

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXI Jornada de Pesquisa

PERFIL ELETROFORÉTICO DE EXTRATO PROTEICO DE CISSUS SICYOIDES L. (VITACEAE).¹

Manoel Francisco Mendes Lassen², Inaiara Rosa De Oliveira³, Taisson Kroth Tomé Da Cruz⁴.

¹ Pesquisa integradora de trabalho de conclusão do curso de Ciências Biológicas

² Biólogo formado pela Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí, Campus Ijuí. Ex-bolsista de Iniciação científica pesquisa e extensão do Programa de Educação Tutorial – PET/SESu/MEC.

³ Professora do Instituto Federal Farroupilha - Campus Santo Augusto.

⁴ Biólogo formado pela Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí, Campus Ijuí. Ex-Bolsista de Iniciação científica pesquisa e extensão do Programa de Educação Tutorial – PET/SESu/MEC.

INTRODUÇÃO

Em 1889, Joseph Von Mering e Oscar Minkowski descobriram que o pâncreas produzia uma substância capaz de controlar o açúcar no sangue, descrita posteriormente como insulina (Oliveira, 2002) e isolada, pela primeira vez, em 27 de julho de 1921 por pesquisadores da Universidade de Toronto.

A insulina é um hormônio proteico responsável por regular a entrada e absorção de açúcares nas células, principalmente a glicose. A secreção inadequada de insulina caracteriza uma patologia denominada de diabetes, que resulta em hipoglicemia persistente de caráter leve a grave. O tratamento dos pacientes que convivem com a doença é feito com o uso de medicamentos orais e/ou injeções intravenosas de insulina.

Notoriamente existem muitas pesquisas com o objetivo de diminuir as intervenções com a infusão de insulina, porém estudos na medicina popular buscam uma solução menos incisiva, utilizando plantas medicinais como forma de tratamento da patologia (Vasconcelos, 2007).

Entre os estudos realizados com plantas medicinais estão as do gênero *Cissus*, que revelaram inúmeras atividades farmacológicas desse gênero, dentre as quais se destacam as ações hipotensora, anti-reumática, hipoglicemiante, anti-inflamatória e antibacteriana (Vasconcelos, 2007; Lima et al., 2001; Beltrame, 2002; Garcia et al., 1997; Garcia et al., 2000). Dentro desse gênero, a espécie *Cissus sicyoides*, uma planta nativa das Américas central e sul e conhecida popularmente como “insulina vegetal”, vem sendo utilizada no tratamento de diversas patologias, dentre elas a diabetes mellitus.

Uma vez que a *C. sicyoides* também é conhecida como “insulina vegetal”, levanta-se a hipótese, eventualmente, de que a planta possa apresentar um composto com características similares à da insulina humana, hormônio de natureza proteica responsável pela regulação da glicemia humana, o que torna relevante investigar a presença de polipeptídeos nos extratos de *C. sicyoides* com massa molecular similar a da insulina humana.

Portanto, este estudo teve por objetivo analisar o perfil eletroforético dos extratos proteicos totais das folhas de *C. sicyoides*.

MATERIAL E MÉTODOS

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXI Jornada de Pesquisa

MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado no município de Jóia, Rio Grande do Sul – Brasil conforme as coordenadas 28° 38' 42" S; 49° 43' 19" W, -28.646944, -54.121944. A planta *C. sicyoides* foi cultivada em substrato para verduras, durante três meses, e posteriormente transferida para o solo onde permaneceu por mais quatro meses para o desenvolvimento total das folhas.

EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO

Para extração do conteúdo proteico das folhas das amostras, foi utilizado o protocolo proposto por Silva (2009) adaptado. Cerca de 1.000 mg de tecidos de folhas foram macerados na presença de nitrogênio líquido e submetidos a extração do conteúdo proteico com 3 mL de tampão salino [50 mM Tris, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 2 mM PMSF, pH 7.5] e 4 mL de tampão sacarose [700 mM sacarose, 500 mM Tris, 50 mM EDTA, 100 mM KCl, 2 mM PMSF, pH 8.0] (De Mot & Vanderleyden, 1989). A seguir, os extratos foram centrifugados a 14.000 rpm em temperatura de 10°C, o sedimento obtido foi descartado e o sobrenadante contendo as proteínas do extrato foi conservado em freezer a -20°C.

O ensaio de quantificação das proteínas do extrato de *C. sicyoides* foi realizado seguindo o método descrito por Bradford (1976). A determinação da concentração proteica foi feita a partir da curva padrão com BSA (0,1 mg/mL) e a leitura espectrofotométrica foi realizada a 595 nm utilizando o espectrofotômetro (Pharmacia Biotech Ultraspec 2000).

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, sob condições desnaturantes, conforme o método descrito por Laemmli (1970) com adaptações.

Para a montagem e a corrida eletroforética dos géis foi utilizado o sistema Mini-protean II TETRA CELL® (Bio-Rad), seguindo os procedimentos determinados pelo fabricante. Os géis SDS-PAGE 15% foram submetidos à corrida em temperatura ambiente durante aproximadamente 2 h e 45 min em solução tampão pH 8.3 [Tris, glicina, SDS, H₂O destilada], utilizando uma corrente inicial de 10 mA e, posteriormente, aumentada para 20 mA com voltagem aberta até o final da corrida.

Após a eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G 250, descorados com solução de metanol 20% (v/v) até a visualização das bandas proteicas, e fotografados.

Para acompanhar a identificação das bandas proteicas foi utilizado o marcador Polypeptide SDS-PAGE Standards (Bio-Rad™) na concentração 10/10 µl (v/v) e insulina humana comercial (Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação dos métodos de extração revelou valores de rendimento bastante similares (Tabela 1). Porém, em termos quantitativos o tampão sacarose proporcionou um rendimento um pouco maior na extração de proteínas totais quando comparado com o tampão salino.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXI Jornada de Pesquisa

A eficiência do tampão sacarose em relação ao tampão salino pode estar relacionada à propriedade da sacarose em favorecer a ruptura de membranas celulares e a solubilização de diferentes classes de proteínas (Válcu & Schlink, 2006).

As análises em SDS-PAGE (Figura 1) mostraram que os extratos proteicos de folhas de *C. sisyoides* obtidos com os tampões salino e sacarose apresentaram perfis muito similares com bandas de aproximadamente 26 kDa, 17kDa, 10 kDa e 6 kDa (Figura 1, linhas 4 a 7).

Comparando o perfil das bandas pode se observar que o extrato obtido com o uso do tampão sacarose apresentou um maior número de bandas e de maior intensidade. Como mencionado anteriormente, a sacarose favorece a ruptura de membranas celulares e a solubilização de diferentes classes de proteínas (Válcu & Schlink, 2006), o que poderia explicar uma maior intensidade das bandas proteicas no gel quando comparadas com as obtidas após a extração com o tampão salino.

A análise eletroforética revelou a presença de bandas proteicas com massa molecular próxima de 6 kDa, porém a intensidade dessas bandas foi muito fraca. Isso talvez se deva a baixa concentração dessas proteínas nos extratos bem como o tipo de método de coloração utilizado para sua detecção. Sabe-se que a sensibilidade do método de coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250 é de 100 ng de proteínas, podendo aumentar significativamente, se for utilizado o método de coloração com nitrato de prata, o qual detecta de 0.1 a 1.0 ng de proteína (Patton, 2002). Portanto, se tivéssemos utilizado o método de coloração com nitrato de prata, talvez pudéssemos ter uma melhor marcação de algumas proteínas.

Já a banda proteica de 6 kDa correspondente a insulina humana comercial (Figura 1, linhas 2 e 3) não foi detectada no gel SDS-PAGE, talvez porque o método utilizado para análise eletroforética ou de coloração não tenha sido o mais adequado.

No método descrito por Laemmli (1970) para análise eletroforética em gel SDS-PAGE o tampão de corrida contém, geralmente, na formulação os reagentes Tris e glicina. Porém, esse tampão não é recomendado para corrida eletroforética de polipeptídeos com massa molecular menor que 10 kDa (Villar, 2006). Em nossos experimentos, a utilização do tampão Tris/glicina mostrou-se adequado desde que a corrida do gel fosse realizada com amperagem fixada entre 10 e 20 mA, o que possibilitou a migração de polipeptídeos de até 1,4 kDa do marcador Polypeptideo SDS-PAGE Standards™ (BioRad), bem como de proteínas com massa molecular variando de 6 a 26 kDa.

Embora, alguns pesquisadores mencionam que o tampão contendo os reagentes Tris e tricina é o mais indicado para análise de polipeptídeos cujas massas moleculares são menores do que 10 kDa (Schagger e Von Jagow, 1987; Villar, 2006), porque o reagente tricina atua como “trailing” íon, os resultados obtidos neste trabalho corroboram que o método Laemmli também pode ser utilizado para observação de proteínas de baixa massa molecular, desde que sejam feitas algumas adaptações para melhorar a migração e a visualização dessas moléculas.

A presença de bandas de aproximadamente 6 kDa nos extratos proteicos de *C. sisyoides*, parece indicar, eventualmente, que essa planta pode apresentar alguma proteína de massa molecular análoga a da insulina humana, porém esta ideia é muito prematura, uma vez que a nossa análise foi baseada apenas no perfil eletroforético dos extratos proteicos brutos. Sendo assim, faz-se necessário estudos de proteômica mais complexos, tais como análises de espectrometria de massa e ensaios de Western Blotting, que possam elucidar a identidade molecular das proteínas encontradas nos

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXI Jornada de Pesquisa

extratos de *C. sicyoides* e também testes para detecção da capacidade hipoglicemiante de cada uma delas, principalmente a de proteínas de massa molecular em torno de 6 kDa.

CONCLUSÃO

Este trabalho é pioneiro na análise em gel de poliacrilamida SDS-PAGE do conteúdo proteico total presente nas folhas da planta *C. sicyoides*, e os resultados obtidos revelaram a presença de proteínas de baixa massa molecular entre elas uma de aproximadamente 6 kDa, massa correspondente a da insulina humana. Nossos dados sugerem pela primeira vez que uma proteína com massa molecular análoga à da insulina humana poderia ser o composto ativo responsável pela capacidade hipoglicemiante atribuída a *C. sicyoides*.

PALAVRAS CHAVES: *Cissus sicyoides* (L), insulina vegetal, Proteômica, SDS-PAGE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbosa, W. L. R.; Santos, W. R. D.; Pinto, L. N.; Tavares, I. C. C. 2002. Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12: 13-15.
- Beltrame, F. L.; Pessini, G. L.; Doro, D. L.; Dias Filho, B. P.; Bazotte, R. B.; Cortez, D. A. G. 2002. Evaluation of the anti diabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 45(1).
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding - *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254;
- Barbosa, W. L. R.; Santos, W. R. D.; Pinto, L. N.; Tavares, I. C. C. 2002. Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12: 13-15.
- Beltrame, F. L.; Pessini, G. L.; Doro, D. L.; Dias Filho, B. P.; Bazotte, R. B.; Cortez, D. A. G. 2002. Evaluation of the anti diabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 45(1).
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding - *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254;
- De Mot, R.; Vanderleyden, J. 1989. Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 35: 960-967.
- Garcia A. M.; Quílez M. T.; Saenz M. E.; Martinez-Dominguez R. P. 2000. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. *Journal Ethnopharmacol*, 71: 395-400.
- Garcia, G.; Cartas-Heredia, L.; Lorenzana-Jimenez, M. and Gijón, E. 1997. Vasoconstrictor effect of *Cissus sicyoides* on Guinea-Pig aortic rings. *General Pharmacology*, 29: 457-462.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXI Jornada de Pesquisa

- Lima, J. C. F.; Lima, L. S.; Teixeira, J. B. P.; Vecchi, C.; Soares, G. L. G. 2001. Caracterização Histoquímica da “Insulina Vegetal” *Cissus verticillata* (L.) Nicholson & C. E. Jarvis (Vitaceae). V Jornada Paulista de Plantas Medicinais, Natureza, ciência e Comunidade. São Paulo. 219p.
- Lizama R. S.; Martinez M. M.; Pèrez O. C. 2000. Contribución al estudio de *Cissus sicyoides* L. (Bejuco-ubi). Revista Cubana de Farmacologia, 34: 120-124.
- Oliveira, R. F. 2002. Diabetes dia-a-dia: guia para o diabético, seus familiares, amigos e membros das equipes de saúde. Rio de Janeiro: Revinter, 2: 362 p.
- Patton, W.F. 2002. Detection technologies in proteome analysis. Journal of Chromatography B, 771: 3-31.
- Rocha, J. F. da. 2014. Indução de calos em explantes foliares de *Cissus verticillata* (L.) Nicholson & C. E. Jarvis. Dissertação (Mestrado) Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho – Rondônia. 41 f
- Schagger H.; Jagow G.V. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical biochemistry, 166: 368-379.
- Silva, R. dos S., Souza, C. R. B. de. 2009. Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*. Acta Amazonica, 39: 255-260.
- Souza, V. C.; Lorenzi, H. Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.
- Válcu, C.M.; Schlink, K. 2006. Efficient extraction of proteins from woody plant samples for two-dimensional electrophoresis. Proteomics, v 6, p.4166-75.
- Vasconcelos, T. H. C. de; Modesto-Filho, J.; De Fátima, M.; Diniz, F. M; Santos, H. B.; Aguiar F. B. de.; Moreira, P. V. L. 2007. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). Revista brasileira de farmacognosia, 17: 583-591.
- Villar, L. S. Otimização de metodologia para extração e determinação de metalotioneínas por eletroforese em gel de poliacrilamida de ostras *Crasostrea rhizophorae* (Guiling, 1828) para aplicação em estudos ambientais. 2006. [s.n] Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal Fluminense Niterói, RJ. 50f.

Tabela 1: Dados de quantificação via espectrofotômetro dos extratos proteicos totais de folhas de *Cissus sicyoides*. Amostras contendo 1.000 mg de tecidos foram extraídas em 3 mL e 4 mL de tampões salino e sacarose respectivamente.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXI Jornada de Pesquisa

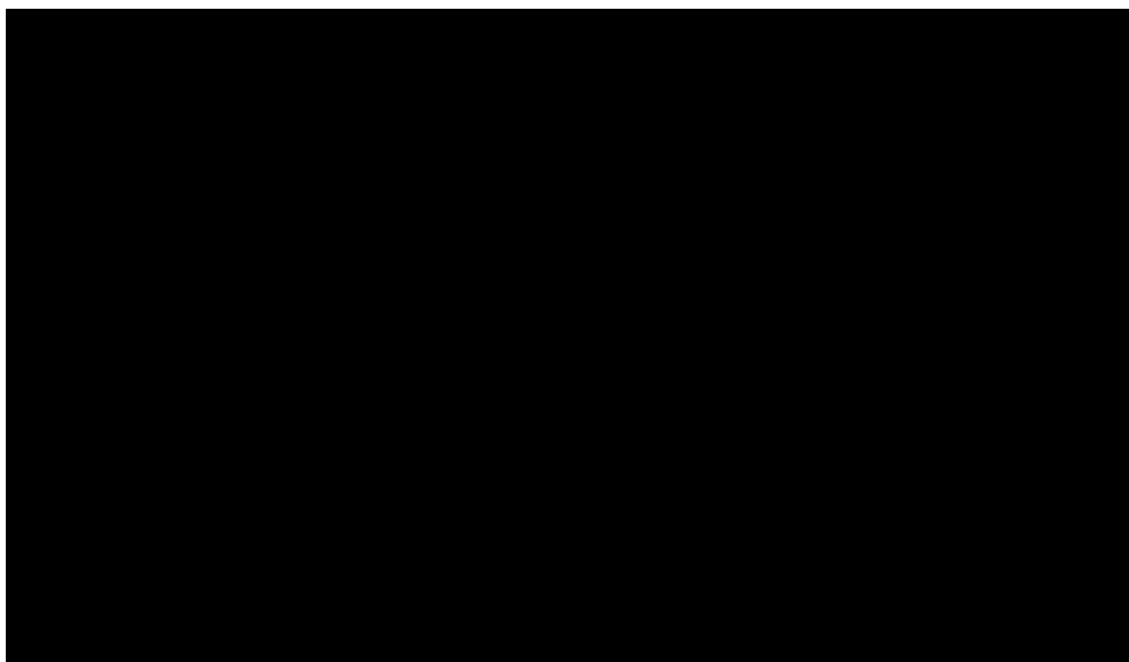


Figura 1. Gel de eletroforese SDS-PAGE dos extratos proteicos de *Cissus sycioides*. M, marcador Polipeptídico SDS-PAGE Standards - Bio-Rad™; IH, Insulina Humana; SL e SC, extratos de *Cissus sicyoides* com tampão salino e tampão sacarose, respectivamente.