

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DA LECTINA DE TESTA DE ROMÃ (*Punica granatum*)

Laysa Creusa Paes Barreto Barros Silva<sup>1</sup>; Patrícia Maria Guedes Paiva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Farmácia -CCB- UFPE; E-mail: laysa.barros@yahoo.com.br, <sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Bioquímica – CCB – UFPE. E-mail: ppaiva63@yahoo.com.br

**Sumário:** As plantas têm sido descritas como fonte de medicamento para os seres humanos e frutos da romãzeira (*Punica granatum* L.) são usados para tratamento de diversas doenças. Uma lectina isolada da testa de *Punica granatum* L. (PgTeL) apresentou atividade antimicrobiana contra agentes causadores de doenças em humanos. Lectinas isoladas de plantas vêm sendo isoladas e identificadas como agentes antibacterianos, antiviral, antiinflamatório, imunoestimulante e antitumoral. O objetivo deste trabalho foi isolar PgTeL e avaliar o seu efeito na viabilidade de células normais e cancerosas. PgTeL foi isolada através de procedimento que incluiu extração de proteínas com NaCl 0,15 M, fracionamento salino utilizando sulfato de amônio (30 % de saturação) e cromatografia em coluna de quitina. A determinação da atividade hemaglutinante (AH) e concentração de proteína foi realizada em todas as etapas do procedimento de purificação. A investigação da citotoxicidade de PgTeL foi realizada utilizando-se células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) e linhagens de células tumorais. O procedimento de purificação foi eficiente em isolar PgTeL (fator de purificação: 24,9 vezes) com elevada atividade hemaglutinante. A lectina não foi citotóxica para todas as células testadas.

**Palavras-chave:** lectina; *punica granatum*; romã; testa.

### INTRODUÇÃO

As plantas têm sido fonte de medicamentos para os seres humanos desde a Pré-História e é notável o crescente interesse no estudo e utilização de fitoterápicos. Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (INCA, 2012). Nas últimas décadas, o câncer vem se apresentando como um problema de saúde pública mundial, despertando o interesse na pesquisa para o desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral. A romã (*Punica granatum* L.) é uma espécie frutífera pertencente à família Lythraceae. As propriedades antioxidante, anticancerígena e antiinflamatória de extratos de tecidos da romã tem sido investigadas visando o potencial uso dos mesmos no tratamento de câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, doenças dentárias, infecções bacterianas e danos da pele induzida por radiação ultravioleta (JURENKA, 2008; DIPAK *et al.*, 2012). Lectinas são proteínas hemaglutinantes encontradas em diversos organismos que apresentam a propriedade de reconhecer especificamente e ligar-se reversivelmente a carboidratos (ETZLER, 1985; CORREIA *et al.*, 2008). Esta propriedade permite a interação das lectinas com glicoproteínas de superfície celular que são expressas em certas células tumorais, podendo levar a mudanças significativas nas respostas relacionadas à transdução de sinais intracelulares (CAO *et al.*, 2010). O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antitumoral de uma lectina isolada a partir da testa de *P. granatum* (PgTeL).

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Isolamento de PgTeL:** Sementes de romã foram passadas em peneira de plástico para obtenção da testa. A extração de proteínas da testa foi feita em NaCl 0,15 M, na proporção de 10% (v/v) sob agitação constante durante 6 h a 4°C. Em seguida, a mistura foi filtrada em gaze e centrifugada (15 min, 5.000 x g, 4°C). O sobrenadante (extrato) foi tratado com sulfato de amônio a 30% de saturação e após agitação por 4 h foi efetuada centrifugação (15 min, 5.000 x g, 4 °C). A fração sobrenadante 0-30% (FS 0-30%) foi coletada, dialisada contra NaCl 0,15 M e submetida à cromatografia em coluna de quitina. A lectina PgTeL foi eluída com ácido acético 1,0 M e em seguida foi dialisada contra água destilada e NaCl 0,15 M para remoção do eluente.

**Determinação da concentração de proteínas e de atividade hemaglutinante:** A dosagem de proteínas foi efetuada de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando curva padrão de albumina sérica bovina (31,25–500 µg/mL). A atividade hemaglutinante foi realizada de acordo com Paiva & Coelho (1992) utilizando eritrócitos de coelho fixados em glutaraldeído. A AH foi definida como o inverso da maior diluição da amostra capaz de promover aglutinação dos eritrócitos. A AH específica (AHE) foi definida como a razão entre a AH e a concentração protéica (mg/mL).

**Investigação de citotoxicidade:** Suspensões celulares a  $10^5$  células/mL (células aderidas) ou  $0,3 \times 10^6$  células/mL (células em suspensão) de células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) de voluntários sadios e células tumorais (hepatocarcinoma, HEPG2; leucemia de células T, Jurkat; e câncer de mama metastático, T47D) foram distribuídas em placas de cultura com 96 poços e incubadas a 37°C, em atmosfera úmida (5% de CO<sub>2</sub>), durante 24 h. Em seguida, as amostras foram adicionadas às placas em diferentes concentrações. Após 72 h de incubação foi adicionado 25 µL de [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] (MTT, 0,5 mg/mL) e as placas foram mantidas na estufa por 3 h. Após o período de incubação foi adicionado dimetilsufóxido (100 µL a cada poço). A leitura óptica foi realizada em leitor automático de microplacas (540 nm) (MOSMANN, 1983). Três experimentos independentes foram realizados. O procedimento de coleta das PBMCs foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da UFPE (CEP/CCS/UFPE 145/09).

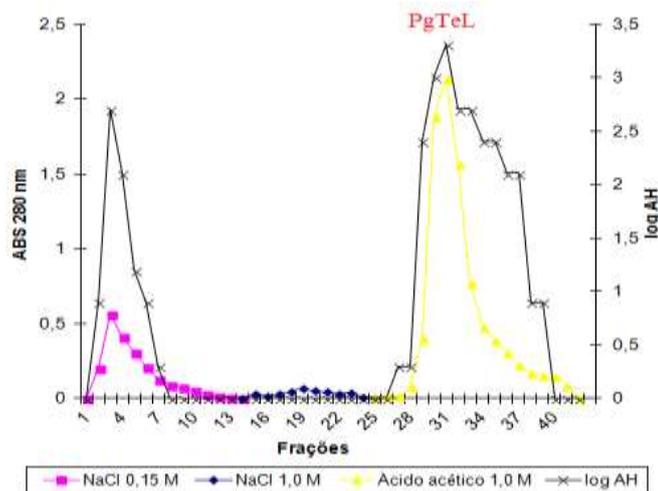
## RESULTADOS

A partir de 151 mL da testa foram extraídas 2,1 g de proteínas. O extrato (AHE de 18,3) foi submetido ao processo de fracionamento salino com sulfato de amônio e a FS30% resultante apresentou AHE de 781. PgTeL foi eluída da coluna de quitina com ácido acético 1,0 M como um único pico protéico (Figura 1). PgTeL apresentou AHE de 19.430, evidenciando um fator de purificação de 24,9 vezes (Tabela 1).

**Tabela 1.** Purificação de PgTeL.

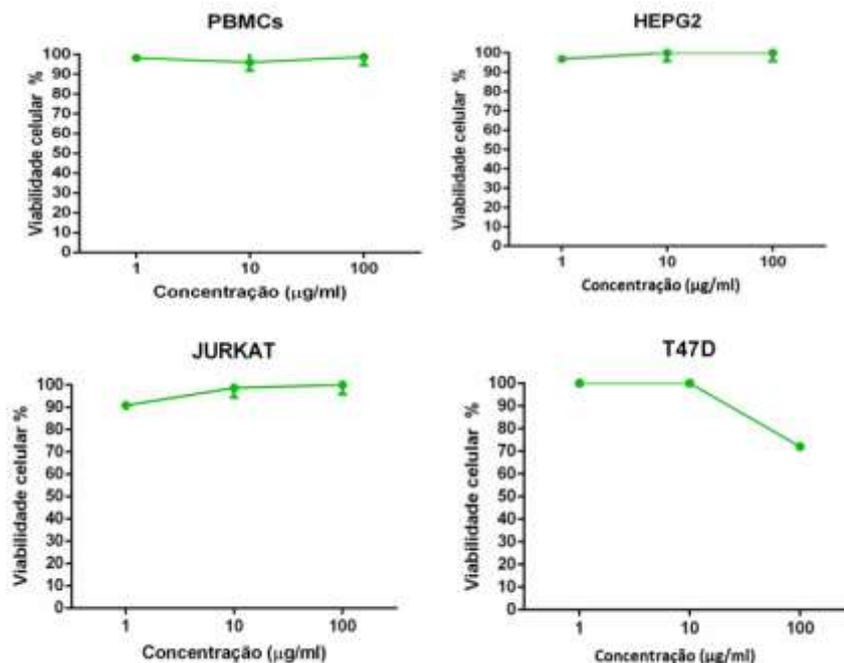
Amostra	Proteínas (mg/mL)	AH (título <sup>-1</sup> )	AHE	Fator de purificação
Extrato	14	256	18,3	1,0
FS30%	1,31	1024	781,3	42,7
PgTeL	0,1054	2048	19.430	24,9

Atividade hemaglutinante (AH) determinada com eritrócitos de coelho. Atividade hemaglutinante específica (AHE) foi calculada dividindo-se o título<sup>-1</sup> pela concentração protéica (mg/mL). O fator de purificação foi calculado através da razão entre a AHE da amostra e a AHE do extrato.



**Figura 1:** Isolamento de PgTeL por cromatografia de FS30% em coluna de quitina.

A figura 2 apresenta os efeitos de PgTeL na viabilidade das células normais e tumorais. Houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) apenas na viabilidade de células T47D, porém de apenas 28%. TEM COMO COLOCAR  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nas figuras??



**Figura 2.** Citotoxicidade de PgTeL sobre células normais (células mononucleadas de sangue periférico, PBMCs) e células tumorais (HEPG2: hepatocarcinoma; JURKAT: leucemia de células T; T47D: câncer de mama).

## DISCUSSÃO

A maior AHE de PgTeL em relação ao extrato, preparação de partida para o isolamento da lectina, revela que a utilização de sulfato de amônio e da cromatografia em coluna de quitina resultaram em purificação da lectina. PgTeL não apresentou potencial antitumoral, uma vez que não houve redução da viabilidade celular maior que 50% em nenhuma das concentrações testadas. AFAQ *et al.*, (2005) demonstraram que extrato acetônico de frutos de *P. granatum* rico em antocianinas e taninos hidrolisáveis apresentou atividade

antitumoral em modelo de indução de tumor de pele por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato, por meio da inibição das vias MAPK e do NF-kappaB.

### CONCLUSÕES

PgTeL, uma lectina ligadora de quitina, apresentou baixa atividade citotóxica sobre células de câncer de mama metastático e não interferiu na viabilidade de células mononucleadas do sangue periférico humano, hepatocarcinoma e leucemia de células T.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao PIBIC-UFPE, ao CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro. Os autores agradecem a colaboração da Msc. Pollyanna Michelle da Silva e do Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego, do Departamento de Bioquímica da UFPE.

### REFERÊNCIAS

- CAO, X.; HUO *et al.* Purification of lectin from larvae of the fly, *Musca domestica*, and in vitro anti-tumor activity in MCF-7 cells. *Journal of Insect Science*, v. 10, n. 164, 2010.
- CORREIA, M. T. S.; *et al.* Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic? In: Yasir Hasan Siddique. (Org.). *Recent Trends in Toxicology* vol. 37. Kerala, India: Transworld Research Network, pp. 47-59. 2008.
- DIPAK, G. *et al.* Phytochemical and Pharmacological profile of *Punica granatum*: an overview. *International Research Journal of Pharmacy*, v. 3, p. 65-68, 2012.
- ETZLER, M. E. Plant lectins: molecular and biological aspects. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 36, p. 209-234, 1985.
- INCA. Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. [Acesso em 4 de janeiro de 2012]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia>.
- JURENKA, J. Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review. *Alternative Medicine Reviews*, v. 13, p. 128-144, 2008.
- LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (amaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 36, n. 2, p. 113-118, 1992.