

PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE ADSORÇÃO DA LECTINA BVL DE *Bauhinia variegata* EM ESFERAS MAGNÉTICAS

SILVEIRA, Carolina da Silva^{1,3}; MONTE, Leonardo Garcia²; PINTO, Luciano da Silva³

¹Bolsista PROBITI, graduanda em Biotecnologia– CDTec/UFPel; ²Bolsista PNPd CDTec/UFPel

³Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Proteômica – CDTec/UFPel – Campus Universitário – Caixa postal 354 – CEP 96010-900.

carolinnasilveira@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A utilização de nanocompostos funcionalizados, seja para a aplicação como carreadores de fármacos ou para estudo da regeneração tecidual, pode ter suas aplicações ampliadas quando são associadas a moléculas biologicamente ativas. Uma das possibilidades de aplicação de materiais nanoestruturados é sua funcionalização com lectinas, que fazem parte de uma classe de proteínas de grande interesse biológico/farmacológico cuja existência está ligada às mais variadas formas de vida, desde procariotos até plantas e animais (GERLACH et al., 2005).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem sítios ativos para carboidratos, com um ou mais sítios de ligação por subunidade. Estas moléculas se ligam seletiva e reversivelmente aos carboidratos e precipitam polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos, agem como reconhecedoras de células (SINGH et al., 1999). O reconhecimento pelos carboidratos acontece em variadas situações, razão pela qual essas proteínas formam um grupo diverso pertencente a várias famílias (LIS; SHARON, 1998; LORIS, 2002).

Essa associação é a primeira etapa em diferentes eventos biológicos como infecção, diferenciação celular, interação parasito-hospedeiro, formação de órgãos, metástase e reconhecimento celular. Elas também são exploradas como imunomoduladores e imunoadjuvantes em bioterapia do câncer (GANGULY & DAS, 1994; VAN DAMME et al., 1998; CORDAIN et al., 2000; VAN HUYEN et al., 2002). Por este motivo estas proteínas podem ser utilizadas com insumos biotecnológicos em diagnósticos, já que reconhecem carboidratos das células de diferentes organismos.

Contudo, o objetivo deste trabalho é a obtenção de um protocolo de conjugação entre esferas magnéticas e a lectina BVL de *Bauhinia variegata* para utilização como insumo biotecnológico em testes diagnósticos.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

A lectina foi extraída das sementes de *B. variegata*, popularmente conhecida como pata-de-vaca, conforme protocolo estabelecido por PINTO, et al. (2008). Antes de todos os ensaios, a BVL foi previamente caracterizada por SDS-PAGE 12% e quantificada por Kit BCA Protein Assay Reagent (GE).

Após a extração e caracterização da BVL, a lectina foi adsorvida na superfície de esferas magnéticas (Bio Mag® Carboxyl) seguindo as instruções do fabricante (Bangs Laboratories, Inc). Brevemente, as esferas foram ativadas com EDAC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida] para a formação de pontes

peptídicas entre os grupos carboxílicos expostos na superfície das esferas e a lectina BVL. A padronização do processo de ancoramento foi realizada com diferentes concentrações de BVL (100/200/400 µg/mL). Logo após, anticorpos policlonais anti-BVL foram adicionados e a detecção do complexo esfera/BVL/Ac realizada com anticorpos secundários de cabra anti-coelho conjugados com FITC (isotiocianato de fluoresceína). Entre todas as etapas do ensaio foram feitas lavagens com PBS pH 7,4 com auxílio de um separador magnético (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Como controles negativos foram utilizados o anticorpo conjugado com FITC e o anticorpo anti-BVL diretamente na esfera sem a ativação com EDAC. Os complexos fluorescentes foram visualizados em microscópio de fluorescência (Olympus BX51).

Para confirmar a atividade de ligação aos carboidratos específicos, a BVL ligada nas esferas foi utilizada em um ensaio hemaglutinante. Para tal, amostras de sangue foram coletadas de coelhos saudáveis, e após a coleta foram imediatamente misturadas com uma solução anticoagulante (heparina). Os eritrócitos foram lavados por quatro vezes com tampão Tris-HCl pH 7,6 mais NaCl 0,15 M e o complexo esfera/BVL exposto ao sangue. Ensaio controles foram realizados somente com as esferas e com a BVL não ancorada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de adsorção da BVL nas esferas magnéticas foi realizado com eficiência somente com o uso do EDAC e na concentração proteica de 400 µg/mL. Esses resultados foram confirmados já que os controles negativos não apresentaram qualquer fluorescência (Fig. 1).

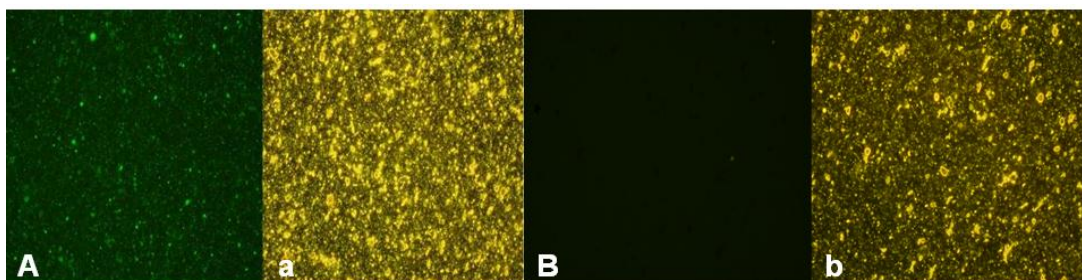


Figura 1: Detecção do ancoramento da lectina BVL de *B. variegata* sobre as esferas magnéticas com anticorpos anti-BVL conjugados com FITC. Painel "A": amostra teste - esfera/BVL/anticorpo anti-BVL (400 µg/mL) e painel "B": controle negativo - esfera/anticorpo anti-BVL. Painéis "a" e "b" observação do mesmo campo óptico em campo escuro. A visualização foi realizada com aumento de 400 x.

Após a padronização da concentração de BVL detectável nas esferas magnéticas (400 µg/mL) a atividade da BVL ancorada foi testada utilizando o complexo esfera/BVL. Como demonstrado na Figura 2, a exposição do complexo ao sangue foi capaz de causar hemaglutinação. Esses resultados demonstraram que apesar da ligação da BVL nas esferas magnéticas os sítios de ligação aos carboidratos expostos nos eritrócitos foram mantidos.

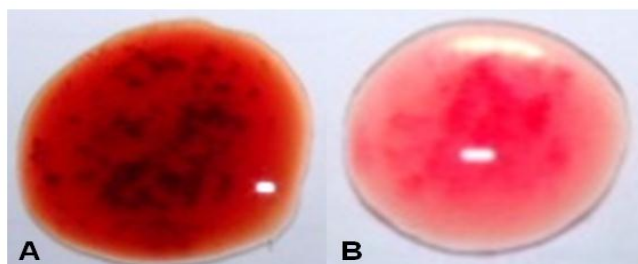


Figura 2: Ensaio de hemaglutinação utilizando o complexo esfera/BVL. Painei A: amostra teste - esferas/BVL; Painei B: controle positivo - BVL + sangue.

4 CONCLUSÃO

A lectina BVL quando associada a esferas magnéticas são capazes de se ligar a carboidratos específicos. Com base nessas informações o complexo será posteriormente utilizado em ensaios que visem à detecção de células tumorais e diagnóstico.

5 REFERÊNCIAS

CORDAIN, L., TOOHEY, L., SMITH, M. J., HICKEY, M. S. Modulation of immune function by dietary lectins in rheumatoid arthritis. **British Journal of Nutrition**, 83: 207–217, 2000.

GANGULY, C., & DAS, S. Plant lectins as inhibitors of tumour growth and modulators of host immune response. **Chemotherapy**, 40, 272–278, 1994.

GERLACH, D.; SCHILOTT, B.; ZHRINGER, U.; SCHMIDT, K. H. *N*-acetyl-D-galactosamine/*N*-acetyl-D-glucosamine – recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*. **Immunology and Medical Microbiology**, v43, p. 223-232, 2005.

LIS, H.; SHARON, H. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v.98, n.2, p.637-634, 1998.

LORIS, R. Principles of structure of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1572, p.263-273, 2002.

PINTO, L.; NAGANO, C. S.; OLIVEIRA, T. M.; MOURA, T. R.; SAMPAIO, A. H.; DEBRAY, H; PINTO, V. P.; DELLAGOSTIN, O. A.; CAVADA, B. S. Purification and molecular cloning of a new galactosespecific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **Journal of Biosciences**, v. 33, p. 355-363, 2008.

SINGH R. S.; TIWARY A. K.; KENNEDY J. F. Lectins: sources, activities, and applications **Critical Reviews in Biotechnology**, v.19, n.2, p.145-178, 1999.

VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., PUSZTAI, A., & BARDOCZ, S. Plant lectins in mammalian nutrition, immunology, metabolism and as oral therapeutic and immune agents. In E. J. M. Van, W. J. Damme, A. Peumans, S. Pusztai, & Bardocz

(Eds.), **Handbook of plant lectins: Properties and biomedical applications** (pp. 31–50), 1998. New York: John Wiley & Sons.

VAN HUYEN, J. D., BAYRY, J., DELIGNAT, S., GASTON, A. T., MICHEL, O., BRUNÉVAL, P., et al. Induction of apoptosis of endothelial cells by *Viscum album*: A role for anti-tumoral properties of mistletoe lectins. **Molecular Medicine**, 8: 600–606, 2002.