

Purificação e Atividade Hemaglutinante das Lectinas de Sementes de *Crotalaria spectabilis* R.

Wilian Rosário de Oliveira¹, Evandro José Lima Rego², Paula Carvalhal Lage von Buettner Ristow³, Suzana Telles da Cunha Lima⁴

^{1,3,4}Universidade Federal da Bahia – Departamento de Biologia Geral
Caixa Postal S/n – CEP: 40170-290, Salvador – Bahia - E-mail: mestrewilian@hotmail.com

^{1,2}Universidade do Estado da Bahia – Departamento de Ciências Exatas e da Terra
Caixa Postal 59 – CEP: 48040-210, Alagoinhas - Bahia

RESUMO

*Lectinas são proteínas que se ligam com afinidade a resíduos de glicídios com capacidade de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. Essas proteínas são importantes porque estão envolvidas no processo de reconhecimento celular e sinalização em diversas vias metabólicas. O objetivo deste estudo foi isolar, purificar e investigar a atividade biológica das lectinas de *Crotalaria spectabilis* R. A extração foi feita das sementes, as quais foram moídas e suas células lisadas em solução NaCl 0,15 M. Seguiu-se precipitação protéica por acetona e sulfato de amônio. A partir dos dados da quantificação, observou-se que o método de precipitação salina apresentou maior rendimento de proteínas. Os ensaios de hemaglutinação foram positivos para atividade hemaglutinante. Assim, a partir dos dados obtidos concluímos que nas sementes de *C. spectabilis* R. existem lectinas com capacidade de reconhecer os receptores presentes na membrana dos eritrócitos humanos ligando-se a estes e promovendo a aglutinação celular.*

Palavras-chave: Especificidade, Hemaglutinação, Receptores.

INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas com capacidade de se ligarem especificamente a carboidratos e aglutinarem células. Nas plantas estão presentes em todos os órgãos, embora encontradas em maior quantidade nas sementes de leguminosas. Apresentam distribuição e atividade em todos os organismos vivos ocorrendo desde vírus até mamíferos^{1,2}, embora tenham sido pesquisadas em maior número em plantas^{3,4}. O objetivo da pesquisa foi isolar, purificar e investigar a atividade biológica das lectinas extraídas de sementes de *Crotalaria spectabilis* R., para que possam ser utilizadas como uma ferramenta molecular em áreas como oncologia, bacteriologia, virologia entre outras aplicações.

Dessa forma, pesquisas sobre a atividade biológica de lectinas das sementes de *Crotalaria spectabilis* R. são importantes para a compreensão de processos envolvidos no reconhecimento celular, para que funcionem como uma ferramenta molecular em novos estudos, assim como na descoberta de produtos biotecnológicos inovadores.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram trituradas 90 g de sementes de *Crotalaria spectabilis* R., em seguida, submetidas a extração salina com NaCl 0,15 M (1:10 p/v), após isto, parte do extrato, 130 ml, foi precipitado com acetona 80 % (v/v), a 4 °C. A outra parte, 130 ml foi precipitada com sulfato de amônio 80 % (v/v), a 4 °C nas mesmas condições. O pellet de ambos os extratos cetônico e com sulfato de amônio foi ressuspenso em tampão, 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0, seguindo centrifugação à 14000 rpm. Ambos os materiais foram dialisados contra água destilada por 24 h a 4 °C. Seguiu-se centrifugação de ambos os materiais a 14000 rpm, 4 °C, nas mesmas condições. O precipitado foi descartado e o sobrenadante liofilizado.

A seguir, as proteínas dos diferentes extratos obtidos durante as etapas de purificação foram quantificadas pelo método de Bradford⁵ e o SDS-PAGE⁶ à 12,5 % revelou o perfil destas proteínas.

Por fim, os ensaios de hemaglutinação foram realizados utilizando 50 µl de solução salina 0,15 M, por poço da placa de microtitulação. A seguir, foram adicionados 50 µl da lectina parcialmente isolada na primeira coluna da placa com 12 de poços. Diluíram-se, nas colunas remanescentes as proteínas serialmente até 8 x. Depois, foram adicionados aos poços 50 µl de suspensão de eritrócitos a 3 % (v/v). Os controles não tinham material proteico, mas somente a suspensão de eritrócitos. Nos ensaios, foram utilizados eritrócitos intactos e realizados as leituras após 2 h de incubação, a temperatura ambiente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas e parcialmente purificadas as lectinas presentes nas sementes de *Crotalaria spectabilis* R.

Foi observado também que o método de precipitação por sulfato de amônio 80 % apresentou maior rendimento de proteínas em relação ao tratamento com acetona 80 %. Assim, concluímos que em pesquisas, onde se requer maior quantidade de proteínas é recomendável utilizar o método de precipitação salina.

Os ensaios de hemaglutinação foram positivos para função biológica da proteína com ambos os extratos proteicos, indicando presença de lectinas nas sementes de *Crotalaria spectabilis* R. Estes dados corroboram com os dados observados na literatura, pois os compostos presentes no extrato, como terpenóides, alcaloides e outros, não apresentam capacidade de aglutinar células e nem de precipitar glicoconjugados, que é uma característica exclusiva das lectinas.

A pesquisa da atividade de hemaglutinante dos eritrócitos foi detectada visualmente através da formação, após uma hora de incubação, de uma malha ou rede de hemácias que cobria o fundo e os lados dos poços. Por outro lado, foram considerados negativos os poços onde se visualizava um botão compacto de células no fundo do poço, (Figura 2).

Quando comparados os dados referentes a função biológica das lectinas de *Crotalaria spectabilis* R. com as de *C. pallida* A.^{2,7}, *C. juncea* L.⁸, *C. agatiflora* S.⁹, *C. paulina* S.¹⁰, *C. medicaginea* L.¹¹, *C. striata* D.¹² e *C. mucronata* D.⁹ percebeu-se que todas essas espécies não possuem especificidade para nenhum tipo de eritrócitos com exceção de *C. striata* D.¹²

Sendo assim, concluímos que nas sementes de espécies do gênero *Crotalaria* existem proteínas capazes de reconhecer os receptores presentes na membrana dos eritrócitos humanos ligando-se a estes e promovendo a aglutinação celular.

Figura 1. Representação dos Extratos: A. Bruto; B. Cetônico; C. Salino; D. TCD (Liofilizado através do tratamento com acetona dialisado); E. TSD (Liofilizado obtido através do tratamento sulfato de amônio dialisado); E. Gráfico representando o rendimento proteico dos extratos Cetônico, Salino, TCD e TSD.

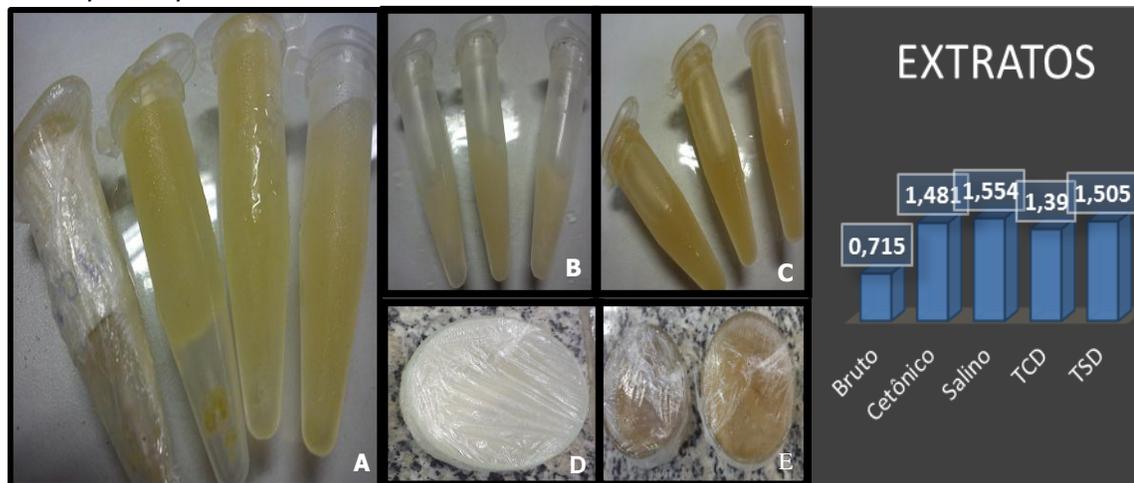
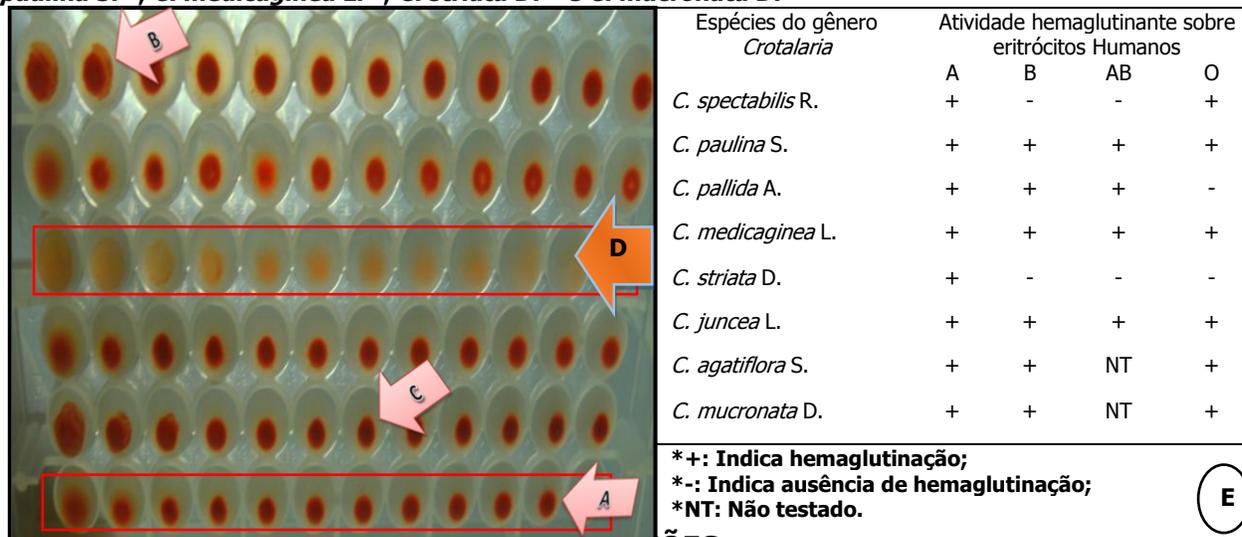


Figura 2. Representação da Placa de microtitulação com eritrócitos intactos tipo A⁺: A. Última coluna sem proteínas, somente com suspensão de eritrócitos que representou o controle; B. O poço, onde ocorreu atividade aglutinante; C. Ausência de hemaglutinação, isto é, um botão compacto de células no fundo do poço da placa de microtitulação; D. Coluna da placa de microtitulação que ocorreu hemólise dos eritrócitos. E. Tabela representando a comparação da atividade hemaglutinante das lectinas de *Crotalaria spectabilis* R. com as espécies de *C. pallida* A.^{2,7}, *C. juncea* L.⁸, *C. agatiflora* S.⁹, *C. paulina* S.¹⁰, *C. medicaginea* L.¹¹, *C. striata* D.¹² e *C. mucronata* D.⁹



CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a presença de proteína com capacidade de hemaglutinar eritrócitos nas sementes de *Crotalaria spectabilis* R. A capacidade de uma proteína de se ligar a carboidratos e aglutinar células se constitui na característica fundamental para que esta seja definida como lectina. Assim, com base nos resultados e nos requisitos



III SIMBBTEC
Londrina 2013

Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: ORAL

adotados pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica, pode-se concluir pela existência de lectina nas sementes da espécie estudada.

A capacidade de hemaglutinação verificada nos extratos brutos e nos extratos cetônicos apontam para a presença de lectina sem especificidade para um tipo sanguíneo específico, indicando que a mesma é capaz de reconhecer e se ligar a diferentes receptores de membrana.

Dessa forma, os resultados abrem caminhos, para que as lectinas presentes nas sementes de *Crotalaria spectabilis* R. funcionem como uma ferramenta molecular em novos estudos. Recomenda-se também utilizar o método de precipitação por sulfato de amônio 80 %, em trabalhos que requerem altos rendimentos proteicos.

REFERÊNCIAS

- (1) VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N. Expression Analysis of Jasmonate-Responsive Lectins in Plants. **Methods in Molecular Biology**, v. 1011, p. 251-263, 2013.
- (2) REGO, E. J. L. **Purificação e caracterização de uma lectina isolada das sementes de *Crotalaria pallida* Aiton**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- (3) VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. Plant lectins. **Advances in Botanical Research In Advances in Botanical Research**, v. 48, p. 107-209, 2008.
- (4) VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.
- (5) BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248 - 254, may 1976.
- (6) LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- (7) REGO, E. J. L.; CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Lectins from seda of *Crotalaria pallida* (smooth rattlexbox). **Phytochemistry**, v. 60, n. 5, p. 441-446, 2002.
- (8) ERSSON, B.; ASPBERGK, K.; PORATH, J. The phytohemagglutinin from sunn hemp seeds (*Crotalaria juncea*). Purification by biospecific affinity chromatography. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 310, n. 2, p. 446-452, 1973.
- (9) GOMEZ, G. P.; NAVARRO, Y. N. Normalizacion del metodo de migracion capilar para evaluar eritroaglutinacion. **Revista Colombiana de Química**, v. 8, n. 1, p. 15-23, 1978.
- (10) PANDO, L. A.; CARVALHO, D. D.; TOYAMA, M. H.; DI CIERO, L.; NOVELLO, J. C.; PASCHOLATTI, S. F.; MARANGONI, S. Purification and characterization of a lectin from *Crotalaria paulina* seeds. **The Protein**, v. 23, n. 7, p. 437-444, 2004.
- (11) KAUR, N.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S. Affinity purification and characterization of a seed lectin from *Crotalaria medicaginea*. **Indian Journal Biochemistry and Biophysics**, v. 39, n. 1, p. 49-54, 2002.
- (12) KHANG, N. Q.; JEAN-LUC, G.; HOEBEKE, J. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1033, n. 2, p. 210-3, 1990.