

Determinação da Constante de Afinidade da Lectina ArtinM-Célula Leucêmica (NB4) por meio da Técnica Piezoelétrica de Microbalança a Cristal de Quartzo (QCM)

Denise Cristina Martins¹, Fernanda Caroline Carvalho¹, Maria Cristina Roque Barreira², Paulo Roberto Bueno¹

¹Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Departamento de Físico-Química
– CEP 14800-900, Araraquara – SP - E-mail: denisebcm86@gmail.com

²Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos -
CEP: 14049-900 Ribeirão Preto – SP

RESUMO

*A técnica de microbalança a cristal de quartzo (QCM) foi utilizada para estudar as constantes de afinidade da lectina ArtinM nativa, das sementes de *Artocarpus heterophyllus* (Jaca), com células NB4 da leucemia promielocítica aguda, uma vez que a ArtinM promove efeito citotóxico sobre essas células. Para tanto, a lectina ArtinM foi imobilizada em superfícies metálicas de Au por meio da formação de uma monocamada auto-organizada utilizando uma mistura de dois alcanotiós, o ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) e o 6-mercaptoetanol (C6OH). As várias concentrações de células leucêmicas foram deixadas em contato com a lectina imobilizada para que ocorressem as interações desejadas. As medidas foram avaliadas utilizando-se QCM e foi determinada a constante de afinidade. O valor desta constante foi comparado com o valor da constante relacionada à interação ArtinM recombinante-NB4. As diferenças entre estas constantes podem estar relacionadas com a distinta citotoxicidade da ArtinM nativa e recombinante sobre as células NB4.*

Palavras chave: ArtinM, lectina, QCM, leucemia, NB4.

INTRODUÇÃO

As lectinas, proteínas ou glicoproteínas ligantes de carboidratos, possui distribuição ubíqua na natureza e são capazes de decodificar informações biológicas por meio da ligação específica a açúcares¹. Estudos mostraram que algumas lectinas vegetais possuem uma maior habilidade de se ligarem às células tumorais em comparação às células normais, pois se ligam mais facilmente às glicoproteínas alteradas da superfície das células tumorais, e essa interação pode induzir a morte ou inibir o crescimento celular.². Neste trabalho demos destaque a lectina vegetal, ArtinM, presente nas sementes de *Artocarpus heterophyllus* (jaca). À ArtinM são atribuídas atividades como imunoestimulação e imunomodulação para o perfil Th1³, regeneração

tecidual⁴ e atividade citotóxica sobre células leucêmicas⁵. Estas atividades estão relacionadas com a capacidade da lectina em reconhecer N-glicanas de receptores celulares.

O estudo da interação lectina-carboidrato pode ser realizado por meio do desenvolvimento de superfícies de reconhecimento, que são capazes de decodificar os processos de reconhecimento molecular em sinais mensuráveis, auxiliando no estudo e na caracterização de eventos biológicos^{6,7,8}. Superfícies de reconhecimento podem ser criadas por meio da imobilização do material biológico em uma membrana adequada, que é acoplada junto à superfície do transdutor, o qual monitora as reações e/ou associações que ocorrem entre o material biológico imobilizado e o material de interesse⁹.

Para o desenvolvimento da superfície de reconhecimento foi utilizada a técnica de QCM, que é baseada no fenômeno da piezoelectricidade, o qual consiste na capacidade que alguns cristais possuem de gerar um campo elétrico quando os mesmos sofrem algum estresse mecânico ou o efeito oposto - a aplicação de uma voltagem sobre o cristal provocando distorções físicas no mesmo¹⁰. Esta técnica é direta (sem marcadores) e altamente sensível.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a interação ArtinM purificada a partir da semente da jaca (jArtinM)-NB4 para a obtenção da constante de afinidade, por meio da técnica de microbalança a cristal de quartzo (QCM) e comparar este valor com os dados da constante de afinidade para a interação ArtinM recombinante-NB4 que utilizou a mesma técnica.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a construção da superfície de reconhecimento, imobilização da lectina ArtinM, foi utilizada a técnica de monocamadas auto-organizadas (SAM – “*self-assembled monolayer*”), utilizando uma mistura de dois alcanotóis (ácido 11-mercaptopundecanoico e 6-mercaptopetanol). Esta imobilização permitiu que a biomolécula ficasse fixada sobre a superfície condutora de uma maneira estável e com a manutenção de sua propriedade biológica de reconhecimento. O cristal de quartzo com a ArtinM imobilizada foi colocado na QCM, foram injetadas várias concentrações de solução de NB4 e a interação lectina-célula leucêmica foi monitorada pela técnica de QCM. Com isso, foi possível relacionar a variação de frequência na oscilação no cristal de quartzo e a variação de massa na superfície do mesmo, pois com a ocorrência da interação ArtinM-NB4, a massa sobre a superfície do cristal aumenta e por consequência sua frequência de oscilação diminuiu de maneira proporcional a concentração de células aplicadas^{6,7,10}.

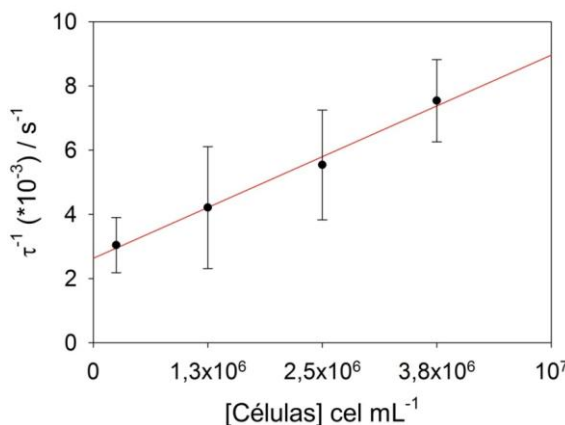
RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo utilizado para a determinação da constante de afinidade da interação ArtinM-NB4 foi o da isoterma de Langmuir.



A variação da frequência foi registrada em função do tempo para diferentes concentrações de NB4 adicionada a diferentes cristais de quartzo funcionalizados. Esses dados foram ajustados e foram obtidos os tempos de relaxação, τ , correspondentes a cada concentração de NB4 adicionada. As constantes de relaxação, τ^{-1} , definida pelo inverso do tempo de relaxação, foram esboçadas em função de cada concentração de NB4 adicionada a ArtinM. Por meio da razão entre o coeficiente angular e o linear da reta da Figura 1 foi determinada a constante de afinidade, K_a , da interação ArtinM-NB4.

Figura 1 – Isoterma de Langmuir linearizada para a interação ArtinM-NB4 obtida para o cálculo da constante de afinidade, K_a .



O valor da constante de afinidade obtido do estudo da interação jArtinM-NB4 neste trabalho foram comparados com os valores obtido no trabalho de Pesquero (2010) (ArtinM recombinante – rArtinM). O valor de K_a para a interação jArtinM-NB4 foi de $(1,8 \pm 1,1) \times 10^{-7}$ mL cel⁻¹ e para a interação rArtinM-NB4 foi de $(0,3 \pm 0,1) \times 10^{-7}$ mL cel⁻¹. Como é possível observar, o valor de K_a é maior para a primeira situação e isto pode estar relacionado à diferença na oligomerização da cadeia peptídica. Enquanto em ArtinM nativa os monômeros (13kD) se associam de forma não-covalente e originam tetrâmeros de 54 kD¹¹, rArtinM apresenta-se na forma monomérica. Possivelmente, a lectina nativa, por ser tetramérica, tem uma maior possibilidade de interagir com maior número de receptores da NB4 simultaneamente, gerando assim, um valor mais alto de K_a . Esses resultados vão de encontro ao fato de que rArtinM é pouco eficiente em induzir a citotoxicidade em células NB4⁶, sugerindo que haja a necessidade de um “cross-linking” de receptores para promoção do sinal de morte celular.

CONCLUSÕES

Foi possível determinar a constante de afinidade da interação ArtinM nativa-NB4 por meio da técnica de QCM e a comparação do valor desta constante com o da interação ArtinM

recombinante-NB4 mostrou a possível relação entre o valor de K_a e o poder citotóxico desta lectina.

REFERÊNCIAS

- (1) VAN-DAMME, E. Resumo apresentado no 20th International Lectin Meeting - Copenhagen - Dinamarca, maio de 2002.
- (2) GORELIK, E.; GALILI, U.; RAZ, A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev.** v.20, n.3-4, p. 245-277, 2001.
- (3) PANUNTO-CASTELO, A.; SOUZA, M.A.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; SILVA, J.S. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against Leishmania major antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology** v.12, p.1035-1042, 2001.
- (4) CHAHUD, F.; RAMALHO, L.N.Z.; RAMALHO, F.S.; HADDAD, A.; ROQUE-BARREIRA, M.C. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits. **Int. J. Exp. Path.** 2008.
- (5) CARVALHO, F. C.; SOARES, S. G.; TAMAROZZI, M. B.; REGO, E. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C. The recognition of N-Glycans by the lectin ArtinM mediates cell death of a human myeloid leukemia cell line. **Plosone**. v. 6, p. 1-10, 2011.
- (6) PEDROSO, M. M. **Estudo da interação lectina-carboidrato por meio da técnica de microbalança de cristal de quartzo**. 2006. 91 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química Analítica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.
- (7) PESQUERO, N. C. **Estudo da equivalência entre a lectina artin m obtida a partir da semente da jaca e a sua forma recombinante na afinidade por Glicanas**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- (8) STONES, J. D.; CHERVIN, A. S.; KRANZ, D. M. *T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity*. **Immunology**, v. 126, p. 165-176, 2009.
- (9) FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p. 28-39, jan. 1992.
- (10) DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, jul. 2004.
- (11) ROSA, J.C.; DE OLIVEIRA, P.S.; GARRATT, R.; BELTRAMINI, L.; RESING, K.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; GREENE, L.J. KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. **Protein Sci.** v.8, p.13-24, 1999.