

INVESTIGAÇÃO DA INDUÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELA LECTINA EXTRAÍDA DE *Bauhinia variegata*

AMANDA SIGAL SOARES¹; CAROLINE RIZZI², AMANDA MUNARI GUIMARÃES¹; GIOVANNI VICTORIO CERRUTI¹; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR³; LUCIANO DA SILVA PINTO⁴

¹ BioPro Lab, graduação Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas – amanda_soares@hotmail.com; amanda_munari@hotmail.com; gvicerruti@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – ccrizzi@yahoo.com.br;

³ Fundação Universidade de Rio Grande- varelajras@hotmail.com

⁴ Coordenador BioPro Lab, CD Tec/Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas – ls_pinto@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A demora na cicatrização é considerada um problema terapêutico complexo da medicina moderna, principalmente em pacientes com diabetes e outras desordens fisiológicas. A pele constitui uma barreira mecânica que dificulta a invasão do organismo por patógenos, sendo de fundamental importância a manutenção de sua integridade (ABBAS & LICHTMAN, 2005). A investigação de novos fármacos pode ser realizada empregando-se moléculas de origem natural, sendo o desenvolvimento de tecnologias para a cura de feridas ou úlceras na pele de grande interesse para a indústria farmacêutica (NASCIMENTO-NETO; PINTO, L.S., 2011).

Lectinas são encontradas em diversos organismos e são caracterizadas por serem um grupo heterogêneo de proteínas ou glicoproteínas, com capacidade de se ligar reversivelmente a carboidratos (LAM; NG, 2010). Dentre as diversas atividades biológicas atribuídas às lectinas, destacam-se a identificação de grupos sanguíneos, a caracterização de micro-organismos, a estimulação mitogênica de células imunes, a detecção e o isolamento de carboidratos em superfície celular (SELL; COSTA, 2000). A habilidade dessas moléculas de ligarem-se a receptores celulares e estimular sua proliferação indica potencial para acelerar a cicatrização de feridas e a regeneração epitelial.

A lectina de *Bauhinia variegata* (BvL) tem demonstrado a capacidade de induzir a cicatrização de feridas *in vivo* em trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (NASCIMENTO-NETO; PINTO, L.S., 2011. REIS, L.B., 2013). Esta lectina é isolada da planta pata-de-vaca e apresenta diversas atividades biológicas (MISHRA, A. & SHARMA. 2013). O estímulo de proliferação celular é um mecanismo que agentes terapêuticos podem iniciar a reparação tecidual e os fibroblastos são as principais células envolvidas no reparo de danos na pele (PHAN *et al.*, 1998). O objetivo deste trabalho é avaliar a nível celular os efeitos da BvL na indução da cicatrização empregando a linhagem humana de fibroblastos, HFF-1 e de melanoma humano, A-375.

2. METODOLOGIA

A partir da espécie vegetal *Bauhinia variegata*, foi isolada a lectina denominada BvL, através de etapas de Trituração, delipidação com hexano, extração, purificação por cromatografia de afinidade seguido por diálise e, finalmente, liofilização do material.

A ação biológica da lectina foi realizada através do teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazolico), que avalia viabilidade e proliferação celular, em linhagens HFF-1 (fibroblastos humanos) e A-375 (melanoma humano). As linhagens celulares foram tratadas com BvL em diferentes concentrações (0,1; 0,05; 0,025; 0,0125 e 0,006 mg/mL) e nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Como controles de proliferação, foram utilizados albumina de soro bovino (BSA) e Concanavalina A (ConA). Para os experimentos, as células foram mantidas em meio DMEM ou MEM suplementados com 10% de soro fetal bovino à 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Após os períodos de incubação, as células tratadas por duas horas com meio contendo 5 mg/mL de MTT. A leitura das absorbâncias foi feita a 492 nm. O ensaio de MTT foi realizado em triplicata.

Para a avaliação da proliferação celular foi realizado o ensaio empregando o kit Click-iT Plus EdU Flow Cytometry Assay (Life technologies). As células HFF-1 foram mantidas como descrito anteriormente na presença de BvL por 72 horas. Após esse período, as células foram incubadas por uma hora na presença de 10 µM de EdU. Posteriormente, as células foram tripsinizadas e lavadas com PBS contendo 1% de BSA e em seguida, fixadas e permeabilizadas empregando tampão contendo saponinas. As células foram então marcadas com o corante fluorescente picolil azida por 30 minutos e analisadas por citometria de fluxo com excitação a 488 nm. Todos os dados gerados foram analisados empregando o programa GraphPad e o teste estatístico ANOVA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes *in vitro* demonstraram ausência de citotoxicidade de BvL, além de incrementos da proliferação celular de 169% a 210% quando a lectina foi empregada concentrações de 0,0125 e 0,006 mg/mL em 72 horas de tratamento ($p \leq 0,05$) (Figura 1).

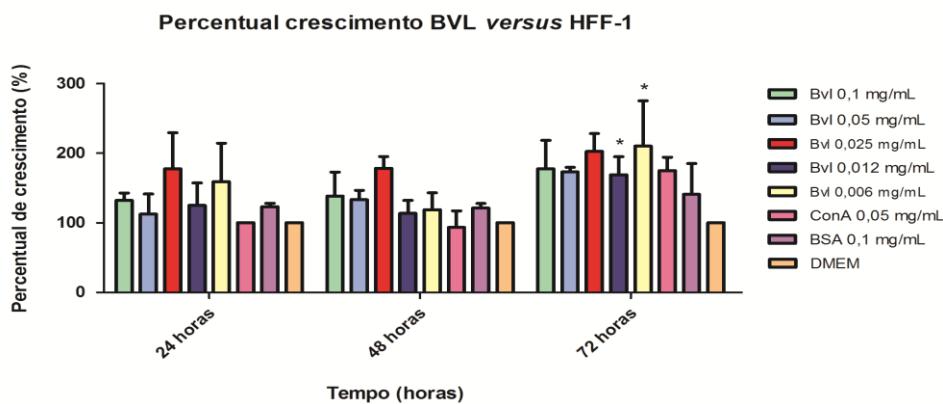
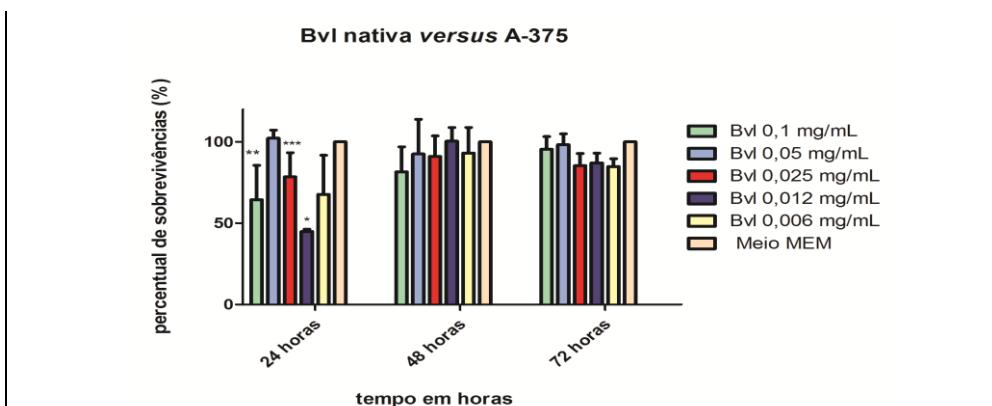


Figura 1: Proliferação dos fibroblastos humanos (HFF-1) na presença de BvL em diferentes concentrações e tempos. (* $p \leq 0,05$), teste ANOVA.

Para avaliar se a BvL também teria atividade proliferativa em melanoma (linhagem A-375), o que impossibilitaria seu uso como terapêutica na cicatrização de feridas na pele, foram realizados ensaios empregando a lectina em estudo nessa linhagem celular. A lectina BvL não estimulou a proliferação das células

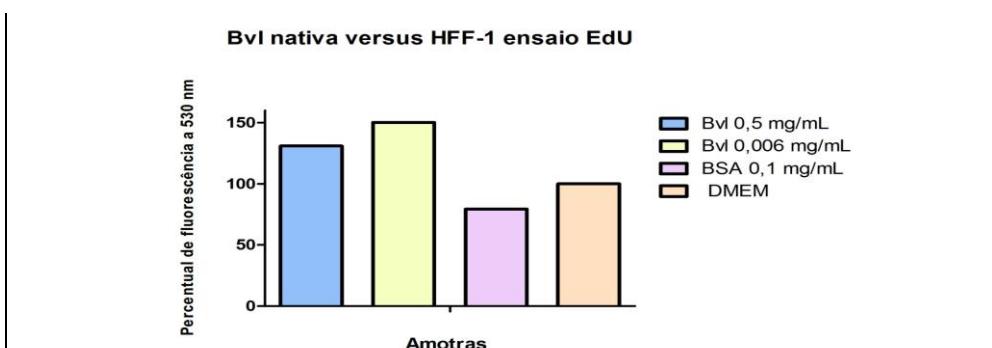
tumorais, por outro lado inibiu significativamente a proliferação dessas células em algumas concentrações no período de 24 horas (Figura 2).



Formatado: Centralizado

Figura 2: Proliferação de célula tumoral de pele (melanoma, A-375) na presença de BvL em diferentes concentrações e tempos. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,0001$), teste ANOVA.

O ensaio EdU avalia a proliferação celular diretamente pela medição da síntese do DNA empregando um nucleosídeo análogo a timidina fluorescente (EdU) que é incorporado ao DNA durante sua síntese, a qual pode ser quantificada através da citometria de fluxo. Na presença de BvL apó 72 horas, as células HFF-1 demonstraram um incremento de 131% e 150% em relação ao controle (Figura 3).



Formatado: Centralizado

Figura 3: Percentual de fluorescência a 530 nm correspondente a síntese de DNA nas células HFF-1 tratadas com BvL por 72 horas.

A cicatrização é o processo em que ocorre a substituição de um tecido lesado por um tecido conjuntivo altamente vascularizado. O primeiro passo é o início de uma reação inflamatória, onde as células fagocitárias recrutadas reabsorvem o sangue extravasado e os produtos da destruição celular. Em seguida, a proliferação fibroblástica e endotelial são as responsáveis por originar o tecido conjuntivo cicatricial. As tentativas de restaurar a lesão induzida por uma agressão local resultam em reparo e substituição das células mortas por células saudáveis (CARVALHO, 2002). Os fibroblastos são células essenciais para a cura de ferimentos cutâneos e a estimulação de sua proliferação é um mecanismo pelo qual os agentes terapêuticos iniciam o reparo (PHAN *et al.* 1998). Entretanto, o mesmo agente terapêutico não pode induzir a proliferação de células malignas.

O tratamento com BvL induziu a proliferação de fibroblastos em relação aos controles, dados demonstrados pela cultura celular e pela incorporação de DNA, o que poderia explicar parcialmente os dados obtidos por Neto *et al* (2011). Por outro lado, não contribuiu para a proliferação de células de melanoma humano.

4. CONCLUSÕES

Desta maneira, a lectina BVL apresenta potencial como fármaco para estimular a cicatrização feridas. Por outro lado, apresenta possível potencial na inibição do crescimento de melanoma. No entanto, outros estudos serão realizados como *western blot* e PCR em tempo real, a fim de determinar os mecanismos de ação da lectina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2005.
- AGRAWAL, R.C.; PANDEY, S. Evaluation of anticarcinogenic and antimutagenic potential of *Bauhinia variegata* extract in Swiss albino mice. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 10, p. 913-916, 2009.
- CARVALHO, P.T.C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectofotometria: Estudo experimental em ratos diabéticos**. 2002. Dissertação. (Mestrado em Bioengenharia). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC. Universidade de São Paulo.
- DAMODARAN, D. Cancer LectinDB: a database of lectins relevant to cancer. **Glycoconjugate Journal**. India, 2008. v. 25, n. 3, p. 191-198.
- LAM, S.K.; NG, T.B. Lectins: production and practical applications. Springer, **Applied Microbiology and Biotechnology**. China, 2011. v. 89, n. 1, p. 45-55.
- MISHRA, A.; SHARMA, A.K.; KUMAR, S.; SAXENA, A.K.; PANDEY, K. *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. **Hindawi Publishing Corporation**. BioMed Research International. India, 2013.
- NETO, L.G. PINTO, L. DA S.; BASTOS, R.M.; EVARISTO, F.F.; VASCONCELOS, M.A.; CARNEIRO, V.A.; ARRUDA, F.V.; PORTO, A.L.; LEAL, R.B.; JUNIOR, V.A.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E. H. Effect of the lectin of *Bauhinia variegata* and its recombinant isoform on surgically induced skin wounds in a murine model. **Molecules**. Brasil, 2011. v.16, n. 11, p. 92-98.
- PHAN T.T., HUGHES M.A., CHERRY G.W. Enhanced proliferation of a fibroblasts and endothelial cells treated with an extract of the leaves of *Chromolaena odorata* (Eupolin), an herbal remedy for treating wounds. **Plastic and Reconstructive Surgery**. Vietnam, 1998. v.101, n. 3, p. 756-65.
- REIS, L.B.; RIZZI, C.; BIDONE, J.; FONSECA, A.F.; MAIDANA, M.; PINTO, L.S. Efeito da lectina extraída de *Bauhinia variegata* incorporada ao hidrogel natrosol na cicatrização *in vivo*. **CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, Pelotas, 2013.
- SELL, A.M.; COSTA, C.P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, Brasil, 2000. v. 22, n. 2, p. 297-303.

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman

Formatado: Espaço Antes: 6 pt

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman

Formatado: Fonte parág. padrão, Fonte: (Padrão) Times New Roman, Cor da fonte: Preto, Português (Brasil), Padrão: Transparente

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman, Não Negrito

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman, Não Negrito

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman, Não Negrito

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman, Não Negrito

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman, Não Negrito

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman, Não Negrito

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman