

EFEITO DE DESMETILAÇÃO NO PADRÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE CULTURA DE CALOS DE *CEREUS PERUVIANUS* L. (CACTACEAE).

Gabriel Mendes Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Sandra Aparecida de Oliveira Collet (Orientadora), 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; SDS-PAGE; Eletroforese.

Resumo:

A expressão gênica diferencial da cultura de calos de *C. peruvianus* pode resultar na produção diferenciada de compostos secundários de interesse. A 5-Azacitidina é um agente desmetilante do DNA, que pode promover alterações nas cadeias polipeptídicas detectáveis por SDS-PAGE. Os calos de *C. peruvianus* foram cultivados em meio de cultura MS com 5-AzaC nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mM. Nas condições testadas neste trabalho, a 5-AzaC parece não ter efeito sob a expressão dos genes codificantes para cadeias polipeptídicas de calos de *C. peruvianus* coradas com coomassie blue.

Introdução

Cereus peruvianus é uma espécie de cactos conhecida popularmente como mandacaru. A cultura de calos desta espécie já foi considerada um método eficiente para a multiplicação clonal de plantas, obtendo rápida propagação (OLIVEIRA et al. 1995). Esta cultura é uma via alternativa para a obtenção de vários compostos de interesse que são produzidos pelas plantas desta espécie, e representa um biorreator para a produção de metabólitos secundários relevantes. A expressão gênica diferencial poderia resultar na produção diferenciada de compostos de interesse industrial. A metilação do DNA tem sido associada com a alteração da expressão gênica em numerosas espécies vegetais, sendo que ela pode aumentar as variações das características quantitativas, pois muitos genes podem ser afetados simultaneamente (JAIN, 2001). A 5-Azacitidina (5-AzaC) é conhecida como um potencial inibidor da metilação do DNA, e seus efeitos têm sido estudados em nível molecular. As alterações nas sequências de DNA codificantes para proteínas podem promover mudanças nas cadeias polipeptídicas, e estas são detectadas por eletroforese como bandas de migração diferenciadas. Neste trabalho a técnica de eletroforese em gel de poli(acrilamida) dodecil sulfato (SDS-PAGE) foi utilizada para avaliar o efeito

do agente desmetilante 5-AzaC na expressão de proteínas totais da cultura de calos de *C. peruvianus*.

Materiais e métodos

1. Manutenção dos calos

Os calos foram cultivados em meio de cultura MS, com os reguladores de crescimento 2,4-D e cinetina na concentração de 4 mg/L, e com o agente desmetilante 5-AzaC nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mM. Os calos foram repicados e transferidos para meio novo na mesma concentração de 5-AzaC, quando necessário, e os setores oxidados ou contaminados foram descartados.

2. Extração de proteínas e eletroforese SDS-PAGE

As amostras de calos (200 mg) cultivados nas diferentes concentrações de 5-AzaC foram homogeneizadas com 20µL de solução de extração e no gelo. Foram testadas 3 diferentes tampões de extração: tampão salino (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, pH 7,5); tampão sacarose (700 mM sacarose, 500 mM Tris, 100 mM KCl, pH 8,0); e o tampão Fosfato de sódio (Tampão Fosfato 1,0 M, pH 7,0, PVP-40 7,5%, β-mercaptoetanol 0,75%, 10% glicerol e sílica 0,2 mg). As amostras foram centrifugadas a 12000 r.p.m. por 30 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes de cada amostra foram separados em alíquotas de 35 µL, para testar a eficácia de amostras congeladas uma parte foi congelada, e a outra parte e misturada com 10µL do tampão das amostras (Tris HCl 0,24 M, pH 6,8, glicerol 20 %, β-mercaptoetanol 2 %, SDS 2 %, e azul de bromofenol 0,01 %). Uma parte das amostras misturadas ao tampão das amostras foi submetida à fervura em banho-maria por 3 minutos. As amostras foram aplicadas no gel SDS-PAGE, e foram testadas três voltagens para a corrida 100, 150 e 170 V, a fonte foi desligada quando o front do corante chegasse ao final do gel. Para a coloração dos géis foi utilizado o método com *Coomassie blue*.

Resultados e Discussão

A melhor condição para a extração de proteínas de calos foi obtido com a solução preparada com Fosfato de sódio e demais reagentes conforme descrito em materiais e métodos, estas amostras apresentaram melhor definição das bandas no gel (Figura 1). As amostras fervidas em banho-maria por 3 minutos apresentaram maior definição no gel do que as não fervidas (Figura 2). As amostras de calos cultivados em diferentes concentrações de 5-Azac e em diferentes tempos de cultivo apresentaram padrões de bandas semelhantes nos géis. A melhor condição de voltagem foi a 170 volts. A 5-AzaC parece não ter efeito sob a expressão dos genes codificantes para cadeias polipeptídicas de calos de *C. peruvianus* coradas com coomassie blue (Figura 3). O coomassie blue detecta as proteínas mais

abundantes, enquanto que as menos abundantes são visualizadas com a coloração de prata, esta última é mais sensível podendo detectar até 10 ng de proteínas em uma banda (ALBERTS, et al. 2017).

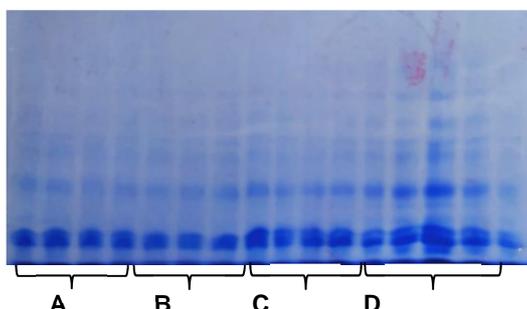


Figura 1. Gel SDS-PAGE com amostras de calos de *C. peruvianus* maceradas com diferentes soluções de extração. A- tampão das amostras; B- tampão salino; C- tampão sacarose e D- tampão Fosfato de sódio.

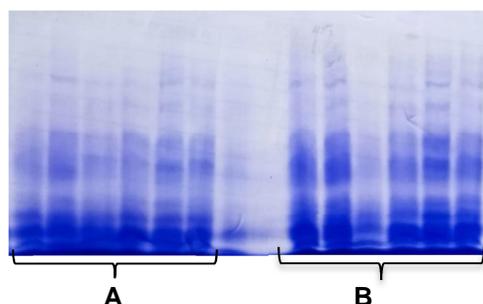


Figura 2. Gel SDS-PAGE com amostras de calos de *C. peruvianus*, em A- amostras não fervidas; B- amostras fervidas em banho maria.

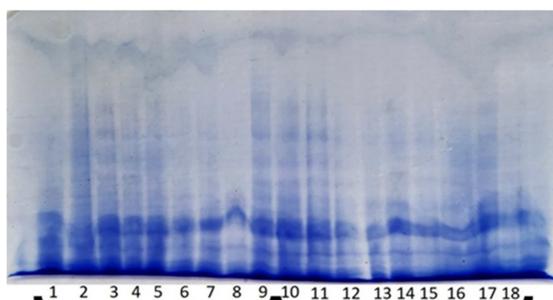


Figura 3. Gel SDS-PAGE de calos de *C. peruvianus*. Amostras de 1 a 9 são congeladas e de 10 a 18 são recém-maceradas. 1- Controle; 2 e 3 - 50mM; 4 e 5 - 100mM; 6 e 7 - 150mM; 8 e 9 - 200mM; 10- Controle; 11 e 12 - 50mM; 13 e 14 - 100mM; 15 e 16 - 150mM; 17 e 18 - 200mM. As amostras ímpares foram inoculadas em meio com 5-Azac por 35 dias e as amostras pares por 85 dias.

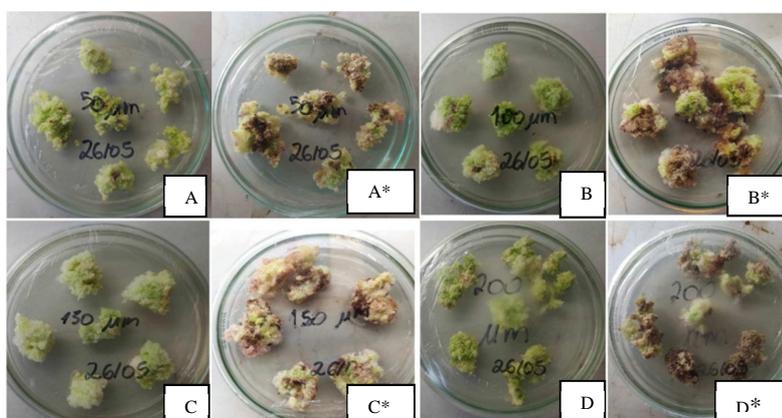


Figura 4. Calos de *C. peruvianus* cultivados em meio MS com diferentes concentrações de 5-AzaC. Em A 50mM.; em B 100mM; em C 150mM e em D 200mM. O * indica 40 dias após a inoculação.

Os calos de *C. peruvianus* cultivados por 40 dias em todas as concentrações testadas de 5-AzaC apresentaram muitos setores oxidados (Figura 4). Estes resultados indicaram que concentrações acima de 50 mM de 5-AzaC podem ser tóxicas para os calos de *C. peruvianus*.

Conclusões

- A melhor solução de extração para os calos de *C. peruvianus* foi a preparada com tampão fosfato de sódio 1M, pH 7;
- As amostras de calos de *C. peruvianus* para eletroforese SDS-PAGE não podem ser guardadas congeladas e devem ser fervidas em banho-maria;
- As diferentes concentrações de 5-AzaC e diferentes tempos de cultivo testados neste trabalho parecem não ter efeito sob a expressão das cadeias polipeptídicas de calos de *C. peruvianus* coradas com coomassie blue;
- Concentrações menores que 50 mM de 5-AzaC devem ser testadas, as maiores promoveram oxidações nos calos de *C. peruvianus*;
- A coloração com prata deve ser testada para os calos submetidos às mesmas condições.

Agradecimentos

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

Referências

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAAF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. Trad: Simonetti, A.B. et al., 6ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul Ltda. 2017.

JAIN, S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v.118, p.153- 166, 2001.

OLIVEIRA, S.A.; MACHADO, M.F.P.S.; PRIOLI, A.J. e MANGOLIN, C.A. In vitro propagation of *Cereus peruvianus* mill. (Cactaceae). **In Vitro Cell Dev. Biol.** 31:47-50, 1995.