

LECTINAS DE *Dioclea rostrata*, *Dioclea violacea* E *Canavalia brasiliensis* NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE TABACO BY2

AMARAL, Marcelo Nogueira do¹; NORA, Leonardo²; PINTO, Luciano da Silva⁴; PETERS, José Antônio³; NORA, Fabiana Roos⁴

¹Universidade Federal de Pelotas, Ciências Biológicas; ²Universidade Federal de Pelotas – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel; ³Universidade Federal de Pelotas – Instituto de Biologia; ⁴ Universidade Federal de Pelotas, Centro de desenvolvimento Tecnológico – Núcleo de Biotecnologia.
fabiana.roos.nora@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Organismos multicelulares são geralmente suscetíveis a defeitos na regulação da proliferação e diferenciação das células, o que causa células individuais ou grupos de células a escaparem as barreiras do desenvolvimento normal e proliferarem inapropriadamente (conhecido como neoplasia). Em animais, estes defeitos levam a formação do tumor e câncer. Plantas também desenvolvem tumores, que são compostos de tecidos desorganizados; nos quais frequentemente possuem uma importância econômica, pois perturbam a função ou o desenvolvimento da planta. A maioria dos tumores vegetais são causados por patógenos (como a galha da coroa e infecções virais), porém também se desenvolvem espontaneamente, apesar das plantas serem bem menos susceptíveis a neoplasia (GELVIN, 2003; PARK et al., 2004).

Células vegetais são fixadas em uma matriz; a parede celular, não sendo móveis e, portanto metástases não podem ocorrer. Assim os tumores de plantas são menos frequentes e não são tão letais quanto em animais, onde se argumenta que as células vegetais individuais parecem ter maior dificuldade para escaparem dos controles coletivos. Apesar destas diferenças cruciais, células vegetais, como células animais, necessitam de mecanismos para impor controles sociais na proliferação das células (SABLOWSKI, 2004). A regulação molecular do ciclo celular em plantas é surpreendentemente similar à de animais. Proliferação em células vegetais é integrada com crescimento e desenvolvimento, como em animais, através de sinais intercelulares (DE JAGER et al., 2005; HARASHIMA; SCHNITTGER, 2010; INZE; DE VEYLDER, 2006). Embora estes sinais intercelulares sejam diferentes, há similaridades intrigantes na tumorigênese entre plantas e animais, incluindo o envolvimento da via retinoblastoma assim como sobreposições com mecanismos que são usados para a manutenção das células-tronco meristemáticas (BORGHI et al. 2010; BURKHART; SAGE, 2008). Devido plantas e animais poderem ser vistos como dois experimentos evolucionários independentes em multicelularidade, acredita-se que comparações possam destacar princípios fundamentais da tumorigênese (MEYEROWITZ, 2002).

Lectinas são um grupo de proteínas altamente diversas e de origem não imune, que contém pelo menos um domínio não catalítico; permitindo que elas reconheçam seletivamente e se liguem reversivelmente a açúcares livres específicos ou glicanos presentes nas glicoproteínas e glicolipídeos sem alterar a estrutura do carboidrato (LANNOO; VAN DAMME, 2010). Lectinas vegetais possuem diversas atividades biológicas potentes, dentre elas a sua atividade antitumoral. Várias lectinas têm sido relatadas por possuírem propriedades anticâncer *in vivo*, *in vitro* e em estudos de caso; elas são utilizadas como agentes terapêuticos,

preferencialmente se ligando a membranas de células cancerígenas ou seus receptores, causando citotoxicidade, apoptose e inibição no crescimento de tumores (DE MEJIA; PRISECARU, 2005).

O objetivo deste trabalho no entanto é testar agentes biológicos; como as lectinas vegetais, na proliferação celular vegetal, para identificar possíveis interações e posteriormente buscar identificar o mecanismo de regulação afetado.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas em colaboração com o Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Desenvolvimento Tecnológico – UFPel. A linhagem celular BY2 de tabaco foi mantida como descrito por (NAGATA et. al., 1992). Para o desenvolvimento do experimento, 20 μl de suspensão BY2 com 7 dias de cultivo foi dispensada radialmente sobre o meio de cultivo em cinco regiões, em uma placa de Petri de 10mls. Regiões estas que constituíram os 5 clusters. As células foram mantidas nas placas com meio modificado; para conter 10 mg.L^{-1} de tiamina, 30 g.L^{-1} de sacarose, 200 mg.L^{-1} de KH_2PO_4 , 100 mg.L^{-1} de MgSO_4 , 0,2 mg.L^{-1} de 2,4-D, 4 g.L^{-1} de gelright e diferentes concentrações de lectinas. Lectinas extraídas de *Dioclea rostrata*, *Dioclia violacea*, *Canavalia brasiliensis* e, liofilizadas, foram resuspendidas em tampão (NaCl 0,15M CaCl_2 5mM MnCl_2 5mM) na concentração final de 5 mg.ml^{-1} . A seguir foram adicionadas ao meio de cultura nas concentrações de 0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (T1: Controle), 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (T2), 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (T3) e 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (T4). O experimento foi realizado em uma placa por tratamento contendo cinco repetições (5 clusters). O material foi mantido em sala de crescimento a 23 °C no escuro. O material foi analisado visualmente e com o auxílio de estereoscópio quanto as características visuais dos clusters e o seu crescimento no meio de cultura ao longo de um período de 117 dias. No final deste período, foi realizada a pesagem (g) dos clusters individualmente. Para análise estatística da variável peso, adotou-se o teste de Turkey ao nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na proliferação celular, os mecanismos crescimento em tamanho (conteúdo intercelular) e proliferação (número) da célula ocorrem de maneira harmônica e contínua. Aqui nós realizamos avaliações visuais e de massa (peso) de clusters de células em divisão. As análises visuais mostraram que os clusters dos tratamentos contendo lectina não apresentaram diferenças aparentes, mostrando-se similar quanto ao seu aspecto, proliferação e morte celular quando comparado com os controles sem lectina (Fig. 1). Em análise estatística os resultados nos mostraram que não houve uma diferença significativa de peso dos clusters quando presente no meio de cultura as lectinas de *Dioclea rostrata* e *Dioclea violacea*. Entretanto, os clusters mostraram diferença de peso quando em meio contendo a lectina *Canavalia brasiliensis* (Tabela 1), sugerindo uma indução da proliferação. Porém é importante a observação de que esta diferença foi obtida somente quando utilizado a lectina *Canavalia brasiliensis* na concentração de 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, onde se observou o maior peso médio dos clusters no valor de 0,579 g. Embora a lectina de *Canavalia brasiliensis*

na concentração de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ tenha influenciado significativamente o peso dos clusters, interessante foi o fato das concentrações 10 e $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ não ter tido o mesmo efeito positivo no peso quando comparado com o controle. No entanto também não diferiu do tratamento com de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Fig. 1).

Adicionalmente, houve diferença entre as lectinas na concentração de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, onde *Dioclea rostrata* parece impor uma diferença significativa nos pesos dos clusters quando comparado com *Dioclea violacea* e *Canavalia brasiliensis*, diferença esta que sugere uma inibição da proliferação com o menor peso dos clusters (0,381 g) nesta concentração. Este comportamento também foi visualizado na concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ *Dioclea rostrata*. Por outro lado, com esta lectina não se observou diferença significativa entre as concentrações $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e o controle $0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Fig. 1).



Figura 1 – Clusters de células de tabaco BY2 em meio de cultura contendo diferentes concentrações de lectinas vegetais. A- Lectina de *Dioclea rostrata*. B- Lectina de *Dioclea violacea*. C- Lectina de *Canavalia brasiliensis*. Canto superior esquerdo: T1 controle ($0 \mu\text{g}/\text{ml}$), direito: T2 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$). Canto inferior esquerdo: T3 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$), direito: T4 ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$).

Tabela 1 – Efeito de lectinas vegetais no crescimento de células de Tabaco BY2.

Espécie vegetal	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)			
	0	1	10	100
<i>Dioclea rostrata</i>	0,485 a A	0,381 b A	0,495 a A	0,397 b A
<i>Dioclea violacea</i>	0,547 a A	0,539 a A	0,552 a A	0,559 a A
<i>Canavalia brasiliensis</i>	0,449 a B	0,579 a A	0,568 a AB	0,500 ab AB

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem significativamente na coluna e médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem significativamente na linha quando comparadas através do teste de Turkey ao nível de 5%.

4 CONCLUSÃO

Os dados nos sugerem que a lectina de *Canavalia brasiliensis* pode influenciar positivamente o crescimento celular vegetal, assim como há uma tendência da lectina de *Dioclea rostrata* influenciar negativamente o ciclo celular. As observações obtidas neste trabalho com a variável peso, certamente merecem maiores investigações para a obtenção de respostas mais consistentes.

Com isto, o trabalho terá andamento visando a utilização de outras técnicas de avaliação, nos permitindo assim buscar respostas aos nossos questionamentos no tema. A avaliação da influência destas lectinas, especialmente de *Canavalia brasiliensis*, na proliferação celular deverá ser realizada em células em

suspensão e, avaliado o ciclo celular por citometria de fluxo. Adicionalmente para monitorar os efeitos das lectinas na divisão celular, poderá ser utilizado genes do grupo da ciclina D (controla a transição da fase G1-S) e ciclina B (controla G2-M) como marcadores para a atividade mitótica.

5 REFERÊNCIAS

BORGHI, Lorenzo; GUTZAT, Ruben; FUETTERER, Johannes; LAIZET, Yechan; HENNIG, Lars; GRUISSEM, Wilhelm. Arabidopsis RETINOBLASTOMA-RELATED Is Required for Stem Cell Maintenance, Cell Differentiation, and Lateral Organ Production. **The Plant Cell**, v. 22, p. 1792-181, 2010.

BURKHART, Deborah; SAGE, Julien. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, p. 671-682, 2008.

DE JAGER, Sarah M.; MAUGHAN, Spencer; DEWITTE, Walter; SCOFIELD, Simon; MURRAY, James. The developmental context of cell-cycle control in plants. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 16, p. 385-396, 2005.

DE MEJIA, Elvira; PRISECARU, Valentin. Lectins as bioactive plant proteins: A potential in cancer treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45 p. 425-445, 2005.

GELVIN, Stanton. Agrobacterium-mediated plant transformation: The biology behind the "gene-Jockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, p.16-37, 2003.

HARASHIMA, Hirofumi; SCHNITTGER, Arp. The integration of cell division, growth and differentiation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 66-74, 2010.

INZE, Dirk; DE VEYLDER, Lieven. Cell cycle regulation in plant development. **Annual Review of Genetics**, v. 40, p. 77-105, 2006.

LANNOO, Nausicaä, VAN DAMME, J. M. Els. Nucleocytoplasmic plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1800, p. 190-201, 2010.

MEYEROWITZ, M. Elliot. Comparative genomics - Plants compared to animals: The broadest comparative study of development. **Science**, v. 295 p. 1482-1485, 2002.

NAGATA, Toshiyuki; NEMOTO, Yasuyuki; HASEZAWA, Seiichiro. Tobacco BY-2 cells as the "HeLa" cells in the cell biology of higher plants. **International Review of Cytology**, v. 132, p. 1-30, 1992.

PARK, Jongbum; HWANG, Hyunsik; SHIM, Haekyung; IM, Kyunghoan; AUH, Chung-Kyoon; Lee, SUKCHAN; DAVIS, R. Keith. Altered cell shapes, hyperplasia, and secondary growth in Arabidopsis caused by beet curly top geminivirus infection. **Molecules and Cells**, v. 17, p. 117-124, 2004.

SABLOWSKI, Robert. Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? **Trends in Cell Biology**, v. 14, p. 605-611, 2004.