

## **IDENTIFICAÇÃO DE ISOFORMAS DA LECTINA DE SEMENTES DE *Bauhinia forficata* ATRAVÉS DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE).**

ARTHUR DE SIQUEIRA BRAHM<sup>1</sup>; GUILHERME CARDOSO<sup>2</sup>; LARISSA BRUSSA REIS<sup>3</sup>; AMANDA SOARES<sup>4</sup>; LUCIANO DA SILVA PINTO<sup>5</sup>;

<sup>1</sup>Graduando em Biotecnologia - CDTec - UFPel - arthurdsb@gmail.com

<sup>2</sup>Doutorando em Biotecnologia - CDTec - UFPel- guilescardoso@gmail.com

<sup>3</sup>Graduanda em Biotecnologia - CDTec - UFPel- amaanda\_soares@hotmail.com

<sup>4</sup>Graduanda em Biotecnologia - CDTec - UFPel - laribrussa@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Professor Adjunto Centro de Biotecnologia - CDTec - UFPel- lspinto@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunogênica que se ligam especificamente e reversivelmente a diferentes carboidratos e glicoproteínas. Representam um grupo heterogêneo de proteínas oligoméricas variando em tamanho, estrutura, organização molecular e entre os sítios de ligação a carboidratos, e estão amplamente distribuídas em plantas, vírus, bactérias e animais (GERLACH, 2005). Essas proteínas servem como importantes moléculas de reconhecimento em organismos, desempenhando um importante papel. Elas apresentam um amplo espectro de atividades biológicas como hemaglutinante, antifúngica, antibacteriana, antitumoral e agente coagulante. (PAN, 2010).

O gênero *Bauhinia* (Caesalpinioideae), conhecida comumente como pata de vaca, está presente na maioria das regiões tropicais, incluindo África, Ásia e América do Sul. Plantas desse gênero são utilizadas na medicina tradicional como anti-diabético, anti-inflamatórios e agentes que prolongam a coagulação sanguínea (SILVA et al., 2012).

As lectinas, como outras proteínas, possuem isoformas: diferentes proteínas produzidas por diferentes genes ou mesmo gene com splicing alternativo que apresentam similaridades na composição e função. É importante estudar as isoformas para identificar corretamente a função de cada proteína e sua identidade dentro de um grupo similar, caracterizando-a de forma mais completa e possibilitando uma análise de suas atividades biológicas (BOYLE; PETERS, 1988).

As propriedades biológicas das lectinas, especialmente as de vegetais, estão sendo amplamente estudadas (LEMES et al., 2008). Porém, até o presente momento, não existem estudos realizados a respeito da purificação e caracterização das isoformas de lectinas provenientes de extratos de sementes de *B. forficata*.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de isoformas da lectina de sementes de *B. forficata* através da eletroforese bidimensional.

### 2. METODOLOGIA

A extração foi realizada com um protocolo adaptado de SILVA et al.(2012). Sementes de *B. forficata* foram coletadas no município de Capão do Leão – RS, estas foram descascadas e trituradas mecanicamente. Posteriormente, o extrato foi

obtido após ficar em agitação durante a noite em uma concentração de 10% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1M com 0,15M NaCl pH 7,6 (THB). O extrato bruto foi centrifugado a 5070g por 15 min. a uma temperatura de 4°C. As proteínas presentes no sobrenadante foram precipitadas usando concentrações de 0-40% sendo então centrifugadas nas condições acima e o sobrenadante sendo o extrato F0-40 e o pellet sendo ressuscitado em THB e precipitado novamente com sulfato de amônia na concentração de 40-80%. Foi então feito uma centrifugação nas condições acima, o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado em THB, sendo esse o extrato F40-80. As amostras então foram dialisadas, com quatro trocas em água destilada e duas em THB, com trocas a cada 2 horas.

As amostras foram submetidas ao teste de atividade hemaglutinante (HA) com sangue de coelho. Foram então passadas em coluna de afinidade de agarose-lacose na presença de THB e posteriormente em coluna de afinidade de quitina, onde foi eluída com ácido acético 1M Após, realizou-se a leitura das amostras purificadas na coluna em espectrofotômetro a 280nm de absorvância para verificar a presença de proteínas e então realizada a diálise contra água destilada (seis trocas a cada 2 horas), e após foi liofilizada.

A lectina liofilizada foi ressuscitada em 1 ml de água ultrapura estéril e utilizada na eletroforese (SDS-PAGE) e na eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Para eletroforese (SDS-PAGE) o gel de poli(acrilamida) (12%) foi corrido por 2 horas com o marcador BenchMark Protein Ladder (Invitrogen). O gel foi corado com Comassie Blue posteriormente descorado e fotografado. Na eletroforese bidimensional o preparo da amostra, focalização e corrida do gel foram realizados conforme protocolo da GE Healthcare®.

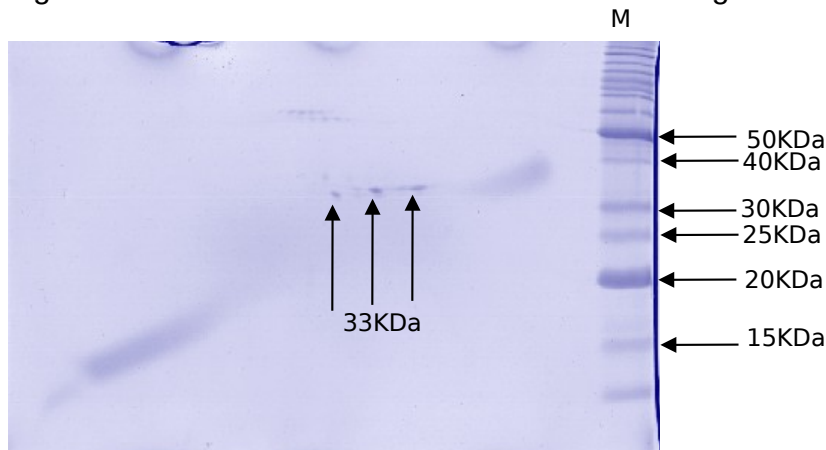
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudos precedentes, CAMACHO (2007) demonstraram a presença de um gene codificante para a lectina *BfL*. Mais recentemente, em trabalho realizado por SILVA et al.,(2012), foi demonstrada a presença de uma forma diferente desta lectina, apesar de elevada similaridade. Os resultados encontrados por estes pesquisadores corroboram com os resultados obtidos nessa pesquisa, onde foi demonstrada por 2D-PAGE a presença de três isoformas de aproximadamente 33KDa. Em outros estudos precedentes (COELHO et al., 2000) foram encontradas nos extratos de folhas de outra espécie do mesmo gênero (*Bauhinia monandra* Link), lectinas com massa molecular aparente de 33 kDa.

Para a eletroforese 2D-PAGE (Figura 1), o produto da purificação em coluna de afinidade em coluna de quitina foi utilizado. Foram identificados três spots localizados em diferentes pontos isoelétricos. Isso aponta a existência de três isoformas da *BfL*, sendo que entre essas isoformas não há uma diferença significativa de massa molecular, tornando-as indetectáveis entre si em uma análise por SDS-PAGE, mas sim uma diferença em relação ao seu ponto isoelétrico (o ponto em que há um equilíbrio entre cargas positivas e negativas de uma molécula), um parâmetro analisado na eletroforese 2D-PAGE.

A presença de diferentes pontos isoelétricos sugere que essas isoformas não possuem a mesma seqüência de aminoácidos, segundo BEVAN et al.,(1998), em plantas superiores, muitas proteínas e enzimas são codificadas por famílias multigênicas. A existência de famílias multigênicas pode, muitas vezes, refletir níveis adicionais de controle genético ou a existência de proteínas isoformas com funções específicas (MEKHEDOV et al., 2000).

O próximo passo será realizar novas eletroforeses bidimensionais por 2D-PAGE, a digestão e a preparação destas proteínas para realização de seqüenciamento por MS/MS, para identificação dos aminoácidos que serão utilizados para a construção de genes de expressão em modelo *Escherichia coli* para produção em larga escala desta lectina como insumo biotecnológico.



**Figura 1:** Gel de poliacrilamida (15%) correspondente à migração eletroforética bidimensional do extrato de sementes de *B. forficata*. M: Marcador BenchMark Protein Ladder (Invitrogen)

#### 4. CONCLUSÕES

Teve-se êxito em identificar as três isoformas da lectina de *B. forficata* baseado no seu ponto isoelétrico através de uma eletroforese bidimensional. Identificar corretamente uma proteína e suas isoformas contribuiu para um entendimento maior do funcionamento da proteína e suas aplicações biotecnológicas, sendo essencial diferenciá-las para conhecer com precisão cada proteína individualmente e sua função.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEVAN, M., BENNETZEN, J.L., MARTIENSSEN, R. Genome studies and molecular evolution commonalities, contrasts, continuity and change in plant genomes: Editorial overview. **Current Opinion in Plant Biology**, v.1, n.2, p.101-102, 1998.

BOYLE, F.A., PETERS, T.J. Characterisation of galactosyltransferase isoform by ion-exchange and lectin affinity chromatography. **Clinica Chimica Acta** v.178, n.3, p.289-296, 1988.

CAMACHO, N. N. **Expressão heteróloga da lectina de *Bauhinia forficata* Link em *Escherichia coli* e efeito sobre linhagens celulares tumorais**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agrícola). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**. v.11, p.295-300, 2000.

GERLACH, D.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U.; SCHMIDT, K. H. *N*-acetyl-Dgalactosamine/*N*-acetyl-D-glucosamine - recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*.

*hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*.

**Immunology and Medical Microbiology**, v. 43, p. 223-232, 2005.

LEMES, G.A.F., KERSANACH, R., PINTO, L., DELLAGOSTIN, O.A., YUNES, J.S., MATTHIENSEN, A. Biodegradation of microcystins by aquatic Burkholderia sp. from a South Brazilian coastal lagoon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. V.69, n.3,p.358-365,2012.

MEKHEDOV, S., ILÁRDUYA, O.M., OHLROGGE, J. Toward a Functional Catalog of the Plant Genome. A Survey of Genes for Lipid Biosynthesis **Plant Physiology**, v.122, n.2, p.389-402, 2000.

PAN, S., TANG, J., GU, X. Isolation and characterization of a novel fucose-binding lectin from the gills of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.133, p.154–164, 2010.

SILVA, M.C.C., SANTANA, L.A., MENTELE, R., FERREIRA, R.S., MIRANDA, A. SILVA-LUCCA, R.A., SAMPAIO, M.U., CORREIA, M.T.S., OLIVA, M.L.V. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. **Process Biochemistry** v.47, n.7, p.1049–1059, 2012.