

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Clonagem e análise da expressão do gene de lectina obtido de diferentes tecidos de *Eugenia malaccensis* L.

Isabel Renata de Souza Arruda
Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia
Co-orientadora: Márcia Vanusa da Silva

Recife
2010

ISABEL RENATA DE SOUZA ARRUDA

Clonagem e análise da expressão do gene de lectina obtido de diferentes tecidos de *Eugenia malaccensis* L.

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva

**RECIFE
2010**

Arruda, Isabel Renata de Souza

Clonagem e análise da expressão do gene de lectina obtido de diferentes tecidos de *Eugenia malaccensis* L. / Isabel Renata de Souza Arruda. – Recife: O Autor, 2010.

51 folhas : fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia.

Co-Orientadora: Márcia Vanusa da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

CCB. Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica genética 2. Genética molecular 3. Expressão genética 4. Proteínas 5. Lectinas I. Título.

572.8 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2010-117

ISABEL RENATA DE SOUZA ARRUDA

Clonagem e análise da expressão do gene de lectina obtido de diferentes tecidos de *Eugenia malaccensis* L.

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biotecnologia.

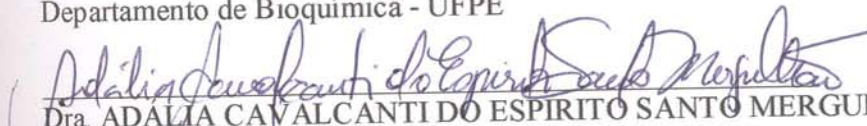
Data da Aprovação 09 / 02 / 2010

BANCA EXAMINADORA:


Profª. Dra. MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA (Orientadora)
Departamento de Bioquímica - UFPE


Profª. Dra. MARCIA VANUSA DA SILVA (1º Titular)
Departamento de Bioquímica - UFPE


Prof. Dr. RANILSON DE SOUZA BEZERRA (2º Titular)
Departamento de Bioquímica - UFPE


Dra. ADALIA CAVALCANTI DO ESPIRITO SANTO MERGULHÃO (Suplente)
Laboratório de Genoma - IPA

RECIFE
2010

DEDICO

Aos meus amados irmãos Thiago Henrique de Souza Arruda e Maria Verônica de Souza Arruda, para que saibam que devemos persistir nos estudos e no trabalho, e assim conseguirmos crescer e conquistar sucesso nessa vida.

AGRADECIMENTO

Em especial a Deus, por estar comigo em todos os momentos da minha vida. O Senhor sim é verdadeiramente responsável por todas as minhas vitórias.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia e co-orientadora Prof^a. Dra Márcia Vanusa pela orientação, oportunidade, confiança, sugestões e paciência em todos os momentos.

Aos professores e funcionários da UFPE que contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento profissional.

Aos colegas do curso de mestrado em ciências biológicas pela amizade e apoio durante todo o curso.

Aos amigos Adriana Guedes, Alexandre Gomes Silva, Clébia Almeida, Daniel Oliveira Jordão e José de Paula pela companhia, atenção e disponibilidade durante todo desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus mais novos “sobrinhos” Carol Malafaia e Túlio Diego é um prazer trabalhar com jovens tão responsáveis.

Ao Laboratório de genoma (IPA) por ceder a infra-estrutura dos laboratórios durante o transcorrer do trabalho.

A todos os colaboradores do Laboratório de genoma (IPA), sem a ajuda e competência de todos a realização desse trabalho não seria possível.

À minha amada e querida família, em especial aos meus pais José Tadeu de Souza Arruda e Edna Guedes de Souza Arruda, pelo amor incondicional; aos meus irmãos Thiago Henrique e Maria Verônica por fazerem parte da minha vida; e a Glauber Cavalcanti Moreira Júnior pela inquestionável dedicação e apoio as minhas escolhas. Vocês são o que tenho de mais valioso; Amo muito a todos.

Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver amor e caridade, não sou nada.

I Coríntios 13-2

RESUMO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não-imune que são capazes de reconhecer e ligar-se a carboidratos de forma específica e reversível. O isolamento e a caracterização de novas lectinas revelam propriedades que são de importância prática para diferentes áreas da pesquisa biológica. No reino vegetal, estas proteínas são abundantes em sementes, raízes, frutos, flores e folhas. A espécie *Eugenia malaccensis* L., conhecida popularmente no Brasil como jambo vermelho, tem sido empregado na medicina popular para diversos fins. O objetivo do trabalho foi clonar um gene de lectina em genótipo de *E. malaccensis*, bem como analisar a expressão gênica em diferentes tecidos da planta pela técnica RT-PCR semiquantitativo e quantitativo (q-PCR). As sequências de genes de lectinas vegetais apresentam domínios protéicos conservados em diferentes espécies. Para a clonagem do gene de lectina de *E. malaccensis*, foi realizado alinhamento de sequências desse gene de espécies vegetais e obtido o desenho do oligonucleotídeos para as regiões conservadas. Foram realizadas amplificações do gene, a partir do DNA gênomico, por PCR. As reações de PCR foram aplicadas em gel de agarose (1,2%) e os fragmentos obtidos foram purificados e clonados em vetor TOPO TA e sequenciados. O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) dos tecidos de folhas, sementes, raízes e caule e analisado a sua expressão gênica pela técnica RT-PCR semiquantitativo e PCR quantitativo (q-PCR). O conjunto de *oligonucleotídeos* desenhados para a clonagem do gene da lectina de *E. malaccensis*, amplificou um fragmento de, aproximadamente, 320 pares de bases (pb) e após o sequenciamento foi comprovada a identidade com outras sequência de genes de lectinas de plantas onde foi identificado um domínio de ligação a manose. Esse gene parcial de lectina foi denominado de EmLec1. A estratégia de clonagem gênica utilizada foi eficiente para o isolamento e caracterização do gene parcial de lectina com ligação a glicose/manose de *E. malaccensis* (gene EmLec1). A análise de expressão do gene EmLec1 mostrou sua síntese em diferentes tecidos vegetais, como folhas, sementes, raízes e caule em *E. malaccensis*. Portanto, o presente trabalho promoveu o primeiro relato sobre clonagem de gene parcial de lectina com ligação a glicose/manose de *E. malaccensis*, sendo o ponto inicial para futuras investigações sobre a sua função biológica.

Palavras-chave: *Eugenia malaccensis*; Expressão gênica; Lectina ligadora de manose.

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin derived from plants, animals or microorganisms that have specificity for terminal or subterminal carbohydrate residues. The lectins represent a large group of plant proteins. The isolation and characterization of novel lectins reveal properties which are of practical importance for different areas of biological research. *Eugenia malaccensis* L. species, popularly known in Brazil as red “jambo”, has been used in popular medicine for various purposes. Despite researchs with different extracts tissues of *E. malaccensis* demonstrate proven antimicrobial potential against human pathogenic micro-organisms, there are not reports about the cloning and characterization of genes encoding lectins from different tissues of *E. malaccensis*. The objective of this work was to clone lectin from *E. malaccensis* L. as well as analyse its gene expression in different plant tissues using RT-PCR technique semi-quantitative and quantitative (qPCR). All reactions were performed in realplex thermocycler Mastercycler ep (Eppendorf) in triplicate in the presence of white control and gene control. The set of primers designed for cloning of the *E. malaccensis* lectin gene, amplified a fragment size of approximately 320 base pairs (bp) and after sequencing its identity was confirmed with other gene sequences of plant lectins. This partial lectin gene was named EmLec1. The strategy of gene cloning has been used effectively for the isolation and characterization of partial gene with lectin binding to glucose / mannose *E. malaccensis* (gene EmLec1). The analysis of gene expression showed EmLec1 their synthesis in different plant tissues such as leaves, seeds, roots and stems of *E. malaccensis*. Therefore, this study promoted the first report about cloning of lectin gene partial connection with the glucose / mannose *E. malaccensis*, being the starting point for further investigations on their biological function.

Keywords: *Eugenia malaccensis*; Gene expression; Mannose binding lectin.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
µM	- Micromolar
cDNA	- DNA completar ao RNA mensageiro
ConA	- Conavalina A
CTAB	- Cationin hexadecyl trimethyl ammonium bromide
DEPC	- Dietilpirocarbonato
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dNTP'S	- Desoxirribonucleosídeo trifosfato
EDTA	- Ácido etilnodiaminotetracético, sal sódico
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
HSV	- Vírus da herpes simplex
kb	- kilobase
LB	- Meio de cultivo Luria-Bertani
M	- Molar
mg	- Miligrama
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
NaCl	- Cloreto de Sódio
ng	- Nanograma
pb	- Pares de bases
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
pH	- Potencial de hidrogeniônico
q-PCR	- PCR quantitativo
RNA	- Ácido ribonucléico
rRNA	- RNA ribossomal
mRNA	- RNA mensageiro
rpm	- Rotações por minutos
RT-PCR	- PCR utilizando transcriptase reversa
T.A.	- Temperatura Ambiente

TBE	- Tris-Borato EDTA
TE	- Tris EDTA
Tris	- 2-amino-2-hidroxi metilpropano-1,3-diol
UV	- Radiação ultravioleta
V	- Volts

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1: Representação esquemática dos principais tipos de lectinas de plantas. Fonte: Adaptado de PEUMANS; VAN DAMME, 1998. 17

Figura 2: Sequências consenso de aminoácidos de Lectinas de plantas utilizadas para a síntese dos primers. 40

Figura 3: Alinhamento das sequências de nucleotídeos de genes de Lectinas de plantas com os respectivos primers na região consenso. As sequências foram alinhadas usando o programa Multalin version 5.4.1.. 41

Figura 4: Representação esquemática do vetor T/A PCR2.1 TOPO 42

Figura 5: Sequência de nucleotídeo do cDNA do gene parcial de lectina de *E. malaccensis* (EmLec1). 45

Figura 6: Dendrograma de lectinas de plantas. Árvore filogenética foi desenhada com o programa CLUSTAL W. 45

Figura 7: Eletroforese em gel desnaturante de RNA total de *Eugenia malaccensis*. 46

Figura 8: Análise do perfil de expressão do gene EmLec1 em diferentes tecidos de *E. malaccensis*. 47

Figura 9: Quantificação da expressão do gene EmLec1 de *E. malaccensis* nos diferentes tecidos da planta: S-semente; F-folha; C- caule e R- raiz. 47

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Classificação das lectinas de plantas nos grupos de reconhecimento a carboidrato.	18
Tabela 2. Descrição dos genes depositados no NCBI com identidade com gene EmLec1 de <i>E. malaccensis</i> .	44
Tabela 3. Análise espectrofotométrico da qualidade e quantidade do RNA total ^a .	46

SUMÁRIO

Pág.

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Lectinas	15
1.1.1 Histórico	16
1.1.2 Classificação	17
1.1.3 Aplicações de Lectinas	18
1.2 Família Myrtaceae	19
1.2.1 Gênero <i>Eugenia</i>	20
1.2.2 <i>Eugenia malaccensis</i> L.	20
1.3 Clonagem e Expressão Gênica	21
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

CAPÍTULO II

3. JUSTIFICATIVA	34
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo Geral	34
4.2 Objetivo Específico	34

CAPÍTULO III

5. ARTIGO CIENTÍFICO	36
5.1 INTRODUÇÃO	38
5.2 METODOLOGIA	39
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44

5.4 CONCLUSÃO	48
5.5 AGRADECIMENTOS	48
5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

CAPÍTULO I



1. INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

Lectinas são proteínas que reconhecem carboidratos, moléculas cujas características estruturais favorecem suas interações com receptores específicos celulares e que são, portanto, envolvidas em vários processos celulares (SHARON, 2004). Essas proteínas ligadoras de carboidratos e de distribuição ubíqua na natureza possuem a capacidade de agir como moléculas de reconhecimento dentro de células, na superfície celular e em fluidos fisiológicos (GEMEINER et al, 2008). Dentre as diversas proteínas presentes em plantas as lectinas apresentam grande importância devido à habilidade de ligar-se especificamente a carboidratos presentes em superfícies celulares (SUN, et al, 2007). Essa capacidade possibilita as mesmas desempenharem um importante papel em eventos celulares como aglutinação, reconhecimento celular, simbiose, estimulação da proliferação, opsonização, metástase e apoptose (DUTTA, et al. 2005). Além disso, apresentam atividades como defesa contra patógenos (OLIVEIRA, et al. 2008), medeiam interações célula célula e parasito hospedeiro (GABIUS, 2000), atuam na renovação de glicoproteínas do soro e na resposta imune inata (BELTRÃO, et al.1998).

A abundância dessas proteínas solúveis nos extratos de sementes de leguminosas permitiu que um grande número dessas lectinas fossem isoladas e caracterizadas. As lectinas de sementes apresentaram homologia considerável em sua sequência de aminoácidos, e uma especificidade de ligação a carboidratos, permitindo assim que esse grupo de lectinas estudadas fosse empregado como ferramentas úteis em uma ampla variedade de procedimentos analíticos e biomédicas.

Devido às interações lectina-carboidratos serem reversíveis e altamente específicas, elas têm sido amplamente estudadas como ferramentas para análise dos carboidratos, quer na forma livre quer ligado a lipídeos ou proteínas (NILSON, 2007; GEMEINER et al., 2008). Em outras palavras, enquanto os açúcares são capazes de carrear uma informação biológica, lectinas são capazes de decifrar esse glicocódigo (SHARON; LIS, 2004; AMBROSI et al., 2005; GEMEINER et al., 2008). Além disso, algumas propriedades farmacológicas de plantas são atribuídas ao seu teor de lectinas, cujas propriedades biológicas identificadas incluem atividades antitumoral, mitogênica e antioxidante (ANDRADE, 2004; MACIEL, 2004).

1.1.1 Histórico

O estudo de lectinas iniciou-se em 1888 quando um jovem doutor, Peter Hermann Stillmark da Universidade Dorpat atual Universidade de Tartu na Estônia, apresentou sua tese de Doutorado intitulada “*Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen Von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen*” a qual se referia à descoberta de uma proteína tóxica, denominada Ricina, presente no feijão castor que tinha a propriedade de aglutinar células do sangue ampliando desta forma o estudo de aplicações destas proteínas. Este evento é internacionalmente conhecido como o nascimento de um novo ramo na ciência chamado de lectinologia (KENNEDY et al., 1995; GABOR et al., 2001; BIES et al., 2004).

A abrina e a ricina, proteínas com as mesmas propriedades, foram usadas por Paul Ehrlich, um médico cientista, em seus estudos imunológicos na última década de 1800 (SHARON; LIS, 1990). William Boyd e Elizabeth Shapleigh em 1954 nomearam este novo grupo de proteínas de Lectinas, do latim, *Lectus* “escolhido, selecionado”, refletindo etimologicamente sua propriedade de aglutinar seletivamente grupos sanguíneos (KENNEDY et al., 1995; MATSUI et al., 2001).

Uma Análise detalhada de mais de centenas de lectinas tem demonstrado que elas são um grupo heterogêneo de proteínas na qual diferem fortemente uma das outras com respeito à especificidade do açúcar, estrutura molecular e atividade biológica. Devido as lectinas terem a habilidade de se ligar a carboidratos, cada ligação pode resultar em uma variedade de efeitos biológicos (MACHUKA et al., 1999) e estes efeitos atraem cada vez mais o interesse da comunidade científica (KONOZY et al., 2003; MONZO et al., 2007). Centenas de lectinas são, atualmente, bem caracterizadas, e o número de isolamento das mesmas vem crescendo muito rápido; elas têm sido isoladas de plantas, animais e microorganismos (SHARON e LIS, 1990, VORNHOLT et al., 2007).

O contraste é impressionante com a situação de aproximadamente trinta anos atrás, quando justamente um pequeno número destas proteínas, quase todas de plantas, foram purificadas sendo duas lectinas de legumes, Concanavalina A (ConA) e aglutinina do feijão de soja (Soybean agglutinin – SBA) e uma de cereal, aglutinina de germe de trigo (Wheat germ agglutinin – WGA). Mesmo que os dados disponíveis naquela época fossem limitados, conclui-se que enquanto lectinas tem numerosas propriedades em comum, eles representam um grupo diversificado de proteínas com respeito a tamanho, composição e estrutura (SHARON, 1993; ELGAVISH; SHAANAN, 1997).

1.1.2 Classificação

As diferenças estruturais entre as lectinas são devido à variação quanto ao número de subunidades por molécula e pela natureza dos polipeptídeos. Pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio e também as interações hidrofóbicas podem estar presentes nas subunidades de associação, promovendo a grande variedade de lectinas existentes (KENNEDY, et al. 1995). As lectinas de plantas podem ser classificadas de acordo com a especificidade dos domínios de interação com carboidratos em: lectinas glicose/manose específicas (CORREIA; COELHO, 1995; NOMURA, et al. 1998), galactose específica (COELHO; SILVA, 2000), ácido siálico específicas (BHOWAL; GUHA; CHATTERJEE, 2005), manose específicas (KOIKE, et al. 1995).

As lectinas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura geral em: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Merolectinas consistem em um único domínio de ligação a carboidrato e, seu caráter monovalente as tornam incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Hololectinas consistem exclusivamente de domínios de reconhecimento a carboidrato, mas possuem pelo menos dois domínios de ligação e estes podem ser idênticos ou muito similares e, assim, podem aglutinar células e precipitar glicoconjugados. As superlectinas são compostas de no mínimo dois domínios de ligação a carboidrato, porém, estes domínios de ligação não são idênticos ou similares reconhecendo açúcares estruturalmente diferentes. As quimerolectinas, no entanto, não consistem exclusivamente de domínios de reconhecimento a carboidrato, mas são formadas por domínio de ligação a carboidratos e outro domínio que possui uma atividade catalítica ou com outra função que age independentemente do domínio de ligação a carboidratos. As quimerolectinas comportam-se como mero ou hololectinas dependendo do número de sítios de ligação a carboidrato.

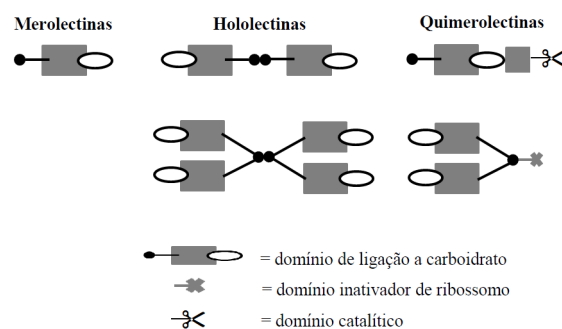


Figura 1: Representação esquemática dos principais tipos de lectinas de plantas. Fonte: Adaptado de PEUMANS; VAN DAMME, 1998.

As lectinas ainda podem ser classificadas, de acordo com o carboidrato que ela reconhece (Tabela 1) a que preferencialmente se ligam (PEUMANS; VAN DAMME, 1998; RABINOVICH et al., 1999).

Tabela 1: Classificação das lectinas de plantas nos grupos de reconhecimento a carboidrato.

GRUPO	ESPECIFICIDADE	FONTE
Fucose	FUCOSE	<i>Ulex europaeus agglutinina I</i> (Tojo)
N-acetilglicosamina	GlcNAc	<i>Triticum aestivum</i> (Germe de Trigo)
	Galactose>>GalNAc	<i>Artocarpus integrifolia</i> (Jacalina)
Galactose/ N-acetilgalactosamina	Gal=GalNAc	<i>Clerodendron trichotomum</i> (Clerodendro japonês)
	Gal<<GalNAc	<i>Glycine Max</i> (Feijão de Soja)
	Manose/Glicose	<i>Canavalia ensiformis</i> (Concanavalina A)
Manose	Manose/Maltose	<i>Calystegia sepium</i> (Bons Dias)
	Monose	<i>Galanthus nivalis</i> (Campanhia Branca)
Complexo Glicano	Glicoproteína	<i>Phaseolus vulgaris</i> Agglutinina (PHA)

1.1.3 Aplicações de Lectinas

Devido à sua característica de reconhecer carboidratos, as lectinas têm sido exploradas em vários ramos de pesquisa, podendo ser utilizadas para diferentes aplicações. As lectinas podem ser usadas como ferramentas para estimular a proliferação de linfócitos (MACIEL et al., 2004), para tipagem de grupos sanguíneos (MATSUI et al., 2001), para detectar componentes de carboidratos presentes em superfícies de células normais e cancerígenas (BELTRÃO et al., 2003; KOMATH et al., 2006). Podem ser imobilizadas em suporte insolúvel para purificação de outras glicoproteínas e glicolipídeos de interesse médico como, por exemplo, a purificação de glicoproteínas do vírus HIV (do inglês - *human immunodeficiency virus*) o qual está sendo bastante utilizado em projetos de desenvolvimento de vacinas (BERTRAND et al., 1998).

Estas proteínas podem ser utilizadas como ferramenta para a produção dos chamados medicamentos inteligentes, onde, estes medicamentos diferem dos tradicionais, por atuarem em células específicas do organismo evitando efeitos colaterais, do tipo provocado pela quimioterapia (CLARK et al., 2000; TORCHILIN et al., 2001; WOODLEY, 2001). A afinidade de lectinas por glicoproteínas de

superfície celular tem sido usada para a identificação de microorganismos como, por exemplo, a *Neisseria gonorrhoeae* que pode ser diferenciada de outras espécies de *Neisseria* (WU et al., 2001) ou, para identificação de grupos sanguíneos ABO (MATSUI et al., 2001).

Apresentam também como Papel biológico a proteção contra predadores animais, fungos e bactérias, mas também por outro lado elas podem estar envolvidas no processo simbiótico entre plantas e bactérias (CAVADA et al., 1998; RATANAPO et al., 2001; LIMPENS; BISSELING, 2003; VORNHOLT et al., 2007).

Lectinas de legumes têm sido o grupo mais bem estudado de lectinas de plantas e o crescimento de evidência experimental sugere que elas são proteínas de defesa que possivelmente protegem sementes contra o ataque de predadores, como insetos (MONZO; BONN; GUTTMAN, 2007; VORNHOLT; HARTMANN; KEUSGEN, 2007). Embora, a localização e a maior concentração estejam necessariamente nas sementes, outros tecidos de muitos vegetais apresentam-se como fontes de lectinas. Estas apresentam uma ampla e variada área de aplicabilidade podendo ser valiosas em processos biotecnológicos, nas áreas de pesquisa médica, biológica, farmacológica e bioquímica (CHUMKHUNTHOD, et al. 2006; WONG; WONG; NG, 2006).

1.2 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae esta bem representada na flora brasileira onde ocorrem em diferentes biomas. Myrtaceae constitui uma das mais importantes famílias de Angiospermas no Brasil constando de uma única tribo, Myrtae e três subtribos Myrciinae, Eugeniinae e Myrtinae com 80 gêneros e cerca de 3.000 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do globo (OLIVEIRA; DIAS; CÂMARA, 2005).

Conhecida por sua elevada riqueza de espécies e por seu importante papel na fitossociologia das Florestas do Sul e Sudeste do Brasil, sendo um dos grupos predominantes do componente arbóreo da Mata Atlântica (VIEIRA et al., 2004). Muitas de suas espécies são cultivadas, seja por conta dos frutos comestíveis, seja com finalidade ornamental ou, ainda, visando-se a produção de extratos de valor comercial, como por exemplo a *E. malaccensis* (VIEIRA et al., 2004; SILVA; BILIA; BARBEDO, 2005a). Esta família está dividida em duas subfamílias: Myrtoideae e Leptospermoideae e, no Brasil, todos os representantes nativos pertencem à subfamília Myrtoideae, onde se inclui o gênero *Eugenia* (LIMBERGER et al., 2004).

1.2.1 Gênero *Eugenia*

O gênero *Eugenia* encontra-se bem representado nas diversas formações vegetacionais do Brasil, não apenas quanto à riqueza específica, mas também quanto à abundância e frequência de suas espécies (ARANTES; MONTEIRO 2002). Muitas dessas espécies são ricas em óleos essenciais e taninos, e são frequentemente utilizadas na medicina popular (LUNARDI et al. 2001). São, também, fornecedoras de frutos comestíveis, que são apreciadas tanto pelo homem como pela fauna silvestre (ROMAGNOLO; SOUZA 2006).

Esse gênero é considerado um dos maiores da família Myrtaceae, com aproximadamente 500 espécies de árvores e arbustos, dos quais cerca de 400 distribuem-se no Brasil (OLIVEIRA et al., 2005) e assumem destaque especial, por fornecer extratos utilizados na medicina tradicional como agentes antimicrobianos, antiinflamatórios (HUSSEIN et al., 2003), antidiabéticos, nas arritmias ou insuficiências cardíacas (VENDRUSCOLO et al., 2005) entre outras aplicações. No Brasil, entre as espécies populares e apreciadas encontram-se a jaboticabeira (*E. edulis* Vell.), a pitangueira (*E. uniflora* L.), o jambolão (*E. jambolana* Lam.), o cravo da Índia (*E. caryophyllata* Thunb.) e o jambeiro (*E. malaccensis* L.) (OLIVEIRA et al., 2006).

1.2.2 *Eugenia malaccensis* L.

A espécie *Eugenia malaccensis* L., pertence à família Myrtaceae de origem asiática, mais especificamente da Índia e da Malásia. Embora não seja originário da América, aclimatou-se muito bem às condições do trópico americano. Com árvores de médio e grande porte, podendo variar de 6 a 15 metros de altura e os frutos sendo produzidos em média a partir do oitavo ano de vida. Seu fruto, conhecido como jambo, apresenta formato ovóide, coloração vermelha e polpa branca e succulenta, de aspecto atraente (SANTOS et al., 2005). Conhecida popularmente no Brasil como jambo vermelho, jambo roxo e jambo encarnado, faz parte das plantas considerada medicinais, sendo utilizada principalmente pelas populações de baixo poder aquisitivo (OLIVEIRA, et al. 2008). Grande parte dos frutos é desperdiçada na época da safra, em virtude da alta produção de frutos por árvore e do curto período de produção e da falta de conhecimento da viabilidade tecnológica para a sua industrialização (CARDOSO, 2008). As folhas e os frutos são usados como adstringentes e estimulantes do apetite,

como diuréticos e no combate a anemias (CAMPELO, 1988).

Em várias partes do mundo, *E. malaccensis* L., é empregada, na medicina popular, no tratamento de processos inflamatórios, febre, coceira, diabetes, catarro no pulmão, tosse, dores de cabeça, disenteria e como moluscicida e larvicida (OLIVEIRA 2006). Estudos farmacológicos demonstraram a atividade antiviral seletiva do extrato aquoso da casca do caule frente aos vírus da Herpes Simplex-1 (HSV-1) e 2 (HSV-2), da estomatite vesicular e HIV-1 (LOCHER et al., 1995; 1996), enquanto, o extrato aquoso das folhas revelou forte inibição das bactérias *Staphylococcus aureus* e do *Streptococcus pyogenes* (LOCHER et al., 1995).

Uma lectina de sementes de *E. malaccensis* L. (EmaL) tem sido investigada no Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica, do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). EmaL pertence ao grupo de lectinas glicose/manose, ao qual Con A, uma das lectinas mais bem estudadas também pertence, no entanto apresentou características distintas àquelas apresentadas por este grupo, como por exemplo peso molecular, e demonstrou ser um potente agente antimicrobiano contra microorganismos patógenos ao homem (BRUSTEIN, 2006).

1.3 Clonagem e Expressão Gênica

Com o início da tecnologia do DNA recombinante foi possível o isolamento e clonagem de um gene individual a partir do genoma. O procedimento básico de clonagem consiste em extrair e cortar o DNA do genoma doador, e inserir em pequenas moléculas de DNA de replicação autônoma, chamadas de vetores, que podem ser plasmídeos, fagos, cosmídeos ou cromossomos artificiais de bactérias (GOTO, 2007). O DNA recombinante, vetor com o fragmento inserido, é introduzido em células bacterianas por meio de transformação. Uma vez na célula hospedeira, o vetor irá se replicar, independentemente do cromossomo bacteriano e, com ele, irá replicar o fragmento exógeno resultando em um clone molecular do fragmento de DNA inserido (PATHAK, et al. 2006). Após muitos ciclos de multiplicação celular, uma única célula transformada com um único vetor recombinante apresenta muitas cópias do DNA doador (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989; FOSTER; TWELL, 1996; PEREIRA, et al. 2009). Geralmente, os vetores possuem genes que conferem resistência a antibiótico o que permite a seleção das células transformadas. Uma coleção de clones de DNA, pode

ser uma biblioteca genômica ou uma biblioteca de cDNA. O uso de cDNA apresenta como vantagem o menor tamanho do fragmento devido à ausência de íntrons em sua sequência.

Outra maneira alternativa para a clonagem, sem a necessidade de construção de bibliotecas e de sondagens, pode ser por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) (INNIS; GELFAND; 1990), utilizando dados de genes já clonados. Desde que as sequências que delimitam suas regiões codificadoras sejam conhecidas, um par de *primers* (oligonucleotídeos) pode ser quimicamente sintetizado e usado para amplificar esse fragmento, a partir do DNA genômico ou do cDNA, em quantidade suficiente a ser clonada diretamente em um vetor (PATHAK, et al. 2006).

Vários genes de lectinas de plantas já foram caracterizados utilizando diferentes estratégias de clonagem. Lectinas com ligação a manose foram clonados e caracterizados de oito família das angiospermas, como as Alliaceae, Amaryllidaceae, Orchidaceae, Bromeliaceae, Liliaceae, Araceae, Iridaceae e Zingiberaceae (Van Damme et al., 2000; An et al., 2006; Wright et al., 1999; Smeets et al., 1997a; Neuteboom et al., 2002; Balzarini et al., 2004; Chen et al., 2005).

Um gene de lectina com ligação a manose foi isolado de *Typhonium divaricatum*, uma erva medicinal tradicional chinesa, possui tamanho de 594 bp (ORF- open reading frame) que codifica uma proteína de 197 aminoácidos. Após a clonagem a análise das sequências revelou a presença de regiões homologas a domínios de reconhecimento a aminoácidos referentes a membros da superfamília MMBL (lectinas de monocotiledôneas com ligação a manose), que evolutivamente desempenham papéis importantes na defesa das plantas. Através do método *Northern blot* foi observado que o gene era expresso em um tecido de forma específica, com maior expressão nos tubérculos e quase nenhuma expressão no pecíolo e na folha (KONG et al., 2006).

Lin et al., 2007, utilizando a técnica SMART-RACE a partir de RNA total extraído de tecidos de *Pinellia pedatisecta* obteve a sequência completa de cDNA que possui 771 bp (ORF- open reading frame) que codifica a lectina de 256 resíduos de aminoácidos com uma proteína predita de 40 kDa.

O gene de lectina de semente de *Lens culinaris* ssp. *Culinaris* foi clonado e caracterizado com sequência de nucleotídeos de aproximadamente 828 pb e uma proteína predita de 275 aminoácidos. Os dados da análise de *Southern blot* indicaram a presença de apenas um gene lectina no genoma dessa espécie (Galosso et al., 2004).

Diversos estudos visando o isolamento e caracterização de lectinas, tem encontrado tais proteínas com domínios de ligação glicose/manose *Canavalia brasiliensis* (NOGUEIRA et al., 2002), *Viscum álbum* (PEVZNER et al., 2005), *Arachis hypogaea* (PATHAK, et al. 2006). Dentre as lectinas

que se liga a manose muitas são da família das Araceae e a sequência de aminoácidos deduzida desses genes possuem três sítios de ligação a manose (QXDXNXVXY) (VON HEIJNE et al., 1986; PEUMANS; VAN DAMME, 1998; FEI et al., 2003). Esses sítios são essenciais para propriedade dessas lectinas em que se liga a manose (RAMACHANDRAIAH et al., 2000). O gene de lectina de *Pinellia pedatisecta* possui três sítios de ligação a manose (QXDXNXVXY) (LIN et al., 2007). Entretanto, outras lectinas de plantas possuem um ou dois desses sítios de ligação a manose (KONG, 2006).

Outro gene de lectina com ligação a manose foi clonado usando o RNA extraído de *Pinellia cordata* e a expressão gênica avaliada pelo método de RACE e RT-PCR semiquantitativo. A análise revelou que a lectina é expressa em todos os tecidos testados, incluindo folhas, caule e bulbo (LIN et al., 2008) assim como em *Pinellia pedatisecta* sendo a expressão avaliada também pelo método *Northern blot* (LIN et al., 2007). Entretanto, a expressão de lectinas em sementes de plantas são mais estudadas e caracterizadas do que nos tecidos vegetativos. Estudos sobre essas lectinas de tecido vegetativo mostram que são expressas durante o desenvolvimento da planta e, portanto, pode ajudar a definir a função biológica das lectinas (Pathak et al., 2006).

Apesar das pesquisas com extratos de diferentes tecidos de *E. malaccensis* empregados na medicina popular, não existem relatos na literatura acerca da clonagem e caracterização dos genes que codificam lectinas dos diferentes tecidos de *E. malaccensis*. Caracterizar os genes de lectinas e analisar a sua expressão gênica em diferentes tecidos da planta é de grande importância para elucidar a sua real função, uma vez que a mesma ainda não está esclarecida. O presente trabalho objetivou a clonagem de genes de lectinas em genótipo de *E. malaccensis*, bem como analisar a expressão gênica em diferentes tecidos da planta pela técnica RT-PCR semiquantitativo e q-PCR quantitativo.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROISI, N.; CAMERON, N. R.; DAVIS, B. G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic and Biomolecular Chemistry**. v. 3, p. 1593-1608, 2005.

ANDRADE, C. A. S. et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin 4 encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 278, p. 435-445, 2004.

ARANTES, A. A.; MONTEIRO, R. A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**. v.3, n. 2, p. 111-127, 2002.

BELTRÃO, E.I.C. et al. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v.74, p.125-134, 1998.

BELTRÃO, N. E. M. et al. Mamona: árvore do conhecimento e sistemas de produção para o Semi-Árido Brasileiro. Campina Grande: EMBRAPACNP, 2003. 19 p.

BERTRAND, B. et al. Relations entre les populations de nematodes *Meloidogyne exigua* et *Pratylenchus* sp. dans les vaicenes de *Coffea arabica* na Costa Rica. **Plantations Recherche Developpement**. v. 5, p. 281-286, 1998.

BHOWAL, J. GUHA, A. K.; CHATTERJEE, B. P. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Carbohydrate Research**. v. 340, p. 1973-1982, 2005.

BIES, C.; LEHR, C-H.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 56, p. 425-534, 2004.

BRUSTEIN, V. P. Caracterização da lectina de *Eugenia malaccensis* (EmaL): avaliação de atividades biológicas. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)**. Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

CAMPELO C. R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais no Estado de Alagoas. **Acta-Amazonica**. v. 18 (Supl), p. 305-312, 1988.

CARDOSO, R. L. Estabilidade da cor de geléia de jambo (*Eugenia malaccensis*, L.) sem casca armazenada aos 25°C e 35°C na presença e ausência de luz. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 32, n. 5, p. 1563-1567, 2008.

CAVADA, B. S. et al. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vaiterea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**. v. 49, p. 675-680, 1998.

CHUMKHUNTHOD, P. et al. Purification and characterization of an N-acetyl-d-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1760, p. 326-332, 2006.

CLARK, M. A.; HIRST, B. H.; JEPSON, M. Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 43, p. 207-223, 2000.

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. 1-6, 2000.

CORREIA M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoforma 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry Biotechnology**. v.55, n. 3, p. 261-273, 1995.

DUTTA, S. et al. Characterization of a galactose binding serum lectin from the Indian catfish, *Clarias batrachus*: Possible involvement of fish lectins in differential recognition of pathogens. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 141, p.76-84, 2005.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences** v. 22, n.12, p. 462-467, 1997.

FOSTER, G. D.; TWELL, D. **Plant Gene Isolation. Principles and Practice**. John Wiley & Sons, Chichester. (1996).

GABIUS H. J. Biological information transfer beyond the genetic code: The sugar code, **Naturwissenschaften**. v. 87, 108–21, 2000.

GABOR, F.; KLAUSEGGER, U.; WIRTH, M. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 221, p. 35–47, 2001.

GALASSO, I. et al. Identification and isolation of lectin nucleotide sequences and species relationships in the genus *Lens* (Miller). **Theoretical and Applied Genetics**. v.108, p.1098–1102, 2004.

GEMEINER, P. et al. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances**. v. 27, n. 1, p. 1-15, 2009.

GOTO, L. S. Estudos estruturais e funcionais sobre duas lectinas: cadeia B recombinante da *Pulchellina* & *Campyosemina*. **Tese (Doutorado em Física Aplicada – Opção Física Biomolecular)**. Universidade de São Paulo, 2007.

HUSSEIN, S. A. M. et al. Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*. **Phytochemistry**. v. 64, p. 883-889, 2003.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. Optimization of PCRs. In: **PCR protocols. A guide to methods and applications**. Academic Press, Inc, Cap 1, p.3-12, 1990.

KENNEDY, J.F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polimers**. v. 26, p. 219-230, 1995.

KOIKE, T.; et al. A 35 kDa mannose-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from Kidachi Aloe (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger). **Journal of Biotechnology**. v. 118, p. 1205-1210, 1995.

KOMATH, S. S., KAVITHA, M.; SWAMY, M. S. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. **Organic and Biomolecular Chemistry**. v. 4, n. 6, p. 973-988, 2006.

KONG, W. et al. Characterization of a mannose-binding lectin gene from *Typhonium divaricatum* (L.) Decne. **African Journal of Biotechnology**. v. 5, n.10, p. 793-799, 2006.

KONOZY, E. H. E.; et al. Isolation, purification and physicochemical characterization of galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 222-220, 2003.

LIMBERGER, R. P. et al. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**. v. 27, p. 916-919, 2004.

LIMPENS, E.; BISSELING, T. Signaling in symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 6, p. 343-350, 2003.

LIN, J. et al. cDNA cloning and expression analysis of a mannose-binding lectin from *Pinellia pedatisecta*. **Journal of Biosciences**. v. 32, n.2, p.241–249, 2007.

LIN, L. et al. Molecular cloning and characterization of a mannose-binding lectin gene from *Pinellia cordata*. **Molecular Biology Reports**. v. 35, p.641–647, 2008.

LIQI, L. et al. Evolutionary analysis of the APA genes in the Phaseolus genus: wild and cultivated bean species as sources of lectin-related resistance factors? **Theoretical and Applied Genetics**. v.115, p.959–970, 2007.

LOCHER, C. P. et al. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 49, p. 23-32, 1995.

LOCHER, C. P. et al. Antiviral activity of Hawaiian medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV- 1). **Phytomedicine**. v. 2, p. 259-264, 1996.

LUNARDI, I. et al. Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. **Journal of Brazilian Chemical Society**. v.12, n. 2, p. 180-183, 2001.

LUO, S.; ZHANGSUN, D.; TANG, K. Functional GNA expressed in *Escherichia coli* with high efficiency and its effect on *Ceratovacuna lanigera* Zehntner. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**. v. 69, p. 184-191, 2005.

MACHUKA, J. S. et al. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. **Phytochemistry**, v. 51, p. 721-728, 1999.

MACIEL, E. V. M. et al. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**. v. 32, p. 57-60, 2004.

MATSUI, T. et al. Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1525, p. 50-57, 2001.

MONZO, A.; BONN, G. K.; GUTTMAN, A. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 26, n. 5, p. 23-43, 2007.

NILSON, C. L. Lectins: Analytical tools from nature. In: _____. Lectins: Analytical tools from nature. 1.ed. Oxford: Elsevier, 2007. cap. 1, p. 1-14.

NOGUEIRA, N. A. P. et al. Expression and purification of the recombinant ConBr (*Canavalia brasiliensis* lectin) produced in *Escherichia coli* cells. **Protein and Peptide Letters**, v. 9, n. 1, p. 59-66, 2002.

NOMURA, K.; et al. Purification and characterization of a manose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. **Phytochemistry**. v. 49, p. 667-673, 1998.

OLIVEIRA, A. M. et al. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, p. 618-624, 2006.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**. v.46, p.371–376, 2008.

OLIVEIRA, R. N.; DIAS, I. J. M.; CÂMARA, C. A. G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, p. 39-43, 2005.

PATHAK, M. et al. Molecular cloning, expression, and cytokinin (6-benzylaminopurine) antagonist activity of peanut (*Arachis hypogaea*) lectin SL-I. **Plant Molecular Biology**. v. 62, p.529–545, 2006.

PEREIRA, J. O. P. et al. Genetic variability in *Melipona quinquefasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from northeastern Brazil determined using the first internal transcribed spacer (ITS1). **Genetics and Molecular Research**. v. 8, n. 2, p.641-648, 2009.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins versateli proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Geneteic Engineering Rewiews**. v. 15, p. 199 - 228, 1998.

PEVZNER, I. B. et al. Cloning and Expression of Mistletoe Lectin III B-Subunit. **Biochemistry**. v. 70, n. 3, p. 306-315, 2005.

RABINOVICH, G. A. Galactins: an evolutionary conserved family of animal lectins with multifunctional properties: a trip from the gene to clinical therapy. **Cell Death & Differentiation**. v. 6, p. 711-721, 1999.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *Pseudomonas syringae* pv. *mori*. **Plant Science**, v. 160, p. 739-744, 2001.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 20, n.3, p. 529-548, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANTOS, A. F. S. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**. v. 39, p. 975–980, 2005.

SANTOS, J. P. Ensacamento de frutos como alternativa para o controle de pragas em pomar orgânico de macieira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 3., 2005, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis: Epagri, 2005. 1 CD.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: atomic view. **Trends Biochemical Science**, v. 18, p. 221-226, 1993.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **The Journal of Biological Chemistry**. vol. 282, n. 5, p. 2753–2764, 2007.

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

SHARON, N.; LIS, H. Legumes lectins - a large family of homologous proteins. **Federation American Societies Experimental Journal**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SILVA, C. V.; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 27, p.86-92, 2005a.

SUN, J.; WANG, L.; WANG, B.; GUO, Z.; LIU, M.; JIANG, K.; LUO, Z. Purification and characterization of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 23, p. 292-299, 2007.

TORCHILIN, V. P. et al. p-Nitrophenylcarnyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific legands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1511, p.397-441, 2001.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, p. 361-372, 2005.

VIEIRA, T. R. et al. Constituintes químicos de *Malaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**. v. 27, p. 536-539, 2004.

VORNHOLT, W.; HARTMANN, M.; KEUSGEN, M. S. P. R. Studies of carbohydrate-lectin interactions as useful tool for screening on lectin sources. **Biosens Bioelectron**. v. 15, p. 2983-2988, 2007.

WONG, J. H.; WONG, C. C. T.; NG, T. B. Purification and characterization of a galactose-specific lectin with mitogenic activity from pinto beans. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1760, p. 808-813, 2006.

WOODLEY, J. Bioadhsion: New possibilities for drug administration? **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, p. 77-84, 2001.

WU, A. M. et al. Carbohydrate specificity of an agglutinin isolated from the root of *Trichosanthes kirilowii*. **Life Sciences**. v. 66, p. 2571-2581, 2001.

CAPÍTULO II



3. JUSTIFICATIVA

Apesar das diferentes pesquisas com lectinas, não existem relatos na literatura acerca da clonagem e caracterização dos genes que codificam essas proteínas na espécie *Eugenia malaccensis*. As lectinas em geral, apresentaram homologia considerável em sua sequência de aminoácidos, e uma especificidade de ligação a carboidratos. Então esses domínios podem ser utilizados para a síntese de oligonucleotídeos específicos a tais genes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Clonar um gene de lectina em genótipo de *Eugenia malaccensis*, bem como analisar a expressão gênica em diferentes tecidos da planta pela técnica RT-PCR semiquantitativo e q-PCR quantitativo.

4.2 Objetivos Específicos

- Clonar um gene de lectina de *E. malaccensis* e caracterizá-lo por sequenciamento de nucleotídeos;
- Avaliar a expressão de genes de lectinas em diferentes tecidos de *E. malaccensis*;
- Analisar as sequências obtidas utilizando ferramentas da bioinformática;

CAPÍTULO III



5. ARTIGO CIENTÍFICO

CLONAGEM E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE DE LECTINA OBTIDO DE DIFERENTES TECIDOS DE *Eugenia malaccensis* L.

ISABEL R. S. ARRUDA¹; MÁRCIA V. SILVA²; MARIA T. S. CORREIA¹

¹ Centro de Ciências Biológicas CCB – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE);

² Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife – PE Brasil.

RESUMO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas não-imune que são capazes de reconhecer e ligar-se a carboidratos de forma específica e reversível. No reino vegetal, estas proteínas são abundantes em sementes, raízes, frutos, flores e folhas. A espécie *Eugenia malaccensis* L., tem sido empregada na medicina popular para diversos fins. O objetivo do trabalho foi clonar um gene de lectina em genótipo de *E. malaccensis*, bem como analisar a expressão gênica em diferentes tecidos da planta pela técnica RT-PCR semiquantitativo e quantitativo (q-PCR). Para a clonagem do gene de lectina, o RNA total foi extraído dos tecidos de folhas, sementes, raízes e caule de *E. malaccensis*, e foi realizado o desenho do oligonucleotídeos específicos utilizados em reações de PCR os fragmentos obtidos foram purificados, clonados e sequenciados. A estratégia de clonagem gênica utilizada foi eficiente para o isolamento e caracterização do gene parcial de lectina com ligação a glicose/manose de *E. malaccensis* (gene EmLec1). A análise da expressão gênica de EmLec1 demonstrou sua síntese em diferentes tecidos vegetais, como folhas, sementes, raízes e caule. Portanto, o presente trabalho promoveu o primeiro relato sobre clonagem de gene parcial de lectina com ligação a glicose/manose de *E. malaccensis*, sendo o ponto inicial para futuras investigações sobre a sua função biológica.

Palavras-chave: *Eugenia malaccensis*; Expressão gênica; Lectinas ligadora de manose.

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins non-immune cells can recognize and bind to carbohydrates in a specific and reversible. In the plant kingdom, these proteins are abundant in seeds, roots, fruits, flowers and leaves. The *Eugenia malaccensis* L. species, has been used in folk medicine for several. The objective of this work was to clone a lectin gene in genotype from *E. malaccensis* L. as well as analyse its gene expression in different plant tissues using RT-PCR technique semi-quantitative and quantitative (qPCR). Total RNA was extracted from tissues of leaves, seeds, roots and stems. For the cloning of lectin gene from *E. malaccensis*, there was the design of specific primers used in PCR fragments obtained were purified, cloned and sequenced. The strategy of gene cloning has been used effectively for the isolation and characterization of the lectin gene partial that bind to glucose / mannose *E. malaccensis* (gene EmLec1). We confirmed the uniform expression of the gene EmLec1 in different plant tissues such as leaves, seeds, roots and stems. Therefore, this work produced the first report on cloning of lectin gene partial connection with the glucose / mannose *E. malaccensis*, being the starting point for further investigations on their biological function.

Keywords: *Eugenia malaccensis*; Gene expression; Mannose binding lectins.

5.1 INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas que reconhecem carboidratos, moléculas cujas características estruturais favorecem suas interações com receptores específicos celulares e que são, portanto, envolvidas em vários processos celulares (SHARON, 2004). Dentre as diversas proteínas presentes em plantas as lectinas apresentam grande importância devido à habilidade de ligar-se especificamente a carboidratos presentes em superfícies celulares (Sun, et al, 2007).

O grupo mais bem estudado de lectinas de plantas são as lectinas de legumes, o crescimento da evidência experimental sugere que estas lectinas são proteínas de defesa que possivelmente protegem sementes maduras contra o ataque de predadores, como insetos (MONZO; BONN; GUTTMAN, 2007; VORNHOLT; HARTMANN; KEUSGEN, 2007). Embora, a localização e a maior concentração estejam necessariamente nas sementes, outros tecidos de muitos vegetais apresentam-se como fontes de lectinas. Estas apresentam uma ampla e variada área de aplicabilidade podendo ser valiosas em processos biotecnológicos, nas áreas de pesquisa médica, biológica, farmacológica e bioquímica (CHUMKHUNTHOD, et al. 2006; WONG; WONG; NG, 2006).

As diferenças estruturais entre as lectinas são devido à variação quanto ao número de subunidades por molécula e pela natureza dos polipeptídeos. Pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio e também as interações hidrofóbicas podem estar presentes nas subunidades de associação, promovendo a grande variedade de lectinas existentes (KENNEDY, et al. 1995). As lectinas de plantas podem ser classificadas de acordo com a especificidade dos domínios de interação com carboidratos em lectinas glicose/manose específicas (CORREIA; COELHO, 1995; NOMURA, et al. 1998), galactose específica (COELHO; SILVA, 2000), ácido siálico específicas (BHOWAL; GUHA; CHATTERJEE, 2005), manose específicas (KOIKE, et al. 1995).

A *Eugenia malaccensis* L. pertence à família Myrtaceae de origem asiática, mais especificamente da Índia e da Malásia. Embora não seja originário da América, aclimatou-se muito bem às condições do trópico americano. Seu fruto, conhecido como jambo, apresenta formato ovóide, coloração vermelha e polpa branca e succulenta, de aspecto atraente (SANTOS et al., 2005). Conhecida popularmente no Brasil como jambo vermelho, jambo roxo e jambo encarnado, faz parte das plantas considerada medicinais, sendo utilizada principalmente pelas populações de baixo poder aquisitivo (OLIVEIRA, et al. 2008).

Apesar das pesquisas com extratos de diferentes tecidos de *E. malaccensis* empregados na medicina popular, não existem relatos na literatura acerca da clonagem e caracterização dos genes que

codificam lectinas dos diferentes tecidos de *E. malaccensis*. Caracterizar os genes de lectinas e analisar a sua expressão gênica em diferentes tecidos da planta é de grande importância para elucidar a sua real função, uma vez que a mesma ainda não está esclarecida. O presente trabalho objetivou a clonagem de genes de lectinas em genótipo de *E. malaccensis*, bem como analisar a expressão gênica em diferentes tecidos da planta pela técnica RT-PCR semiquantitativo e q-PCR quantitativo.

5.2 METODOLOGIA

Material Vegetal

Diferentes tecidos tais como; sementes, folhas, caule e raízes, de *E. malaccensis*, crescida em condições naturais, no Campus da Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Município de Recife, Pernambuco, foram utilizados para isolamento dos ácidos nucleicos e seguida da clonagem e análise da expressão gênica de lectinas. O material testemunho esta depositado no herbário Dárdano de Andrade-Lima (IPA) exsicata nº 83147.

Extração de Ácidos Nucléicos

Para extração de DNA foi utilizado o método do CTAB, descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). O RNA total foi extraído dos diferentes tecidos utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e a concentração do DNA e RNA total foram mensuradas por eletroforese em gel desnaturante de agarose a 1,2 % e espectrofotômetro, respectivamente.

Quantificação de RNA

A concentração de RNA nas amostras foi avaliada por espectrofotometria, tendo uma alíquota de amostra de RNA dissolvida em água deionizada, na proporção de 1:100 (5µL de RNA: 495 µL de água deionizada autoclavada). O grau de pureza do RNA foi estimado pela razão entre as absorbâncias medidas a 260 e 280 nm, que deve ser igual ou superior a 1,9 (SAMBROOK, RUSSELL 2002). Para uma amostra de RNA pura tem-se que: $OD_{260}/OD_{280} = 1,9$ a $2,1$. Uma densidade óptica igual à $1,0$ corresponde a $40\text{ }\mu\text{g}$ de RNA (fita simples) por mL. Desta forma a concentração de RNA na amostra pode ser calculada através da seguinte relação:

$\text{Concentração de RNA } (\mu\text{g/mL}) = OD_{260} \times \text{Fator de diluição (100)} \times 40.$
--

Desenhos de Oligonucleotídeos Específicos Para o Gene de Lectina e Otimização da Reação de PCR

Oligonucleotídeos para as reações de PCR foram desenhados a partir da sequência consenso, obtida pelo alinhamento de sequências de lectinas de *Vigna unguiculata* e *Arachis hypogaea* selecionadas do GenBank (National Center of Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Figura 2), utilizando o programa multalin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) para obter a sequência consenso (Figura 3) e o programa Primer 3 (ROZEN; SKALETSKY, 1998), para obtenção dos *primers*. O *primer forward* específico para *E. malaccensis* foi denominado EmF (5' CAACGTTCTCAGCAAGCAAG 3') com temperatura de anelamento (T_m) de 53,1°C. O *primer reverse* específico foi denominado EmR (5' TTCTCCTCTCCCACTTGGTG 3') com temperatura de anelamento (T_m) de 53,7°C. Os *primers* compreenderam 20pb e as condições de PCR foram otimizadas em termociclador Mastercycler ep realplex (Eppendorf). O produto de amplificação previsto seria de aproximadamente 320pb. Posteriormente, a especificidade dos oligonucleotídeos foi confirmada em reações de PCR. A otimização da reação mostrou que 55°C foi a temperatura de anelamento ideal para o par de *primers* desenhados para os tecidos de *E. malaccensis*. As reações de amplificação foram realizadas num volume final de 25µL nas seguintes condições: tampão 1X (Tris-HCl 20mM pH 8.4; KCl 50mM), MgCl₂ 2,5mM, dNTP 0,3mM, 0,2µM de cada *primer*, *Taq* DNA polimerase 0,4U (Invitrogen Life Technologies) e 25 ng de DNA. A reação de PCR envolveu um passo inicial de desnaturação (94°C por 4 min.), seguido de 30 ciclos envolvendo: (a) desnaturação final a 94°C por 40 s; (b) anelamento a 55°C por 60 s, (c) extensão inicial a 72°C por 60s e a extensão final de 72°C por 3 min. Os produtos de amplificação do gene de lectina foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% a 3 V/cm em tampão de corrida TBE 0,5X pH 8,0, utilizando marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen). O DNA foi corado com SYBR-Green I (Molecular Probes) e visualizado utilizando o fotodocumentador L-pix (Loccus).

VuLec	EF541131	10	LSIATIFLLL-----YQFHEPQSGV	260
AhLmg1	U22469	10	LSIATIFLLL-----YQSHELQSWWS	260
AhLmg2	DQ993156	10	LSIATIFLLL-----YQSHELQSWWS	260
AhLmg	DQ995292	10	LSIATIFLLL-----YQSHELQSWWS	260

Figura 2: Sequências consenso de aminoácidos de Lectinas de plantas utilizadas para a síntese dos primers. Sequências de aminoácidos de Lectinas de VuLec (*Vigna unguiculata*, EF541131), AhLmg1 (*Arachis hypogaea*, U22469), AhLmg2 (*Arachis hypogaea*, DQ993156) e AhLmg (*Arachis hypogaea*, DQ995292) estão alinhadas. Duas regiões separadas por distâncias adequadas estão marcadas com os números correspondentes a cada um dos resíduos iniciais de Lisina. Sequência consenso de aminoácidos marcada em cinza representa a região utilizada para a síntese dos primers.

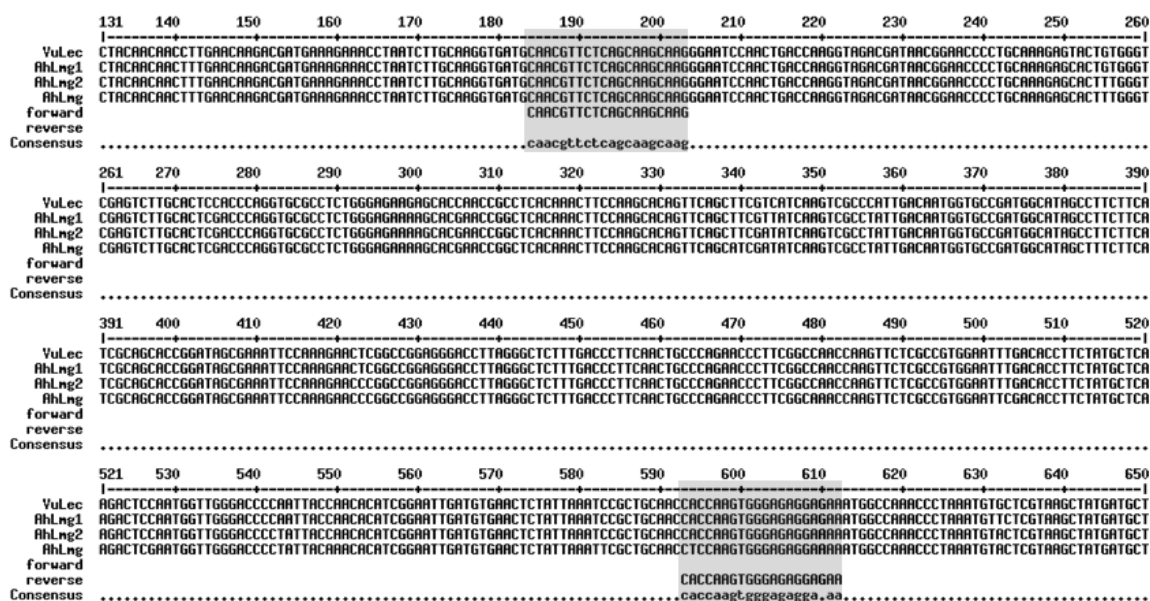


Figura 3: Alinhamento das sequências de nucleotídeos de genes de Lectinas de plantas com os respectivos primers na região consenso. As sequências foram alinhadas usando o programa Multalin version 5.4.1.

RT- PCR Semiquantitativo

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita partindo-se de 10 µg de RNA total de cada tecido, 50 µM do iniciador EmF e H₂O DEPC para volume final de 10 µL. O RNA foi desnaturado a 70°C por 10 min e resfriado em gelo por 1 min. Foi adicionado tampão PCR 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 500 µM e DTT 10 mM, resultando em um volume final de 20µL. As amostras foram incubadas por 5 min a 42°C e, em seguida foi adicionado 200 U de transcriptase reversa Superscript II. Incubou-se por 50 min a 42°C. A enzima foi inativada a 70°C por 15 min. Foram adicionadas 2 U de RNaseH às reações, e incubou-se por 20 min a 37°C, para a degradação das fitas de RNA dos híbridos de cDNA:RNA formados. As soluções de cDNA foram armazenadas a -20°C. O cDNA obtido foi utilizado nas amplificações por PCR realizadas nas seguintes condições: solução tampão PCR 1X (20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 4 mM MgCl₂, 3 mM dNTPs 0,1 µM de *primers* específicos EmF e EmR e 1 U de Taq-DNA polimerase. A amplificação foi realizada em um ciclo a 94°C por 2 min, 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s. a 55°C e 1 min a 72°C e uma extensão final por 4 min a 72°C. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% - TBE 0,5X, revelados utilizando SYBR-Green e visualizados utilizando o fotodocumentador L- pix (Loccus).

PCR Quantitativo (q-PCR)

A expressão de RNAm do gene da lectina foi avaliada por q-PCR em termociclador Mastercycler ep realplex (Eppendorf). A quantificação relativa seguiu o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001) normalizada com o gene constitutivo GPDH (*Forward* 5'TTCTTGAGGTGCTGGCATGGTAGA3', *Reverse* 5'AGAAGGTGAGAGGCTTGCTTGACA3'). As reações de amplificação foram conduzidas em volume final da amostra de 25µL contendo: 50 ng de cDNA, 1X do Platinum SYBR Green q-PCR SuperMix-UDG (Invitrogen), e 200 mM de cada um dos oligonucleotídeos. As condições de amplificação estabelecidas foram: 95 °C por 2 min., 40 ciclos de 95° C por 15 s e 55° C por 20s 68°C por 20s seguidos pela curva de *melting*.

Clonagem em Vetor TOPO T/A

Os produtos purificados da amplificação do cDNA utilizando os oligonucleotídeos específicos para o gene de lectina, foram clonados no vetor T/A PCR2.1 TOPO (Invitrogen) (Figura 4), seguindo as instruções do fabricante. O vetor T/A PCR2.1 TOPO, adequado para clonagem de produtos de PCR, apresenta sítios de reconhecimento para várias enzimas de restrição.

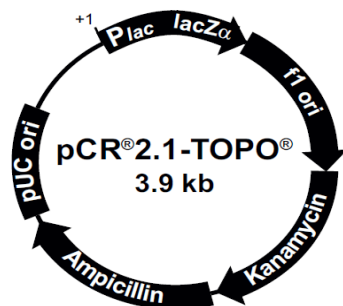


Figura 4: Representação esquemática do vetor T/A PCR2.1 TOPO. Fonte:INVITROGEN.

Transformação de Células Competentes de *E. coli*

O vetor TOPO recombinante foi inserido em células de *E. coli* One Shot® TOP10 quimicamente competentes (Invitrogen), via transformação física. A mistura de 3 µL da reação TOPO Cloning com 25 µL de *E. coli* foi incubada em gelo por 45 min. Seguido de choque térmico a 42°C por 30s., retornando ao gelo por mais 5 min. Às células recombinantes acrescentou-se 250 µL de meio de cultura SOC (Invitrogen). Essas foram então incubadas a 37°C sob agitação (250 rpm) por uma hora, em seguida plaqueadas em meio LB sólido, acrescido de 50 µg/mL de canamicina. Os clones

resistentes foram visualizados após um período de incubação de 16h a 37°C. Estas colônias foram transferidas para o meio de cultura LB líquido e cultivadas durante 16h sob agitação constante (250 rpm).

Extração do DNA Plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído pelo método de minipreparação por lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2002). Após o cultivo das bactérias, o meio foi centrifugado a 4000 x *g* por 5 min a 4°C. O pellet foi lavado com solução contendo Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM (pH 8,0) e glicose 50 mM. Em seguida, foi adicionada a solução contendo SDS 1%, NaOH 0,2N e incubada no gelo por 10 min. Foi adicionada a solução contendo acetato de potássio 3 M e ácido acético 10% (v/v), misturada por inversão, incubada em gelo por 10 min e centrifugada a 4000 x *g* por 20 min. a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, sendo adicionado 15 µg de RNaseA, e incubou-se a 37°C por 20 min. O DNA foi precipitado com isopropanol gelado e incubado em gelo por 5 min. O precipitado foi centrifugado a 4000 x *g* por 40 min a 4°C e o pellet foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado. O pellet foi então seco e dissolvido em água deionizada esterilizada. A concentração de DNA foi determinada através de espectrofotometria a 260 nm e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,2% -TBE 0,5X, sendo revelado pela coloração SYBR-Green. Os plasmídeos recombinantes foram analisados por análise de restrição e submetido ao sequenciamento de DNA.

Sequenciamento e Análise de Bioinformática

As sequências de nucleotídeos de cada clone foram determinadas em sequenciador automático de DNA (ABI PRISM 377 Applied Biosystems, Foster City, Califórnia), utilizando o kit "Big Dye Terminator" (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas, utilizando-se o programa BlastX (ALTSCHUL et al., 1997), com sequências homólogas em bancos de dados "National Center for Biotechnology Information", NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), "The Institute for Genomic Research". O alinhamento de múltiplas sequências foi realizado com o software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk>) (THOMPSON et al., 1994) e, em seguida, construída uma árvore filogenética pelo método neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987) com MEGA 3.1 (KUMAR et al., 2005). A confiabilidade da árvore foi mensurada por análise de *bootstrap* com 1500 simulações e editada com MEGA 3.1.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conjunto de oligonucleotídeos desenhados para a clonagem do gene lectina de *E. malaccensis*, amplificou um fragmento de, aproximadamente, 320 pares de bases (pb) e foi realizado o sequenciamento. Com a obtenção das sequências, foi estudada a similaridade com sequências de genes já conhecidos. A similaridade foi considerada com valores de E menores do que 10^{-5} (1e-05), sendo, portanto, considerando significativa. Com o sequenciamento do fragmento amplificado foi comprovada a identidade com outras sequência de genes de lectinas. O gene parcial de lectina clonado foi nomeado de EmLec1. O alinhamento e análise da sequência nos programas BLASTn e BLASTx mostrou que o gene EmLec1 apresenta 85% de identidade com o gene de lectina de *Vigna unguiculata* (EF541131), 83% de identidade com o gene de lectina com ligação a glicose/manose *Arachis hypogaea* (U22473.1), 82% de identidade com o gene de lectina com ligação a glicose/manose *Arachis hypogaea* (DQ993156.1), 73% de identidade com o gene de lectina com ligação a glicose de *Sesbania bispinosa* (EU263636.1), 68% de identidade com o gene de lectina com ligação a glicose/manose *Arachis hypogaea* (U22469.1) e 68% de identidade com gene precursor de lectina de *Arachis hypogaea* (AJ585523) (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição dos genes depositados no NCBI com identidade com gene EmLec1 de *E. malaccensis*

Nº do acesso	Função	Organismo	Identidade de aminoácido (%)
EF541131	lectin gene	<i>Vigna unguiculata</i>	85
U22473.1	mannose/glucose-binding lectin	<i>Arachis hypogaea</i>	83
DQ993156.1	mannose/glucose-binding lectin precursor	<i>Arachis hypogaea</i>	82
EU263636.1	putative glucose-specific lectin mRNA	<i>Sesbania bispinosa</i>	73
U22469.1	mannose/glucose-binding lectin	<i>Arachis hypogaea</i>	68
AJ585523	mRNA for putative lectin precursor	<i>Arachis hypogaea</i>	68

Foi ainda identificado na sequência parcial do gene EmLec1 resíduos conservados de domínio de ligação a manose (Figura 5). A maioria dos genes clonados de lectina que se liga a manose é da família das Araceae e a sequência de aminoácidos deduzida desses genes possuem três sítios de ligação a manose (QXDXNXVXY) (VON HEIJNE et al., 1986; PEUMANS; VAN DAMME, 1998; FEI et al., 2003). Esses sítios são essenciais para propriedade dessas lectinas em que se liga a manose (RAMACHANDRAIAH et al., 2000).

```

1  ccctcagggcgacggcaacctccgtatctaccatagccttcttcaggatagcgatcttta  60
   Q X D X N L V X Y
61  agaaattccaaagagacccactcgccggaggaccttagggctctttgaccctgacnnn 121

122 cctagaagaccttgaactgcccagaacccttcgcgggtaataccaagttctcctctaac 182

183 tgcccagaagggtatggcctagaatttgacaccttctatgctcaagactccaatgggtga 243

244 gggcaattcagtggccgggtaaggatttggtgaaagaggaaaaatggccaaaccctaaa 304

305 tgtactcgtaag

```

Figura 5: Sequência de nucleotídeo do cDNA do gene parcial de lectina de *E. malaccensis* (EmLec1). O sítio de ligação a manose (QXDXNXVXY) está em destaque. Onde: Q-Glutamina, X - Qualquer aminoácido, D- Aspartato, N- Asparagina, L- Leucina, V- Valina, Y- Tirosina.

Uma árvore filogenética de sequências de lectinas a partir de plantas superiores foi criada. Esta análise filogenética indicou dois distintos “clusters”, apoiado pelo alto valor bootstrap: um que agrupa o gene de lectina com ligação a glicose/manose *Arachis hypogaea* (U22469.1), *Arachis hypogaea* (AJ585523) e o gene de lectina com ligação a glicose de *Sesbania bispinosa* (EU263636.1) e outro grupo com o gene de lectina de *Vigna unguiculata* (EF541131), do gene lectina de *E. malaccensis*, com o gene de lectina com ligação a glicose/manose *Arachis hypogaea* (U22473.1) e com o gene de lectina com ligação a glicose/manose *Arachis hypogaea* (DQ993156.1), sugerindo que o gene clonado parcialmente de *E. malaccensis* pode reconhecer glicose/manose (Figura 6).

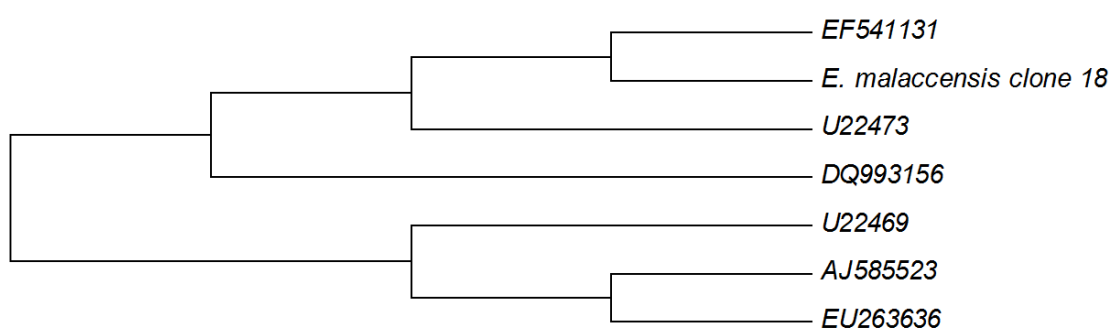


Figura 6: Dendrograma de lectinas de plantas. Árvore filogenética foi desenhada com o programa CLUSTAL W. As sequências de lectinas foram utilizadas do NCBI, e os números de acessos: *Vigna unguiculata* (EF541131), *Arachis hypogaea* (U22469.1), *Sesbania bispinosa* (EU263636.1), *Arachis hypogaea* (U22473.1), *Arachis hypogaea* (AJ585523) e gene EmLec1 de *E. malaccensis*.

Para investigar o padrão de expressão do EmLec1 em vários tecidos de *Eugenia malaccensis*, RNA total foi isolado dos tecidos de folhas, sementes, raízes e caule e submetidos a RT-PCR e PCR quantitativo (q-PCR). As técnicas de análise de expressão gênica exige um eficiente método para a obtenção de grande quantidade e alta qualidade do RNA total. Análise do RNA total das amostras por eletroforese em gel desnaturante a 1% de agarose apresentaram os amplicons referentes ao rRNA 28S e 18S (Figura 7), indicando boa qualidade. A razão da densidade óptica de $A_{260/230}$ e $A_{260/280}$ foi em média de, aproximadamente, 2,0 e 1,9, sugerindo pouca contaminação de polissacarídeos e proteínas, respectivamente, além de elevado rendimento de RNA total (Tabela 3).

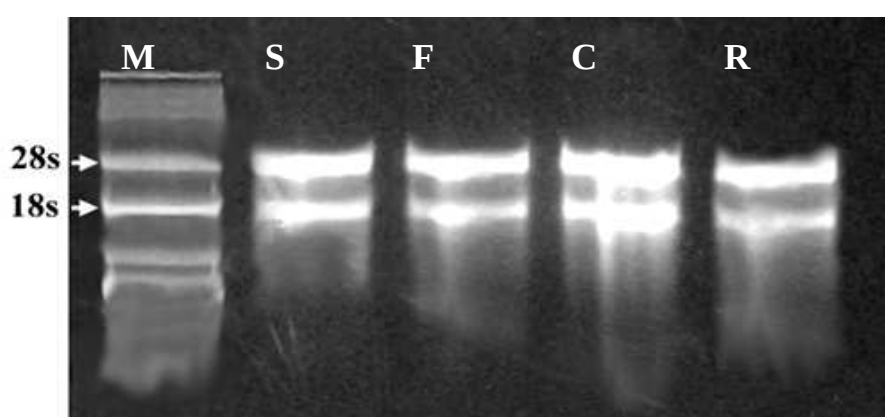


Figura 7: Eletroforese em gel desnaturante de RNA total de *Eugenia malaccensis*. M – Marcador de peso molecular; S – RNAtotal de Semente; F – RNAtotal de Folha; C – RNAtotal de Caule; R – RNAtotal de Raiz.

Tabela 3. Análise espectrofotométrico da qualidade e quantidade do RNA total^a.

Amostra (RNA)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Rendimento ($\mu\text{g/g}$)
Semente	$1,88 \pm 0,14$	$2,06 \pm 0,23$	408 ± 22
Folha	$1,96 \pm 0,1$	$2,12 \pm 0,18$	1260 ± 35
Caule	$1,92 \pm 0,15$	$2,02 \pm 0,25$	1424 ± 40
Raiz	$1,98 \pm 0,12$	$2,09 \pm 0,2$	604 ± 12

^aos valores são médias $\pm$ Desvio padrão (n=3).

A análise por RT-PCR do gene EmLec1 nos tecidos de folhas, sementes, raízes e caule confirmaram a expressão gênica em todos os tecidos (Figura 8). Na maioria das espécies, lectinas que se liga a manose/glicose ocorrem em quase todos os tecidos vegetativos, tais como folhas, flores, ovários, bulbos, tubérculos e raízes (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Entretanto, devido à técnica do RT-PCR ser considerada qualitativa, é mais recomendada para análise da expressão gênica a

utilização do PCR quantitativo e com este objetivo o PCR em tempo real foi realizado e não foi encontrada diferença significativa na expressão desse gene entre os tecidos analisados (Figura 9).

O presente trabalho promoveu o primeiro relato sobre clonagem de gene parcial de lectina com ligação a glicose/manose de *E. malaccensis*, sendo o ponto inicial para futuras investigações sobre a sua função biológica.

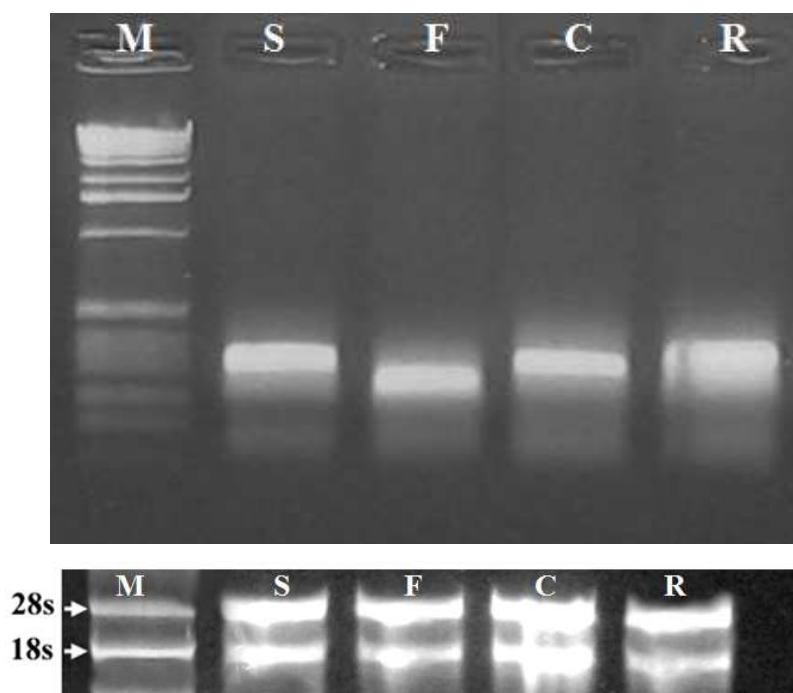


Figura 8: Análise do perfil de expressão do gene EmLec1 em diferentes tecidos de *E. malaccensis*. O RNA total foi isolado de diferentes tecidos da planta: S-semente; F-folha; C- caule e R- raiz e submetidos a RT-PCR semi-quantitativo. Peso molecular (M) de 100 pb. No painel abaixo rRNA 28S e 18S (controle).

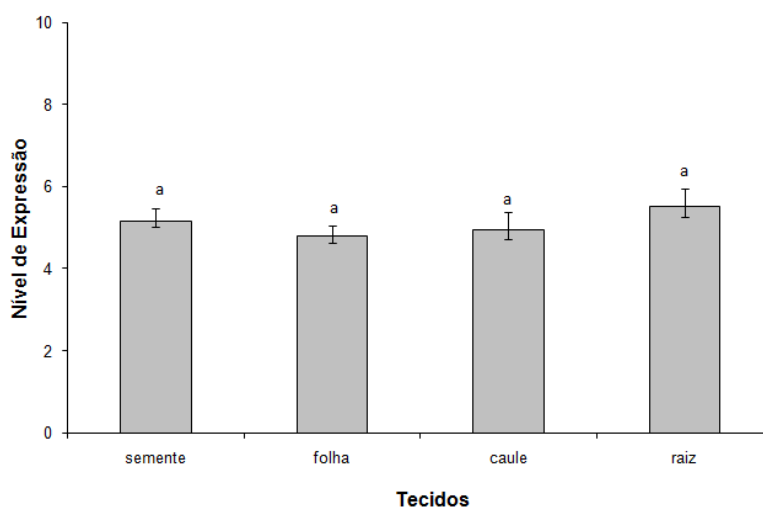


Figura 9: Quantificação da expressão do gene EmLec1 de *E. malaccensis* nos diferentes tecidos da planta: S-semente; F-folha; C- caule e R- raiz.

5.4 CONCLUSÃO

1- A estratégia de clonagem gênica utilizada foi eficiente para o isolamento e caracterização do gene parcial de lectina com ligação a glicose/manose de *E. malaccensis* (gene EmLec1).

2- Foi confirmada a expressão do gene EmLec1 em diferentes tecidos vegetais, como folhas, sementes, raízes e caule em *E. malaccensis*.

5.5 AGRADECIMENTOS

Os autores expressam sua gratidão à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento do projeto ao Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) pelo suporte técnico e a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pela disposição do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas.

5.6.REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Oxford University Press**. p. 3389-3402, 1997.
- BELTRÃO, E.I.C. et al. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v.74, p.125-134, 1998.
- BHOWAL, J. GUHA, A. K.; CHATTERJEE, B. P. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Carbohydrate Research**. v. 340, p. 1973-1982, 2005.
- CHUMKHUNTHOD, P. et al. Purification and characterization of an N-acetyl-d-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1760, p. 326-332, 2006.
- 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. 1-6, 2000.
- CORREIA M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoforma 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry Biotechnology**. v.55, n. 3, p. 261-273, 1995.
- DUTTA, S. et al. Characterization of a galactose binding serum lectin from the Indian catfish, *Clarias batrachus*: Possible involvement of fish lectins in differential recognition of pathogens. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 141, p.76-84, 2005.
- FEI, J. et al. Molecular cloning and characterization of a novel mannose-binding lectin gene from *Amorophallus konjac*; **Molecular Biology Reports**. v. 30, p. 177–183, 2003.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Brasília. 121p. (1998).
- GABIUS H. J. Biological information transfer beyond the genetic code: The sugar code, **Naturwissenschaften**. v. 87, 108–21, 2000.
- KENNEDY, J.F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polimers**. v.

26, p. 219-230, 1995.

- KOIKE, T.; et al. A 35 kDa mannose-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from Kidachi Aloe (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger). **Journal of Biotechnolgy**. v. 118, p. 1205-1210, 1995.
- MONZO, A.; BONN, G. K.; GUTTMAN, A. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 26, n. 5, p. 23-43, 2007.
- NOMURA, K.; et al. Purification and characterization of a manose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. **Phytochemistry**. v. 49, p. 667-673, 1998.
- OLIVEIRA, M. D. L. et al. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**. v.46, p.371–376, 2008.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins versateli proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Geneteic Engineering Rewiews**. v. 15,
- RAMACHANDRAIAH, G et al. Computational analysis of multivalency in lectins: Structures of garlic lectin-oligosachharide complexes and their aggregates. **Glycobiology Advance Access Published**. p. 1-30, 2003.
- ROZEN, S.; SKALETISKY, H. J. *Primer 3*. Code available at (1998) http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html. acessado em: 27/08/2008.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic. **Molecular Biology and Evolution**. v.4, n.4, p.406-425, 1987.
- SAMBROOK, J. E.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2700 p., 2002.
- SANTOS, A. F. S. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**. v. 39, p. 975–980, 2005.
- SUN, J.; WANG, L.; WANG, B.; GUO, Z.; LIU, M.; JIANG, K.; LUO, Z. Purification and characterization of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 23, p. 292-299, 2007.

- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- VON HEIJNE, G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. **Nucleic Acid Research**. v. 14, p. 4683-4690, 1986.
- VORNHOLT, W.; HARTMANN, M.; KEUSGEN, M. S. P. R. Studies of carbohydrate-lectin interactions as useful tool for screening on lectin sources. **Biosens Bioelectron**. v. 15, p. 2983-2988, 2007.
- WONG, J. H.; WONG, C. C. T.; NG, T. B. Purification and characterization of a galactose-specific lectin with mitogenic activity from pinto beans. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1760, p. 808-813, 2006.