

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LECTINA(S) EM SEMENTES DE *Swartzia ingifolia*

Rafael Menezes MONTEIRO¹; Andreia Varmes FERNANDES²; José Francisco de Carvalho GONÇALVES³

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Orientadora CDAM/INPA; ³Co-orientador CDAM/INPA

1. Introdução

Uma das prováveis classes de proteínas responsáveis pela defesa vegetal são as lectinas (Peumans e Van Damme 1995). Essa classe protéica foi inicialmente descrita por Hermann Stillmaker (1888), quando se percebeu que extratos de sementes de *Ricinus communis* aglutinavam eritrócitos. Deste então, vários estudos científicos vêm caracterizando estrutural e funcionalmente as lectinas (Stillmaker 1888; Sharon e Lis 2004; Lam e Ng 2011; Fernandes *et al.* 2012; De Souza Lima *et al.* 2013).

Conceitualmente as lectinas são descritas como sendo um grupo de proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica capaz de se ligar reversível e especificamente a carboidratos sem ocasionar quaisquer mudanças nessas moléculas (Gatehouse *et al.* 1995; Peumans e Van Damme 1995; Fernandes *et al.* 2011; Fernandes *et al.* 2012; De Souza Lima *et al.* 2013).

Grande parte das lectinas em estudo é proveniente de sementes da família botânica Fabaceae, compreendendo um grupo de proteínas estruturalmente semelhantes. Embora elas difiram pela especificidade a carboidratos, as lectinas são similares físico-quimicamente, apresentando massa molecular de aproximadamente 25 a 30 kDa, com um domínio de ligação a metais (Ca²⁺ e Mn²⁺) por subunidade, além de apresentarem estabilidade a variações de temperatura e pH (Peumans e Van Damme 1995; Varki *et al.* 1999).

A espécie *Swartzia ingifolia*, popularmente conhecida como coração de negro, é uma espécie da Fabaceae pertencente à subfamília Faboideae, tribo Swartzieae. A partir de estudos desta genealogia botânica tem sido encontradas lectinas ainda não descritas na literatura (Fernandes *et al.* 2012). Portanto, este estudo visa identificar e caracterizar a(s) lectina(s) nas sementes de *Swartzia ingifolia* a fim de se obter uma molécula com potencial biotecnológico, agregando valor às espécies arbóreas amazônicas. E ainda, por meio dos resultados obtidos, contribuir para o entendimento das relações evolutivas de lectinas na família Fabaceae.

2. Material e Métodos

Para a obtenção do extrato protéico, sementes inteiras e maduras de *Swartzia ingifolia*, foram trituradas em moinho analítico de facas até obtenção de um material pulverizado e, homogeneizado em solução salina de NaCl 0,15 M. A suspensão (10% p/v) foi mantida sob leve agitação, a temperatura ambiente, durante 2 horas e centrifugada a 11.000 x g durante 20 minutos a 10 °C. O sobrenadante foi dialisado contra água destilada durante 48 horas, a temperatura de 4 °C, e liofilizado até a obtenção de uma massa totalmente seca (Cavalcanti e Coelho 1990).

A fim de avaliar a atividade hemaglutinante (AHE), amostras de 3 mL de sangue, obtidas de animais saudáveis (rato branco e coelho), foram coletadas e homogeneizadas com 30 µL de heparina. O sangue foi transportado em gelo para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV/CDAM) e, lavado com NaCl 0,15 M a 3.000 rpm, 10 minutos a 4 °C. Esse procedimento foi repetido três vezes. O precipitado foi ressuspenso em NaCl 0,15 M, de modo a obter uma suspensão final de eritrócitos a 2% v/v (Moreira e Cavada 1984).

A AHE foi determinada pelo método de diluição seriada em placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços; inicialmente, a cada um dos poços adicionou-se 25 µL da solução salina (NaCl 0,15 M), em seguida 25 µL da amostra (extrato protéico na concentração 5 mg / mL em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 adicionado de NaCl 0,15 M) no primeiro poço e, nos demais seguiu-se com a diluição seriada até o último poço, por último foram adicionados em cada poço 25 µL da suspensão de eritrócitos nativos a 2% v/v, posteriormente as placas foram incubadas durante 30 minutos a 37 °C e os resultados foram analisados por diagnose visual após 30 minutos e 12 horas após o período de incubação em temperatura ambiente (Moreira e Perrone 1977).

A fim de fracionar o extrato protéico de *Swartzia ingifolia*, optou-se por cromatografia de troca aniônica, onde o extrato protéico de *Swartzia ingifolia* foi aplicado em uma coluna de troca aniônica DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare). A resina (20 mL) foi empacotada em uma coluna de poliestireno com dimensões 1,5 x 12 cm e equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. O extrato protéico (2,5 mg / mL em Tris-HCl 0,05 M pH 8,0) de *Swartzia ingifolia* foi aplicado na coluna, sendo coletadas frações de 2,0 mL. A eluição foi realizada por meio da aplicação de gradiente salino utilizando os tampões Tris-HCl 0,05 M com pH 8,0 contendo NaCl 0,1 M; 0,3 M; 0,6 M e NaCl 1 M e, coletadas frações de 2 mL. Posteriormente foram realizadas leituras espectrofotométricas no comprimento de onda igual a 280 nm (Espectrofotômetro UV/Visível Ultrospec 2100 Pro, Armesham Biosciences). Nas frações correspondentes a cada pico foram realizados ensaios da AHE.

Identificada a presença de lectinas e sua afinidade a carboidratos da serie galactose, aplicou-se o extrato protéico em uma resina de afinidade: α – Lactose - Agarose (SIGMA) empacotada em coluna de vidro (2 x

31 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, CaCl₂ 0,005 M e MnCl₂ 0,005 M. O extrato protéico (2,5 mg / mL Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, CaCl₂ 0,005 M e MnCl₂ 0,005 M) de *Swartzia ingifolia* foi aplicado na coluna e coletadas frações de 2,0 mL. A eluição das proteínas retidas foi conseguida com solução de glicina 0,1 M, pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M e, coletadas frações de 4 mL. O monitoramento do perfil cromatográfico foi realizado por meio de leituras espectrofotométricas no comprimento de onda igual a 280 nm. Nas frações correspondentes a cada pico foram realizados ensaios da AHE.

O ensaio de inibição da AHE frente a diferentes carboidratos foi realizado como previamente descrito por Ramos (1997). Os extratos proteicos (5 mg / mL em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 adicionado de NaCl 0,15 M) que apresentaram AHE, sob as condições testadas, foram incubadas com concentrações decrescentes de carboidratos (100 mM) e posteriormente, adicionou-se a cada poço uma suspensão de eritrócitos nativos a 2% v/v nas placas de microtitulação. As placas foram incubadas durante 30 minutos a 37 °C e os resultados foram em seguida analisados por diagnose visual.

Para avaliarmos a pureza da amostra e podermos estimar a massa molecular das proteínas, segundo o método de Laemmli (1970), foram preparados géis de poliacrilamida (SDS – PAGE). Os marcadores de massas moleculares da Promega (220 kDa - 10 kDa) foram utilizados.

Após a eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue com ácido acético 0,1% v/v, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5 durante 2 horas e então, descorados em solução de ácido acético glacial, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5.

Para a eletroforese em gel de poliacrilamida 2D, a focalização isoeletrica, foi realizada utilizando o equipamento IPGphor (Ettan IPGPhor 3/GE Healthcare). Amostras, de um dos picos provenientes da cromatografia de troca iônica, contendo 50 µg de fração protéica, foram diluídas em um volume final de 250 µL em solução de reidratação (DeStreak™ rehydration solution/GE Healthcare) com 2% v/v de tampão IPG pH 3 a 10. As amostras foram aplicadas nas fitas com gradiente de pH imobilizado (IPG) (13-cm pH 3 a 10 linear; GE Healthcare) para reidratação. A reidratação passiva foi feita a 50 µL durante 12 h a 20 °C. As fitas foram estocadas a -80 °C durante 24 h e posteriormente aplicadas diretamente sobre o gel para a realização da segunda dimensão. Após a FI, as fitas foram equilibradas em tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M uréia, 30% v/v de glicerol, 2% p/v de SDS e traço de azul de bromofenol) contendo 10 mg / mL ditioneína (DTT) durante 20 minutos. E em uma segunda etapa, com tampão de equilíbrio contendo 25 mg / mL de iodoacetamida durante mais 20 minutos. Finalizada a FI, a separação na segunda dimensão foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 % p/v em condições desnaturantes, nas seguintes condições: P1- 600 V, 30 ml por gel, 30 W durante 30 minutos e P2 – 600 V, 40 ml por gel, 30 W durante 4 horas.

Os pontos de proteína no gel foram visualizados após tratamento com 0,1% p/v de solução de Coomassie Brilliant Blue R-250. O gel foi escaneado usando o programa Imager Scanner (Amersham Biosciences), usando ferramentas do programa LabScan. Todos os detalhes do gel individual e as análises comparativas foram realizadas por meio do programa Image-Master 2D Platinum Software 6.0 (Amersham Biosciences).

3. Resultados e Discussão

O extrato protéico das sementes de *Swartzia ingifolia* apresentou hemólise para o sangue de todos os animais testados (coelho, rato branco, hamster e camundongo), dificultando a identificação de lectina(s) na amostra, visto que para ocorrer a hemaglutinação é necessária a integridade dos eritrócitos. A ocorrência de hemólise pode ser atribuída à desestruturação de proteínas e fosfolípidios presentes na membrana do eritrócito (Ribeiro e Jorge 2004). Essa atribuição do processo hemolítico foi dada as saponinas devido a sua interação com esteróis presentes na membrana plasmática de eritrócitos, aumentando a permeabilidade dessa membrana, o que permite a entrada de íons e água para o interior da célula resultando na ruptura da mesma (Marqui *et al.* 2008).

A fim de avaliar o perfil protéico do extrato das sementes de *Swartzia ingifolia* foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições redutoras, onde não se visualizou um padrão de bandas específicas.

No sentido de fracionar o extrato protéico obtido a partir das sementes de *Swartzia ingifolia*, a amostra foi aplicada em uma coluna de troca aniônica em resina de DEAE – Sepharose Fast Flow (Figura I).

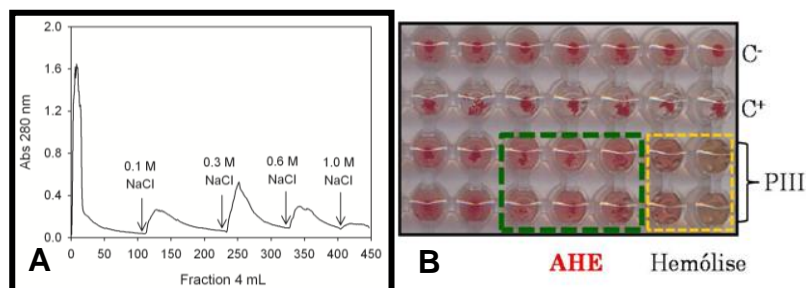


Figura I: Cromatograma de troca aniônica do extrato de *Swartzia ingifolia* em uma coluna de DEAE Sepharose Fast Flow e determinação da AHE do PIII – 0,3 M NaCl. A- Para a análise, 20 mL (2,5 mg /

mL) da amostra foram aplicados a uma coluna de DEAE (20 mL) pré-equilibrada com 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0. O pico não retido (PI) foi eluído com o mesmo tampão; enquanto PII, PIII, PIV e PV foram eluídos por gradiente salino de NaCl (0,1, 0,3, 0,6 e 1,0 M), tal como indicado pelas setas. As frações (4 mL) foram coletadas a uma taxa de fluxo de 0,5 mL / min e monitoradas espectrofotometricamente a 280 nm. B- Hemaglutinação do PIII 0,3 M NaCl do extrato de *Swartzia ingifolia* foi separado por cromatografia de troca iônica e determinada usando eritrócitos de coelho 2% v/v. C- - controle negativo (ausência de amostra); C+ - controle positivo: extrato protéico de *Parkia platycephala* (reconhecidamente aglutinar eritrócitos de coelho 2% v/v). As amostras foram aplicadas em diluição seriada.

Entre os cinco picos protéicos do extrato de *Swartzia ingifolia* obtidos de DEAE Sepharose Fast Flow (Figura 1 - A), a AHE foi observada somente para as frações eluídas com NaCl 0,3 M (PIII) (Figura 1 - B). Esses resultados demonstram que foi possível separar moléculas que provocam hemólise, sendo possível visualizar AHE.

A fim de se identificar a afinidade da provável lectina presente nas frações obtidas de DEAE Sepharose Fast Flow dos extratos protéicos de *Swartzia ingifolia*, fez-se o ensaio de inibição da AHE com açúcares simples e o pico PIII 0,3 M NaCl apresentou forte inibição da AHE por D-galactose (< 0,01 M) e α -lactose (< 0,01 M).

Com base no resultado de inibição da AHE das frações cromatográficas obtidas de DEAE Sepharose Fast Flow, o extrato de *Swartzia ingifolia* foi aplicado em uma coluna de afinidade α - Lactose - Agarose (20 mL). Porém, nenhuma fração protéica do extrato interagiu com essa resina de afinidade. Em seguida, somente o PIII 0,3 M NaCl de *Swartzia ingifolia* foi aplicado na coluna de α - Lactose - Agarose (5 mL) e, da mesma forma não houve fração protéica retida.

A fração PIII 0,3 M NaCl de *Swartzia ingifolia* obtida de DEAE Sepharose Fast Flow foi submetida à análise em eletroforese por SDS-PAGE a fim de observar o perfil protéico daquelas frações que exibiram AHE (Figura 1).

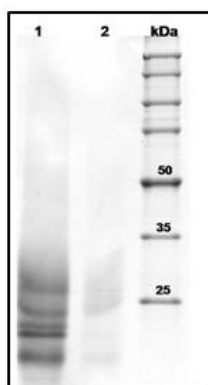


Figura 2. Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% p/v, em condições redutoras, do extrato de *Swartzia ingifolia* e das frações protéicas de PIII 0,3 M NaCl. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250. 1 - Extrato protéico de *Swartzia ingifolia* (10 μ g); 2 - PIII 0,3 M NaCl (+ AHE) de *Swartzia ingifolia* em DEAE Sepharose Fast Flow; kDa- Unidade de massa atômica.

Não foi visualizado, claramente, um padrão de bandas específico nessa fração protéica (Figura 2), assim como no perfil eletroforético do extrato protéico. Mesmo com os resultados obtidos até então, o PIII 0,3 M NaCl de *Swartzia ingifolia* foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional, a fim de identificar isoladamente as proteínas presentes nessa fração protéica (Figura 3).

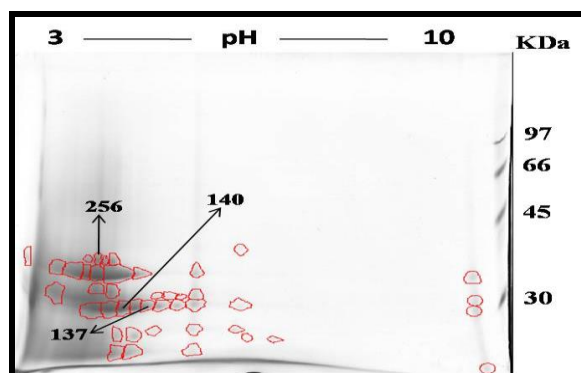


Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% p/v 2D das frações do PIII 0,3 M NaCl de *Swartzia ingifolia* obtidas de DEAE Sepharose. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração com 0,1% p/v de Coomassie Brilliant Blue R-250. Amostra de 30 μ g de proteína foi aplicada na fita para ser

focalizada. Os pontos protéicos nos quais os peptídeos foram seqüenciados e analisados e que apresentaram homologia com lectinas de espécies da família Fabaceae são indicados. Os pontos protéicos nos quais os peptídeos foram seqüenciados e analisados e que apresentaram homologia com lectinas de espécies da família Fabaceae são indicados.

Peptídeos identificados no banco de dados Mascot® do gel 2D nos pontos protéicos das frações do PIII 0,3 M NaCl de *Swartzia ingifolia* obtidas de DEAE Sepharose, seqüenciados por espectrometria de massa (ESI-QTOF) apresentaram homologia com lectinas de espécies da família Fabaceae. Essas espécies, pertencentes a tribo Sophora, são: *Sophora flavescens*; *Sophora alopecuroides* e *Sophora japonica*. Confirmando a presença de lectinas nas sementes de *Swartzia ingifolia*.

4. Conclusão

A maior prevalência de bandas protéicas com massa molecular aparente entre 10 e 30 kDa, sugere a presença de lectinas nos extratos das espécies estudadas.

A ocorrência de hemaglutinação das frações do PIII da cromatografia de troca iônica em resina de DEAE Sepharose Fast Flow do extrato protéico e a inibição da AHE com α -lactose e D-galactose confirmam a presença de lectinas.

Eletroforese em gel de poli(acrilamida 12,5% p/v) 2D das frações do PIII 0,3 M NaCl reforçaram a presença de lectinas presentes no extrato protéico de *Swartzia ingifolia*.

5. Referências Bibliográficas

- Cavalcanti, M.S.M.; Coelho, L.C.B.B. 1990. Isolation and partial purification of a lectin from *Swartzia pickellii* Killip (white jacaranda). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85: 371-372.
- Lima, H.S.; Santana, A.A.; Souza, N.S.; Rosa, I.G. 2013. Plant lectins: na exploration of the species *Artocarpus integrifolia* L. *Acta Brazilian Science*, 1: 13-30.
- Fernandes, Andreia Varmes; Ramos, M.V.; Gonçalves, J.F.C.; Maranhão, P.A.C.; Chevreuril, L.R.; Souza, L.A.G. 2011. Seeds of Amazonian Fabaceae as a source of new lectins. *Braz. J. Plant Physiol*, 23(3): 237 – 244.
- Fernandes, Andreia Varmes; Ramos, M.V.; Vasconcelos I.M.; Moreira A.C.; Moreno F.B.; Pereira J.O.; Gonçalves, J.F.C.; 2012. Purification and Characterization of a Lectin of the Swartzieae Legume Taxa. *Protein and Peptide Letters*, 19: 1082-1088.
- Gatehouse, A.M.R.; Powell, K.S.; Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M.; Gatehouse, J.A. 1995. Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection. *Biomedical Perspectives*, 1: 35-37.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lam, S.K.; Ng, T.B. 2011. Lectins: production and practical applications. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 89: 45-55.
- Marqui, S.R.; Lemos, R.B.; Santos, L.A.; Gamboa, I.C.; Cavalheiro, A.J.; Bolzani, V.S.; Silva, D.H.S. 2008. Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*. *Química Nova*, 31: 828-831.
- Moreira, R.A.; Cavada, B.S. 1984. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. *Biologia Plantarum*, 26: 113-120.
- Moreira, R.A.; Perrone, J.C. 1977. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*, 59: 783-787.
- Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol*, 109:347-352.
- Ramos, M.V. 1997. Biosynthesis and structural lectin features of the Phaseoleae, Diocleinae and the Viciae (Leguminosae = Fabaceae) under a phylogenetic perspective. *Journal of Comparative Biology*, 2: 129-136.
- Ribeiro, J.; Jorge, R.A. 2004. Análise das propriedades anticancerígenas de meso – tetramesitilporfirina empregando métodos espectroscópicos. *Revista Analytica*, 10: 43 – 49.
- Sharon, N.; Lis, H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11): 53-62.
- Stillmaker, H. 1888. *Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen*. Tese de Doutorado. University of Dorpat, Estônia.
- Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G.; Marth, J. 1999. *Essential of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. La Jolla, California, 572p.