

## EFEITO DA DESMETILAÇÃO NA CULTURA DE CALOS DE *CEREUS PERUVIANUS* L. (Cactaceae)

Gabriel Mendes Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Sandra Aparecida de Oliveira Collet (Orientador), Claudete Aparecida Mangolin (Coorientadora) e-mail: ra114967@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/Maringá, PR.

**Área: 2020005 - Genética; Subárea: 20203004 - Genética Vegetal**

**Palavras-chave:** 5-azacitidina; Isoesterases; Desmetilante; Expressão gênica; Proteínas.

### Resumo

A cultura de calos de *Cereus peruvianus* produz diversos compostos de interesse econômico, com aplicações industriais. A adição de agentes químicos, que interferem na expressão genica, pode potencializar a produção de compostos de interesse na cultura de calos. O objetivo deste trabalho foi investigar por meio de análises eletroforéticas de esterases e pelo monitoramento da cultura, possíveis alterações metabólicas na cultura de calos de *Cereus peruvianus*, induzidas pelo agente desmetilante 5-Azacitidina (5-AzaC). Os calos foram cultivados em meio contendo 5-AzaC, nas concentrações zero, 100, 150, 200, 250 e 300  $\mu\text{M}$ . As análises eletroforéticas de esterases mostraram que calos cultivados nas concentrações de 100 e 150  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC, por 30 dias apresentaram bandas de coloração mais intensa, do que os cultivados em concentrações mais altas e os controle. Os calos mantidos em 300  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC, no mesmo período, ficaram escuros e com alguns setores avermelhados. As concentrações de 100 e 150  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC parecem induzir a expressão de genes de esterases. A concentração de 300  $\mu\text{M}$  parece inibir a expressão das esterases, além de causar estresse na cultura de calos.

### Introdução

*Cereus peruvianus* é uma espécie de cacto, popularmente conhecida como mandacaru. Esta espécie vem sendo estudada por produzir diversos compostos de interesse econômico, com aplicações industriais, na produção de cosméticos, na indústria de alimentos e inclusive com potencial farmacêutico. O cultivo *in vitro* de calos desta espécie permite a propagação indefinidamente em meio suplementado e seu uso como fonte alternativa de diversos compostos de interesse, substituindo o uso de plantas adultas (MACHADO et al., 2010).

A biossíntese de metabólitos secundários tem se tornado objeto de interesse desde a década de 1960, e com o advento das tecnologias baseadas no DNA, novas aplicações foram desenvolvidas para a cultura de calos (EFFERTH, 2019).

Neste trabalho a cultura de calos de *Cereus peruvianus* foi submetida à 5-Azacidina (5-AzaC), um agente desmetilante que pode diminuir dos níveis de metilação do DNA e desta forma alterar a expressão de genes relacionados à diferenciação, regeneração de plantas e a produção de metabólitos secundários.

## Materiais e métodos

### 1. Manutenção dos calos

Os calos controle de *C. peruvianus* foram mantidos em meio de cultura MS suplementado com vitaminas, sacarose 3%, 4,0 mg/L de 2,4-D) e 4,0 mg/L de Kinetina. Para testar o efeito da desmetilação, os calos foram transferidos para placas contendo o meio MS controle acrescido das concentrações 100, 150, 200, 250 e 300  $\mu$ M de 5-AzaC. Os calos foram mantidos nas condições originais com fotoperíodo e temperaturas controladas.

### 2. Extração de proteínas e eletroforese

As amostras de calos (200 mg) foram homogeneizadas com solução de extração, contendo tampão Fosfato 1,0 M, pH 7,0, PVP-40 (duas concentrações 5 e 7,5%),  $\beta$ -mercaptoetanol (duas concentrações 0,5 e 0,75%), 10% glicerol e com sílica (0,2 mg) e sem sílica. As amostras foram maceradas com volumes de 20 e 30  $\mu$ l de solução de extração, com auxílio do bastão de vidro e no gelo para evitar a desnaturação enzimática. A centrifugação ocorreu a 12.000 rpm por 30 min a 4°C. Os sobrenadantes (45  $\mu$ l) foram aplicados no gel de poliacrilamida (PAGE) no sistema descontínuo. A eletroforese foi conduzida a 4°C (geladeira) durante 5 h com a voltagem constante de 200 V.

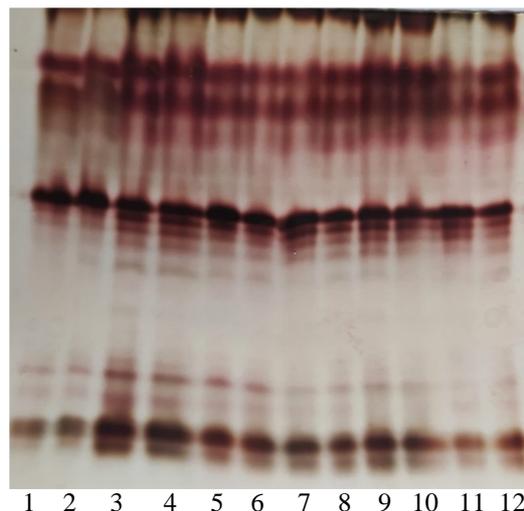
## Resultados e Discussão

A padronização das condições de extração de enzimas é crucial para alcançar bons resultados nas análises eletroforéticas. As amostras de calos maceradas com 20  $\mu$ l de solução de extração preparada com Fosfato 1,0 M, pH 7,0, PVP-40 7,5%,  $\beta$ -Mercaptoetanol 0,75%, glicerol 10% e sílica (0,2 mg) apresentaram maior número de bandas com melhor definição no gel, indicando essas condições as mais adequadas para a avaliação do efeito da 5-AzaC sob as esterases.

As esterases são proteínas que catalisam reações de esterificação nas células, neste trabalho 14 esterases de calos de *Cereus peruvianus* foram identificadas em gel de poliacrilamida (Figura 01). As  $\alpha$ - esterases aparecem

coradas em preto, as  $\beta$ -esterases avermelhadas e  $\alpha/\beta$ -esterases em vermelho escuro. As análises eletroforéticas mostraram que calos cultivados nas concentrações de 100 e 150  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC, por 30 dias apresentaram bandas de coloração mais intensa, do que os cultivados em concentrações mais altas e os controle. As concentrações de 100 e 150  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC parecem induzir a expressão de genes de esterases. Os calos mantidos em 300  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC, no mesmo período, ficaram escuros e com alguns setores avermelhados. A concentração de 300  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC, parece inibir a expressão das esterases, além de causar estresse na cultura de calos.

A metilação do DNA tem sido associada com a alteração da expressão gênica em diversas espécies de plantas, aumentando as variações das características, pois muitos genes podem ser afetados simultaneamente. A 5-azaC é conhecida como um potencial inibidor da metilação do DNA e seus efeitos na alteração dos padrões de metilação têm sido estudados em nível molecular (CASTILHO et al., 1999). Os efeitos da 5-AzaC foram investigados em algumas espécies vegetais. FARIA et al. (2020) observaram uma diminuição na metilação do DNA de folhas de Urucum cultivadas por 60 dias com 1  $\mu\text{M}$  de 5-Azacidina e o aumento no teor do antioxidante bixina, em relação às plantas controle. Em cultura de células transformadas de *Vitis amurens*, a utilização de 200  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC teve efeito sobre a produção de resveratrol e aumento da expressão do gene da desmetilase (KISELEV, 2013). A 5-AzaC foi utilizada na agricultura para aumentar o conteúdo de proteína em semente de trigo e milho (VANYUSHIN et al., 2002). Neste estudo, a 5-AzaC parece promover alterações nas sequências de DNA que codificam para as enzimas esterases. Tais alterações foram detectadas nos géis de poliacrilamida, como bandas de intensidade de coloração diferenciadas (Figura 01).



**Figura 01.** Esterases de calos de *Cereus peruvianus*, cultivados com 5-AzaC. Amostras 1 e 2 – controle, 3 e 4 – 100  $\mu\text{M}$ , 5 e 6 – 150  $\mu\text{M}$ , 7 e 8 – 200  $\mu\text{M}$ , 9 e 10 – 250  $\mu\text{M}$  e 11 e 12 – 300  $\mu\text{M}$ .

## Conclusões

- As condições de extração e de eletroforese para avaliar do efeito da 5-AzaC sob as esterases de calos de *Cereus peruvianus* foram padronizadas.
- O agente desmetilante 5-AzaC parece promover alterações na expressão genica da cultura de calos de *Cereus peruvianus*.
- As concentrações de 100 e 150  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC parecem induzir a expressão de genes de esterases nos calos.
- A concentração de 300  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC parece inibir a expressão das esterases, além de causar estresse na cultura de calos.

## Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária pela bolsa concedida e ao laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal pela oportunidade de desenvolver este projeto.

## Referências

CASTILHO, A.; NEVES, N.; RUFINI-CASTIGLIONE, M.; VIEGAS, W.; HESLOP-HARRISON, J. S. **5-Methylcytosine distribution and genome organization in Triticale before and after treatment with 5- azacytidine.** Journal of Cell Science 112, 4397-4404, 1999.

EFFERTH T. **Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures.** Engineering 5, 50–59, 2019.

FARIA, D.V., DE FREITAS CORREIA, L.N., BATISTA, D.S. **5-Azacytidine downregulates the *SABATH* methyltransferase genes and augments bixin content in *Bixa orellana* L. leaves.** *Plant Cell Tiss Organ Cult* 142, 425–434, 2020.

KISELEV, K.V., TYUNIN, A.P. & KARETIN, Y.A. **Influence of 5-azacytidine and salicylic acid on demethylase gene expression in cell cultures of *Vitis amurens* Rupr..** *Acta Physiol Plant* 35, 1843–1851, 2013.

MACHADO, M. F. P. S.; MANGOLIN, C. A.; OLIVEIRA-COLLET, S. A.; OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, R. A. C. **Potencial da cultura de tecidos e células de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) para a obtenção de enzimas e processos de biotransformação.** In: Biotatálise e Biotransformação: Fundamentos e aplicações. 1ª ed. Salto - São Paulo: Editora Schoba Ltda, v.1, 158-194, 2010.

VANYUSHIN, B.F., SHORNING, B.Y., SEREDINA, A.V. **The Effects of Phytohormones and 5-Azacytidine on Apoptosis in Etiolated Wheat Seedlings.** *Russian Journal of Plant Physiology* 49, 501–506, 2002.