

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA**

**CAMILA LEITE SANTOS**

**ANÁLISE DE ATIVIDADE CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DA LECTINA EXTRAÍDA  
DO LÁTEX DE *Euphorbia milii*. var. *milii***

Porto Alegre, Julho de 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA**

**CAMILA LEITE SANTOS**

**ANÁLISE DE ATIVIDADE CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DA LECTINA EXTRAÍDA  
DO LÁTEX DE *Euphorbia milii*. var. *milii***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Biociências da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção  
do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Kátia Valença C. L. Da Silva

Consultora: Prof<sup>a</sup> Dra. Magdolna Maria Vozári Hampe

Banca examinadora:

Dra. Melissa Postal

Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Cançado Figueiredo

Porto Alegre, Julho de 2013

## AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente aos meus pais que sempre valorizaram o estudo e não mediram esforços - tanto financeiros quanto psicológicos - para que este momento se realizasse, pelo o apoio e incentivo nos momentos difíceis, pelo carinho, pela atenção e por acreditarem nos meus sonhos.

À Professora Orientadora Kátia Valença C. L. da Silva, pois sem sua paciência, seu cuidado, sua participação tanto nos trabalhos práticos quanto na elaboração da redação desta monografia, não seria possível o término deste trabalho.

À Dra. Magdolna Maria Vozári Hampe que não só disponibilizou a lectina utilizada neste estudo, mas também participou ativamente dos experimentos, colaborou profundamente com seu conhecimento e manteve o interesse em acompanhar os resultados obtidos.

Aos colegas dos laboratórios 210 e 212 do Departamento de Biofísica e do GENOTOX por suas agradáveis companhias.

À Farmacêutica doutoranda Fernanda Cortez Lopes pela colaboração na execução das análises com fungos filamentosos e demais colegas do Laboratório de Proteínas Tóxicas – LAPROTOX – do Departamento de Biofísica.

## RESUMO

A crescente preocupação com as consequências de se expor o ser humano a agentes químicos, naturais ou artificiais, justifica a utilização de metodologias capazes de detectar atividades citotóxicas e mutagênicas.

Ensaio utilizando animais são os mais indicados para avaliação dos riscos sobre o uso de compostos químicos. Adicionalmente, não é exequível submeter a estudos as inúmeras substâncias encontradas no meio ambiente, o que torna indispensável o uso de testes mais rápidos, mais baratos e com elevado nível de confiabilidade, entre os quais pode-se destacar os testes realizados com células em cultura.

O presente trabalho utilizou células de organismos eucarióticos: fungos filamentosos e levedura, para averiguar possíveis efeitos citotóxicos e mutagênicos de uma lectina extraída do látex de *Euphorbia milli*, var. *milli*. Esta lectina é uma glicoproteína que apresenta atividade mitogênica para células mononucleadas do sangue periférico humano, induz a migração de neutrófilos de ratos *in vivo* e *in vitro*.

Neste trabalho, analisou-se a atividade citotóxica da lectina estudada em quatro espécies de fungos filamentosos e as atividades citotóxica e mutagênica em uma linhagem haplóide de *S. cerevisiae*. A lectina de *Euphorbia milli*, var. *milli* induziu citotoxicidade ao fungo *Penicillium herguei* e à linhagem haplóide XV185-14c de *S. cerevisiae*. Foi verificada atividade mutagênica apenas no locus *his1-7* desta levedura, não havendo indução de reversões nos locos *lys1-1* e *hom3-10*. Porém, a lectina não foi citotóxica para os fungos filamentosos *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum* e *Curvularia lunata*. Ademais, em todas as concentrações testadas da lectina em *Fusarium oxysporum*, verificou-se, aparente crescimento celular, indicativo de indução mitogênica. Este tipo de resposta torna possível o uso da lectina de *Euphorbia milii* var. *milii* em estudos de mitogenicidade e em mecanismos de respostas imune.

Palavras-chave: lectina, *Euphorbia milii* var. *milii*, citotoxicidade, mutagênese.

## ABSTRACT

The growing concern about the consequences of exposing humans to chemical, natural or artificial agents, justifies the use of methodologies that can detect cytotoxic and mutagenic activities.

Tests using animals are the most suitable for the risk assessment on the use of chemical compounds. Additionally, it is not feasible to undergo studies the many substances found in the environment, which makes it necessary to use faster, cheaper and a high level of reliability tests, among which we can highlight tests carried out with cells in culture.

The present study utilized cell eukaryotic organisms: filamentous fungi and yeast, to investigate cytotoxic and mutagenic potential of a lectin extracted from the latex of *Euphorbia milli*, var. *milli*. This lectin is a glycoprotein that has mitogenic activity on mononuclear cells of human peripheral blood, induces the migration of rat neutrophils *in vivo* e *in vitro*.

In this work it was analyzed the cytotoxic activity of the lectin studied in four species of filamentous fungi and the cytotoxic and mutagenic activity in a haploid strain of *S. cerevisiae*. The *Euphorbia millii* var. *millii* lectin induced cytotoxicity to the fungus *Penicillium herguei* and to the haploid strain XV185-14c *S. cerevisiae*. Mutagenic activity was showed only in the locus *his1-7* and did not happen induced reversions in the *lys1-1* and *hom3-10* locus. But the lectin was not cytotoxic to filamentous fungi *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum* and *Curvularia lunata*. Furthermore, at all the lectin concentrations tested on *Fusarium oxysporum*, it was found apparent cell growth, indicative of mitogenic induction. This type of response makes it possible to use the lectin from *Euphorbia millii* var. *millii* in mitogenicity studies and immune response mechanisms.

Keywords: lectin, *Euphorbia millii* var. *millii*, cytotoxicity, mutagenicity.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	7
Lectinas.....	7
<i>Euphorbia milii</i> .....	9
Propriedade antifúngica.....	10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	13
Lectina.....	13
Fungos filamentosos.....	13
Obtenção de esporos de fungos filamentosos.....	13
Determinação da citotoxicidade em fungos filamentosos .....	14
Análises estatísticas.....	14
Cepa de levedura de <i>S.cerevisiae</i> .....	14
Meios de culturas de <i>S.cerevisiae</i> .....	14
Condições de crescimento.....	15
Curva de sobrevivência.....	16
Determinação da indução de mutações reversas.....	16
<b>RESULTADOS</b> .....	17
Efeito sobre o crescimento de fungos filamentosos.....	17
Efeito citotóxico em levedura.....	21
Efeito mutagênico em levedura.....	22
<b>DISCUSSÃO</b> .....	24
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	26

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas capazes de se ligar reversivelmente e com especificidade a carboidratos (Peumans & Van Damme, 1995).

As lectinas foram descritas pela primeira vez por Peter Hermann Stillmark, em 1888, ao estudar extratos das sementes de *Ricinus communis* (mamona) durante sua tese de doutorado, descobrindo um composto tóxico com propriedade hemaglutinante. Stillmark mostrou que o composto que causava a aglutinação era uma proteína, nomeando-a “ricina”. Este foi considerado o marco inicial das pesquisas envolvendo lectinas.

Logo após, Hellin demonstrou que extratos de semente de jequeriti (*Abrus precatorius*), também provocava a aglutinação de eritrócitos e nomeou o novo composto hemaglutinante de “abrina”.

Com estes dois compostos disponíveis comercialmente, o bacteriologista Paul Ehrlich empregou-os em estudos que desenvolveram um dos princípios da imunologia que é o da especificidade da ligação do anticorpo ao seu antígeno. Ele inoculou uma população de ratos com ricina e outra população com abrina e estes produziram, respectivamente, anticorpos anti-ricina e anti-abrina sendo que o soro de um animal imunizado com ricina não neutralizava os efeitos tóxicos da abrina e o soro de um animal imunizado com abrina não neutralizava os efeitos tóxicos da ricina (Sharon & Lis, 2004).

Sumner e Howell (1936) propuseram que a aglutinação das células vermelhas do sangue ocorreria devido a interações entre a lectina estudada e os carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos, porém a confirmação desta hipótese aconteceu somente em 1952 com os experimentos de Watkins e Morgan (1952).

O termo lectina, do latim *legere* que significa escolher, selecionar, foi atribuído por Boyd e Sharpleigh (1954), reforçando a capacidade de algumas proteínas aglutinarem seletivamente tipos celulares diferentes (Sell & Costa, 2000).

Goldstein et al. (1980), definiram lectinas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, que interagem com carboidratos através de, pelo menos, dois

sítios de ligação, aglutinando células animais e vegetais. Em 1983, Kocourek e Horejsi formularam uma nova definição: “Lectinas são proteínas de natureza não imune capazes de um reconhecimento específico e reversível, ligando-se a carboidratos, sem alterar a estrutura covalente dos glicídios” (Etzler, 1985).

Apesar de terem sido detectadas originalmente em vegetais superiores, as lectinas são encontradas no mais diversos organismos tais como: bactérias, vírus e animais, tanto em invertebrados quanto em vertebrados (Loris, 2002). Elas desempenham papéis biológicos variados, dentre suas propriedades pode-se citar a ação fungicida (Freire et al., 2002), bactericida (Santi-Gadelha et al., 2006) e nematocida (Ripoll et al., 2003), etc.

No reino vegetal, as lectinas podem constituir de 6% a 11% das proteínas totais dos vegetais superiores, sendo mais abundantes em sementes, onde foram descobertas (Liener, 1991). Uma das funções mais discutidas para lectinas vegetais é a de proteínas de defesa e a especificidade dirigida a determinados carboidratos ausentes em plantas seria um forte argumento a favor desta suposição de elas atuarem contra patógenos e predadores (Follmer et al., 2004; Peumans & Van Damme, 1995).

Várias lectinas são conhecidas pela sua toxicidade em diversos tipos celulares quando ingeridas na sua forma nativa. A toxicidade é particularmente relevante quando há a presença de lectinas em alimentos consumidos crus ou pouco cozidos, como vegetais e frutos. Até mesmo em alimentos cozidos, a temperatura pode ser insuficiente para inativar estas proteínas, podendo causar intoxicação alimentar.

O estudo das atividades biológicas das lectinas é de grande interesse por várias razões uma vez que por meio deste, tem-se a base para suas possíveis aplicações, além de servir na investigação de processos celulares, principalmente aqueles iniciados na superfície celular (Sharon & Lis, 1989).

As lectinas são mediadoras da ligação das células de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e de bactérias a macrófagos, seguida de fagocitose. Células de leveduras cobertas com Concanavalina A ligam-se em maior número a macrófagos peritoniais de camundongos e estes as fagocitam mais facilmente (Rossetto, 1997). A WGA (Wheat Germ Agglutinin) também acentua marcadamente



a ligação e a fagocitose por macrófagos peritoniais de camundongos das bactérias como *Staphylococcus aureus*, *S. albus*, *Micrococcus luteus*, entre outros. (Sharon & Lis, 1989).

Rossetto (1997), purificou uma lectina do látex de *Euphorbia milii*, var. *milii*, tendo determinado algumas de suas propriedades físico-químicas e biológicas. Nos testes para verificação da atividade mitogênica a lectina estimulou células mononucleares de sangue periférico humano e, além disso, estimulou a migração de neutrófilos em ratos, *in vivo* e *in vitro*.

*A estimulação mitogênica de linfócitos é um fenômeno importante, por ser o elemento chave na resposta imune do organismo contra antígenos (Roitt et al., 1996). A maior consequência da indução de proliferação linfocitária é a produção de citocinas (Rossetto, 1997). Citocinas são fundamentais para o sistema imune, na inflamação, na remodelação de tecidos e no desenvolvimento embrionário. Elas compreendem um grupo de proteínas de baixo peso molecular que são produzidas por diferentes tipos celulares e raramente são liberadas isoladamente. Uma citocina individual é capaz de estimular a produção de outras, gerando um conjunto que interage com outros reguladores celulares (Terra, 1999).*

## **1.2 *Euphorbia milii***

A família Euphorbiaceae compreende cerca de 290 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies (Oliveira et al., 2005) e apresenta uma distribuição predominantemente pantropical. No Brasil ocorrem cerca de 70 gêneros e de 1.000 espécies, representando uma das principais famílias da flora brasileira e uma das mais complexas do ponto de vista taxonômico. No reconhecimento prático das espécies que pertencem a esta família, pode-se citar a presença de flores *unissexuadas, de fruto e de látex*.

As Euphorbiaceae incluem diversas espécies de interesse econômico destacando-se: a seringueira (*Hevea brasiliensis*), espécie nativa da Amazônia Brasileira, responsável por um dos nossos ciclos econômicos; a mandioca, aipim ou macaxeira (*Manihot esculenta*) e a mamona (*Ricinus communis*), espécie africana invasora de culturas no Brasil, com sementes ricas em óleo de ampla aplicação

industrial e medicinal. Várias espécies de Euphorbiaceae são utilizadas como plantas ornamentais, mas, por possuírem flores não vistosas, o aspecto ornamental é dado por brácteas ou pela folhagem. Inclui-se nesse grupo a coroa-de-cristo (*Euphorbia milii*), planta com látex capaz de causar grande irritação cutânea, muito utilizada como cerca viva graças aos rígidos espinhos (Souza e Lorenzi, 2005).

### **1.3 Propriedade antifúngica**

Doenças infecciosas, principalmente a candidíase e a aspergilose, causadas por leveduras e fungos filamentosos são sérios problemas em âmbito mundial, especialmente nos países tropicais e subtropicais onde o número de pacientes imunossuprimidos (que frequentemente desenvolvem essas doenças) tem crescido ao longo das últimas décadas. Drogas utilizadas para tratar essas micoses têm baixa eficácia, baixa solubilidade e alta toxicidade, causando efeitos colaterais. Além destes problemas, o surgimento de cepas resistentes aos agentes terapêuticos atuais torna urgente a identificação de novos compostos antifúngicos.

As plantas são uma excelente fonte de compostos com propriedades antifúngicas já que são expostas frequentemente a uma ampla gama de fungos fitopatogênicos presentes no ambiente (Postal et al., 2012).

### **1.4 *Saccharomyces cerevisiae***

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um fungo unicelular, foi o primeiro organismo eucariótico a possuir o genoma completamente sequenciado, tornando-se uma ferramenta extremamente importante para pesquisas no papel de protótipo útil para o melhor entendimento de diversas funções biológicas principalmente na biologia do câncer e nos estudos de genética toxicológica. (Goffeau et al., 1996; Boeira et al., 2002; Soares et al., 2005).

Os ensaios com leveduras são de grande utilidade por existir uma notável homologia do seu material genético com o dos seres humanos, pela facilidade da manipulação do seu genoma, pelos testes rápidos, econômicos e reprodutíveis (Toussaint et al., 2006; Menacho-Marquez & Murguia, 2007).

A *S. cerevisiae* é um organismo anaeróbico facultativo dependendo da disponibilidade de carbono existente em seu habitat, isto é, pode utilizar glicose e frutose tanto aerobicamente quanto anaerobicamente sendo a glicose a fonte de carbono utilizada preferencialmente. Quando há uma grande quantidade de glicose no ambiente, a levedura reprime a expressão de genes utilizados nas rotas metabólicas aeróbicas e cataboliza a glicose por fermentação. Em meios ricos como, por exemplo, o meio YEPD (Yeast Extract-Peptide-Dextrose), a fermentação oferece energia suficiente para que a reprodução ocorra exponencialmente a cada 90 minutos. Com a queda da concentração da glicose no meio, as células param de se dividir por algumas horas, ativando os genes responsáveis pelo processo aeróbico. Após, o crescimento populacional é retomado de maneira mais lenta – a cada 3 ou 4 horas, em meio YEPD -. Depois de mais algumas divisões celulares, a densidade da população na cultura é tão alta que as fontes de carbono chegam ao fim e como consequência, as leveduras param de se reproduzir e entram na chamada fase estacionária, na qual as células podem resistir por muito tempo (Maris et al., 2001).

Ensaio utilizando leveduras tem sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos, complementando os ensaios de mutagênese realizados em bactérias (Henriques et al., 1987; Poli et al., 1999; Terziyska et al., 2000). As mutações são detectáveis através da expressão fenotípica, causadas por mudança súbita e hereditária no genótipo do organismo, alterando suas características. A ocorrência de mutações, no entanto, depende da natureza da lesão e das respostas celulares aos danos do DNA, podendo assim ser dividida em: mutações gênicas e mutações cromossômicas. As mutações gênicas são alterações que ocorrem na sequência de nucleotídeos do DNA e as cromossômicas são as que produzem alterações no número ou estrutura dos cromossomos (Friedberg et al., 1995).

Experimentos de mutações reversas são realizados com frequência e se baseiam na restauração ou compensação de um defeito gênico responsável por um requerimento nutricional (Zimmermann, 1975). Para que seja identificada a mutação reversa é necessária a utilização de uma linhagem com alterações genéticas adequadas como, por exemplo, a linhagem haplóide de *S. Cerevisiae* XV185-14c, isolada por Von Borstel (Parry & Parry, 1984). Esta linhagem permite a detecção de:

reversões do alelo *lys1-1* (alteração para o códon UAA de término de cadeia) ou do alelo *missense his1-7* (códon alterado codifica um aminoácido diferente), e reversões por deslocamento de quadro de leitura de DNA (*frameshift*) verificadas no locus *hom3-10*. As células revertentes podem ser detectadas pelo semeamento em placas contendo meio seletivo no qual o fator de crescimento inicialmente requerido não está presente, ou está em pequenas quantidades (Soares et al., 2005).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Lectina

A lectina de *Euphorbia milii*, var. *milii* (EML) 10,40mg/mL foi gentilmente cedida pela professora Dra. Magdolna Maria Vozári Hampe. A lectina foi extraída, isolada e purificada no Laboratório de Lectinas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Rossetto, 1997). Para o tratamento de células de leveduras e fungos filamentosos, uma solução estoque de 10,40mg/mL de lectina foi utilizada e mantida em freezer a -20°C. As concentrações foram obtidas por diluições da solução estoque em água pura (Milli-Q).

### 2.2 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos *Colletotrichum musae*, *Penicillium herguei*, *Fusarium oxysporum* e *Curvularia lunata* pertencem à micoteca do Laboratório de Proteínas Tóxicas, do Departamento de Biofísica da UFRGS sob coordenação da professora Dra. Célia Regina Carlini. As cepas fúngicas foram doadas gentilmente pela professora Dra. Valdirene Gomes do Centro de Biociência e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense e pelo professor Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.

#### 2.2.1 Obtenção de esporos de fungos filamentosos

Os fungos foram cultivados por cinco dias em PDA (Potato-dextrose-agar; Biobras, Montes Carlos, Brasil) a 28°C. Para o preparo da suspensão de esporos, foram utilizados 5mL de água destilada e uma alça de Drigalski, previamente flambada. A suspensão de esporos foi coletada em tubo Falcon estéril e a concentração de esporos foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer (Silva et al., 2009).

### **2.2.2 Determinação de citotoxicidade da lectina de *Euphorbia milli*, var. *milli* em fungo filamentosos**

Para avaliar a inibição do crescimento dos fungos na presença da lectina de *E. milli* var. *milli*, a proteína foi adicionada nas concentrações: 8µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mL e 400µg/mL em microplacas de 96 poços com fundo em U, juntamente com  $1 \times 10^6$  esporos/mL de cada fungo e PDA. O volume total de cada poço foi de 200µL e as microplacas foram incubadas por até 48 horas a 28°C. Foi efetuada leitura da absorvância a 620nm a cada 24 horas, com intuito de avaliar o crescimento do fungo frente à solução teste. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.3 Análises estatísticas**

Os gráficos de 48 ou 72 horas de ensaio realizados em fungos filamentosos foram criados no software GraphPad Prism 3.0, bem como as análises estatísticas, ANOVA e Tukey com nível de confiança de 95% (Postal et al., 2012). Este mesmo software foi aplicado nas análises estatísticas e construção dos gráficos dos resultados obtidos nos tratamentos com levedura.

### **2.4 Cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae***

A linhagem haplóide utilizada nos experimentos, XV185-14c, foi obtida a partir da linhagem de R. C. Von Borstel (Edmonton - Canadá) e apresenta o genótipo MAT $\alpha$  *ade2-2 arg4-17 his1-7 lys1-1 trp5-48 hom3-10*.

### **2.5 Meios de cultura e soluções utilizadas em testes com *S. cerevisiae***

As células foram cultivadas em meio líquido completo YEPD contendo 0,5% de extrato de levedura (Difco), 2% de bactopectona (Difco) e 2% de glicose (Difco). O meio mínimo continha 0,67% de Yest Nitrogen Base Without Amino Acids (Difco), 2% de glicose (Difco) e 2% de bacto agar (Difco).

Para a determinação do número de células viáveis (unidades formadoras de colônias), foram feitos plaqueamentos em meio YEPD solidificado com 2% de agar-agar ou em meio sintético completo (SC).

O meio SC é composto pelo meio mínimo (MM) acrescido de 2mg de adenina, 2mg de arginina, 5mg de lisina, 1mg de histidina, 2mg metionina, 2mg de triptofano e 24mg de treonina por 100mL de MM. Para ensaios mutagênicos, os meios de omissão SC-lys, SC-his ou SC-hom foram sub-suplementados com 0,1mg de lisina, histidina ou metionina, respectivamente, para cada 100mL de meio de omissão. O meio SC-lys continha somente 0,5mg de adenina. A solução salina (NaCl 0,9%) foi empregada na diluição de alíquotas para o semeio em meios sólidos e na lavagem das células de leveduras.

Utilizou-se PBS (Phosphate-Buffered Saline, Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 20mM; pH 7,4) para a ressuspensão de células em fase exponencial ou estacionária de crescimento após a lavagem com solução salina e durante o tratamento com a lectina.

## **2.6 Condições de Crescimento**

A cultura em fase estacionária de crescimento foi obtida por inoculação em 10mL de meio líquido YEPD de uma colônia isolada. Após 72 horas de incubação a 30°C, com aeração em rumbeira, a cultura alcançou  $2-3 \times 10^8$  células por mL.

A fase exponencial de crescimento das células foi obtida por inoculação de  $5 \times 10^5$  células por mL, de uma cultura em fase estacionária recente, em 10mL de YEPD líquido. Após 18 horas de incubação a 30°C, com aeração em rumbeira, a cultura alcançou  $1-2 \times 10^7$  células por mL com 20-30% de células em brotamento. As células após atingirem a fase de crescimento desejada, eram centrifugadas a 3.000 rpm., durante cinco minutos, à temperatura ambiente numa centrífuga Sorvall – Legend Mach 1.6R. A seguir, o sedimento era ressuspensionado em 10mL de solução salina, sendo a operação repetida mais duas vezes, para a eliminação de resíduos do meio de crescimento e finalmente ressuspensionado em PBS. O número e a proporção de células em broto foram determinados por contagem na câmara de Neubauer.

## **2.7 Curva de sobrevivência**

A sensibilidade relativa da linhagem XV185-14c à lectina foi testada após incubação de  $3 \times 10^8$  células por mL de PBS com as concentrações de: 0 (dose controle); 25µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mL, 400µg/mL e com 0,5µg/mL de óxido de 4-nitroquinoleína Sigma Co., (controle positivo) por 20 horas a 30°C, com aeração em rumbeira. Para a detecção da habilidade de produzir colônias, alíquotas foram diluídas em salina e plaqueadas em meios YEPD ou SC para obter aproximadamente  $3 \times 10^2$  células por placa. Placas foram incubadas a 30°C de 3 a 5 dias para posterior contagem das colônias sobreviventes. Os ensaios foram repetidos em triplicatas para cada dose.

## **2.8 Determinação da indução de mutações reversas pela lectina**

Células haplóides de XV185-14c foram usadas para testes de mutagênese. Uma suspensão de  $3 \times 10^8$  células por mL foi incubada com as concentrações de lectina nas condições acima citadas. A sobrevivência foi determinada em meio SC (3-5 dias, 30°C) e a indução de mutação (reversões LYS, HIS e HOM) em meios de omissão apropriados (7-10 dias, 30°C). Os ensaios foram repetidos em triplicatas para cada dose.



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Efeito sobre o crescimento de fungos filamentosos

Para averiguar a influência da lectina de *E. milii* var. *milli* sobre o crescimento celular dos fungos filamentosos utilizou-se a análise turbidimétrica a 620nm em microplacas.

A figura 1 revela que todas as concentrações utilizadas inibiram o crescimento do fungo filamentoso *Penicillium herguei*. Observa-se, ainda, que há diferença estatisticamente significativa das amostras em relação ao controle negativo (água) e o controle positivo (água oxigenada) com grau de confiança  $P < 0,001$ . A concentração mínima utilizada foi de  $8\mu\text{g/mL}$  sendo esta já tóxica.

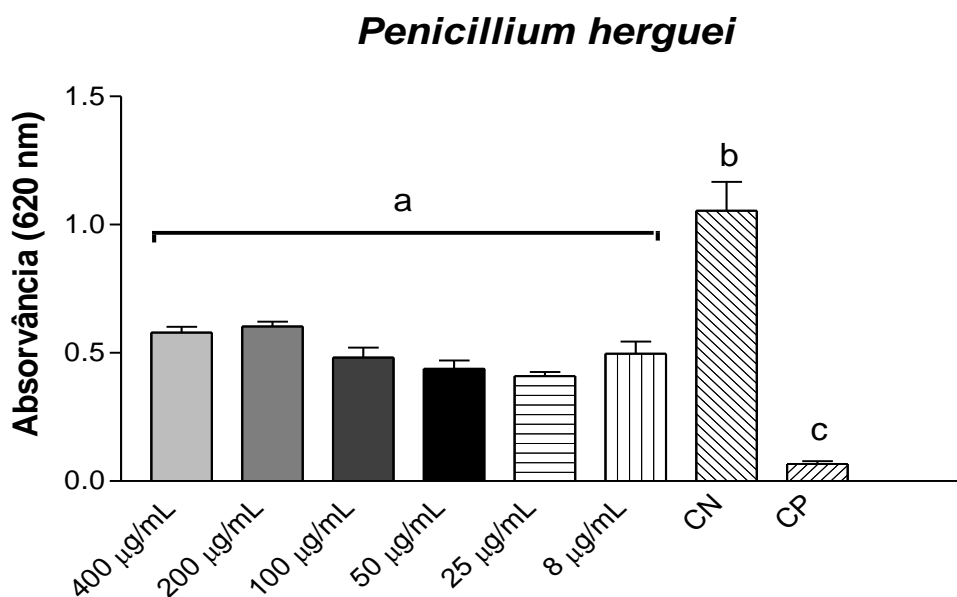


Figura 1: Sensibilidade de *Penicillium herguei* à lectina de *Euphorbia milii*, var. *milli*. A água foi utilizada como controle negativo (CN) e peróxido de hidrogênio como controle positivo (CP). As letras “a”, “b” e “c” indicam que estes resultados são estatisticamente diferentes em relação ao crescimento do fungo no CN.

Os experimentos foram feitos em triplicatas e será preciso realizar novos testes para verificar qual será a concentração mínima inibitória do crescimento do fungo *Penicillium herguei* quando tratado com lectina de *E. milii*, var. *milli*. Por outro

lado, os tratamentos de lectina sobre os fungos *Curvularia lunata*, *Colletotrichum musae* e *Fusarium oxysporum* (ver Figuras 2, 3 e 4) não mostraram inibição de crescimento, isto é, não revelaram citotoxicidade da lectina sobre estes fungos.

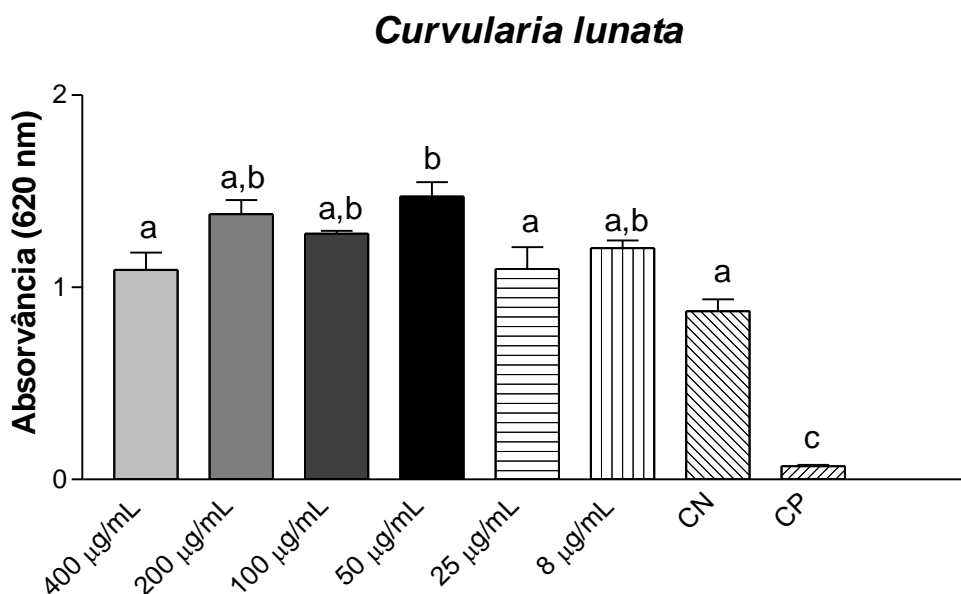


Figura 2: Sensibilidade de *Curvularia lunata* à lectina de *Euphorbia millii*, var. *millii*. A água foi utilizada como controle negativo (CN) e água oxigenada como controle positivo (CP). As letras “a”, “b” e “c” indicam que estes resultados são estatisticamente diferentes em relação ao crescimento do fungo no CN.

Na Figura 2 observa-se que as concentrações testadas não inibiram o crescimento do fungo *Curvularia lunata*. Estas concentrações variaram de 8µg/mL a 400µg/mL de lectina e não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo ( $P>0,05$ ). O volume de 50µg/mL pareceu favorecer o crescimento do fungo.

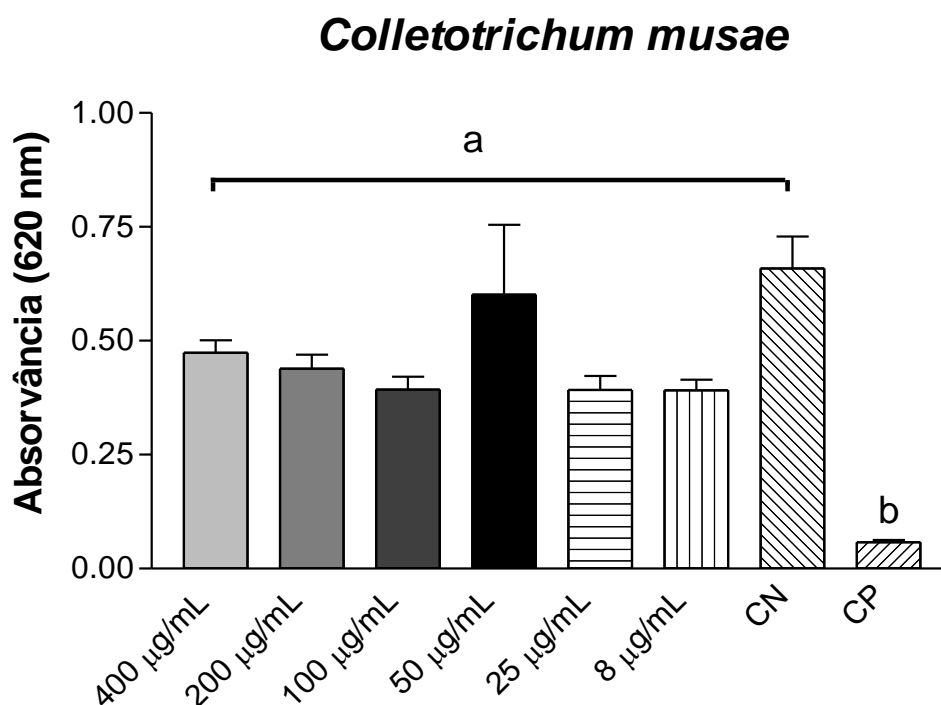


Figura 3: Sensibilidade de *Colletotrichum musae* à lectina de *Euphorbia milii*, var. *milii*. A água foi utilizada como controle negativo (CN) e água oxigenada como controle positivo (CP). As letras “a” e “b” indicam que estes resultados são estatisticamente diferentes em relação ao crescimento do fungo no CN.

Novamente, na Figura 3, observa-se que não houve diferença significativa entre o crescimento do fungo *Colletotrichum musae*, as amostras de lectina e o controle negativo ( $P > 0,05$ ). O curioso foi que, outra vez, o volume de 50µg/mL também pareceu ter “ativado” o crescimento, mas ainda assim não apresentou diferença estatística. O tempo de incubação, neste caso, foi de 72 horas, pois este fungo tem um crescimento mais lento, enquanto os outros foram de 48 horas de incubação com as diferentes doses de lectina.

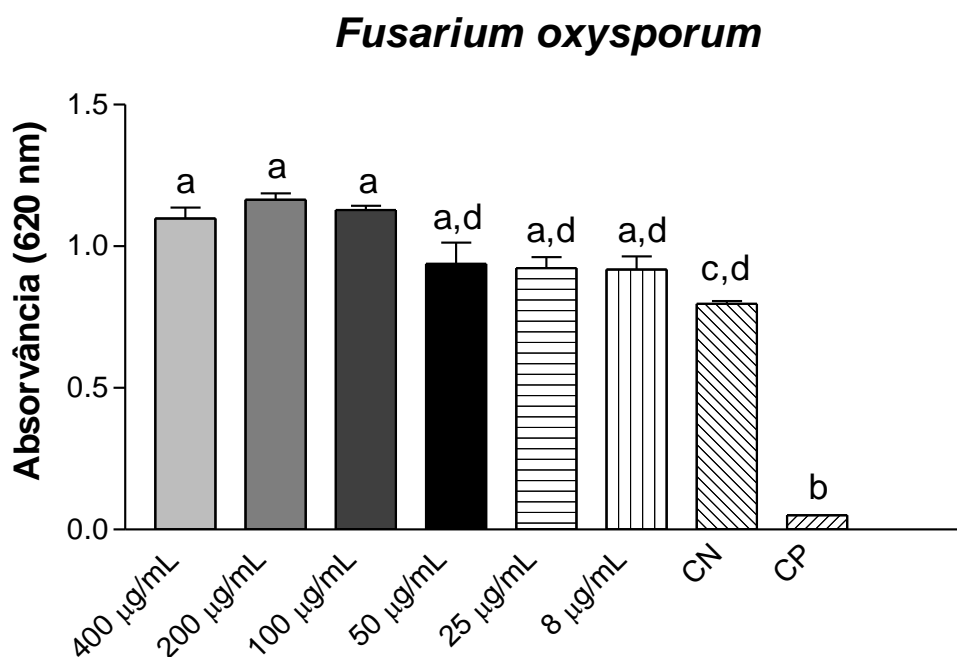


Figura 4: Sensibilidade de *Fusarium oxysporum* à lectina de *Euphorbia milii*, var. *milii*. A água foi utilizada como controle negativo (CN) e água oxigenada como controle positivo (CP). As letras “a”, “b”, “c” e “d” indicam que estes resultados são estatisticamente diferentes em relação ao crescimento do fungo no CN.

Na Figura 4 observa-se que não houve inibição do crescimento de células do fungo filamentoso *Fusarium oxysporum* após tratamentos com lectina de *E. milii* por 48 horas em meio nutritivo. As concentrações 8µg/mL, 25µg/mL e 50µg/mL não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo, enquanto, as concentrações 100µg/mL, 200µg/mL e 400µg/mL, indicaram maior crescimento celular, apresentando maiores leituras de absorvâncias e com diferenças estatísticas significativas em relação ao controle negativo.

### 3.2 Efeito Citotóxico em levedura

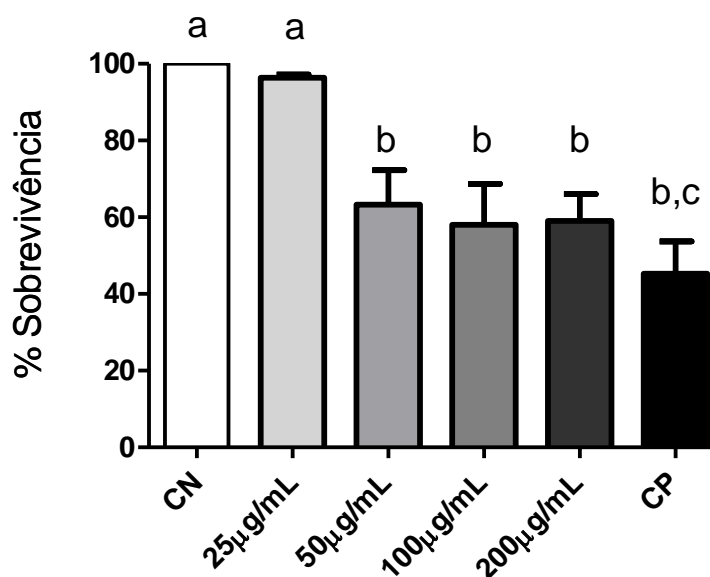


Figura 5: Sobrevivência de células haplóides de *Saccharomyces cerevisiae* após tratamento com lectina de *Euphorbia milii*, var. *milii*. CP =Controle positivo: 4-NQO, µg/mL. CN=Controle negativo: PBS.

Na figura 5 observa-se o resultado do tratamento de células de *S. cerevisiae*, em fase exponencial de crescimento e com variadas doses de lectina de *Euphorbia milii* var. *milii*. Nota-se que em dose igual ou acima de 50µg/mL há certo efeito citotóxico deixando uma taxa de cerca de 60% da população de células tratadas sobreviventes e independente do aumento da dose, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre as maiores doses utilizadas. Portanto, devem ser realizados novos testes em *S. cerevisiae* com largo espectro de doses para confirmar os atuais resultados. Verificou-se, ainda, que a menor dose aplicada, 25µg/mL, da lectina de *E. milii* var. *milii* não foi tóxica para a levedura, porém, indutora de resposta mutagênica, dobrando o número de células revertentes em relação ao número de revertentes do controle negativo (ver Figura 6). Na concentração de 200µg/mL o número de revertentes triplicou, indicando tratar-se de um efeito mutagênico dose-dependente. Por outro lado, a lectina de *E. milii* var. *milii*, não induziu reversões nos locos *lis1-1* e *hom3-10* como mostrado nas Figuras 7 e 8.

### 3.3 Efeito mutagênico em levedura

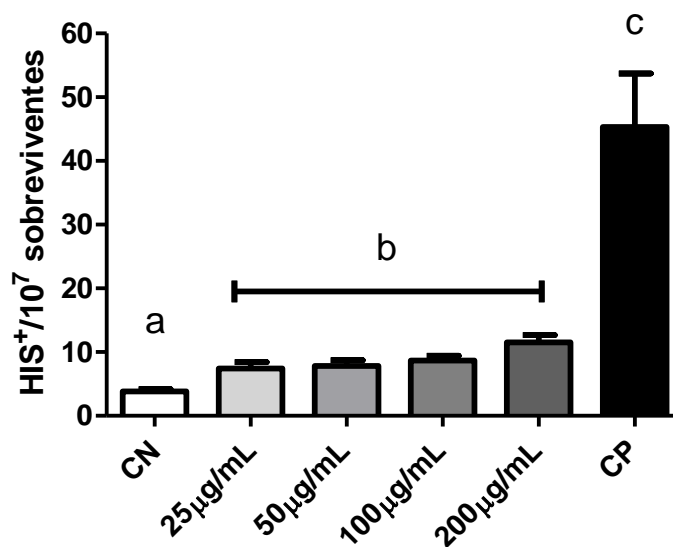


Figura 6: Indução de mutação reversa HIS<sup>+</sup>/10<sup>7</sup> sobreviventes após tratamento com lectina de *Euphorbia milii*, var. *milii*. CP=Controle positivo: 4-NQO, 5µg/mL. CN=Controle negativo: PBS.

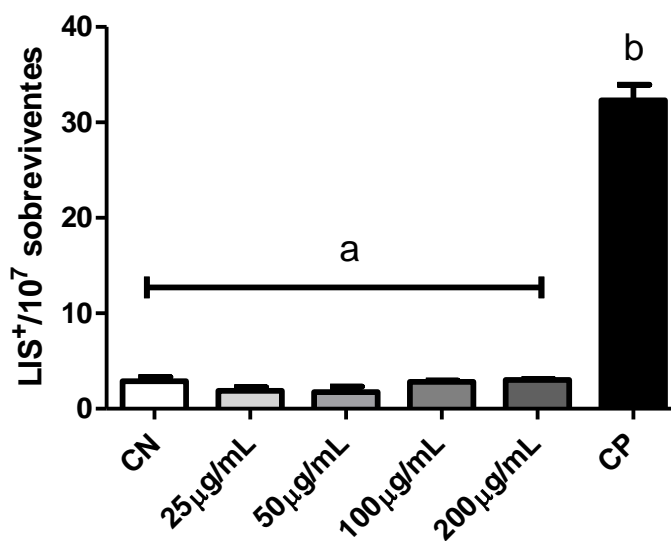


Figura 7: Indução de mutação reversa LIS<sup>+</sup>/10<sup>7</sup> sobreviventes após tratamento com lectina de *Euphorbia milii*, var. *milii*. CP=Controle positivo: 4-NQO, 5µg/mL. CN=Controle negativo: PBS.

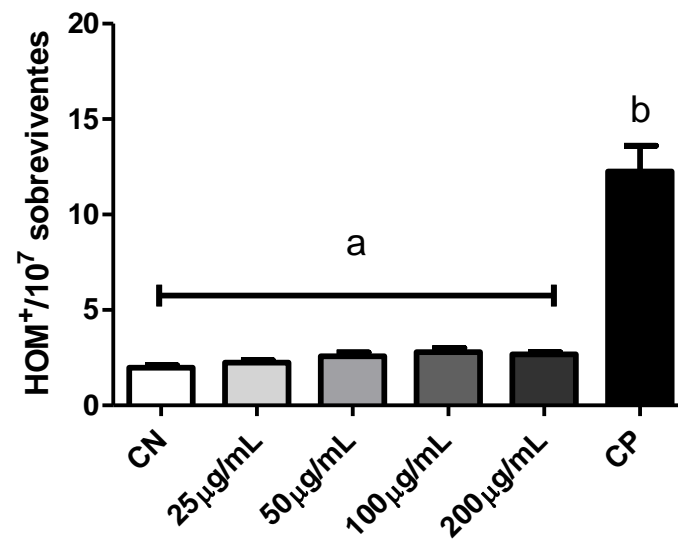


Figura 8: Indução de mutação reversa HOM<sup>+</sup>/10<sup>7</sup> sobreviventes após tratamento com lectina de *Euphorbia milii*, var. *milii*. CP=Controle positivo: 4-NQO, 5µg/mL. CN=Controle negativo: PBS.

#### 4. DISCUSSÃO

A crescente preocupação com as consequências de se expor o ser humano a agentes químicos, naturais ou artificiais, justifica a utilização de metodologias capazes de detectar atividades citotóxicas e mutagênicas.

Ensaio utilizando animais são os mais indicados para avaliação dos riscos inerentes ao uso de compostos químicos, e os resultados são extrapolados para a espécie humana. Atualmente, é indispensável o uso de testes mais rápidos, mais baratos e com elevado nível de confiabilidade, entre os quais pode-se destacar os testes realizados com células em cultura.

Testes com microrganismos eucarióticos, como fungos filamentosos e leveduras, são excelentes e promovem resultados rápidos a respeito da indução de respostas genotóxicas, citotóxicas e/ou mutagênicas de substâncias e compostos químicos que despertam os mais variados interesses, tanto para as indústrias ou como poluentes ambientais. As lectinas estão neste grupo de interesses. São proteínas que se ligam reversível a açúcares livres ou associados a peptídeos ou lipídios. Quando ligadas a açúcares da membrana plasmática de células, podem aglutiná-las se possuírem dois sítios de ligação além de produzirem algumas manifestações bioquímicas e biológicas como mitogênese, quimiotaxia e toxicidade (Kennedy et. al., 1995). A lectina do látex de *Euphorbia milii*, var. *milii* é uma glicoproteína de aproximadamente 61kDa, específica para N-acetilglicosamina e galactose. Ela apresenta atividade mitogênica para células mononucleadas do sangue periférico humano, induz a migração de neutrófilos de ratos *in vivo* e *in vitro*, são mediadoras da ligação das células de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e de bactérias a macrófagos, seguida de fagocitose auxiliando no processo de defesa do organismo (Rossetto, 1997).

Para complementar os estudos sobre a lectina de *E. milii*, var. *milii*, no presente trabalho, foram investigadas as atividades citotóxicas desta lectina em quatro espécies de fungos filamentosos e as atividades citotóxica e mutagênica em uma linhagem haplóide da levedura *S. cerevisiae*. Esta lectina induziu citotoxicidade ao fungo *Penicillium herguiei* e à linhagem XV185-14c de *S. cerevisiae*.

Várias lectinas são conhecidas por exercerem efeitos tóxicos em diversos



tipos de células quando ingeridas na sua forma nativa. A PHA exerce ação tóxica em mamíferos e pássaros (Pusztai et al., 1991), já a WGA e as lectinas de arroz e de tomate exercem ação tóxica apenas para insetos predadores de sementes e não para humanos (Chrispeels & Raikhel, 1991). Essas e outras lectinas agem pela inibição da biossíntese de proteínas nas células, por mecanismos de ação diversos.

A lectina de *Euphorbia milii*, var. *milii* apresentou atividade mutagênica dose-dependente no locus *his1-7* da levedura *S. cerevisiae* porém, não induziu reversões nos locos *lys1-1* e *hom3-10* e não foi citotóxica para os fungos filamentosos *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum* e *Curvularia lunata*. Em concentrações mais elevadas de lectina, a partir de 50µg/mL em meio de cultura, verificou-se que para fungo *Fusarium oxysporum* há um aparente crescimento celular, indicativo de indução mitogênica dose-dependente. Isto não foi observado em concentrações inferiores a esta. Entretanto, este tipo de resposta também foi verificado por Rossetto,1997, para células mononucleadas do sangue periférico humano, onde a maior estimulação foi obtida com concentração de 62,5µg/mL o que a torna passível de uso em estudos de mitogenicidade e de mecanismos de respostas imune.

Em se tratando de resultados preliminares, mais estudos devem ser realizados para elucidar melhor as atividades biológicas e possíveis mecanismos de ação desta lectina de *Euphorbia milii*, var. *milii* sobre fungos e leveduras.

## 5. REFERÊNCIAS

BOEIRA, J. M.; VIANA, A. F.; PICADA, J. N.; HENRIQUES, J. A. P. Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutation Research*, 500:39-48, 2002.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). *Science*. V. 119, p. 419, 1954.

CHRISPEELS, J. M.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes and their role in plants defense. *Plant Cell*, v. 13, p.1-9, 1991.

ETZLER, M. E. Plant lectins: Molecular and Biological Aspects. *Annual Review Plant Physiology*, v.36, p. 209-234, 1985.

FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; SIMONE, S. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology Biochemistry*. V. 40, p. 61-68, 2002.

FOLLMER, C.; WASSERMANN, G. E.; CARLINI, C. R. Separation of Jack (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Science*. v.167, p.241-246, 2004.

FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W. DNA Repair and Mutagenesis. *American Society for Microbiology*, Washington DC., 1995.

GOFFEAU, A.; BARREL, B. G; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W; DUJON, B; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D; JAQC, C.; JOHNSTON, M; LOUIS, E. J; MEWES, H. W; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G, Life with 6000 genes. *Science*, 274:563-567, 1996.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin. *Nature*, v. 285, p. 66, 1980.

HENRIQUES, J. A. P.; VALSA, J. O.; GOMES, R. A. Utilização de testes com microorganismos para detecção de atividades mutagênicas e/ou potencialmente oncogênicas, In: Pinto, S. O. C. (Ed.) *Genética Molecular de Microorganismos*, Manole, São Paulo, 1987.

KENNEDY, J.F.; PAIVA, P. M. G. ; CORELLA, M. T. M.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, p. 219-230, 1995.

LIENER, I. E. Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites. London, Academic Press, Inc, 1991.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*. nº 1572, p. 198-208, 2002.

MARIS, A. F.; ASSUSNÇÃO, A. L. K.; BONATTO, D.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J. A. P. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Curr Genet.*, 39(3): 137-149, 2001.

MENACHO-MARQUES, M.; MURGUIA, J. R. Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clin Transl Oncol*, 9:221-228, 2007.

OLIVEIRA, R. B.; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C.; FILHO, M. J. P.; ARAÚJO, D. M.; PAULA, J. R.; BASTOS, M. A. Toxicidade aguda de látex e extrato etanólico de folhas de *Synadenium umbellatum* em camundongos. *Rev. Eletrônica Farm.*, v.2, n.2, p.143-145, 2005.

PARRY, E. M.; PARRY, J. M. The assay of genotoxicity of chemicals using the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Mutagenicity testing: A practical approach, Venitt, S.; Parry, S. M (Eds.), *ORL Press*, Oxford, Washington DC, 1984.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, J. M. Lectins as plants defense proteins. *Plant Physiology*, v.109, p.347-352, 1995.

POLI, P.; BUSCHINI, A.; CANDI, A.; ROSSI, C. Bleomycin genotoxicity alteration by glutathione and cytochromo P-450 cellular content in respiratory proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutagenesis*, v.14, p.233-238, 1999.

POSTAL, M.; MARTINELLI, A. H. S.; BECKER-RITT, A. B.; LIGABUE-BRAUN, R.; DEMARTINI, D. R.; RIBEIRO, S. F. F.; PASQUALI, G.; GOMES, V. M.; R. CARLINI, C. R. Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. *Peptides*. v. 38, p. 22-32, 2012.

PUSZTAI, A.; CLARK, M. W.; KING, T. P. The nutritional toxicity of Phaseolus vulgaris lectin. *The Proceedings of the Nutrition Society*, v. 38, p. 115-120, 1991.

PUSZTAI, A. *Plant Lectins*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

RIPOLL, C.; FAVERY, B.; LECONTE, P.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; ABAD, P.; JOUANIN, L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. *Plant Science*. n.4, p.1-7, 2003.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Immunology*, 4 ed., London: Mosby, 1996.

ROSSETTO, S. Purificação e caracterização parcial da lectina de *Euphorbia milii*, var. *milii*. Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997. Dissertação de mestrado.

SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A. A.; ARAGÃO, K. S.; OLIVEIRA, C. C.; MOTA, M. R. L.; GOMES, R. C.; PIRES, A. F.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; ALENCAR, N. M. N.; CRIDDLE, D. N.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.350, n.4, p.1050-1055, 2006.

SELL, A. M.; COSTA, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. *Acta Scientiarum*, v.22, n.2 p.297-303, 2000.

SHARON, N.; LIS, H. *Lectins*, London: Chapman e Hall, 1989.

SHARON, N.; LIS, H. History of Lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, v.14, n.11, p.53-62, 2004.

SILVA, L. A. D.; LOPES, F. C.; SILVEIRA, S. T.; BRANDELLI, A. Production of Cellulolytic Enzymes by *Aspergillus phoenicis* in Grape Waste using Response Surface Methodology. *Appl Biochem Biotechnol*, 152(2):295-305, 2009.

SOARES, D. G.; POLETTO, N. P.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; SCHWARTSMANN, G.; HENRIQUES, J. A. P. Low cytotoxicity of ecteinascidin 743 in yeast lacking the major endonucleolytic enzymes of base and nucleotide excision repair pathways. *Biochemical Pharmacology*, v.70, p.59-69, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. SP: Instituto Plantarum, 2005.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concavalina A. *Journal of Bacteriology*. v.32, n.2, p.227-237, 1936.

TERRA, L. L. Atividade Mitogênica e Imunomoduladora da Lectina de *Euphorbia milii* var. *milii*, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999. Dissertação de mestrado.

TERZIYSKA, A., WALTSCHEWA, L., VENKOV, P. A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution. *Environmental Pollution*, v.109, p.43-52, 2000.

TOUSSAINT, M.; LEVASSEUR, G.; GERVAIS-BIRD, J., WELLINGER, R. J.; ELELA, S. A.; CONCONI, A. A high-throughput method to measure the sensitivity of yeast cells to genotoxic agents in liquid cultures. *Mutation Research*, v.606, p.92-105, 2006.

ZIMMERMANN, F. K. Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, v.31, p.71-86, 1975.

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. *Nature*, 169, n. 4307, p.825-826, 1952.