



XXXI Congresso de
Iniciação Científica
Unicamp

2023



O VALPROATO DE SÓDIO AFETA A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM RAÍZES DE *ALLIUM CEPA*

Palavras-chave: *Allium cepa*; VPA; deacetilases de histonas; divisão celular.

Autores: Marcella Brancaccio, Eli H.M. dos Anjos, Maria Luiza S. Mello

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas
(SP)

RESUMO

É conhecida a ação do valproato de sódio (VPA) sobre células animais no tratamento de doenças neurológicas e como modulador de marcas epigenéticas, atuando como inibidor de deacetilases de histonas (HDACs) e reduzindo a proliferação celular em alguns tumores. Embora HDACs possam ocorrer em células vegetais, estas não são todas idênticas às das células animais e desconhece-se se o efeito do VPA sobre a proliferação celular igualmente aconteceria em células de plantas. Bulbos de *Allium cepa* mantidos em contato com solução aquosa de VPA por 264 h mostraram pouco ou nenhum crescimento de raízes. Sob tratamento com VPA por 48 h, o ciclo celular meristemático revelou drástica redução em metáfases, possivelmente porque o complexo ciclina-quinase que induz o avanço de prófase em metáfase tenha sido afetado. Abre-se uma perspectiva para que investigações futuras busquem o conhecimento de como as HDACs e proteínas do ciclo celular de plantas possam ser afetadas sob a ação do VPA.

INTRODUÇÃO

Deacetilases de histonas (HDAC) são enzimas que atuam em equilíbrio com acetiltransferases de histonas (HAT), regulando a acetilação dinâmica e reversível de histonas, modificando a estrutura e a função da cromatina e permitindo a transcrição gênica (Ma et al. 2013). A hipoacetilação de histonas mediada por HDAC permite o bloqueio da acessibilidade dos fatores de transcrição em genes-alvo, levando à repressão ou silenciamento de genes (Hollander & Liu 2008; Ma et al. 2013). De início identificadas em células animais, incluindo-se células humanas, recentemente foram identificadas em células vegetais como as de milho, arroz, cevada, batata, uvas, tabaco e *Arabidopsis* HDACs não precisamente idênticas às de células animais (revisão em Ma et al. 2013).

A expressão das HDACs em vegetais se dá em vários tecidos, incluindo-se raízes. Uma HDAC presente em plantas, a ZmHDA108 se expressa quando as células meristemáticas entram na fase S do ciclo celular (Lechner et al. 2000; Ma et al. 2013).

Em células humanas, HDACs são inibidas por drogas como o ácido valproico ou seu sal sódico (VPA) e a tricostatina A (TSA). Células tumorais tratadas com VPA demonstram redução em sua proliferação e indução de morte celular (Mello 2021). Uma vez que HDACs estão envolvidas no desenvolvimento de raízes e que a acetilação de histonas afeta a expressão de genes nesses tecidos (Xu et al. 2005), questiona-se se a proliferação celular em raízes poderia ser afetada em presença de VPA.

Neste trabalho, o crescimento de raízes e fases do ciclo celular de *Allium cepa* foram acompanhados em presença de VPA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seis bulbos de *Allium cepa* cultivados de forma orgânica e sem agrotóxicos em Piedade (São Paulo, Brasil), adquiridos no início do mês de abril de 2023, foram utilizados. Três bulbos tiveram sua extremidade em contato com uma solução aquosa de valproato de sódio 10 mM (VPA) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA, filtrada em filtro estéril de 0,22 µm. Três bulbos cuja extremidade foi mergulhada em água de torneira, representaram o grupo controle. Os bulbos foram mantidos no escuro a 25°C a fim de avaliar o crescimento radicular em cada condição experimental por 48 h, tiveram as raízes retiradas para avaliação de fases do ciclo celular, e foram mantidos nas mesmas condições de temperatura e luminosidade por 264 h. O número de bulbos utilizado se baseou em relato publicado (Barbério et al. 2011).

As raízes dos bulbos retiradas após 48 h foram medidas quanto ao comprimento e fixadas em etanol absoluto-ácido acético glacial (3:1, v/v) por 30 min, lavadas e armazenadas

em álcool 70% na geladeira por 96 h. Os bulbos que permaneceram por mais tempo em ambiente controlado de temperatura e luminosidade tiveram suas raízes retiradas, medidas e fotografadas.

Para avaliação do ciclo celular, as raízes foram submetidas à reação de Feulgen segundo Mello e Vidal (2017) e contra coradas com solução ácida de Fast Green 0,1%, seguido de três lavagens com solução de ácido acético a 3% em pH 2,7. Posteriormente, as raízes foram esmagadas levemente para espalhamento suave das células em lâminas de vidro com auxílio de lamínulas de vidro. As lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido e os esmagamentos secados ao ar. O material foi diafanizado em xilol (Synth, Diadema, SP, Brasil) por 15 min e montado em bálsamo natural (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil).

Cada lâmina foi analisada individualmente em microscópio de luz Nikon e 2000 células foram contabilizadas a partir de campos microscópicos escolhidos de forma aleatória, permitindo analisar quais e quantas fases do ciclo celular se achavam presentes.

RESULTADOS

Os comprimentos das raízes em cada condição experimental são apresentados nas Tabelas 1 e 2. O bulbo controle de código 1 não apresentou crescimento de raiz após as primeiras 48 h.

Tabela 1. Comprimentos das raízes de *Allium cepa* crescidas por 48 h à temperatura ambiente.

Itens	Código do bulbo	No. de raízes	Comprimento das raízes (cm)			
			Mínimo	Máximo	Média	SD
Controle	1	0	0	0	0	0
	2	4	0,40	0,60	0,50	0,10
	3	4	0,20	0,60	0,40	0,20
VPA 10 mM	1	3	0,30	0,40	0,37	0,06
	2	3	0,10	0,60	0,30	0,30
	3	4	0,10	0,30	0,20	0,01

SD, desvio padrão

Após 264 h em que os bulbos foram colocados em contato com as soluções aquosas observou-se que aqueles em contato com VPA exibiam pouco ou nenhum crescimento de raízes, ao contrário dos controles (Tabela 2).

Tabela 2. Comprimento das raízes de *Allium cepa* crescidas por 264 h à temperatura ambiente.

Itens	Código do bulbo	No. de raízes	Comprimento das raízes (cm)			
			Mínimo	Máximo	Média	SD
Controle	1	23	0,5	11,5	6,1	3,2
	2	57	0,1	9,7	4,6	2,5
	3	55	0,4	9,7	5,4	3,0
VPA 10 mM	1	1	1,5	1,5	1,5	0,0
	2	4	0,8	1,3	1,0	0,3
	3	∅	∅	∅	∅	∅

A análise das imagens celulares em mitose nas raízes cultivadas por 48 h em solução de VPA ou água demonstrou predominância de células em prófase. No entanto, o percentual de células em metáfase decresceu de modo drástico sob a ação do VPA, embora anáfases e telófases não tragam elementos conclusivos de diminuição com o tratamento pela droga por causa de sua variabilidade. (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência de células em mitose em raízes de *Allium cepa* crescidas nos grupos controle e VPA.

Itens	Código do bulbo	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
Controle	1	∅	∅	∅	∅
	2	97 (72,3%)	14 (10,4%)	11 (8,2%)	12 (8,9%)
	3	127 (55,7%)	38 (16,66%)	19 (8,23%)	44 (19,29%)
VPA 10mM	1	100 (77,5%)	1 (0,77%)	8 (6,2%)	20 (15,5%)
	2	121 (63,35)	11 (5,75%)	23 (12,04%)	36 (18,84%)
	3	196 (77,7%)	17 (6,74%)	7 (2,77%)	32 (12,69%)

CONCLUSÃO

À semelhança do que ocorre em células animais, pôde ser demonstrado pela primeira vez que o VPA interfere com a proliferação celular em tecidos vegetais, o que foi observado pelo pouco ou nenhum crescimento das raízes de *Allium cepa* quando em contato por tempos mais longos com a droga (264 h). Como o percentual de metáfases decresceu de modo drástico com o tratamento pelo VPA, possivelmente o complexo ciclina-quinase que induz o avanço de prófase em metáfase tenha sido afetado pela ação da droga. Se isto se deve à inibição de HDACs e em proteínas que controlam o ciclo celular, trabalhos futuros precisarão investigar a atuação dessas enzimas e de proteínas que inibem os complexos ciclina-quinases sob a ação do VPA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbério A, Voltolini JC, Mello MLS. *Ecotoxicology* 20(4): 927-935, 2011.
Hollender C, Liu Z. *J Integr Plant Biol* 50: 875-885, 2008.
Lechner T, Lusser A, Pipal A et al. *Biochemistry* 39: 1683-1692, 2000.
Ma X, Lv S, Zhang C, Yang C. *Plant Cell Rep* 32: 465-478, 2013.
Mello MLS. *Front Cell Dev Biol* 9: G, Loidl A, Goralik-Schramel M, 645518, 2021.
Mello MLS, Vidal BC. *Acta Histochem* 119(6): 603-609, 2017.
Xu CR, Liu C, Wang YL et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 14469-14474, 2005.

Financial support: FAPESP (2015/10356-2), CNPq: 304797/2019-7.