitos carregadores de elétrons no fotossistema I e II), respiração, fixação de nitrogênio e

síntese de DNA (Laulhere *et al.*, 1988; Briat *et al.*, 1995). Além disso, o ferro age como co-fator de enzimas chaves envolvidas, por exemplo, na síntese de hormônios vegetais (Briat *et al.*, 1995). A importância do ferro nos vários mecanismos biológicos anteriormente citados pode ser explicada pelo fato desse elemento, em pH fisiológico e fase aquosa, poder existir em dois estados redox ( $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ), permitindo sua participação em numerosas reações que envolvem a transferência de elétrons (Briat *et al.*, 1995).

Embora o ferro seja um elemento muito abundante na terra, a baixa solubilidade do íon  $\text{Fe}^{3+}$  ( $10^{-18}$  mol/L) e a reação do íon  $\text{Fe}^{2+}$  com oxigênio molecular, que pode gerar espécies ativas de oxigênio (EAOs), resultaram em diferentes estratégias para transportar e concentrar o ferro de forma segura, sendo a ferritina um dos mecanismos conhecidos que concentram o ferro no nível requerido pelas células, na forma solúvel e, portanto, biologicamente utilizável (Wei & Theil, 2000).

## **2.2. A ferritina**

A ferritina é uma proteína altamente conservada, encontrada em animais, plantas, fungos e bactérias, capaz de armazenar cerca de 4.500 átomos de ferro por molécula, em uma forma não tóxica. Trata-se de uma proteína multimérica, de aproximadamente 450kDa, composta por 24 subunidades (Sczekan & Joshi, 1987; Goto *et al.*, 1999, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2003), excetuando-se a ferritina de *Listeria innocua*, que é constituída por apenas 12 subunidades (Strozycki *et al.*, 2003).

Nas plantas essa proteína se encontra principalmente acumulada nos plastídeos, sendo codificada por gene nuclear, contendo um peptídeo trânsito N-terminal que dirige a proteína até os plastídeos (Seckbach, 1968; Briat *et al.*, 1999; Wei & Theil, 2000). Também foi detectada ferritina em mitocôndrias de células em suspensão de *Arabidopsis thaliana* e de



ervilhas (Zancani *et al.*, 2004). Estudos revelaram que o acúmulo da ferritina ocorre predominantemente em plastídeos não verdes, como os etioplastos e amiloplastos (Briat *et al.*, 1999). Nos cloroplastos, onde o processo fotossintético é ativo, é detectada baixa concentração dessa proteína (Briat *et al.*, 1999).

Em condições de não deficiência de ferro a síntese da ferritina é regulada pelo desenvolvimento vegetal e sua presença é praticamente não detectável nos plastídeos de órgãos vegetais, como folhas e raízes. Entretanto, durante a fecundação foi observada a ativação da absorção de ferro pelas raízes, levando ao acúmulo de ferritina nas flores e sementes em desenvolvimento (Briat *et al.*, 1995). Já quando há excesso de ferro no meio, a síntese e o acúmulo da ferritina são estimulados, resultando em aumento na indução da transcrição do RNAm dessa proteína, correspondendo ao acúmulo da mesma (Lescure *et al.*, 1991; Theil, 2004).

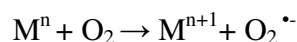
O RNAm que codifica para a ferritina foi detectado em folhas de plântulas de milho após três horas do suprimento com ferro, sendo que o acúmulo máximo é alcançado nas folhas e raízes após 6 e 24 horas do tratamento, respectivamente, decrescendo gradualmente com o tempo (Briat *et al.*, 1999). A diminuição do RNAm da ferritina precede ao acúmulo de suas subunidades protéicas, que atinge um máximo após 24 horas do início do tratamento (Briat *et al.*, 1999).

Uma das funções fisiológicas da ferritina nas plantas é o armazenamento de ferro na cavidade central da molécula e sua liberação quando requerido, por exemplo, durante a síntese de clorofila, nos processos de fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, síntese de DNA e hormônios (Laulhere *et al.*, 1988; Briat *et al.*, 1995). Além das funções fisiológicas descritas anteriormente, a ferritina também proporciona proteção às células contra os efeitos tóxicos do

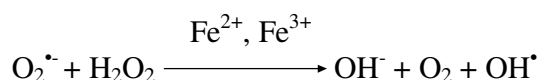
excesso de ferro (Goto *et al.*, 2001). Estudo recente também demonstrou o importante papel da ferritina contra o estresse oxidativo em *Arabidopsis* (Ravet *et al.*, 2009).

### 2.3. Estresse oxidativo

Metais de transição (M), como ferro e cobre, são bons catalisadores para a redução do oxigênio, por possuírem dois estados redox, resultando na geração de radicais superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ), através da seguinte reação (Briat & Lebrun, 1999):



Em fase aquosa e pH neutro, os radicais  $O_2^{\bullet-}$  podem reagir com o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual é decomposto para produzir radicais hidroxilas ( $OH^{\bullet}$ ), o radical mais reativo entre as EAOs, por meio da reação de Haber-Weiss (Briat & Lebrun, 1999):



Quando o metal de transição utilizado na reação de Haber-Weiss é o ferro, a reação denomina-se reação de Fenton ( $Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet-}$ ) (Briat & Lebrun, 1999).

Os radicais  $OH^{\bullet}$  gerados por meio dessas reações podem causar peroxidação de lipídeos e oxidação de proteínas e DNA, resultando em danos celulares e possível morte celular (Briat & Lebrun, 1999; Strozycki *et al.*, 2003). Entretanto, a geração controlada de EAOs pode colaborar na defesa da planta, por exemplo, contra patógenos, além de ter importante papel na sinalização da transcrição e expressão gênica (Strozycki *et al.*, 2003; Gratão *et al.*, 2005).

Assim, a ferritina com sua capacidade de estocar o ferro em uma forma segura (não livre) tem um papel fundamental na proteção contra o estresse oxidativo nas plantas (Briat *et*

*al.*, 1995, 1999), ainda que o vacúolo também participe do processo de detoxificação do ferro (Lescure *et al.*, 1991) por possuir condições ótimas para a deposição desse metal, como baixo pH e alta concentração de ácidos orgânicos (Briat *et al.*, 1999).

Para aliviar os danos causados pelos radicais livres e EAOs as plantas desenvolveram um série de mecanismos de defesa, entre os quais se incluem a síntese de compostos antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos. Entre os compostos não enzimáticos estão, por exemplo, a glutathione reduzida (GSH), o ácido ascórbico, aminoácidos como a cisteína, hidroquinonas,  $\beta$ -carotenóides, flavonóides e alguns alcalóides. Já a defesa antioxidante enzimática envolve enzimas capazes de remover, neutralizar ou vasculhar radicais livres e EAOs. Exemplos de enzimas antioxidantes incluem a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST), glutathione redutase (GR) e peroxidases (Scandalios, 2005; Gratão *et al.*, 2005).

### **2.3.1. Sistema oxidante de resposta**

No estado molecular o oxigênio ( $O_2$ ) é relativamente não reativo. Entretanto, durante atividades metabólicas e como consequência de perturbações ambientais (por exemplo, temperaturas extremas, radiação, xenobióticos, toxinas, estresses bióticos e abióticos e doenças) o  $O_2$  é capaz de originar estados altamente reativos, como os radicais livres e derivados (Scandalios, 2005).

A completa redução do  $O_2$  à  $H_2O$  requer quatro elétrons. Entre as espécies ativas de oxigênio (EAOs), originadas a partir de sua redução, estão os radicais superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais hidroxilas ( $OH^{\bullet}$ ) e oxigênio *singlet* (Scandalios, 2005). O nível de estresse oxidativo celular é determinado pela quantidade de EAOs formadas (Gratão *et al.*, 2005). O principal mecanismo para o controle de EAOs inclui enzimas como a

superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), peroxidases e glutathione redutase (GR). O equilíbrio entre SOD, CAT e peroxidases é essencial para determinar os níveis de equilíbrio de  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  (Gratão *et al.*, 2005).

#### **2.3.1.1. Catalase (CAT)**

A catalase (CAT; EC 1.11.1.6.) tem papel fundamental na remoção do peróxido de hidrogênio. Trata-se de uma proteína tetramérica Fe-porfirina, que catalisa a conversão de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$  (Frugoli, *et al.*, 1996). A catalase é muito abundante nos peroxissomos, organela presente em praticamente todos os organismos eucariotos. Portanto, não se conhece nenhum organismo multicelular que não possua alguma atividade de catalase (Subramani, 1993). A função da catalase nos peroxissomos é metabolizar  $H_2O_2$  liberado devido à conversão do glicolato a glioxalato durante a fotorrespiração (Igamberdiev & Lea, 2002) e decompor o  $H_2O_2$  formado durante a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos nos glioxissomos de tecidos de estocagem de lipídeos (Holtman *et al.*, 1994).

As plantas possuem uma grande variedade de peroxissomos, que são especializados em certas funções metabólicas (del Río *et al.*, 2002). Nas plantas, há proliferação de peroxissomos quando as células são submetidas a condições de estresse biótico ou abiótico (Lopez-Huerta *et al.*, 2000; Igamberdiev & Lea, 2002).

#### **2.3.1.2. Superóxido Dismutase (SOD)**

As superóxido dismutases (SOD; EC 1.15.1.1) são enzimas que fazem parte de uma família de metaloenzimas multiméricas, que são classificadas em função do metal que têm como cofator e da localização celular (Keith & Valvano, 2007). Elas degradam os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), via reação de dismutação, gerando  $H_2O_2$  e  $O_2$ , tendo assim importante papel

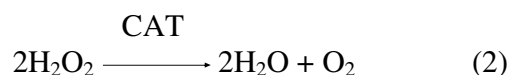
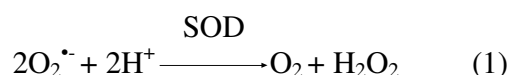
contra os efeitos tóxicos dos radicais  $O_2^{\bullet-}$  produzidos nos diferentes compartimentos celulares (del Río *et al.*, 2002). Trata-se da primeira linha de defesa contra EAOs (Alscher *et al.*, 2002).

Três tipos distintos de isoformas de SOD têm sido detectados em plantas e são classificados da seguinte maneira:

- Manganês SOD (Mn SOD): presentes na matriz mitocondrial e peroxissomos, sendo também relatadas nos cloroplastos de algumas plantas (Vitória *et al.*, 2001; Alscher *et al.*, 2002) e em procariontes (Scandalios, 2005);
- Ferro SOD (Fe SOD): geralmente encontradas em procariontes e nos cloroplastos de um número limitado de espécies vegetais (Scandalios, 2005; Alscher *et al.*, 2002);
- Cobre/zinco SOD (Cu/Zn SOD): localizam-se no citosol de células eucarióticas, cloroplastos, peroxissomos e possivelmente no espaço extracelular (Scandalios, 2005; Vitória *et al.*, 2001; Alscher *et al.*, 2002).

A combinação das enzimas CATs e SODs forma um sistema antioxidante muito eficiente contra os efeitos deletérios de radicais hidroxilas (Scandalios, 2005).

Reações gerais da SOD (1) e CAT (2) (Scandalios, 2005):



### 2.3.1.3. Glutathiona-S-transferase (GST)

A glutathiona-S-transferase (GST; EC 2.5.1.18) é uma proteína com massa molecular de aproximadamente 50 kDa, que catalisa a conjugação da glutathiona ( $\gamma$ -glutamil-cistetil-glicina;

GSH) a uma variedade de substratos hidrofóbicos, eletrofílicos e usualmente citotóxicos, fazendo parte de um complexo sistema de desintoxicação de xenobióticos e radicais de oxigênio em plantas e animais (Marrs, 1996; Dixon *et al.*, 2002a).

A GSH é o componente tiol não protéico mais abundante em muitos organismos (Masip *et al.*, 2006) e nas plantas sua concentração excede 1 mmol/L no citoplasma, tendo importante papel em processos de desintoxicação (Edwards *et al.*, 2000). Após a conjugação da GSH com o substrato tóxico, o que usualmente resulta em um conjugado mais solúvel em água e menos tóxico, ambos são transportados do citoplasma para o vacúolo ou apoplasto, por transportadores específicos, para passarem por processo de desintoxicação (Marrs, 1996; Dixon *et al.*, 2002a).

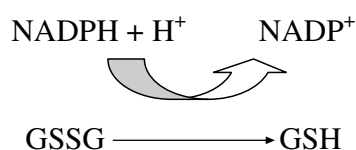
Além de participarem de processos de desintoxicação por formação de conjugados com GSH, as GSTs possuem papel no metabolismo de produtos secundários, incluindo a estabilização de flavonóides para posterior transporte para o vacúolo, atuação como peroxidase na redução de hidroperóxidos a monohidro-álcool durante estresse oxidativo, e no catabolismo da tirosina (Dixon *et al.*, 2002a).

As GSTs são divididas em quatro classes distintas, chamadas Phi, Tau, Zeta e Theta, sendo as duas primeiras específicas de plantas e ambas relacionadas à desintoxicação de herbicidas. Além disso, essas duas GSTs funcionam como proteínas sinalizadoras de estresse, peroxidases durante estresse oxidativo, estabilizadoras de flavonóides e regulam a apoptose (Dixon *et al.*, 2002b).

As classes Zeta e Theta também são encontradas em animais e fungos, indicando a conservação da função essencial dessa enzima em todos os eucariotos. A classe Zeta está envolvida no catabolismo da tirosina, enquanto que a classe Theta age como uma potente peroxidase na desintoxicação de hidroperóxidos formados durante o estresse oxidativo (Dixon *et al.*, 2002b).

#### 2.3.1.4. Glutathione Redutase (GR)

A glutathione redutase (GR; EC 1.6.4.2) é uma flavoproteína amplamente distribuída entre procariotos e eucariotos, desde bactérias heterotróficas e fotossintetizantes até plantas e animais superiores, sendo de ocorrência quase universal (Creissen *et al.*, 1994). A GR regenera a glutathione reduzida (GSH) a partir da glutathione oxidada (GSSG), por meio da redução do NADPH (Gomes-Junior *et al.*, 2006b), conforme a reação seguinte:



A GSH é um importante metabólito no combate às EAOs, especificamente contra os efeitos de  $2\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Scrutton *et al.*, 1987; Masip *et al.*, 2006). Trata-se do componente tiol mais abundante em plantas, essencial para as células contra uma variedade de estresse oxidativo, sendo necessária sua presença na forma reduzida para que desenvolva seu papel como antioxidante em reações enzimáticas e não enzimáticas (Stevens *et al.*, 2000). Além disso, a GSH tem papel importante na síntese de fitoquelatinas (PCs), que são peptídeos ricos em cisteína, com estrutura geral  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$ , onde  $n=2$  a 11 (Zenk, 1996). As PCs são os principais componentes desintoxicantes de metais pesados nas plantas (Grill *et al.*, 1989).

A GR é essencial para manutenção da glutathione na forma reduzida, sendo a enzima chave para manter um ambiente redutor no interior da célula (Stevens *et al.*, 1997, 2000).

Isoformas da GR têm sido encontradas em diversos compartimentos celulares. Em ervilhas foram encontradas isoformas no cloroplasto, mitocôndria e citosol (Stevens *et al.*, 2000).

#### **2.3.1.5. Guaiacol Peroxidase (GPOX)**

A guaiacol peroxidase (GPOX; EC 1.11.1.7) é uma enzima envolvida nos processos de lignificação, suberização, senescência, catabolismo da auxina, defesa contra patógeno, tolerância ao estresse osmótico e a metais pesados (Hiraga *et al.*, 2001; Gomes-Júnior *et al.*, 2006b). A GPOX é uma peroxidase, portanto catalisa a conversão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (Hiraga *et al.*, 2001). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido durante o estresse oxidativo pode ser eliminado tanto pela catalase presente nos peroxissomos, como pela guaiacol peroxidase presente no citosol, vacúolo, parede celular e espaço extracelular (Sharma & Dubey 2007).

A GPOX geralmente reage com compostos contendo grupos hidroxila ligados a anéis aromáticos, como por exemplo, o guaiacol e o pirogallol (Hiraga *et al.*, 2001).

#### **2.4. Toxicidade ao alumínio**

O alumínio é o primeiro metal mais abundante da crosta terrestre (Kochian *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2002). Quando solúvel, o que ocorre em solos ácidos, esse metal pode inibir o crescimento de plantas, sendo sua toxicidade considerada um dos fatores limitantes mais sérios do crescimento vegetal (Nagasaka *et al.*, 2002). Isso ocorre porque o alumínio fica acumulado predominantemente nas células localizadas dentro da zona de crescimento apical da raiz, inibindo rapidamente o alongamento celular. Entretanto, os mecanismos primários dessa inibição não se encontram totalmente elucidados (Yamamoto *et al.*, 2002).

No mundo, mais de 40% das terras agricultáveis possuem pH baixo, fator que limita o crescimento de diversas culturas nesses solos (Liao *et al.*, 2006; Jones & Kochian, 1995; Kochian, 1995) e essa condição atinge aproximadamente dois terços dos solos no Brasil (Vitorello *et al.*, 2005). Em solução do solo com pH maior que 5,5, a concentração de alumínio é menor que 37  $\mu\text{mol/L}$ , mas com a diminuição desse pH o alumínio é liberado dos



minerais do solo, aumentando sua concentração principalmente nas formas catiônicas  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$  e  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$  (Ramírez-Benítez *et al.*, 2008).

A exposição de plantas ao alumínio inibe o crescimento da raiz rapidamente (em uma hora aproximadamente) e isso ocorre devido ao bloqueio do alongamento celular. Entretanto, após períodos maiores que 24 horas de exposição ao metal, além da inibição do alongamento da célula, as divisões celulares são bloqueadas (Jones & Kochian, 1995).

Muitas espécies de plantas que crescem em solos ácidos desenvolveram adaptações metabólicas para resistir a altas concentrações de alumínio na solução do solo (Kochian, 1995; Ramírez-Benítez *et al.*, 2008). Estudos comparativos sobre a tolerância ao alumínio em 22 espécies de sete famílias diferentes estabeleceram que as plantas podem tolerar os efeitos tóxicos desse metal, por meio de “evitação” (*avoidance*) externa ou tolerância interna (Miyasaka *et al.*, 2001). Uma evidência do mecanismo de “evitação” externa é a quelação do alumínio por ácidos orgânicos, como o citrato, malato e/ou oxalato (Kochian *et al.*, 2002; Ramírez-Benítez *et al.*, 2008). Esses ácidos orgânicos são exsudados pelas raízes em resposta às altas concentrações do metal (Miyasaka *et al.*, 2001). Os mecanismos de tolerância interna são caracterizados pela entrada do alumínio via simplasto e a tolerância é obtida por meio da imobilização, compartimentalização ou desintoxicação, podendo incluir quelação no citosol por ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas, peptídeos de baixo peso molecular (fitoquelatinas ou metalotioneínas) ou outros ligantes e a sua posterior compartimentalização no vacúolo (Kochian, 1995; Kochian *et al.*, 2004).

Os íons alumínio possuem alta afinidade por doadores de oxigênio, como os grupos fosfato e carboxilato, e podem levar ao enrijecimento das membranas, processo que facilita e aumenta a reação de peroxidação de lipídeos catalisada pelo ferro (Devi *et al.*, 2003;

Yamamoto *et al.*, 2002). Essa peroxidação pode resultar na perda da integridade da membrana plasmática e, eventualmente, na morte celular (Yamamoto *et al.*, 2002).

O envolvimento da toxicidade do alumínio com estresse oxidativo tem sido sugerido, embora não seja um metal de transição e não possa catalisar reações de oxiredução (Yamamoto *et al.*, 2002; Devi *et al.*, 2003). Recentemente foi demonstrado que a presença do alumínio, sem o suprimento de ferro, aumenta a produção de EAOs, principalmente radicais  $O_2^{\bullet-}$ , em células de tabaco e ervilha (Devi *et al.*, 2003). Outra evidência do envolvimento do alumínio com a geração de estresse oxidativo foi obtida por estudos que mostraram que a presença desse metal aumenta a expressão de muitos genes codificando para enzimas antioxidantes, como a glutathione-S-transferase, peroxidases e superóxido dismutase (Richards *et al.*, 1998, Yamamoto *et al.*, 2002; Sharma & Dubey, 2007), além de afetar os níveis de compostos antioxidantes como o ascorbato e a glutathione (Potters *et al.*, 2002).

Apesar de não documentado para plantas, sabe-se que a ferritina de animais é capaz de acomodar outros metais além do ferro, entre eles estão o cobre, zinco, cádmio, chumbo, berílio e alumínio. Resultados contraditórios demonstraram que o número de átomos de alumínio complexado à ferritina pode variar de 10 a 160, por molécula (Briat & Lebrun, 1999).

Para humanos, o alumínio é uma potente neurotoxina e está relacionado a várias desordens cognitivas, como a doença de Alzheimer e demências, devido ao acúmulo desse metal em células neuronais (Fleming & Joshi, 1988; Miyasaka *et al.*, 2001). Estima-se que em média há a ingestão diária de aproximadamente 30 mg de alumínio por indivíduo, através de alimentos contaminados. Dessa quantia, 10 a 20  $\mu$ g são absorvidas, podendo acumular nos ossos e cérebro (Fleming & Joshi, 1988). Novamente, é importante o papel da ferritina que é capaz de formar complexos com o alumínio presente nesses órgãos, evitando sua toxicidade (Fleming & Joshi, 1988; Youson *et al.*, 1989; Sakamoto *et al.*, 2004).

## 2.5. Aspectos gerais de *Coffea arabica*

O café é a segunda maior *commodity* no mundo depois do petróleo, sendo o principal produto agrícola em muitos países (Gomes-Júnior *et al.*, 2006b). Cerca de 25 milhões de pessoas no mundo trabalham na produção ou processamento do café (Lin *et al.*, 2005). É estimado que somente no Brasil, cerca de seis milhões de pessoas estejam envolvidas com o negócio do café, desde sua produção no campo até o comércio do produto final (Gomes-Júnior *et al.*, 2006b).

No gênero *Coffea*, que pertence à família Rubiaceae, estão reunidas as duas espécies de cafeeiros com maior importância econômica: *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, sendo ambas responsáveis por aproximadamente 70 e 30% da produção mundial, respectivamente (Lin *et al.*, 2005).

A cultivar Mundo Novo de *C. arabica* é um cruzamento natural entre as variedades botânicas Arabica (Typica) e Bourbon, e foi descoberta no município de Mundo Novo, hoje Urupês (Carvalho *et al.*, 1952). Possui porte alto, frutos vermelhos e de média maturação, trata-se de uma cultivar suscetível à ferrugem (*Hemileia vastatrix*). Além disso, apresenta ótima qualidade para bebida e é uma das cultivares mais plantadas no Brasil.

A cultivar Icatu de *C. arabica* é um híbrido interespecífico entre *C. arabica* e *C. canephora*, com repetidos retrocruzamentos para Arábica (Carvalho *et al.*, 1991). Também possui porte alto, frutos vermelhos ou amarelos, de maturação média a tardia e é uma cultivar moderadamente resistente à ferrugem. Produz café de excelente qualidade, comparável a outras cultivares comerciais *C. arabica*. Além disso, tem-se mostrado mais sensível à seca do que as cultivares tradicionalmente cultivadas.

Recentemente foi finalizado o Projeto Brasileiro do Genoma Café (PBGC) (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>) e o banco de dados reúne cerca de 153 mil etiquetas de

seqüências expressas (ESTs) obtidas a partir de 37 bibliotecas de diferentes tecidos, condições fisiológicas e ambientes, de três espécies de café (*C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*). Em uma busca preliminar neste banco usando a palavra ferritina foi encontrada uma série de seqüências que foram identificadas com alta homologia para seqüências codificando para essa proteína, as quais foram depositadas no banco do PBGC. Um estudo mais detalhado das seqüências mostrou que várias eram provenientes de uma biblioteca feita exclusivamente com células em suspensão ou raízes de plantas tratadas com alumínio. Em princípio, a presença de transcritos de ferritina nas bibliotecas de cDNA de células e raízes tratadas com alumínio poderia ser explicada pela indução destes transcritos como uma resposta antioxidativa a esse metal. Por outro lado, uma vez que estudos com animais mostram que a ferritina também pode complexar o alumínio (Fleming & Joshi, 1988; Youson *et al.*, 1989; Sakamoto *et al.*, 2004), podemos especular que o mesmo poderia ocorrer em cafeeiros.

A área agriculturável do Brasil está localizada principalmente em regiões que possuem solos ácidos. Esses solos contêm alumínio suficiente para restringir o crescimento da raiz de muitas espécies agrícolas com alto valor econômico (Pavan & Bingham, 1982). É interessante notar que comparativamente a outras plantas, o cafeeiro consegue crescer adequadamente em quantidades relativamente altas de alumínio no solo (Konrad, 2003). Dentro dos mecanismos de tolerância ao alumínio não é de nosso conhecimento que a complexação desse metal pela ferritina tenha sido descrita. Porém, dadas às características do cafeeiro tolerar relativamente bem o alumínio no solo e a expressão de ferritina ter sido grande em células em suspensão e raízes de plantas tratadas com esse metal, além do fato da ferritina complexar este metal em animais, especulamos que a boa tolerância da planta de café ao alumínio poderia ser em parte devido à complexação do alumínio com ferritina.

### **3. OBJETIVOS**

Verificar em células em suspensão de duas cultivares de *Coffea arabica* L., Mundo Novo e Icatu, se a exposição a níveis elevados de ferro e alumínio induz alterações na expressão de genes codificando para ferritina e/ou na resposta antioxidante das células.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Material biológico**

Foram utilizadas células em suspensão de duas cultivares de *Coffea arabica*, Mundo Novo e Icatu. A cultivar Mundo Novo usada foi a IAC 388-1 e a de Icatu foi a IAC 4045. Estes materiais vêm sendo cultivados na área experimental do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp.

### **4.2. Obtenção de calos e células em suspensão**

Folhas jovens de Mundo Novo e Icatu foram utilizadas para produzir calos e posteriormente culturas celulares. Inicialmente, as folhas jovens, recém expandidas, dos ponteiros dos cafeeiros foram pulverizadas com o fungicida sistêmico Benlate® (DuPont Heritage), metil-1-(butilcarbamoil)-2-bencimidazol-carbamato, na concentração de 1 g de fungicida para 1 L de água, e após 3 dias as folhas foram coletadas. As folhas foram lavadas cuidadosamente com água destilada e detergente, e então foram mantidas sob agitação constante, por 20 minutos, em 200 mL de água destilada acrescida de aproximadamente 4 g do fungicida Benlate®. Em seguida, as folhas foram lavadas novamente e, dentro do fluxo laminar, foram deixadas sob agitação constante em 200 mL de água estéril (por autoclave) contendo duas gotas do polisorbato 20 (Tween®20, Reagen) e 40 mL de hipoclorito de sódio (aproximadamente 6% de cloro ativo), por 20 minutos. Dentro no fluxo laminar as folhas foram lavadas várias vezes com água estéril para remoção do hipoclorito de sódio.

As folhas esterilizadas foram utilizadas como explante na obtenção de calos em meio sólido CIM (*callus induction medium*, Neuenschwander & Baumann, 1992), constituído de sais minerais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), contendo 3% de sacarose e 0,7% de ágar, pH 5,8, suplementado com timina-HCl (10 mg/L), inositol (100 mg/L), cinetina (4

mg/L), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (1 mg/L). Após 12 a 13 semanas no escuro, os calos apresentando cor amarelo-clara e com aspecto friável foram selecionados e transferidos para meio líquido (30 mL de meio CIM em erlenmeyer de 250 mL, a 25°C, a 100 rpm, no escuro). A cada semana, metade do volume do erlenmeyer era transferida para um novo frasco contendo 15 mL de meio novo e durante esse processo, grandes agregados eram eliminados para se obter células caracterizadas por pequenos agregados homogêneos.

### **4.3. Indução da biossíntese de ferritina**

Para induzir a síntese de ferritina, as células em suspensão crescidas em meio CIM foram tratadas com 300  $\mu\text{mol/L}$  e 1.200  $\mu\text{mol/L}$  de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), correspondendo a uma concentração de ferro de 60 e 240  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente. No meio CIM a concentração utilizada de ferro é de 20  $\mu\text{mol/L}$ . Segundo, Gaymard e colaboradores (1996) 500  $\mu\text{mol/L}$  de sulfato ferroso é suficiente pra induzir a síntese e o acúmulo da ferritina em *Arabidopsis thaliana*, assim, optamos por utilizar uma concentração maior e outra menor em relação a esse valor.

Para aplicar o tratamento, o meio CIM (~30 mL) foi totalmente retirado do erlenmeyer com uma pipeta esterilizada e, cerca de 50 mL de meio CIM acrescido com sulfato ferroso foram adicionados à cultura celular. As células permaneceram a 25°C, a 100 rpm, no escuro, e foram coletadas após 72 horas do início do tratamento. Com este tempo de tratamento as células ainda não tinham atingido a fase estacionária, que ocorria ao redor de uma semana da inoculação, quando praticamente todo o volume do frasco era ocupado pelas células.

As células em suspensão também foram tratadas com 5 mmol/L de solução de sulfato de alumínio-potássio ( $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), o que corresponde a concentração de 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio. Também foram coletadas amostras que não passaram por nenhum tratamento (controle), que tiveram apenas o meio de cultura trocado por meio novo.

Para a extração de proteínas e RNA, as células foram lavadas com NaCl (500 mmol/L) (L. G. Santoro – comunicação pessoal) para remoção de ferro e alumínio aderidos na parede celular. Isto foi feito coletando-se as células por filtração a vácuo com funil de Buchner, seguido de lavagem com NaCl e depois com água deionizada (MilliQ). As células foram então congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

#### **4.4. Estudo do banco de EST-Genoma Café**

Usando *ferritin* como palavra chave, foi feita a busca de seqüências no banco de EST do projeto Genoma Café (Vieira *et al.*, 2006). Um total de 91 seqüências EST (*reads*) foi recuperado, que se organizaram em 14 seqüências consenso (*contigs*). Deste total, 25 *reads* eram provenientes de uma biblioteca (RT8) feita a partir de raízes de plantas e de células em suspensão tratadas com alumínio. Um dos *contigs* formados tinha 8 *reads* provenientes da biblioteca RT8 em um total de 13. Esta seqüência consenso *CaFer1* foi então usada para os estudos moleculares.

Em outra análise foram realizadas buscas por BLAST de homólogos das quatro ferritinas caracterizadas em *Arabidopsis thaliana* (Petit *et al.*, 2001), nas bases de dados do banco de EST do projeto Genoma Café. Foram obtidos quatro possíveis genes relacionados aos caracterizados para *A. thaliana*, e optou-se por utilizar a seqüência *CaFer2*, que apresentou função semelhante ao gene *AtFer2* de *A. thaliana*, para análise de expressão por RT-PCR em tempo real. O gene *AtFer2* possui padrão de expressão significativamente divergente dos outros três genes, sendo altamente restrito ao pedúnculo floral e às flores (Petit *et al.*, 2001). Em *C. arabica* sua expressão é significativa nas sementes (P. Nóbile, comunicação pessoal). Esse *contig* foi escolhido por possuir o maior número de *reads* depois de *CaFer1*, apesar de não ter sido freqüente *reads* de bibliotecas de plantas ou células tratadas com alumínio.



#### 4.5. Extração de RNA e produção de primeira fita de cDNA

As células foram maceradas em almofariz com N<sub>2</sub> líquido, até se obter um pó fino. O RNA total foi extraído pelo método de TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação do RNA total foi feita em espectrofotômetro a 260 nm, considerando que 1 unidade de DO<sub>260</sub> equivale a 40 µg/mL de RNA. Também foi obtida a leitura em 280 nm para se estimar a pureza do RNA extraído pela razão A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, que deve estar próxima de 2,0. A qualidade do RNA também foi verificada após separação em gel de agarose 1%, com brometo de etídeo, e visualização sob luz UV. As amostras de RNA total foram tratadas usando o kit DNase-free (Ambion, Austin, TX) e submetidas a transcrição reversa usando o kit SuperScript III de síntese de cDNA primeira fita (Invitrogen).

#### 4.6. Reações de RT-PCR

As RT-PCRs foram feitas com *primers* desenhados a partir da sequência *CaFer1*, utilizando o programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>) que delimita praticamente o fragmento completo do gene da ferritina (1110 pb). As sequências do gene e dos *primers* estão representadas abaixo:

*CaFer1*

[illegible]

Senso            5' – AGTCTGAAAAGCCGCACACT – 3'

Antisenso      5' – GATCCCCTGCTTCAAGAATTT – 3'

Foi utilizada a seguinte programação do termociclador, com 35 ciclos:

- Desnaturação inicial: 94°C/3 min;

- Desnaturação: 94°C/45 s;

- Anelamento: 55°C/30 s;

- Extensão: 72°C/60 s.

Os produtos das reações das RT-PCRs foram visualizados em gel de agarose 1%, com brometo de etídeo sob luz UV.

#### **4.7. Clonagem**

Os fragmentos obtidos nas reações de RT-PCR foram purificados do gel de agarose com o kit de extração da GE Healthcare (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit) e inserido no vetor da Promega (pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems). O vetor (2 µL de DNA) com a sequência de interesse foi inserido em *Escherichia coli* DH10b por eletroporação (Electroporator 2510, Eppendorf) e as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido seletivo, contendo ampicilina, isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo (X-gal) (Sambrook *et al.*, 1989). Com algumas colônias brancas foram realizadas minipreps, para a recuperação dos plasmídios transformados. As sequências foram comparadas com a sequência *CaFer1* para confirmação, utilizando o software ClustalX versão 1.83.

#### **4.8. Análise da expressão de genes da ferritina**

Para observar o acúmulo dos transcritos do gene *CaFer1* foram realizados experimentos de RT-PCR semi-quantitativo (sqPCR) e RT-PCRs em tempo real (qPCR).



o programa GeneRunner. A eficiência dos *primers* foi testada utilizando o software LinReg PCR Analysis of Real-Time PCR data version 7,5 (Remakers *et al.*, 2003). O alinhamento das seqüências de *CaFer1* e *CaFer2* e a localização de seus respectivos *primers* estão representados na figura 1.

As reações da qPCR foram preparadas com o SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Cada amostra foi processada em triplicata, sendo considerada também uma reação controle, sem cDNA. As qPCRs foram analisadas em um ABI 7500 Real Time Cyclor (Applied Biosystems). A especificidade dos produtos amplificados foi avaliada pela análise da curva de dissociação gerada pelo equipamento. Um valor específico de Ct (*Cycle threshold*) foi criado, sendo que o Ct é definido como o número de ciclos no qual a taxa de amplificação do gene alvo é a mais exponencial para todas as amostras avaliadas. A quantidade relativa das moléculas alvos em relação ao calibrador (amostra controle – sem tratamento) foi calculada a partir do Método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001). Cinco genes constitutivos foram escolhidos e testados com base em um trabalho previamente realizado com café (Nóbile *et al.*, 2007), para a utilização como controles endógenos (Tabela 1), para isto foi utilizado o programa geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) (<http://allserv.ugent.be/~jvdesomp/genorm/index.html> - data do último acesso 13/03/2008), que avalia a estabilidade dos genes. Para as amostras de células em suspensão, o gene normalizador considerado mais estável foi o *rpl39*, que codifica a proteína ribossomal L39 (Lepelley *et al.*, 2007).

Para a análise por qPCR foram utilizadas triplicatas biológicas para cada tratamento.

<i>CaFer1</i>	1	CATCGATCCCCTGCTTCAAGAATTTCCTGCTTTTTCATAGTCCTAAAGCCATGCTTCTT
<i>CaFer2</i>	1	AAGATTTCCTCC-CCCTCAAAGATTTC--CCCACTCTAAACTC-CAGAGCCACGGTTGTT
<i>CaFer1</i>	61	CAAGCAGCTATTTCCTTCCAACTTATTCCTTCAACGGGCAGGGGCTACTGCTCATCC
<i>CaFer2</i>	57	TCTTC--GTTTTCCTTTTAAAGAAA---AGAGAGCAATGATGCTGAAGGCCGC-GC
<i>CaFer1</i>	121	TTGTTGTTGAGCAAC--AACTCAGCTACCACTGGCACTCTACTTCTAA--CTTCTTATC
<i>CaFer2</i>	110	CTGCTTTTGCCTTCTGAATCCTGCTAAAG--GGGAGAA---CTTGGTCCCTGTTTTC
<i>CaFer1</i>	177	TTCTTCTTCTGTTATCGGCGGACTCTGCAGGCGGCGCCCAACCAGTG--TCGTTTTCAGAG
<i>CaFer2</i>	165	GTTTCTACCCAAT----TTTCTCGCAAGGCTCTGTGTTGACAAAGAACTTCCCGGCGA
<i>CaFer1</i>	236	CTAATCGCCAGAAAGGAGGCTTCAGGACCTTTGCTTCAGATGAAAAGACCAGCACCTTCT
<i>CaFer2</i>	221	GGGATG---GAAATGGGGGCTTGCTTCTGTATGCT-AAGAAGGAA--ACCAACAATCAAC
<i>CaFer1</i>	296	CACTCAGGGAGTGGTTTTTCAGCCCTTTGAAGAGATTAGAATGA-CGAATTCTTGGTC
<i>CaFer2</i>	275	CTTTCACCGGTATCCTTTTTGAGCCCTTTGAAGAAAGTGAAGAAGAGCTTATGCTTGTGC
<i>CaFer1</i>	355	CCATTCTCCCCCAGTGTTCACCTTGCCCGTCAAGATTCTCCACAGTGTGAGGCGGGA
<i>CaFer2</i>	335	CTTCCGCCCTCA-AGCGTCCCTTGCTCGCCCAAGTTGTTTGATGATTGCGAAGCCGCT
<i>CaFer1</i>	415	ATCAATGAGCAGATCAATCGGAATCTGTGTCTCCTACGCGTATCAGCCATGTATGGA
<i>CaFer2</i>	394	ATCAACGAACAGATCAATCTGGAATATACTGTTTCGTACATATACCATGCCCTGTTTGGC
<i>CaFer1</i>	475	TACTTCGACAGGGACAATATTGCTCTTAAAGGCTAGCCAAATTCTCAAGGAGTCCAGT
<i>CaFer2</i>	454	CATTTTGATAGGGATAACCTTGCTCTCAAGGCTTTGCAAAATTTTCAAGGAATCCAGT
<i>CaFer1</i>	535	GAAGAAGAAAGAGAGCATGCGGAGAAGCTGATGAAATATCAGAACATACGAGGAGGGAGA
<i>CaFer2</i>	514	GAGGAGGAAAGGACCATGCTGAAAAATTGATGGAGTATCAGAACAACGAGCTGGGAGA
<i>CaFer1</i>	595	GTGACATTACTTCCTCTGAAGGAACCAAGTCAAGATTTCGATCACGTGGAGAAGGGCGAT
<i>CaFer2</i>	574	GTGAAGTTTCGAGTGCAATAACAAGCCAATAACCGAGTTTCGATCACCGAGAAAAGGAGAC
<i>CaFer1</i>	655	GCACTGTATGCTATGGAAGTAGCTTTGTGCTTGGAGAAATTGATAAATGCGAAGCTTCTC
<i>CaFer2</i>	634	GCACTGAATGCTATGGAGATTGCAATTGTGTTTCGAGAAGTTGTTGAATGAGAAGCTTCTC
<i>CaFer1</i>	715	GAAGTGCACAGCGTGGCTCATCGGAATAATGATCCTCAGATGCAAGACTTTATAGAGAGC
<i>CaFer2</i>	694	AAGTTACATGGTGTGCTCCCAAAAACAATGACGCGCAGTTGGCTGATTTTGTGAAAGT
<i>CaFer1</i>	775	GAATTCTGGGCGAGCAGGTTGAAGCTATCAAGAAATTTTCAGATTATGTCACTCAATTG
<i>CaFer2</i>	754	GAATTTTGTAGTTGAGCAGGTGAGGCAATAAAGAAGATCTCGGAGTATGTGCTCAGCTG
<i>CaFer1</i>	835	AGGATCGTCCGAAAAGGACACGGCGTGTGGCACTTTAATCAGAAGCTTCTGCAC---CAC
<i>CaFer2</i>	814	AGAAGAGTGGGCAAAGGACATGGTGTCTGGCACTTTGATCAAGCGCTCCTTCATGAGCAC
<i>CaFer1</i>	892	GAGGGGAGGGCGG-CGACGGCGTCTTTAGATTCAAAATGCTCCATAAATAATG---T
<i>CaFer2</i>	874	TAGGAAGCTGTGCTTGTAGTGGAGCATTTTGTTTTACATTGTTGGCTTTAGAGATTTTGGT
<i>CaFer1</i>	947	ATCA-CTACTTCTTTTATCCCTTGTAAATTCCAATCAATAAATGTAGCAGACTGGG
<i>CaFer2</i>	934	GGGATCTAGTTGCGGAAATTGCTTG--AGCTGTTGATAAAAAAGGTCATGATGAATGC-
<i>CaFer1</i>	1006	TTTGTAGTCTTTAGAA-GGTTTCTTTTTCCTTTCCTCATCTCA-GTAAA
<i>CaFer2</i>	991	CTTTAGTTTATAGCTTCGTAGTAGTTGAGCACCCTGAACTTAGACCTTCGTCTTTGAG
<i>CaFer1</i>	1064	CTCTCTGTAAATATCACTAGTAAATAG--CAGCAGTGTGCGG-CTTTTCAGACTCTGCTC
<i>CaFer2</i>	1051	CCTTTTGACAAATTAAGTAGTGATGTTTAAATCTGCGTTAGAAATGTCATACAT--ATA
<i>CaFer1</i>	1121	TACCTCCGCTGTTTGTGTTGTGATAGGCTGCTCAATAAAATACGCTTTTGTAGTTTAAAA
<i>CaFer2</i>	1109	TATAATAGTTTCTAGCTAGTG-TAGTTGCTCC---AACCATTATGTCGGTTTTCAGC
<i>CaFer1</i>	1181	AA
<i>CaFer2</i>	1164	TTGTAGTGCTTCAAA-----CA---CTTA-CC-----GCATAAATTGATTGGGCATC
<i>CaFer1</i>	1241	AAA
<i>CaFer2</i>	1208	TCG

**Figura 1.** Alinhamento dos genes *CaFer1* e *CaFer2* e representação de seus *primers* em azul e vermelho, respectivamente.

**Tabela 1.** *Primers* para PCR em Tempo Real desenhados para dois genes da família de ferritina (*CaFer1* e *CaFer2*) de *C. arabica*. Os *primers* rlp38 (proteína ribossomal L39 - café), actina (café), S19 (proteína ribossomal S19 - maçã), GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - maçã) e CYP (*cyclophylin* - tomate) foram os constitutivos testados. Todos os *primers* delimitam, em média, fragmentos de 60 pb.

<i>Primers</i>	Senso	Antisenso
<b>CaFer1</b>	CTGAAAAGCCGCACACTGC	TTGTTGGTATTTTCCTCATCTCAA
<b>CaFer2</b>	CATGCCCTGTTTGCCTATTT	GCAAGACCCTTGAGAGCAAC
<b>rlp39</b>	GAACAGGCCCATCCCTTATTG	CGGCGCTTGGCATTGTA
<b>Actina</b>	GGGAAATTGTCCGTGACATC	GGCTGTTTCAAGCTCTTGCT
<b>S19</b>	CCGAATGCCATTTTGTCTT	TCCAAACCCAGTTGACTTGC
<b>GAPDH</b>	AGGCTGTTGGGAAAGTTCTTC	ACTGTTGGAAGCTCGGAATGC
<b>CYP</b>	CGTATCACGGAGGGTATGGA	GAAGACCCAACCTGCTCAAC

#### 4.9. Análise de seqüências de ferritina e caracterização *in silico*

No projeto EST Genoma Café também foram feitas algumas bibliotecas com material proveniente de duas outras espécies de café, *C. racemosa* e *C. canephora*. Numa busca no banco dessas espécies verificamos a existência de seqüências que mostravam similaridade com os genes *CaFer1* e *CaFer2* da ferritina de *C. arabica*. Para realizar a análise filogenética dos genes da família da ferritina foi construído um dendrograma utilizando as seqüências traduzidas em aminoácidos dos dois genes de *C. arabica*, *CaFer1* e *CaFer2*, as seqüências homólogas encontradas no banco de dados das espécies *C. canephora* e *C. racemosa* e as seqüências homólogas de outras espécies de plantas encontradas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) por meio da ferramenta de busca por alinhamento local básico (*Basic Local Alingment Search Tool* - BLAST). Foram usadas as seqüências de ferritina de tabaco (*Nicotiana tabacum*), *Arabidopsis thaliana*, arroz (*Oryza sativa*) e tomate (*Solanum lycopersicum*). Tomate é um modelo genômico melhor para o café do que *Arabidopsis*, por compartilharem uma arquitetura cromossômica similar e pertencerem ao clado Asteride I, da família das dicotiledôneas (Lin *et al.*, 2005). Além disso, foram utilizadas duas seqüências que apresentaram melhor e-value no blastx, sendo de alfafa

(*Medicago sativa*) e pêra asiática ou japonesa (*Pyrus pyrifolia*). O dendrograma foi construído utilizando as ferramentas integradas do MEGA versão 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). O agrupamento filogenético das seqüências foi realizado usando o algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) com 10.000 réplicas. Como grupo externo foi utilizada a cadeia pesada da ferritina humana (*Homo sapiens*).

#### **4.10. Extração e purificação de proteínas**

As células das duas cultivares, Mundo Novo e Icatu, foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido e para cada 1,0 g de material foi utilizado cerca de 5-7 mL de tampão Hepes 100 mmol/L (pH 7,0) resfriado a 4°C, contendo 5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 2% ácido ascórbico, 2 mmol/L de EDTA e 10 mmol/L 2-mercaptoetanol. O extrato foi mantido em gelo por 30 minutos, com agitação ocasional, e depois centrifugado a 27.000 xg por 25 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e passado em coluna PD10 – Sephadex G25 (Amersham Biosciences), previamente equilibrada com o tampão Hepes 20 mmol/L (pH 7,0). As proteínas foram eluídas da coluna com o mesmo tampão.

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), com o reagente da Bio-Rad, utilizando a albumina de soro bovino como padrão.

#### **4.11. SDS-PAGE e Western Blot**

Para confecção dos géis desnaturantes de 12% de poliacrilamida (gel de separação), foi utilizado o protocolo de Sambrook *et al.* (1989). As proteínas foram diluídas em tampão de desnaturação (100 mmol/L Tris-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 2% 2-mercaptoetanol, 20% glicerol e 0,1% azul de bromofenol) 1:1 (v/v) e aquecidas a 95°C por 10 minutos, para ocorrer a quebra de ligações dissulfeto. As proteínas nas amostras foram preparadas na concentração de 20

µg/µL. Como padrão de massa molecular foi usado o marcador Precision Plus Protein™ Standarts, Kaleidoscope™ da Bio-Rad.

A eletroforese foi conduzida em uma cuba Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad), em voltagem constante de 120 V.

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C (GE Healthcare), previamente umedecida em tampão de transferência (39 mmol/L glicina, 48 mmol/L Tris base, 0,037% SDS e 20% de etanol), usando o aparelho eletroblot Multiphor II (GE Healthcare) a 3.500 V por 2 horas.

A membrana foi incubada em solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó desnatado em tampão PBS (137 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, 8,0 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,75 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) acrescido de 2% de Azida Sódica e 2% de polisorbato 20, por 2 h, em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário policlonal para a ferritina (diluído 1:100), por 16 h na câmara fria, sob agitação constante, sendo lavada ao final do período por três vezes com PBS (o anticorpo primário contra a proteína ferritina foi gentilmente cedido pela Dra. Janette Palma Fett (UFRGS – Brasil), sendo produzido a partir de ferritina de arroz, expressa em *Escherichia coli* e inoculada em coelho). Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de coelho (diluído 1:300) e conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) (Walker & Pollock, 1993). As bandas foram detectadas pela incubação da membrana com tampão de revelação acrescido de BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-fosfatase) e NBT (NitroBlue Tetrazólico) (Sigma-Aldrich).

Para as análises por Western Blot foi feito um mix das triplicatas biológicas de cada tratamento.



#### 4.12. Atividades de enzimas antioxidantes

As enzimas que tiveram a atividade analisada foram catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) e guaiacol peroxidase (GPOX). As análises foram realizadas por atividade em géis não desnaturantes e por espectrofotometria, dependendo da enzima e de acordo com sua descrição.

Para a confecção dos géis não desnaturantes foi utilizado o mesmo protocolo para todas as enzimas (Azevedo *et al.*, 1998). Os géis de atividade foram analisados por densitometria com o programa Kodak Digital Science – ID Image Analysis Software, versão 3.01.

A atividade de CAT foi determinada por espectrofotometria, como descrito por Kraus *et al.* (1995), com algumas modificações conforme Azevedo *et al.* (1998). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

A atividade de SOD foi medida em PAGE e também foi realizada a determinação das isoformas da enzima. Foi feita a separação das proteínas por eletroforese não desnaturante, utilizando como padrão duas unidades de SOD de fígado de boi (Sigma). A atividade de SOD foi determinada como descrito por Beuchamp e Fridovich (1971). Para a determinação das isoformas de SOD as proteínas foram separadas em eletroforese não desnaturante, conforme Azevedo *et al.* (1998). Foram utilizados 20  $\mu\text{g}$  de proteínas totais. As isoformas foram classificadas como Cu/Zn-SOD, quando a atividade foi inibida por KCN e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Fe-SOD quando houve inibição somente por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo resistente a KCN; Mn-SOD, se a isoforma era resistente aos dois tratamentos. Esta classificação foi baseada em Azevedo *et al.* (1998).

A atividade de GST foi determinada por espectrofotometria (Anderson *et al.*, 1995) e expressa como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, utilizando o coeficiente de extinção de 9,6  $\text{mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

A atividade de GR foi determinada por espectrofotometria, como sugerido por Lee & Lee (2000). Os valores de atividade foram expressos em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

A atividade de GPOX foi determinada por espectrofotometria como descrito por Matsuno & Uritani (1972). Os valores de atividade foram expressos em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

Para a análise das atividades enzimáticas foram utilizadas triplicatas biológicas para cada tratamento e triplicatas técnicas, exceto para SOD, para a qual foram feitas duplicatas técnicas de amostra composta, na qual se misturou as três triplicatas biológicas.

#### **4.12.1. Análise estatística**

Todos os dados obtidos foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% para comparação de médias utilizando-se o programa estatístico SISVAR versão 4.3 (DEX/UFLA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Confirmação da sequência de ferritina *CaFer1*

Através do sequenciamento foi possível comprovar que o fragmento obtido a partir da RT-PCR pertence à proteína ferritina, pois apresentou alto grau de similaridade com a sequência com a qual foram desenhados os *primers* (99% de identidade) e com sequências de ferritinas de outras plantas depositadas NCBI. A sequência de aminoácidos deduzida a partir do *open reading frame* é constituída por 289 resíduos, massa molecular de 32.153 kDa e ponto isoeletrico teórico igual à 5,72.

*CaFer1* sequenciado:

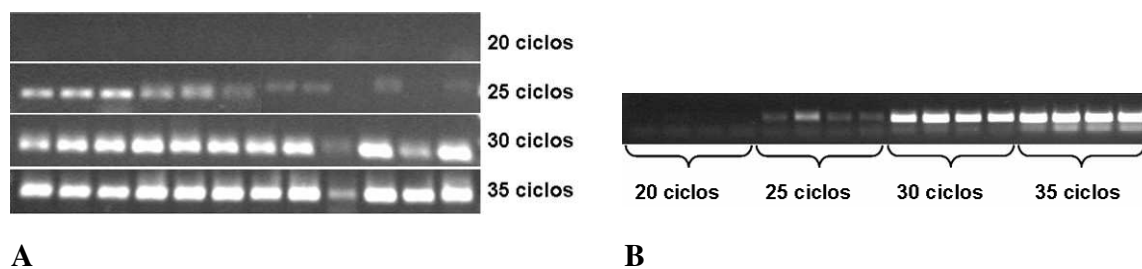
GATTGATCCCCTGCTTCAAGAATTTCTTGCTTTTTTCATAGTCCTAAAGCCATGCTTCTTCAAGCACCTATTTCTTCTCCAACCTTATTCCTTGCAACGGGCAGGGGCTACTGCTCATCCCTTGTGTGAGCAACAACCTCAGCTACCACTGGCACTGCTACTTCTAACTTCTTATCTTCTTCTTTCGTTATCGGCCGACTCTGCAGGCGGCCGCCCAACCAGTGTCGTTTTCAGACTAATCGCCGAAAGGAGGCTTCAGGACCTTTGCTTCAGATGAAAAGACCAGCACCTTGTCACTCACGGGAGTGGTTTTTCAGCCTTTTGAAGAGATTAAGAATGACGAATCTTGGTCCCATTGTCCCCAGTGTTTCACTTGCCTGCAGAGATTCTCCACGAGTGTGAGGCGGCAATCAATGAGCAGATCAATGCGGAATACTGTGTGTCCTACGCGTATCACGCCATGTATGCATACTTCGACAGGGACAATATTGCTCTTAAAGGCCTAGCCAAATTCTTCAAGGAGTCCA GTGAAGAAGAAAGAGAGCATCCGGAGAAGCTGATGAAATATCAGAACATACGAGGAGGGAGAGTGACATTACTTCC TCTGAAGGAACCCAAGTCAGAGTTCGATCACGTGGAGAAGGGCGATGCACTGTATGCTATGGAAGTAGCTTTGTGC TTGGAGAAATTGATAAATGCGAAGCTTCTCGAAGTGCACAGCGTGGCTGATCGGAATAATGATCCTCAGATGCAAG ACTTTATAGAGAGCGAATTCCTGGGGGAGCAGGTTGAAGCTATCAAGAAAATTCAGATTATGTCACTCAATTGAG GATGGTCGGAAAAGGACACGGCGTGTGGCACTTTAATCAGAAGCTTCTGCACCACGAGGGGGAGGGCGGCGACGGC GTCTTTTAGATTCAAATGTCTCCATAATAATGTATCACTACTTCTTTTTTATTCCCTTGTTAATTTCCAATTCAAT AAATGTAGCAGACTGGGTTTTAGTCTTTAGAAGGTTTTCTTTTTTTTTTGTGGTATTTTCTCATCTCAAGTAAAC TCTCTGTAAATATCACTAGTAAATAGCAGCAGTGTGCGGCTTTTCAGACT

Sequência deduzida de aminoácidos:

MLLQAPISSPTYSLQRAGATAHPLLLSNNSATTGTATSNFLSSSSLSADSAGGRPTSVVLQTNRRKGGFRTFASDE KTSTLSLTGVVFQPFEEIKNDEFLVPLSPSVSLARQRFSECEAAINEQINAIEYCVSYAYHAMAYFDRDNIALKG LAKFFKESSEEEEREHPEKLMKYQNIRGGRVTLLPLKEPKSEFDHVEKGDALYAMEVALCLEKLINAKLLEVHVSAD RNNDPQMQDFIESEFLGEQVEAIKKISDYVTQLRMVGKGVWHFNQKLLHHEGEGGDGVF

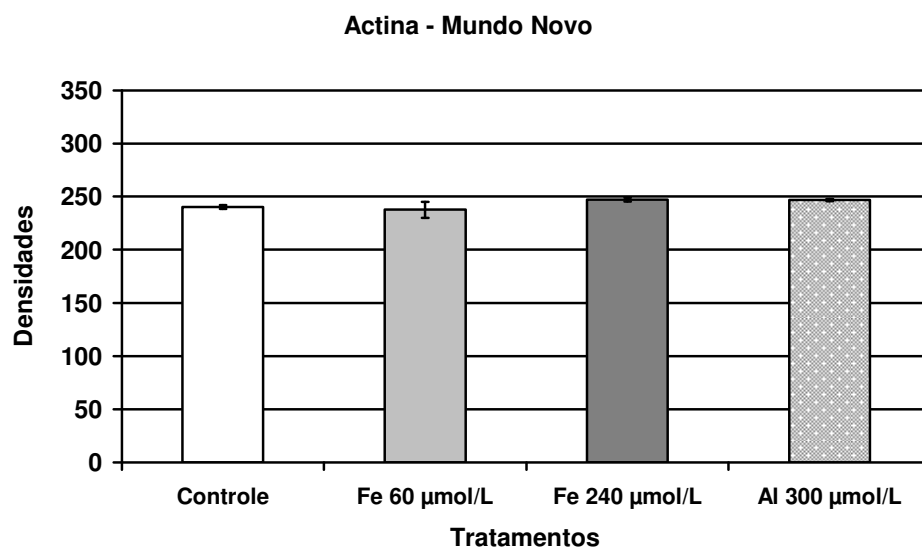
### 5.2. Análise da expressão de genes da ferritina *CaFer1* por sqPCR e qPCR

Os resultados das reações para a detecção da fase exponencial da sqPCR para as amostras de *C. arabica* cultivar Mundo Novo e *C. arabica* cultivar Icatu estão representados nas figuras 2A e 2B, respectivamente.

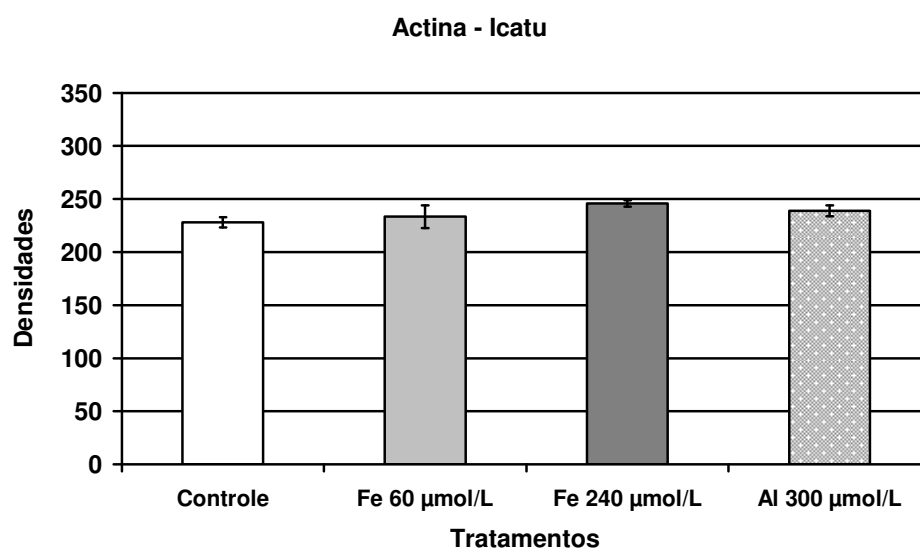


**Figura 2.** Detecção da fase exponencial (25 ciclos) da RT-PCR. **(A)** Cultivar Mundo Novo, para a qual foram utilizadas triplicatas biológicas, na detecção da fase exponencial. **(B)** Cultivar Icatu, para a qual foi utilizada apenas uma amostra de cada tratamento na detecção da fase exponencial.

Foram utilizados 25 ciclos para a normalização das quantidades de cDNA em cada amostra de Mundo Novo e Icatu, com os *primers* da actina (Figura 3A e 3B, respectivamente).



**A**



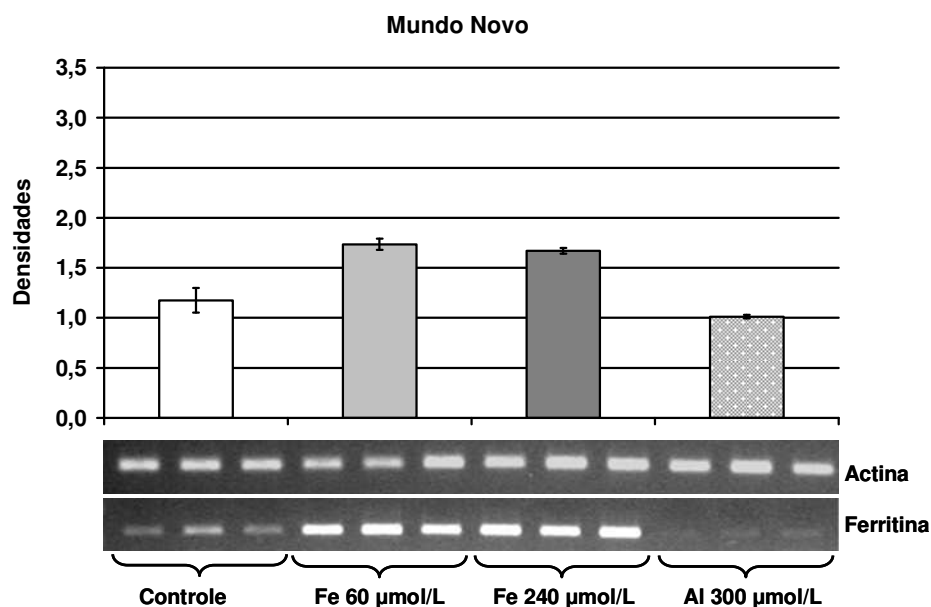
**B**

**Figura 3.** Padronização da quantidade de cDNA para as amostras de *C. arabica* cultivar Mundo Novo (A) e *C. arabica* cultivar Icatu (B) usando actina como normalizador. Amostras coletadas após 72 horas do início dos tratamentos.

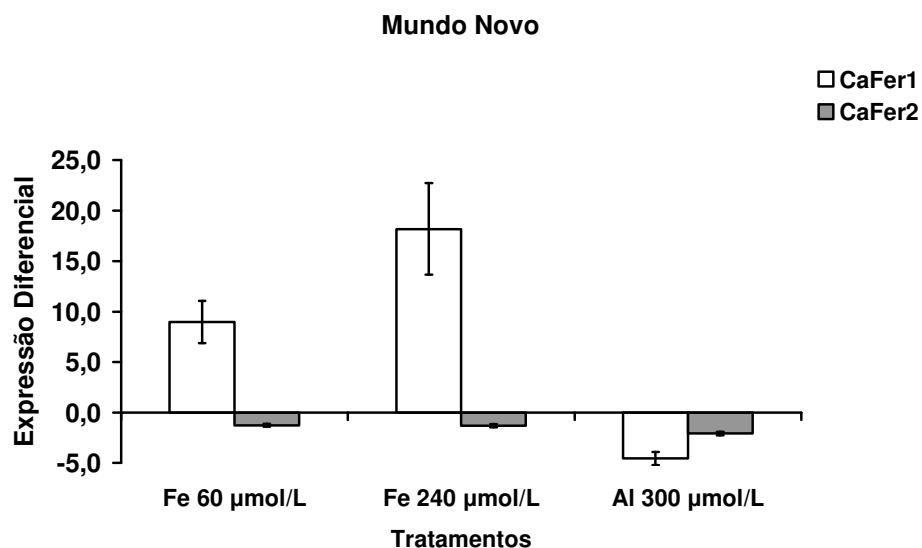
Os resultados da sqPCR revelaram um acúmulo do RNAm do gene *CaFer1* nas amostras de Mundo Novo tratadas com 60 e 240 µmol/L de ferro, em relação ao controle (Figura 4).

Com os dados obtidos por qPCR verificou-se que o aumento foi de até 8,9 e 18,2 vezes em relação ao controle, respectivamente (Figura 5; Tabela 2). Para as amostras tratadas com 300 µmol/L de alumínio observou-se uma diminuição de 4,5 vezes no acúmulo de RNAm, em relação ao controle (Figura 4 e 5; Tabela 2).

O gene *CaFer2* de ferritina, testado somente em qPCR, não apresentou expressão diferencial significativa (Figura 5; Tabela 2).



**Figura 4.** RT-PCR semiquantitativa do gene *CaFer1* de *C. arabica* cultivar Mundo Novo em amostras de células em suspensão tratadas com 60 e 240  $\mu\text{mol/L}$  de ferro, e células tratadas com 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio. Células controle não foram tratadas com ferro ou alumínio. O tamanho do fragmento amplificado foi de 484pb. Amostras coletadas após 72 horas do início dos tratamentos.

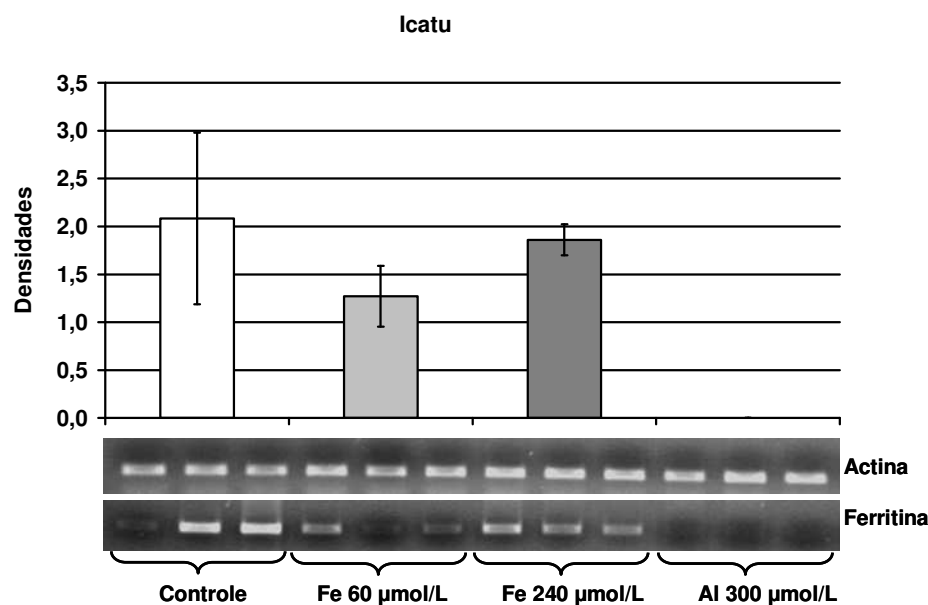


**Figura 5.** PCR em tempo real. Expressão dos transcritos referentes aos genes *CaFer1* e *CaFer2* nas amostras de células em suspensão de *C. arabica* cultivar Mundo Novo tratadas com 60  $\mu\text{mol/L}$  e 240  $\mu\text{mol/L}$  de ferro e com 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio, relativa ao controle

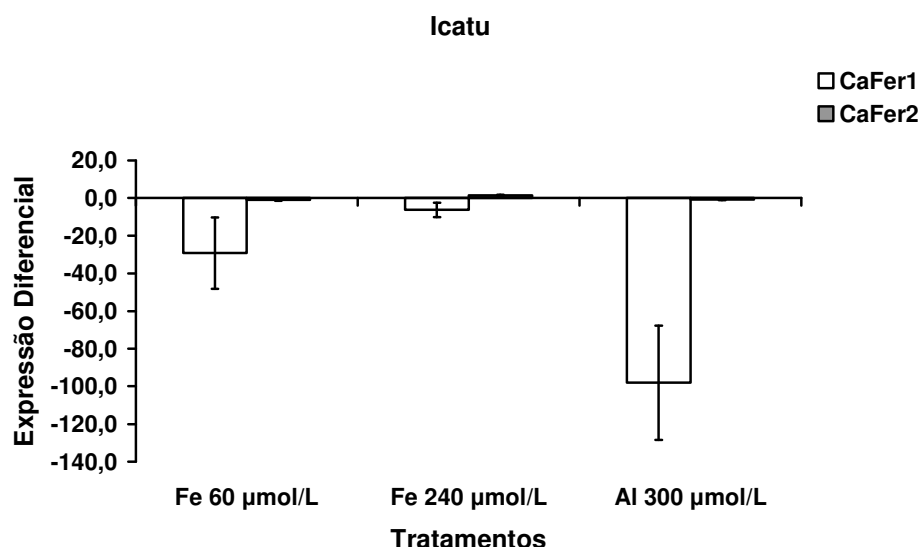
(sem tratamento com ferro ou alumínio), obtida de acordo com o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , em relação à expressão do gene rpl39. Amostras coletadas após 72 horas do início dos tratamentos.

Para Icatu, os resultados de sqPCR revelaram diminuição no acúmulo do RNAm da ferritina *CaFer1* para as amostras de células em suspensão tratadas com 60 e 240  $\mu\text{mol/L}$  de ferro e com 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio, em relação ao controle. Segundo os resultados de qPCR a expressão de cada tratamento foi 29,0; 6,3 e 98,0 vezes menor, respectivamente, em relação ao controle (Figura 6 e 7; Tabela 2).

O gene de ferritina *CaFer2* não apresentou expressão diferencial significativa (Figura 7; Tabela 2).



**Figura 6.** RT-PCR semiquantitativa do gene *CaFer1* de *C. arabica* cultivar Icatu em amostras de células em suspensão tratadas com 60 e 240  $\mu\text{mol/L}$  de ferro e 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio. O tamanho do fragmento amplificado é de 484pb. Amostras coletadas após 72 horas do início dos tratamentos.



**Figura 7.** PCR em tempo real. Expressão dos transcritos referentes aos genes *CaFer1* e *CaFer2* nas amostras de células em suspensão de *C. arabica* cultivar Icatu tratadas com 60 µmol/L e 240 µmol/L de ferro e 300 µmol/L de alumínio relativa ao controle (sem tratamento), obtida de acordo com o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , em relação à expressão do gene *rpl39*. Amostras coletadas após 72 horas do início dos tratamentos.

**Tabela 2.** PCR em tempo real dos genes *CaFer1* e *CaFer2* em amostras de células em suspensão das cultivares Mundo Novo e Icatu. Amostras tratadas com solução de ferro ou alumínio. \*Número demonstrativo de quantas vezes o gene da ferritina foi mais ou menos (-) expresso em relação ao controle, de acordo com o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

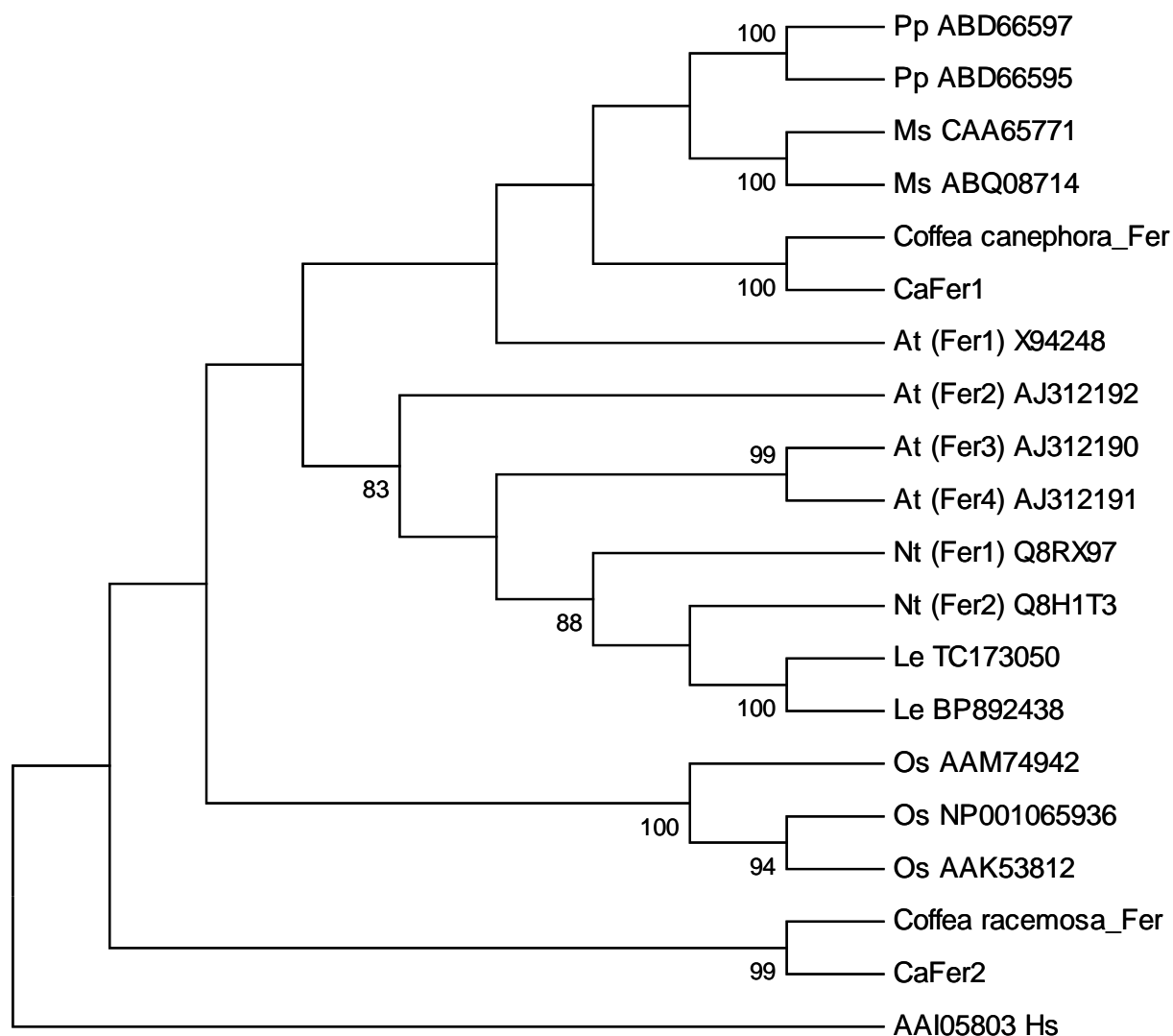
	Expressão diferencial dos genes <i>CaFer1</i> e <i>CaFer2</i>			
	Mundo Novo	Icatu	Mundo Novo	Icatu
	CaFer1*	CaFer1*	CaFer2*	CaFer2*
<b>Fe 60 µmol/L</b>	8,95	-29,14	-1,27	-0,86
<b>Fe 240 µmol/L</b>	18,17	-6,33	-1,33	1,40
<b>Al 300 µmol/L</b>	-4,57	-98,02	-2,09	-0,78

### 5.3. Análise de seqüências e caracterização de ferritina *in silico*

O dendrograma das seqüências de ferritina mostra grande semelhança entre *CaFer1* de *C. arabica* e a seqüência determinada para *C. canephora* e disparidade em relação à seqüência obtida para *C. racemosa* (Figura 8). As duas seqüências de proteína de *C. arabica*, *CaFer1* e *CaFer2*, apresentaram 73% de identidade entre elas.



O gene *CaFer1* de *C. arabica* apresentou 100 e 73% de identidade com as proteínas de *C. canephora* e *C. racemosa*, respectivamente. Já o gene *CaFer2* apresentou 74 e 97% de identidade com as proteínas de *C. canephora* e *C. racemosa*, respectivamente.

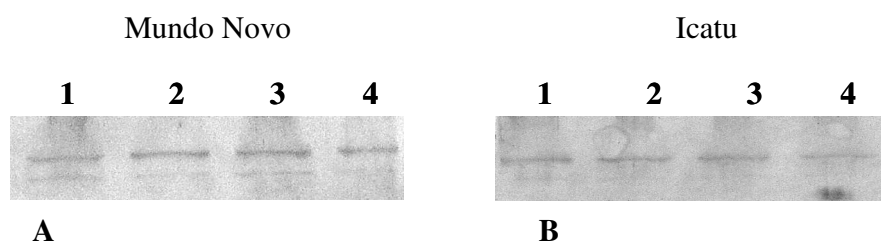


**Figura 8.** Árvore filogenética da ferritina de três espécies de *Coffea* e de outras plantas (*Medicago sativa* – Ms, *Pyrus pyrifolia* – Pp, *Lycopersicon esculentum* – Le, *Nicotiana tabacum* – Nt, *Arabidopsis thaliana* – At, *Oryza sativa* – Os). Grupo externo: *Homo sapiens* – Hs. Árvore construída a partir do método de agrupamento filogenético das sequências pelo algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) com 10.000 réplicas. Visualização do dendrograma utilizando as ferramentas integradas do MEGA versão 3.1.

#### 5.4. Western Blot

Os resultados obtidos pela análise por Western blotting das proteínas extraídas das culturas celulares, submetidas aos tratamentos com os metais, revelaram mesmo sem que uma análise densitométrica tenha sido realizada, que houve um leve aumento na produção de ferritina para Mundo Novo, nos tratamentos com 60 e 240  $\mu\text{mol/L}$  de ferro, em relação ao controle, mas não no tratamento com 300  $\mu\text{mol/L}$  alumínio (Figura 9A). Para Icatu não foi observado aumento na produção de ferritina, aliás, a intensidade da banda referente à ferritina no tratamento com adição de alumínio diminuiu acentuadamente (Figura 9B).

A banda de ferritina visualizada por meio da imunodeteção possui aproximadamente 75kDa.

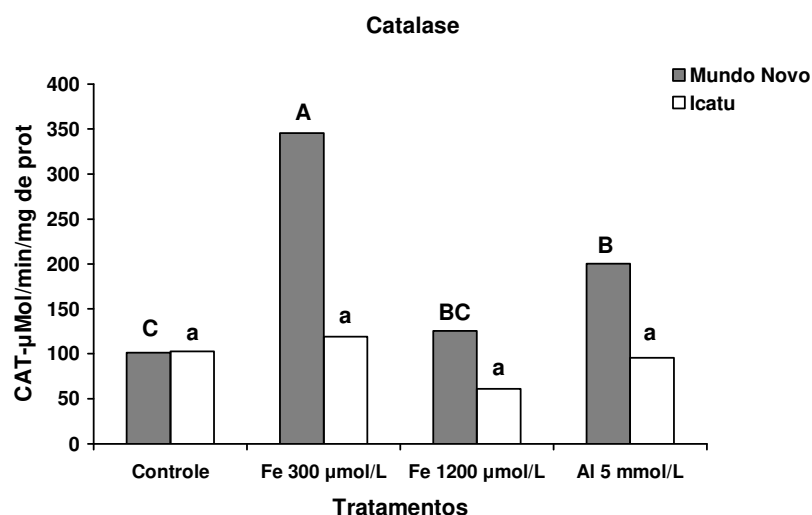


**Figura 9.** Análise de Western Blot da proteína ferritina de culturas celulares de *C. arabica* cultivar Mundo Novo (**A**) e *C. arabica* cultivar Icatu (**B**). Na canaleta 1 está representada a amostra controle (sem tratamento), nas canaletas 2 e 3 as células tratadas com 60  $\mu\text{mol/L}$  e 240  $\mu\text{mol/L}$  de ferro, respectivamente, e na canaleta 4 as amostras tratadas com 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio. Foram aplicados 20  $\mu\text{g}$  de proteínas totais em SDS-PAGE 12%.

#### 5.5. Atividade da catalase

A enzima CAT apresentou diferenças significativas em sua atividade entre os tratamentos aplicados nas duas cultivares. De forma geral, Mundo Novo se mostrou mais responsiva na presença dos metais, sendo que houve aumento significativo na atividade de CAT em relação ao controle, nas células expostas a 60  $\mu\text{mol/L}$  de ferro e 300  $\mu\text{mol/L}$  de

alumínio, e esse aumento foi de 3,4 e 1,9 vezes, respectivamente. Já para Icatu, a adição de ferro ou alumínio não influenciou significativamente a atividade dessa enzima (Figura 10).



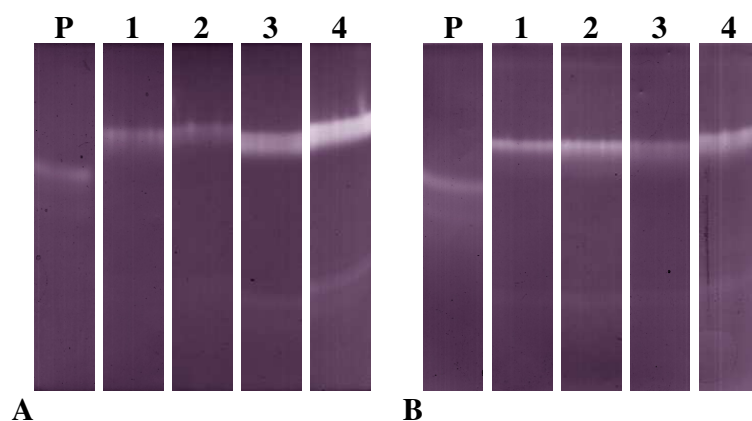
**Figura 10.** Atividade de CAT obtida com método espectrofotométrico, para as cultivares Mundo Novo e Icatu submetidas aos tratamentos com 60 e 240 μmol/L de ferro e com 300 μmol/L de alumínio. Médias com letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey a 5%, sendo que letras maiúsculas e minúsculas comparam as cultivares Mundo Novo e Icatu, respectivamente, entre os tratamentos.

## 5.6. Atividade da superóxido dismutase

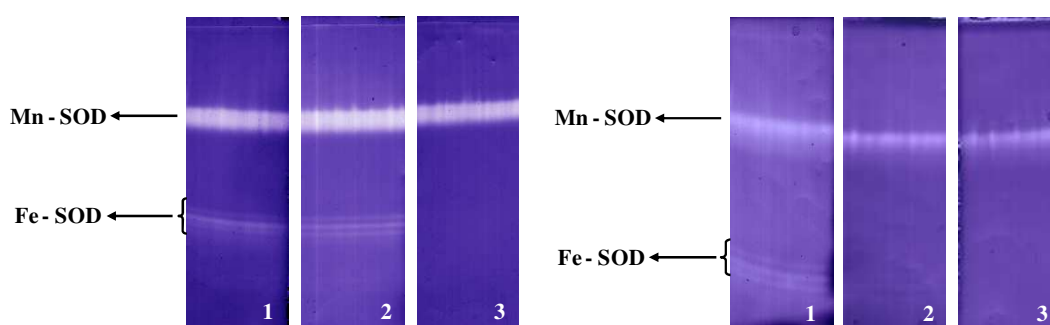
Os resultados da atividade de SOD em PAGE mostraram variações em relação aos metais testados e as cultivares utilizadas (Figura 11). Para Mundo Novo (Figura 11A) foi observada maior atividade de SOD nos tratamentos com 240 μmol/L ferro e com 300 μmol/L de alumínio, em relação ao controle. Para Icatu foi observada diminuição na atividade de SOD no tratamento com 240 μmol/L de ferro, em relação ao controle (Figura 11B). Na caracterização das isoformas (Figura 12) não foi observado o aparecimento da isoforma SOD com co-fator Cu/Zn, pois nenhuma banda foi inibida nas soluções de KCN e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os perfis das duas cultivares foram caracterizados pela presença das isoformas Fe-SOD e Mn-SOD,

sendo que das cinco encontradas em ambas as cultivares, duas eram Mn-SOD e três eram Fe-SOD.

A presença das isoformas foi visualizada mais claramente na caracterização da enzima. No gel revelado para atividade normal de SOD as isoformas não puderam ser distinguidas com clareza no gel.



**Figura 11.** Atividade de SOD em PAGE das cultivares Mundo Novo (**A**) e Icatu (**B**). Nas canaletas 1 estão representadas as amostras controle (sem tratamento); nas canaletas 2 e 3 estão as amostras tratadas com 60 e 240  $\mu\text{mol/L}$  de ferro, respectivamente, e nas canaletas 4 as amostras tratadas com 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio; (P) padrão de SOD de fígado bovino;

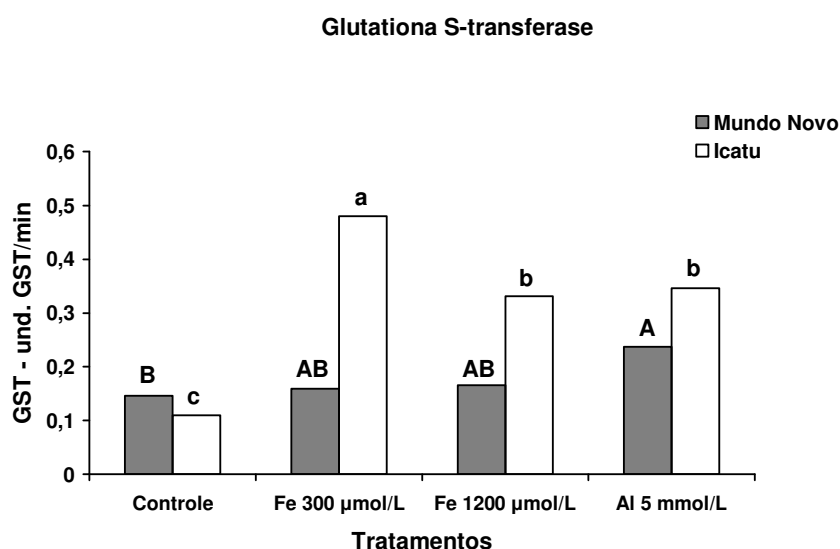


**Figura 12.** Caracterização das isoformas de SOD em PAGE, em amostras das cultivares Mundo Novo (**A**) e Icatu (**B**); 1: controle; 2: presença de KCN e 3: presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 5.7. Atividade da glutathione S-transferase

A atividade de GST para Mundo Novo foi alterada significativamente somente nas células submetidas ao tratamento com 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio, apresentando um aumento de

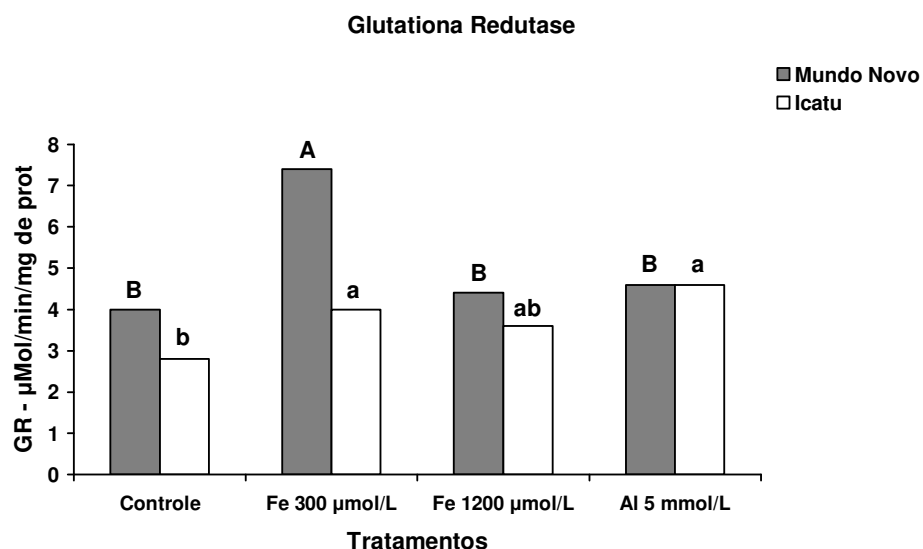
1,6 vezes na atividade dessa enzima, em relação ao controle (Figura 13). Icatu se mostrou mais responsiva na indução da GST em relação a Mundo Novo, apresentando aumento significativo na atividade dessa enzima para todas as amostras submetidas aos tratamentos com os metais (Figura 13). A atividade em células expostas a 60 e 240  $\mu\text{mol/L}$  de ferro foi 4,3 e 3,0 vezes maior, respectivamente, em relação ao controle, já o tratamento com 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio ocasionou um aumento de 3,1 vezes na atividade de GST, em relação ao controle.



**Figura 13.** Atividades de GST obtidas com método espectrofotométrico, para as cultivares Mundo Novo e Icatu submetidas aos tratamentos com 60 e 240  $\mu\text{mol/L}$  de ferro e com 300  $\mu\text{mol/L}$  alumínio. Médias com letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey a 5%, sendo que letras maiúsculas e minúsculas comparam as cultivares Mundo Novo e Icatu, respectivamente, entre os tratamentos.

### 5.8. Atividade da glutathione redutase

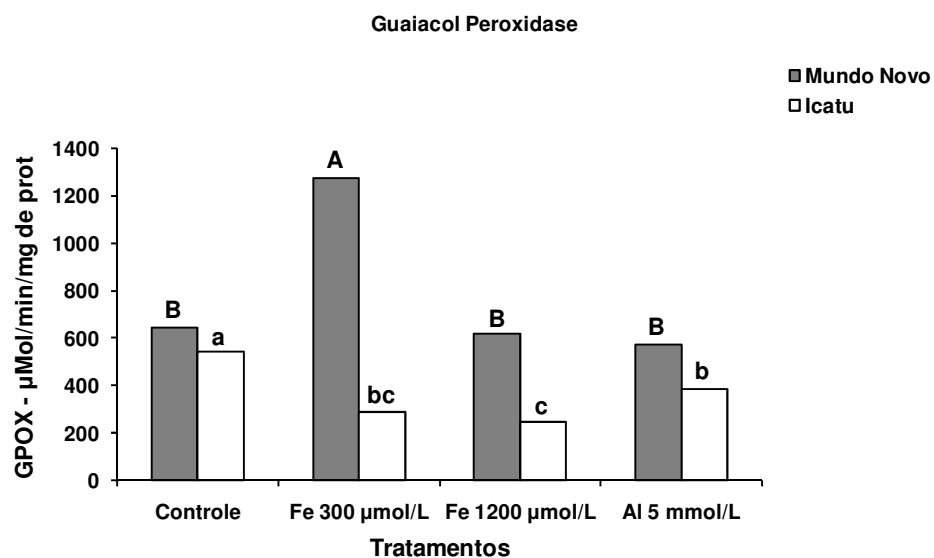
A atividade de GR aumentou significativamente apenas nas amostras de Mundo Novo tratadas com 60  $\mu\text{mol/L}$  de ferro, sendo esse aumento de aproximadamente 1,8 vezes, em relação ao controle. Para Icatu os tratamentos com 60  $\mu\text{mol/L}$  de ferro e 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio induziram aumento na atividade dessa enzima, em relação ao controle (Figura 14).



**Figura 14.** Atividades de GR obtidas com método espectrofotométrico, para as cultivares Mundo Novo e Icatu submetidas aos tratamentos com 60 e 240  $\mu\text{mol/L}$  de ferro e com 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio. Médias com letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey a 5%, sendo que letras maiúsculas e minúsculas comparam as cultivares Mundo Novo e Icatu, respectivamente, entre os tratamentos.

### 5.9. Atividade da guaiacol peroxidase

Em células da cultivar Mundo Novo a atividade de GPOX teve aumento significativo somente para a amostra de células tratadas com 60  $\mu\text{mol/L}$  ferro, em relação ao controle. Já para Icatu houve queda significativa das atividades quando as células foram submetidas aos tratamentos, em relação ao controle (Figura 15). Pôde-se observar que Mundo Novo foi mais responsiva na indução da GPOX, na presença dos metais.



**Figura 15.** Atividades de GPOX obtidas com método espectrofotométrico, para as cultivares Mundo Novo e Icatu submetidas aos tratamentos com 60 e 240  $\mu\text{mol/L}$  de ferro e com 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio. Médias com letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey a 5%, sendo que letras maiúsculas e minúsculas comparam as cultivares Mundo Novo e Icatu, respectivamente, entre os tratamentos.

## 6. DISCUSSÃO

Sabe-se que a síntese e o acúmulo da ferritina são regulados pelo ferro (Lescure *et al.*, 1991). Em cultura celular de soja, a presença do ferro pode provocar um aumento de aproximadamente 45 vezes na transcrição da ferritina, com correspondente acúmulo da proteína (Lescure *et al.*, 1991). Após 48 horas de indução utilizando 500  $\mu\text{mol/L}$  de citrato de ferro, foi observado que o nível de ferritina em células de soja chegou a 5  $\mu\text{g/mg}$  de proteína total, enquanto que em células não tratadas o nível foi menor que 0,1  $\mu\text{g/mg}$  (Proudhon *et al.*, 1989).

Em plântulas de *A. thaliana* crescidas em meio líquido acrescido de 500  $\mu\text{mol/L}$  de citrato de ferro foi observado um aumento progressivo de aproximadamente 25 vezes no conteúdo total de ferro no interior das células, após 48 horas de tratamento. Em resposta à presença do ferro, a quantidade do RNAm da ferritina aumentou significativamente em apenas 3 horas, atingindo um máximo após 12 horas e decréscimo após 24 horas. Também ocorreu acúmulo da proteína ferritina, que pôde ser detectado em apenas 12 horas após o tratamento, com acúmulo predominante após 48 horas (Gaymard *et al.*, 1996).

Na cultivar Mundo Novo observou-se acúmulo do RNAm da ferritina (*CaFer1*) nas células em suspensão submetidas aos tratamentos com 60 e 240  $\mu\text{mol/L}$  de ferro durante 72 horas. Segundo os dados obtidos por qPCR esse aumento foi de até 8,9 e 18,2 vezes, respectivamente, com relação ao controle. Assim como observado em outras plantas, a presença do ferro ocasionou o aumento na expressão da ferritina nas células em suspensão de Mundo Novo. Na cultivar Icatu os mesmos tratamentos resultaram na diminuição da expressão do RNAm da ferritina (*CaFer1*), segundo os resultados de qPCR essa queda foi de 29,0 e 6,3 vezes, em relação ao controle, evidenciando uma diminuição no acúmulo do RNAm. Ao contrário do esperado, a expressão da ferritina em células da cultivar Icatu não foi induzida pela presença do ferro no meio de cultura. Possivelmente, Icatu seja mais sensível à presença



de ferro no meio de cultura, assim, as concentrações utilizadas foram tóxicas para essa cultivar, não provocando indução na síntese de ferritina.

O alumínio é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre e é solubilizado, na forma iônica livre  $\text{Al}^{3+}$ , em condições ácidas. Uma ampla quantidade de efeitos tóxicos causados pelo alumínio tem sido demonstrada em plantas e animais (Kochian *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2002). Para animais, o alumínio é uma potente neurotoxina, enquanto que para as plantas é o maior fator redutor da produção agrícola em solos ácidos (Yamamoto *et al.*, 2002; Capaldi, 2006). A ferritina de animais é capaz de acomodar outros metais além do ferro, entre eles o alumínio (Briat & Lebrun, 1999). Em humanos, observou-se que a ferritina é capaz de formar complexos com o alumínio presente em alguns tecidos, como ósseo e nervoso, evitando sua toxicidade (Fleming & Joshi, 1988; Youson *et al.*, 1989; Sakamoto *et al.*, 2004). Apesar da característica do cafeeiro tolerar relativamente bem o alumínio presente no solo e a expressão da ferritina ter sido elevada em suspensão celular e raízes de plantas tratadas com esse metal segundo as bibliotecas de EST do Programa Genoma Café, no presente estudo não foi observado acúmulo de RNAm de *CaFer1* nas amostras das cultivares Mundo Novo e Icatu tratadas com 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio, durante 72 horas. A concentração de alumínio utilizada pode ter sido muito elevada, causando danos nos ácidos nucleicos ou impedindo a correta transcrição de genes. Foi constatado na literatura que a toxicidade do alumínio pode atingir ácidos nucleicos, além de moléculas de ATP, GTP, glutamato, o transporte de vesículas do endossomo e o citoesqueleto (Poschenrieder *et al.*, 2008). Os resultados das qPCRs demonstraram que para a Mundo Novo houve uma diminuição de 4,57 vezes na expressão desse gene, enquanto que para Icatu essa queda foi de 98,02 vezes, em relação ao controle não tratado.

O gene da ferritina *CaFer2*, analisado nesse estudo por qPCR, não apresentou expressão diferencial significativa para as duas cultivares, tanto nas amostras tratadas com

sulfato ferroso como para as tratadas com sulfato de alumínio-potássio. Em *Lupinus luteus*, uma leguminosa da família Fabaceae, foram caracterizados três genes da ferritina e confirmou-se que todos eram induzidos pela presença de ferro. Entretanto, na indução da ferritina por ácido abscísico foi observado que a expressão de um dos genes permanecia inalterada (Strozycki *et al.*, 2003). Alguns membros da família das ferritinas se expressam diferentemente em resposta a sinais ambientais e durante o desenvolvimento (Petit *et al.*, 2001). É possível que por alguma razão, o gene *CaFer2* seja insensível à presença de ferro ou pelo menos nas quantidades aqui adotadas. Os resultados do Western Blot apresentaram certa concordância com os dados de qPCR, sendo congruentes para o aumento da expressão em células de Mundo Novo tratadas com ferro e na queda de expressão com o tratamento com alumínio em Icatu.

Porém, deve-se considerar que foram encontrados 14 *contigs* de ferritina no banco de EST, sendo que 2 deles se juntaram para formar o gene *CaFer1*, enquanto que o gene *CaFer2* é altamente restrito ao pedúnculo floral e às flores em *A. thaliana* (Petit *et al.*, 2001) e em sementes de *C. arabica* (P. Nóbile, comunicação pessoal). No total, os 11 *contigs* formados puderam ser agrupados em 4 genes, sendo que aqui foram analisadas as expressões de 2 deles. Assim, a falta de total concordância entre os dados de sqPCR e qPCR com os de western blot pode ter sido decorrente da expressão dos outros genes, que poderiam ser reconhecidos pelo anticorpo produzido a partir de ferritina de arroz.

Devido ao não acúmulo da ferritina no tratamento com alumínio nas duas cultivares de *C. arabica* estudadas, possivelmente essa proteína não esteja envolvida na complexação desse metal em cafeeiros. Outros mecanismos podem estar relacionados com a tolerância a solos contaminados por alumínio, como a quelação por ácidos orgânicos ou a compartimentalização e imobilização desse metal (Miyasaka *et al.*, 2001; Kochian *et al.*, 2004). Segundo Kochian (2004), mais de 80% do alumínio presente nas folhas de trigo está no apoplasto, complexado

ao oxalato e a maior parte do complexo alumínio:oxalato é sequestrado pelo vacúolo. Outro motivo para o não acúmulo da ferritina nesse estudo talvez seja a concentração de alumínio utilizada, que pode ter sido muito elevada, não permitindo a transcrição normal dos genes. Richards e colaboradores (1998) observaram que a adição de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  na concentração final de 25  $\mu\text{mol/L}$  já era suficiente para induzir o estresse oxidativo em *Arabidopsis Thaliana*.

Embora para muitas espécies vegetais as informações genômicas ainda sejam limitadas e poucas seqüências da ferritina tenham sido identificadas, acredita-se que estas proteínas sejam codificadas por uma pequena família de genes (Strozycki *et al.*, 2003). Para milho dois genes foram identificados e para *Arabidopsis*, que possui o genoma completamente sequenciado, foram encontrados quatro genes (Strozycki *et al.*, 2003). Na análise *in silico* de dois possíveis genes da família de ferritina de *C. arabica* (*CaFer1* e *CaFer2*), o dendrograma das seqüências de aminoácidos revelou maior similaridade entre os genes da família da ferritina dentro de uma mesma espécie, do que entre as espécies analisadas, exceto para as ferritinas de *C. arabica* que permaneceram distantes no dendrograma. A seqüência de *CaFer1* de *C. arabica* apresentou maior similaridade com a seqüência de *C. canephora*, enquanto *CaFer2* mostrou maior similaridade com *C. racemosa*.

Estudos com culturas celulares têm contribuído com informações valiosas sobre mecanismos envolvidos no metabolismo celular, sinais transduccionais, regulação da expressão gênica, senescência e morte celular, entre outros. Entretanto, torna-se importante salientar o comportamento diferencial das células nessa situação *in vitro* com relação a *in vivo*. Uma das principais características é o estado de estresse oxidativo imposto por essa situação. A maioria das células *in vivo* está exposta a baixas concentrações de  $\text{O}_2$ , que correspondem à faixa de 1-10 mm Hg, com algumas exceções. Na cultura celular estima-se que a concentração seja de, aproximadamente, 150 mm Hg de  $\text{O}_2$  (Gratão, 2003).

Além disso, as propriedades químicas de cada metal adicionado à cultura celular determinam diferentes mecanismos de estresse oxidativo e de resposta à exposição ao respectivo metal. Por se tratar de um metal de transição, o ferro, por exemplo, é capaz de participar de reações de Haber-Weiss (Briat & Lebrum, 1999), gerando radicais livres. Além disso, o ferro possui dois estados de oxidação (2+ e 3+) e é co-fator de enzimas antioxidantes.

Embora seja imprecisa a definição do termo “metal pesado”, o mesmo é comumente aplicado a metais, semimetais e não metais, que possuem número atômico maior que 20 ou massa maior que 5 g.cm<sup>-3</sup> (Zenk, 1996; Gratão *et al.*, 2005). Apesar do alumínio não se enquadrar na definição, ele é considerado um metal pesado, e como um deles, é capaz de gerar estresse oxidativo, embora os mecanismos de toxicidade desse metal não tenham sido totalmente esclarecidos (Kochian *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2002; Vitorello *et al.*, 2006). Em contraste com outros metais pesados, o alumínio não age na produção direta de EAOs, via reações de Haber-Weiss, pois não é um metal de transição.

As propriedades químicas dos dois metais testados nas culturas de células de café provavelmente influenciaram as variáveis analisadas, provocando um estresse oxidativo diferente em cada cultivar. Ambos os tratamentos, adição de ferro ou alumínio, afetou diferentemente a atividade das enzimas antioxidantes nas duas cultivares de *C. arabica*. Provavelmente, essas acentuadas diferenças são devido aos distintos *background* genético que as cultivares estudadas possuem.

A CAT é uma enzima encontrada no citoplasma, mitocôndrias e peroxissomos de células animais, vegetais e microorganismos aeróbicos, que catalisa a conversão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e O<sub>2</sub>, regulando assim os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Igamberdiev & Lea, 2002). No presente estudo observou-se o comportamento diferencial das células das duas cultivares submetidas aos tratamentos com metais, sendo que as culturas de Mundo Novo tratadas com ferro na menor concentração e com alumínio apresentaram aumento significativo na atividade dessa enzima,

em relação ao controle, enquanto que para a Icatu, nenhuma das amostras apresentou aumento na atividade de CAT.

Considerando que a atividade de CAT é diretamente regulada pelos níveis de  $H_2O_2$ , a atividade inalterada desta enzima para a Icatu sugere que não houve alterações significativas no processo de geração de  $H_2O_2$  ou que outro sistema enzimático esteja relacionado, como por exemplo, outra classe de peroxidase. O declínio na atividade de catalase em condições de estresse causadas por concentrações elevadas de alumínio e ferro pode ser devido à inibição da síntese da enzima ou às mudanças conformacionais das subunidades enzimáticas sob essas condições (Sharma & Dubey, 2007).

Já o aumento da atividade da CAT para Mundo Novo pode estar associado a um incremento nos níveis de  $H_2O_2$ , contribuindo dessa forma na atenuação de possíveis danos causados por essa EAO. Estudos com culturas celulares de *C. arabica* tratadas com níquel ( $NiCl_2$ ) e com cádmio ( $CdCl_2$ ) mostraram uma rápida elevação na atividade de CAT (Gomes-Junior *et al.*, 2006a; 2006b). Assim como o ferro, o níquel, além de possuir diferentes estados de oxidação, é um elemento de transição, podendo participar de reações de Haber-Weiss (Briat & Lebrum, 1999; Gomes-Junior *et al.*, 2006a). Já o cádmio, assim como o alumínio, não é um metal de transição e possui apenas um estado de oxidação, no entanto, também pode induzir o sistema antioxidante em plantas (Boscolo *et al.*, 2003; Sharma & Dubey, 2007).

As características e concentrações de ferro e alumínio provavelmente influenciaram a diferente resposta obtida pelas culturas celulares na indução da atividade da CAT. Esses resultados indicam que as células de Mundo Novo são mais responsivas na indução da CAT durante as condições de estresse oxidativo causadas pelos altos níveis de ferro e alumínio.

As SODs são enzimas que contêm metais ligados a suas estruturas e catalisam a dismutação do radical superóxido em  $O_2$  e  $H_2O_2$  (del Río *et al.*, 2002), regulando assim os níveis de  $O_2^{\bullet-}$ , o qual é substrato para a reação de formação de radicais  $OH^{\bullet}$ . Dessa maneira as

SODs desempenham um papel central no mecanismo de defesa antioxidante (Alschers *et al.*, 2002). Em plantas existem três formas dessa enzima, as quais são classificadas segundo o íon metálico presente no sítio ativo: forma manganês (Mn-SOD), ferro (Fe-SOD) e cobre/zinco (Cu/Zn-SOD) (Gomes-Junior *et al.*, 2006b).

No presente estudo, as culturas celulares apresentaram alterações significativas com relação à atividade em PAGE de SOD. Para Mundo Novo houve indução da atividade de SOD para as amostras tratadas com 240  $\mu\text{mol/L}$  de ferro e 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio. No entanto, para Icatu a maior concentração de ferro adicionada ao meio causou a inibição da atividade da SOD.

As duas cultivares estudadas apresentaram somente as isoformas Mn-SOD e Fe-SOD. Interessantemente, nenhuma Cu/Zn-SOD foi detectada na cultura celular das duas cultivares de *C. arabica*, embora essa isoforma seja muito abundante em plantas. Esse resultado obtido está de acordo com Gomes-Junior *et al.* (2006b), que também não detectaram esta isoforma em seus estudos com células em suspensão de café tratadas com cádmio ou níquel.

A inibição mais acentuada da atividade de CAT para Icatu tratada com 240  $\mu\text{mol/L}$  de ferro pode estar relacionada com a baixa produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado pela SOD, que para esse tratamento também apresentou baixa atividade. Para Mundo Novo a alta atividade da CAT para os tratamentos com ferro na maior concentração e com alumínio não teve total correspondência com a atividade de SOD, a qual apresentou atividade aumentada para as amostras tratadas com ferro na maior concentração e 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio, mas não para a menor dose de ferro.

A GST catalisa a conjugação da glutatona a uma variedade de substratos hidrofóbicos, eletrofílicos e usualmente citotóxicos, fazendo parte de um complexo sistema de desintoxicação de xenobióticos e radicais de oxigênio em plantas e animais (Marrs, 1996; Dixon *et al.*, 2002a). O sistema de desintoxicação tem três funções: reconhecimento,

compartimentalização e metabolismo de compostos citotóxicos. Este sistema completo inclui as proteínas citocromo P450, que oxidam os compostos tóxicos, as enzimas GSTs e UDP: glucosiltransferases que conjugam as moléculas tóxicas à glutathione (GSH), podendo ser transportadas para o vacúolo e metabolizadas como compostos não tóxicos (Marrs, 1996).

Culturas de células de ambas as cultivares de *C. arabica* submetidas aos tratamentos com ferro ou alumínio apresentaram aumento na atividade de GST, em relação ao controle. Entretanto, para Icatu a presença de metais no meio induziu mais fortemente a atividade da GST do que em Mundo Novo.

A glutathione é um tripeptídeo com importante função nas plantas, sendo necessária não apenas para manter o balanço redox, mas também na desintoxicação de xenobióticos e metais pesados (Rouhier *et al.*, 2008). A GR é uma enzima que regenera a glutathione reduzida (GSH) a partir da glutathione oxidada (GSSG), por meio da redução do NADPH (Gomes-Junior *et al.*, 2006b), sendo que a glutathione deve estar na forma reduzida para desempenhar várias de suas funções, especialmente a de antioxidante, removendo EAOs, como  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$  (Stevens *et al.*, 2000). Na forma não reduzida, as EAOs podem causar direta ou indiretamente, via peroxidação de lipídeos, danos nos componentes celulares, como enzimas, DNA e membranas (Stevens *et al.*, 2000).

No presente estudo, Mundo Novo apresentou aumento significativo na atividade de GR somente nas culturas tratadas com 60  $\mu\text{mol/L}$  de ferro, em relação ao controle. Esse resultado pode indicar que a resposta enzimática é dose dependente e que em altas doses a capacidade das enzimas antioxidantes é diminuída, levando em conta que a atividade de GR não foi significativa nas amostras tratadas com a maior concentração de ferro e com 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio, que é considerada uma dose muito alta desse metal. Estudos mostram que concentrações menores de alumínio, como por exemplo 25  $\mu\text{mol/L}$ , são capazes de aumentar a

produção de espécies ativas de oxigênio e provocar o estresse oxidativo (Richards *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2002;).

Para Icatu, as culturas de células submetidas aos tratamentos com 60  $\mu\text{mol/L}$  de ferro e 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio apresentaram aumento significativo da atividade enzimática de GR, em relação ao controle. O aumento nas amostras tratadas com os metais ocorreu, provavelmente, para manter altos níveis de GSH, molécula utilizada pela enzima GST, que também apresentou alta atividade em Icatu.

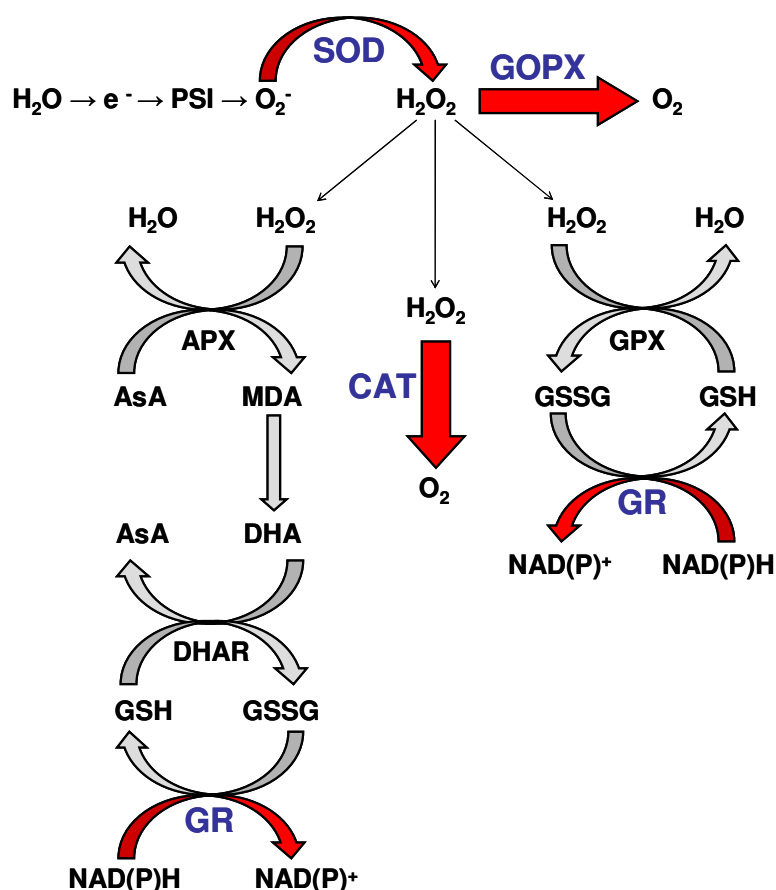
Para Mundo Novo, apesar de elevada a atividade de GR no tratamento com 60  $\mu\text{mol/L}$  de ferro, a indução da GST não foi tão acentuada. Possivelmente, parte da GSH formada esteja sendo utilizada na síntese de fitoquelatinas, mas esta hipótese não foi testada neste estudo. As fitoquelatinas protegem as plantas de metais pesados, complexando e inativando-os, prevenindo a inativação catalítica ou estrutural de proteínas (Zenk, 1996).

A GPOX é uma enzima que participa da biossíntese de lignina, decomposição do ácido indol acético (AIA), defesa contra fitopatógenos e uma variedade de respostas das plantas contra estresses bióticos e abióticos, incluindo metais pesados (Gomes-Junior *et al.*, 2006b). No presente estudo, a atividade da GPOX em Mundo Novo aumentou significativamente nas amostras tratadas com 60  $\mu\text{mol/L}$  de ferro, em relação ao controle. Provavelmente, em culturas de células tratadas com doses elevadas do metal tenha ocorrido inibição da atividade GPOX, assim como ocorreu para enzima GR. Para Icatu, em todos os tratamentos houve redução da atividade de GPOX, sendo possível que os metais estejam alterando diversos processos metabólicos, que também induzem o estresse oxidativo, além de outras peroxidases (Gratão, 2003).

O tipo de resposta obtida pela análise das atividades das enzimas antioxidantes foi diferente nas duas cultivares de *C. arabica*. De forma geral, Mundo Novo se mostrou mais responsiva na indução das enzimas antioxidantes analisadas (Figura 16), exceto em relação à



GST, que foi a enzima que apresentou atividade mais acentuada para Icatu. Entre os tratamentos aplicados em Mundo Novo a resposta mais evidente foi obtida para as culturas celulares tratadas com 60  $\mu\text{mol/L}$  de ferro, tratamento que induziu maior aumento na atividade das enzimas analisadas, exceto para SOD. Assim, possivelmente Mundo Novo tenha uma resposta ou sensibilidade maior ao ferro e essa resposta parece estar condicionada a concentrações menores, sendo que em baixas concentrações de ferro já ocorre uma resposta antioxidativa rápida, porém em níveis mais elevados de ferro (como por exemplo, 240  $\mu\text{mol/L}$ ) outros sistemas são necessários.



**Figura 16.** Ciclo da água e ciclo ascorbato-glutationa. As setas vermelhas indicam as enzimas analisadas, exceto a GST, e evidenciam a maior atividade observada em Mundo Novo.

## 7. CONCLUSÕES

- Nas condições experimentais utilizadas, a ferritina parece não estar envolvida com a complexação de alumínio.
- A concentração de 300  $\mu\text{mol/L}$  de alumínio diminui a quantidade de RNAm codificando para ferritina em ambas as cultivares de *C. arabica* estudadas.
- Por meio da análise *in silico* pôde-se observar que existe maior similaridade entre as famílias de ferritina dentro de uma mesma espécie, do que entre as espécies analisadas, exceto para a ferritina de *C. arabica* estudadas, que permaneceram distantes no dendrograma.
- O ferro e o alumínio adicionados ao meio de crescimento influenciam a atividade de enzimas do sistema antioxidante, sugerindo que os metais induzem estresse oxidativo nas células de *C. arabica*.
- A resposta enzimática parece ser dose dependente, aumentando com a concentração de metal no meio, mas em alguns casos as altas concentrações de metais diminuem a capacidade das enzimas antioxidantes; possivelmente as duas cultivares de *C. arabica* estejam utilizando vias distintas para defesa celular contra espécies ativas de oxigênio.

## 8. REFERÊNCIAS

- Alscher, R.G., Erturk, N., and Heath, L.S.** (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1331-1341.
- Anderson, M.D., Prasad, T.K., and Stewart, C.R.** (1995). Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione-reductase during acclimation to chilling mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*. **109**, 1247-1257.
- Azevedo, R.A., Alas, R. M., Smith, R. J., and Lea, P. J.** (1998). Response of antioxidant to transfer from elevated carbon dioxide air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* **104**, 280-292.
- Baynes, R.D., and Bothwell, T.H.** (1990). Iron Deficiency. *Annual Review of Nutrition* **10**, 133-148.
- Beaucham, C., and Fridovic, I.** (1971). Superoxide dismutase - improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**, 276-282.
- Boscolo, P.R.S., Menossi, M., and Jorge, R.A.** (2003). Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* **62**, 181-189.
- Bradford, M.M.** (1976). Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Briat, J.-F., and Lebrun, M.** (1999). Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* **322**, 43-54.
- Briat, J.-F., Lobréaux, S., Grignon, N., and Vansuyt, G.** (1999). Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**, 155-166.
- Briat, J.F., FobisLoisy, I., Grignon, N., Lobreaux, S., Pascal, N., Savino, G., Thoiron, S., vonWiren, N., and VanWuytswinkel, O.** (1995). Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biology of the Cell* **84**, 69-81.
- Capaldi, F. R.** (2006). Estresse oxidativo e diferenças na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 ao alumínio e à acidez. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Quieroz", Universidade de São Paulo, Brasil, tese de Doutorado.
- Carvalho, A., H. P. Medina, F., Fazuoli, L.C., O. Guerreiro, F., and Lima, M.M.A.** (1991). Aspectos genéticos do cafeeiro. *Brazilian Journal of Genetics* **14** (1), 135-183.
- Carvalho, A., Krug, C.A., Mendes, J.E.T., AntunesFilho, H., Moraes, H., AloisiSobrinho, J., Moraes, M.V., and Rocha, T.R.** (1952). Melhoramento do cafeeiro. IV. Café Mundo Novo. *Bragantia* **12**, 97-129.

- Cheng, L., Wang, F., Shou, H., Huang, F., Zheng, L., He, F., Li, J., Zhao, F.-J., Ueno, D., Ma, J.F., and Wu, P.** (2007). Mutation in nicotianamine aminotransferase stimulated the Fe(II) acquisition system and led to iron accumulation in rice. *Plant Physiology* **145**, 1647-1657.
- Connolly, E., and Guerinot, M.** (2002). Iron stress in plants. *Genome Biology* **3**, reviews1024.1–reviews1024.4.
- Creissen, G.P., Broadbent, P., Kular, B., Reynolds, H., Wellburn, A.R., and Mullineaux, P.M.** (1994). Manipulation of glutathione-reductase in transgenic plants - implications for plants responses to environmental-stress. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B-Biological Sciences* **102**, 167-175.
- del Río, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gomez, M., and Barroso, J.B.** (2002). Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1255-1272.
- Devi, S.R., Yamamoto, Y., and Matsumoto, H.** (2003). An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* **97**, 59-68.
- Dixon, D., Laphorn, A., and Edwards, R.** (2002a). Plant glutathione transferases. *Genome Biology* **3**, reviews3004.3001 - reviews3004.3010.
- Dixon, D.P., Davis, B.G., and Edwards, R.** (2002b). Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants - Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 30859-30869.
- Edwards, R., Dixon, D.P., and Walbot, V.** (2000). Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* **5**, 193-198.
- Fleming, J., and Joshi, J.G.** (1988). Ferritin: isolation of aluminum-ferritin complex from brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **11**, 7866-7870.
- Frugoli, J.A., Zhong, H.H., Nuccio, M.L., McCourt, P., McPeck, M.A., Thomas, T.L., and McClung, C.R.** (1996). Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Plant Physiology*. **112**, 327-336.
- Gaymard, F., Boucherez, J., and Briat, J.F.** (1996). Characterization of a ferritin mRNA from *Arabidopsis thaliana* accumulated in response to iron through an oxidative pathway independent of abscisic acid. *Biochemical Journal* **318**, 67-73.
- Gomes-Junior, R.A., Moldes, C.A., Delite, F.S., Gratao, P.L., Mazzafera, P., Lea, P.J., and Azevedo, R.A.** (2006a). Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. *Plant Physiology and Biochemistry* **44**, 420-429.

- Gomes-Junior, R.A., Moldes, C.A., Delite, F.S., Pompeu, G.B., Gratao, P.L., Mazzafera, P., Lea, P.J., and Azevedo, R.A.** (2006b). Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere* **65**, 1330-1337.
- Goto, F., Yoshihara, T., Masuda, T., and Takaiwa, F.** (2001). Genetic improvement of iron content and stress adaptation in plants using ferritin gene. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **18**, 351-371.
- Goto, F., Yoshihara, T., Shigemoto, N., Toki, S., and Takaiwa, F.** (1999). Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology* **17**, 282-286.
- Gratão, L. P.** (2003). Análise da resposta antioxidante de células de *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 submetidas ao cádmio. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Quieroz", Universidade de São Paulo, Brasil, tese de Mestrado.
- Gratao, P.L., Polle, A., Lea, P.J., and Azevedo, R.A.** (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* **32**, 481-494.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.L., and Zenk, M.H.** (1989). Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (Phytochelatase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 6838-6842.
- Guerinot, M.L., and Yi, Y.** (1994). Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiology* **104**, 815 - 820.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., and Matsui, H.** (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology* **42**, 462-468.
- Holtman, W.L., Heistek, J.C., Mattern, K.A., Bakhuizen, R., and Douma, A.C.** (1994).  $\beta$ -oxidation of fatty-acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in the embryo of germinating barley. *Plant Science* **99**, 43-53.
- Igamberdiev, A.U., and Lea, P.J.** (2002). The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. *Phytochemistry* **60**, 651-674.
- Jones, D.L., and Kochian, L.V.** (1995). Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? *Plant Cell* **7**, 1913-1922.
- Keith, K.E., and Valvano, M.A.** (2007). Characterization of SodC, a periplasmic superoxide dismutase from *Burkholderia cenocepacia*. *Infection and Immunity* **75**, 2451-2460.
- Kochian, L.V.** (1995). Cellular mechanisms to aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**, 237-260.

- Kochian, L.V., Pence, N.S., Letham, D.L.D., Pineros, M.A., Magalhaes, J.V., Hoekenga, O.A., and Garvin, D.F.** (2002). Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. *Plant and Soil* **247**, 109-119.
- Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., and Piñeros, M.A.** (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 459-493.
- Konrad, M. L. F.** (2003). Crescimento do cafeeiro sob influência do alumínio, em solução nutritiva e em solo ácido, inoculado com micorrizas arbusculares. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- Kraus, T.E., Evans, R.C., Fletcher, R.A., and Pauls, K.P.** (1995). Paclobutrazol enhances tolerance to increased levels of UV-B radiation in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **73**, 797-806.
- Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M.** (2004). MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**, 150-163.
- Laulhere, J.P., Lescure, A.M., and Briat, J.F.** (1988). Purification and characterization of ferritins from maize, pea, and soybean seeds - distribution in various pea organs. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 10289-10294.
- Lee, D.H., and Lee, C.B.** (2000). Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Science* **159**, 75-85.
- Lepelley, M., Cheminade, G., Tremillon, N., Simkin, A., Caillet, V., and McCarthy, J.** (2007). Chlorogenic acid synthesis in coffee: An analysis of CGA content and real-time RT-PCR expression of HCT, HQT, C3H1, and CCoAOMT1 genes during grain development in *C. canephora*. *Plant Science* **172**, 978-996.
- Lescure, A.M., Proudhon, D., Pesey, H., Ragland, M., Theil, E.C., and Briat, J.F.** (1991). Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 8222 - 8226.
- Liao, H., Wan, H., Shaff, J., Wang, X., Yan, X., and Kochian, L.V.** (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 Physiology* **141**, 674-684.
- Lin, C.W., Mueller, L.A., Mc Carthy, J., Crouzillat, D., Petiard, V., and Tanksley, S.D.** (2005). Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 114-130.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lopez-Huertas, E., Charlton, W.L., Johnson, B., Graham, I.A., and Baker, A.** (2000). Stress induces peroxisome biogenesis genes. *Embo Journal* **19**, 6770-6777.

- Marrs, K.A.** (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 127-158.
- Masip, L., Veeravalli, K., and Georgioui, G.** (2006). The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxidants & Redox Signaling* **8**, 753-762.
- Matsuno, H., and Uritani, I.** (1972). Phytopathological chemistry of sweet potato with black rot and injury. Physiological behavior of peroxidase isoenzymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. *Plant Cell Physiology* **13**, 1091-1101.
- Miyasaka, S.C., and Hawes, M.C.** (2001). Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. *Plant Physiology* **125**, 1978-1987.
- Murashige, C., and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays
- Nagasaka, S., Nishizawa, N., Negishi, T., Satake, K., Mori, S., and Yoshimura, E.** (2002). Novel iron-storage particles may play a role in aluminum tolerance of *Cyanidium caldarium*. *Planta* **215**, 399-404.
- Neuenschwander, B., and Baumann, T.W.** (1992). A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports* **110**, 608-612.
- Nóbile, P.M., Yamamoto, P.Y., and Colombo, C.A.** (2007). Seleção de genes constitutivos para a normalização da PCR em tempo real em frutos de café. 4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas São Lourenço-MG.
- Pavan, M.A., and Bingham, F.T.** (1982). Toxicity of aluminum to coffee seedlings grown in nutrient solution. *Soil Science Society of American Journal* **46**, 993-997.
- Petit, J.M., Briat, J.F., and Lobreaux, S.** (2001). Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. *Biochemical Journal* **359**, 575-582.
- Poschenrieder, C., Gunsé, B., Corrales, I., and Barceló, J.** (2008). A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Science of the Total Environment* **400**, 356-368.
- Potters, G., De Gara, L., Asard, H., and Horemans, N.** (2002). Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 537-548.
- Proudhon, D., Briat, J.F., and Lescure, A.M.** (1989). Iron induction of ferritin synthesis in soybean cell-suspensions. *Plant Physiology* **90**, 586-590.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H.L., and Moorman, A.F.M.** (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* **339**, 62-66.

- Ramírez-Benítez, J.E., Chee-González, L., and Hernandez-Sotomayor, S.M.T.** (2008). Aluminium induces changes in organic acids metabolism in *Coffea arabica* suspension cells with differential Al-tolerance. *Journal of Inorganic Biochemistry* **102**, 1631-1637.
- Ravet, K.T., B., Boucherez, J., Briat, J.-F., Gaymard, F., and Cellier, F.** (2009). Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*, pp. 400-412.
- Richards, K.D., Schott, E.J., Sharma, Y.K., Davis, K.R., and Gardner, R.C.** (1998). Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **116**, 409-418.
- Rouhier, N., Lemaire, S.D., and Jacquot, J.P.** (2008). The role of glutathione in photosynthetic organisms: Emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 143-166.
- Sakamoto, T., Ogasawara, Y., Ishiia, K., Takahashia, H., and Tanabe, S.** (2004). Accumulation of aluminum in ferritin isolated from rat brain. *Neuroscience Letters* **366**, 264-267.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press. **Vol 1. 2ed.** .
- Scandalios, J.G.** (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**, 995-1014.
- Scrutton, N.S., Berry, A., and Perham, R.N.** (1987). Purification and characterization of glutathione-reductase encoded by a cloned and over-expressed gene in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* **245**, 875-880.
- Szczekan, S.R., and Joshi, J.G.** (1987). Isolation and characterization of ferritin from soybeans (*Glycine max*). *Journal of Biological Chemistry* **262**, 13780-13788.
- Seckbach, J.** (1968). Studies on the deposition of plant ferritin as influenced by iron supply to iron-deficient beans. *Journal of Ultrastructure Research* **22**, 413-423.
- Sharma, P., and Dubey, R.S.** (2007). Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports* **26**, 2027-2038.
- Stevens, R.G., Creissen, G.P., and Mullineaux, P.M.** (1997). Cloning and characterization of a cytosolic glutathione reductase cDNA from pea (*Pisum sativum* L.) and its expression in response to stress. *Plant Molecular Biology* **35**, 641-654.
- Stevens, R.G., Creissen, G.P., and Mullineaux, P.M.** (2000). Characterization of pea cytosolic glutathione reductase expressed in transgenic tobacco. *Planta* **211**, 537-545.



- Strozycki, P.M., Skapska, A., Szczesniak, K., Sobieszczuk, E., Briat, J.F., and Legocki, A.B.** (2003). Differential expression and evolutionary analysis of the three ferritin genes in the legume plant *Lupinus luteus*. *Physiologia Plantarum* **118**, 380-389.
- Subramani, S.** (1993). Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annual Review of Cell Biology* **9**, 445-478.
- Taiz, L., and Zeiger, E.** (2002). *Fisiologia Vegetal 3º edição*.
- Theil, E.C.** (2004). Iron, ferritin, and nutrition. *Annual Review of Nutrition* **24**, 327-343.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F.** (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**, research0034.0031 - research0034.0011.
- Vasconcelos, M., Datta, K., Oliva, N., Klalekuzzaman, M., Torrizo, L., Krishnan, S., Oliveira, M., Goto, F., and Datta, S.K.** (2003). Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. *Plant Science* **164**, 371-378.
- Vieira, L.G.E., Andrade, A.C., Colombo, C.A., Moraes, A.H.d.A., Metha, Â., Oliveira, A.C.d., Labate, C.A., Marino, C.L., Monteiro-Vitorello, C.d.B., Monte, D.d.C., Giglioti, É., Kimura, E.T., Romano, E., Kuramae, E.E., Lemos, E.G.M., Almeida, E.R.P.d., Jorge, É.C., Albuquerque, É.V.S., Silva, F.R.d., Vinecky, F., Sawazaki, H.E., Dorry, H.F.A., Carrer, H., Abreu, I.N., Batista, J.A.N., Teixeira, J.B., Kitajima, J.P., Xavier, K.G., Lima, L.M.d., Camargo, L.E.A.d., Pereira, L.F.P., Coutinho, L.L., Lemos, M.V.F., Romano, M.R., Machado, M.A., Costa, M.M.d.C., Sá, M.F.G.d., Goldman, M.H.S., Ferro, M.I.T., Tinoco, M.L.P., Oliveira, M.C., Sluys, M.-A.V., Shimizu, M.M., Maluf, M.P., Eira, M.T.S.d., Filho, O.G., Arruda, P., Mazzafera, P., Mariani, P.D.S.C., Oliveira, R.L.B.C.d., Harakava, R., Balbao, S.F., Tsai, S.M., Mauro, S.M.Z.d., Santos, S.N., Siqueira, W.J., Costa, G.G.L., Formighieri, E.F., Carazzolle, M.F., and Pereira, G.A.G.** (2006). Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource - Projeto Genoma Brasileiro Café: recursos genômicos baseados em ESTs. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **18**(1), 95-108.
- Vitorello, V.A., Capaldi, F.R., and Stefanuto, V.A.** (2005). Recent advances in aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Brasilian Journal of Plant Physiology* **17**, 129-143.
- Vitória, A.P., Lea, P.J., and Azevedo, R.A.** (2001). Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* **57**, 701-710.
- Walker, R.P., and Pollock, C.J.** (1993). The purification and characterization of soluble acid invertase from coleoptiles of wheat (*Triticum aestivum* L CV AVALON). *Journal of Experimental Botany* **44**, 1029-1037.
- Wei, J.Z., and Theil, E.C.** (2000). Identification and characterization of the iron regulatory element in the ferritin gene of a plant (soybean). *Journal of Biological Chemistry* **275**, 17488-17493.

- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S., and Matsumoto, H.** (2002). Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology* **128**, 63-72.
- Youson, J.H., Sargent, P.A., and Pearce, G.W.** (1989). Iron and aluminum deposition in the meninges of the lamprey - identification of an aluminum-ferritin inclusion body. *The Anatomical Record* **223**, 13-20.
- Zancani, M., Peresson, C., Biroccio, A., Federici, G., Urbani, A., Murgia, I., Soave, C., Micali, F., Vianello, A., and Macri, F.** (2004). Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. *European Journal of Biochemistry* **271**, 3657-3664.
- Zenk, M.H.** (1996). Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* **179**, 21-30.

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada  
“**EXPRESSÃO DE GENES DA FERRITINA E RESPOSTA ANTIOXIDANTE EM  
DUAS CULTIVARES DE *Coffea arabica* EXPOSTAS A FERRO E ALUMÍNIO**”

( ~~se~~ ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

( ☒ ) está inserido no **Projeto CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo nº 2006/02), intitulado  
EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO SECUNDÁRIO EM PLANTAS;

( ) tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP**  
(Protocolo nº \_\_\_\_\_);

( ) tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº \_\_\_\_\_);

( ) tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.  
Especificar: \_\_\_\_\_

Alexandra Bottcher

Aluno:



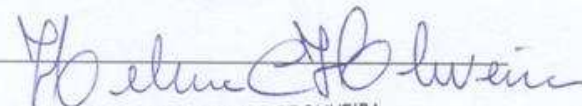
Orientador:

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(☒) Deferido ( ) Indeferido

Nome:

Função:



Profa. Dra. HELENA COUTINHO F. DE OLIVEIRA

Presidente

Comissão Interna de Biossegurança  
CIBio/IB - UNICAMP