

LECTINA rBanlec INIBE O CRESCIMENTO DA LINHAGEM CELULAR A375 DE MELANOMA MALIGNO CUTÂNEO

LAURA JUNQUEIRA DE CAMARGO¹; ANDRÉ ALEX GRASSMANN²; CAROLINE RIZZI²; PAULA FERREIRA KNABAH²; RAFAEL CAGLIARI²; LUCIANO DA SILVA PINTO³

¹Universidade Federal de Pelotas – laurajcamargo@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – grassmann.aa@gmail.com

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

²Universidade Federal de Pelotas – paulaknabah@gmail.com

³BioPro Lab., Universidade Federal de Pelotas – orientador: ls_pinto@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é hoje o tumor que mais cresce em incidência no mundo, correspondendo a aproximadamente 4% dos tumores cutâneos (GARBE et.al, 2011). O câncer se desenvolve como resultado de anormalidades genéticas, levando a inibição do caminho natural de apoptose, em resposta ao dano no DNA (CANTO et.al, 2007). Dentre os principais fatores de suscetibilidade a alterações genéticas que levam ao melanoma, destacam-se a história familiar positiva (três ou mais parentes em primeiro grau com a doença), presença de múltiplos nevos melanocíticos benignos, história de tumor cutâneo prévio (melanoma ou não), presença de pele clara, olhos claros e cabelos loiros ou ruivos, e exposição demasiada ao sol, principalmente aos raios ultravioletas tipo A (UV-A) (CANTO et.al, 2007). As opções de tratamento são limitadas, além do tratamento cirúrgico, há terapia adjuvante com IFN- α (Interferon-alfa), vacinas em desenvolvimento, quimioterapia (utilizando medicamentos como dacarbazina e cisplatina), imunoterapias com IL-2 (interleucina-2), e terapia celular (GARBE et.al, 2011). Porém, estas abordagens não são totalmente eficazes, são controversas, e algumas delas apresentam efeitos indesejáveis (GARBE et.al, 2011). Há a necessidade de desenvolvimento de novos tratamentos eficientes e sem efeitos indesejáveis para combater o melanoma maligno cutâneo.

As lectinas são um grupo de proteínas de origem não imune, que reconhecem e ligam carboidratos reversivelmente, sem os modificar e podem ser aplicadas em diferentes processos biológicos. Estão presentes em diferentes organismos, dos mais variados níveis de complexidade (REIS et.al, 2014). Recentemente, diversos estudos contribuíram para um maior entendimento da famílias de lectinas conhecidas comumente como Lectinas Relacionadas à Jacalinas (JRLs) (REIS et.al, 2014). Uma das representantes de JCLs é a lectina isolada de frutos de *Musa acuminata*, conhecida popularmente como banana (REIS et.al, 2014). Sua lectina, chamada Banlec é uma proteína homodimérica de aproximadamente 15 KDa que se liga à manose e glicose contendo oligossacarídeos. A Banlec já demonstrou atividade imunomoduladora, atividades antiviral/antimicrobiana e antiproliferativa, quando testada em células de leucemia (L1210) e também em células de Hepatoma (HepG2) (SINGH et al., 2014). Neste trabalho, foi obtida uma variante de Banlec desenvolvida após análises de sequencias de JCLs. Esta proteína foi expressa e avaliada quanto a sua

capacidade de inibição de crescimento de linhagem celular A375 de melanoma maligno cutâneo humano.

2. METODOLOGIA

O vetor recombinante para expressão em *Escherichia coli* pAE/Banlec-type utilizado neste trabalho foi construído previamente (REIS et. Al, 2014). A sequência sintética de Banlec-type utilizada foi obtida após análise *in silico* objetivando otimizar a sequência de Banlec nativa, modificando 11 aminoácidos com possível ligação a carboidrato, baseado nas variações encontradas em diversas JCLs. A sequência sintética codificando a lectina Banlec-type foi amplificada do vetor pUC18-seq.453DNA por PCR. O produto da PCR foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e inserido no vetor pAE, digerido com as mesmas enzimas (REIS et. al, 2014).

O vetor recombinante pAE/Banlec-type foi utilizado para transformar *E. coli* BL21(DE3) Star por choque térmico e cultivadas em LB líquido com ampicilina. Quando a cultura atingiu fase exponencial de crescimento a expressão das proteínas recombinantes foi induzida com 1 mM de IPTG. Após 3 h de expressão as células foram coletadas por centrifugação, solubilizadas em tampão de purificação de proteínas recombinantes e lisadas sonicação. Após nova centrifugação o pellet foi ressuspensido no mesmo tampão, agora contendo uréia, e novamente centrifugado. Ambos sobrenadantes foram avaliados em eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE) para identificar a solubilidade da proteína recombinante expressa. Banlec-type recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel no sistema automatizado AKTAprime (GE Healthcare). Após diálise contra tampão fosfato-salino (PBS), rBanlec-type foi observada por SDS-PAGE e Western blot (WB) utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis.

As células de melanoma cutâneo humano, linhagem A375, cresceram em meio MEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37 °C em uma atmosfera úmida contendo 5% de dióxido de carbono. Todos os experimentos foram realizados com as células na sua fase mais rápida de crescimento. As células foram distribuídas em placas de 96 cavidades, com densidade celular inicial de 10^4 céls/poço. Para tratamento rBanlec-type foi dissolvida em MEM/10% SFB para 1 mg.ml^{-1} e em seguida diluída a 0,1, 0,05 e $0,025 \text{ mg.ml}^{-1}$. Como controle negativo foi utilizado albumina sérica bovina (BSA) na concentração de $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$. Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, a citotoxicidade de rBanlec-type em A375 foi avaliada pelo teste de MTT, conforme as instruções do fabricante. A absorbância foi medida a 492 nm e a porcentagem de inibição foi determinada como descrito anteriormente (Begnini et al. 2013). Foram realizados 3 experimentos independentes e os dados analisados por análise de variância (ANOVA) seguido de teste Tukey post hoc para múltiplas comparações. Foi adotado como valor significante diferenças com valor de $P < 0,001$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sequência codificadora de rBanlec-type foi eficientemente clonado no vetor pAE. Depois da indução com IPTG, as células de *E.coli* BL21(DE3) Star expressaram uma proteína recombinante de aproximadamente 15 kDa,

correspondente a rBanlec-type (Fig. 1). A proteína rBanlec-type foi eficientemente purificada por cromatografia de afinidade ao níquel e reconhecida pelo WB utilizando anticorpo anti-6xHis (dados não mostrados). É possível observar uma banda com o dobro do tamanho do monômero de rBanlec-type, possivelmente correspondente ao dímero desta proteína, característica esperada para a lectina de banana.

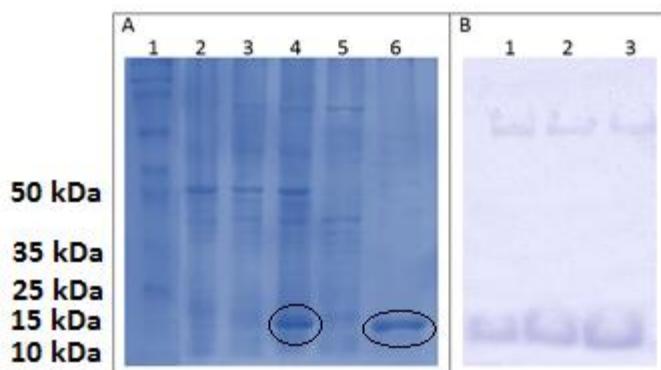


FIGURA 1: Eletroforese em gel de policrilamida 12% mostrando expressão e purificação da lectina rBanlec-type, indicada pela seta à esquerda (15 kDa). A. Processo de expressão e teste de solubilidade de rBanlec-type: 1- Marcador de peso molecular de proteínas (Rainbow protein marker full range – BioRad); 2- *E.coli* BL21 (DE3) Star; 3- *E. coli* Star contendo plasmídeo pAE/Banlec-type não induzida; 4- *E. coli* Star contendo plasmídeo pAE/Banlec-type com a expressão de rBanlec-type induzida por 1mM de IPTG; 5- Sobrenadante após lise celular com tampão sem desnaturante; 6- Sobrenadante contendo as proteínas solúveis em uréia. B. Alíquotas da purificação de rBanlec-type por cromatografia de afinidade ao níquel.

Todas as concentrações testadas de rBanlec-type inibiram o crescimento das células A375 (Fig. 2). Após 24 h de tratamento, a inibição de crescimento foi de cerca de 85% em relação ao controle sem tratamento (apenas meio) para todas as concentrações. Após 48 e 72 h, a inibição do crescimento foi de 92-93% em relação ao controle. BSA não inibiu o crescimento de A375. Não houve o fenômeno de resposta à diferentes doses. Há a necessidade de realizar novos testes, diminuindo as concentrações da lectina para determinar a dose mínima de inibição e buscar um efeito dose-resposta; utilizar a lectina ligada ao carboidrato ligante; e testar o efeito citotóxico em células não neoplásicas.

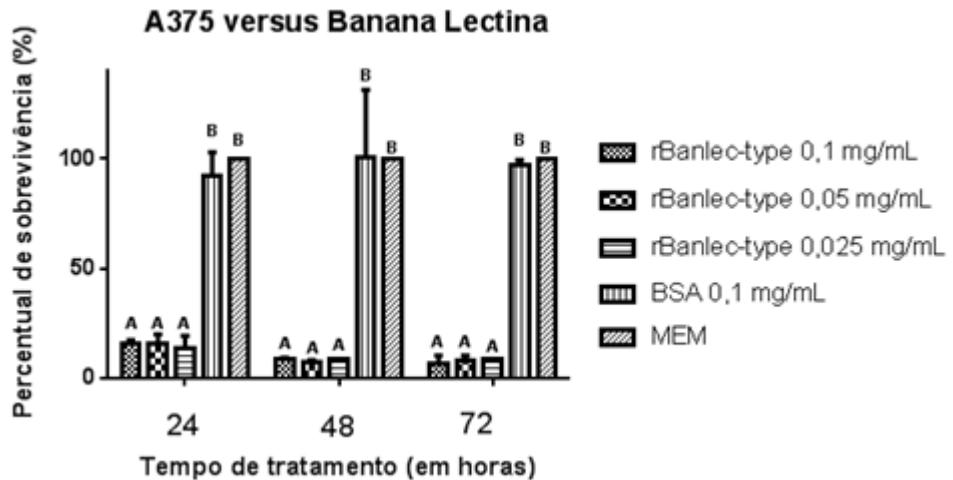


FIGURA 2: Percentual de sobrevivência das células de melanoma em função do tempo em horas das 3 concentrações de rBanlec-type e 2 controles (BSA e MEM). Diferentes letras indicam diferença significativa com $P<0,001$.

4. CONCLUSÕES

A lectina rBanlec-type foi eficientemente expressa em *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade ao níquel. A rBanlec-type apresenta 15 kDa e possível dimerização. Esta proteína inibe significativamente o crescimento da linhagem celular A375 de melanoma maligno cutâneo humano. Não há efeito dose-resposta nas doses testadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GARBE, C.; EIGENTLER, T.K.; KEILHOLZ, U.; HAUSCHILD, A.; KIRKWOOD, J.M. Systematic Review of Medical Treatment in Melanoma: Current Status and Future Prospects. **The Oncologist**, Estados Unidos, p. 1-16, 2011.

CANTO, A.C.M; OLIVERA, J. Melanoma cutâneo: doença curável? Revisão de literatura e apresentação de um organograma de investigação de tratamento. **AMRIGS**, Brasil, p. 1-5, 2007.

REIS, L.B; RIZZI, C; MOREIRA, G; KREMER, F.S; SOARES, A; PINTO, L.S. Expressão heteróloga de uma nova lectina sintética baseada na lectina Banlec de *musa accuminata*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS,23, Pelotas, 2014. Biológicas, Pelotas: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, 2014. p. 1-2.

SINGH, S.S; DEVI, S.K; NG, T.B. Banana Lectin: A Brief Review. **Molecules**, Hong Kong, p. 2 – 5, 2014.

BEGNINI, K.R; RIZZI, C.; CAMPOS, V.F; BORSUK, S.; SCHULTZE, E.; YURGEL, V.C; NEDEL, F.; DELLAGOSTIN, O.A.; COLLARES, T.; SEIXAS, F.K. Auxotrophic recombinant *Mycobacterium bovis* BCG overexpressing Ag85B enhances cytotoxicity on superficial bladder cancer cells in vitro. **Appl Microbiol Biotechnol**, Brasil, p.1-3, 2012.