

## EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA LECTINA RECOMBIANTE *Bauhinia* sp. Link E SUA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

AMANDA SILVA HECKTHEUER<sup>1</sup>; ANDRÉ ALEX GRASSMANN<sup>2</sup>; MARA ANDRADE<sup>3</sup>; LAURA JUNQUEIRA CAMARGO<sup>4</sup>; RAFAEL CAGLIARI<sup>5</sup>; LUCIANO DA SILVA PINTO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – amandasheck@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – grassmann.aa@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – maracamaia@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – laurajcamargo@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – rafael.cagliari@gmail.com

<sup>6</sup>BioPro Lab., Universidade Federal de Pelotas – orientador:  
ls\_pinto@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a principal neoplasia em mulheres, sendo uma doença resultante da multiplicação anormal de células da mama. No Brasil, em 2016 são esperados 57.960 casos novos de câncer de mama, 56,20 casos a cada 100 mil mulheres. Da mesma forma, estima-se para 2016, no Brasil, 16.660 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e de 17.620 em mulheres. Ambas neoplasias são tratáveis e tem bom prognóstico se descoberto precocemente, porém ainda são responsáveis por alta taxa de mortalidade entre os pacientes (INCA, 2015), enfatizando a necessidade constante de desenvolvimento de novos tratamentos.

Lectinas são um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas de origem não imune encontradas em microrganismos, animais e plantas, capazes ligar reversivelmente carboidratos específicos (LANNOO & VAN DAMME, 2010). Dentre as diversas atividades demonstradas para lectinas, destacam-se os efeitos imuno-estimulantes e a atividade anti-neoplásica (PARK et al., 2000; ANDRADE et al., 2004). Plantas do gênero *Bauhinia* pertencem à família Leguminosae e são popularmente conhecidas como pata-de-vaca, devido ao aspecto característico de suas folhas. As lectinas do gênero *Bauhinia* tem sido isoladas e caracterizadas a partir de tecidos de várias espécies, incluindo *B. purpurea* (YOUNG et al., 1985), *B. forficata* (SILVA, 2012) *B. monandra* (COELHO et al., 2000), *B. pentandra* (SILVA et al., 2001) *B. variegata* (SILVA et al., 2007; PINTO et al., 2008; LIN e NG, 2008) *B. bauhinioides* (SILVA et al., 2011) e *B. unguolata* (SILVA, et al., 2014).

Essas lectinas exibem diferentes atividades biológicas, incluindo atividade inseticida (MACEDO et al., 2007), antiviral (LIN e NG, 2008), atividades pró-inflamatórias (SILVA et al., 2011), estímulo o processo de cicatrização de feridas cutâneas em camundongos (NETO et al., 2011), antifúngica (KLAFKE et al., 2013a), antibacterianas (KLAFKE et al., 2013b) e inibição do crescimento de células tumorais (LIN e NG, 2008). A atividade antiproliferativa das lectinas já foi descrita por Silva e colaboradores (2014).

Levando em conta todas atividades biológicas já demonstradas das lectinas, nós clonamos e produzimos uma nova lectina recombinante de uma planta do gênero *Bauhinia* e a atividade desta lectina foi avaliada em cultivo de linhagens celulares de câncer de mama e colorretal.

## 2. METODOLOGIA

A sequência codificadora correspondente a lectina BxL de *Bauhinia sp.* selecionada foi clonada em vetor pET32a de expressão em *Escherichia coli*. O vetor recombinante foi utilizado para transformar, células de *E. coli* BL21 (DE3). Uma colônia recombinante foi inoculada 25 ml de meio Luria Bertani (LB) contendo  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de ampicilina, e incubadas sob agitação à  $37^\circ\text{C}$  por 16 h. Em seguida, a cultura crescida foi utilizada para inocular 500 mL de meio LB líquido com ampicilina e este incubado à  $37^\circ\text{C}$  sob agitação até atingir a fase exponencial de crescimento bacteriano (absorbância de 0,6 - 0,8 a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ).

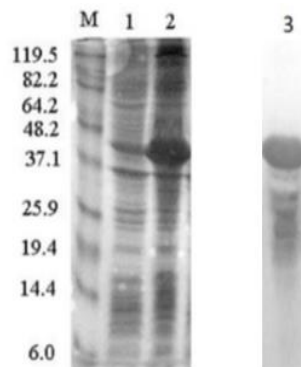
O cultivo foi então induzido com 1 mM de IPTG pelo período de 3 horas, sob agitação a  $37^\circ\text{C}$ . Aliquotas de células foram colhidas por centrifugação e analisadas, por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). O restante do cultivo foi centrifugado e o sedimento lavado com tampão PBS. As células foram ressuspensas em 30 ml de tampão I ( $0,2 \text{ M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ;  $0,5 \text{ M}$   $\text{NaCl}$  e  $20 \text{ mM}$  de imidazol, pH 8,0). A suspensão foi sonicada em 5 ciclos de 30 seg e posteriormente submetido a centrifugação por  $12000 \times g$ , 40 min a  $4^\circ\text{C}$ . Os corpos de inclusão, foram dissolvidos em 30 ml de tampão II ( $8 \text{ M}$  sw ureia,  $0,2 \text{ M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,5 \text{ M}$  de  $\text{NaCl}$  e  $0,5 \text{ M}$  de imidazol, pH 8,0) seguido de nova centrifugação nas mesmas condições. A proteína recombinante foi purificada utilizando cromatografia de afinidade ao níquel em uma coluna HiTrap (GE Healthcare) utilizando o sistema automatizado AKTA Purifier. As alíquotas contendo proteína recombinante pura foram combinadas, dialisada contra água e caracterizadas por Western blotting (WB) com anticorpo anti6xHis. A concentração e pureza de rBxL foi determinada utilizando o kit comercial *BCA Protein Assay Reagent* (Thermo Scientifica) e 12% de SDS-PAGE, respectivamente.

Para a avaliação de atividade antiproliferativa de rBxL foram realizados experimentos de inibição de crescimento das linhagens celulares MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano, e HT-29 de adenocarcinoma de cólon humano. As células foram semeadas em placas de 96 poços ( $10^4$  células/poço) em meio RPMI e após 24h, as células foram expostas a concentrações crescentes de rBxL ( $100$ ,  $50$ ,  $25$  e  $12,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) para verificar se a atividade de lectina estava relacionada ao sítio de ligação a carboidratos, foi incluído um tratamento controle (iBxL) onde a lectina foi incubada com N-acetil-D-glucosamina ( $50 \text{ mM}$ ) durante 1h a  $37^\circ\text{C}$  previamente aos experimentos e avaliada nas mesmas diluições da lectina não inibida. As células foram expostas à lectina por 24, 48 e 72h. Após a incubação, as placas foram centrifugadas ( $500 \times g$ , 5 min) e o sobrenadante foi removido, seguido por adição de uma solução de MTT ( $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  em PBS) e incubação durante 4h a  $37^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado, e em seguida as células foram lisadas por SDS a  $10\%$ /HCL  $0,01 \text{ M}$  durante a noite. A absorbância foi medida utilizando um leitor de microplacas a  $492 \text{ nm}$ . A percentagem de inibição do crescimento celular foi determinada conforme descrito por Monte et al. (2013)

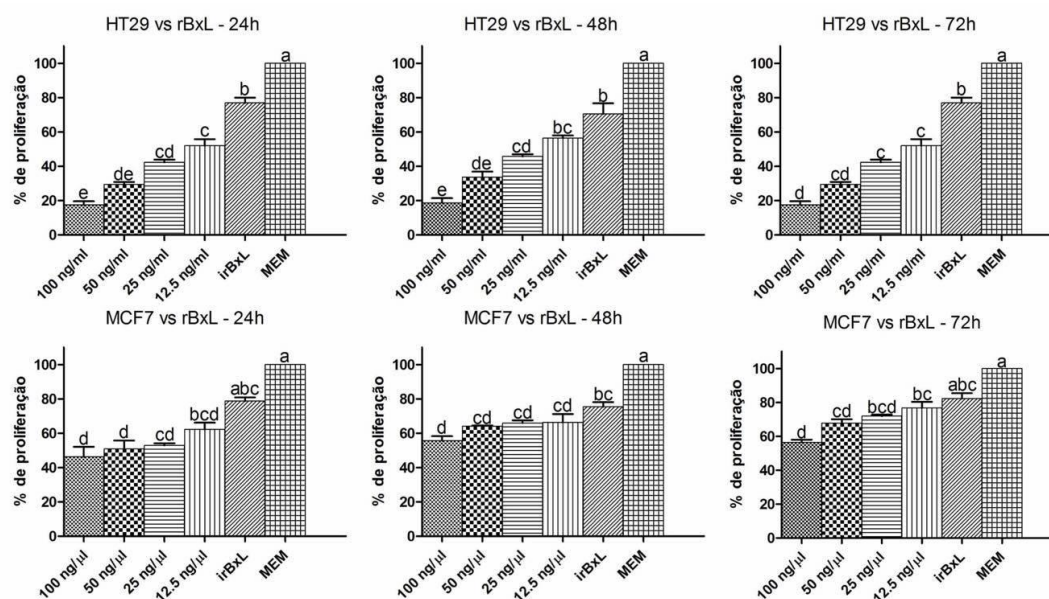
## 3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sequência codificadora de rBxL foi eficientemente clonada no vetor pET32a(+). Depois da indução com IPTG, as células de *E. coli* BL21(DE3) expressaram uma proteína recombinante de aproximadamente  $30 \text{ kDa}$ , correspondente a rBxL (Fig. 1). A proteína recombinante foi eficientemente purificada por cromatografia de afinidade ao níquel e reconhecida pelo WB utilizando anticorpo -anti6xHis

Todas as concentrações testadas de rBxL inibiram o crescimento das células tanto HT-29, e MCF-7 (Fig. 2), embora tenha demonstrado uma atividade com vantagem na inibição de células do adenocarcinoma do cólon. Após as 72 h totais do experimento, a inibição de crescimento para todas as concentrações, manteve-se estabilizada quando comparados ao controle sem tratamento (apenas meio) e a proteína inibida, demonstrando que a atividade de inibição da proliferação está realmente atrelada a lectina recombinante.



**Fig. 1.** Expressão de rBxL em *E. Coli* BL21 (DE3). M. marcador de peso molecular; 1. *E. coli* BL21(DE3)/pET32a(+)-bxl não induzida por IPTG; 2. *E. coli* BL21(DE3)/ pET32a(+)-bxl induzida por IPTG; 3, Western blotting utilizando anticorpo anti6xHis da BxL recombinante expressa em *E. coli*.



**Fig. 2-** Percentual de sobrevivência das células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) em função do tempo em horas das 4 concentrações de rBxL e 2 controles (iBxL e MEM).

#### 4. CONCLUSÕES

A lectina rBxL foi eficientemente expressa em *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade ao níquel. Esta proteína inibe de forma significativa o crescimento de células HT-29 de adenocarcinoma de cólon humano, além de também apresentar uma redução na proliferação celular da linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano. Desta forma, se apresenta como uma

alternativa promissora para o desenvolvimento de novas terapias contra neoplasias humanas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE CAS, et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**. 2004; 278:435-45.

BAINS JS, et al. Mitogenic and anti-proliferative activity of a lectin from the tubers of Voodoo lily (*Sauromatum venosum*). **Biochimica et Biophysica Acta**. 2005; 1723:163-74.

CECCATO, V. M.; et al. Purification and partial characterization of a lectin from *Canavalia grandiflora* Benth. seeds. **Protein and Peptide Letters**, v. 9, n. 1, p. 67-73, 2002

LANNOO M , VAN DAMME EJ. Nucleocytoplasmic plant lectins. **Biochim Biophys Acta**. 2010 Feb;1800(2):190-201

MEJÍA EG, PRISECARU VI. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 2005; 45(6):425-45.

PARK; et al. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK 1) in mistletoe lectin II induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. **Biochemical Pharmacology**. 2000; 60:1685-91.

SILVA, H; et al. Purification and Partial Characterization of a New Pro-Inflammatory Lectin from *Bauhinia bauhinioides* Mart (Caesalpinoideae) Seeds. **Protein & Peptide Letters**. v. 18, n. 4, p. 396-402, 2014,

SILVA, K. L.; CHECINEL , V. F. PLANTS OF THE GENUS *Bauhinia*: CHEMICAL COMPOSITION AND PHARMACOLOGICAL POTENTIAL. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p 449-454, 2002.

SILVA, M; et al. *Bauhinia forficata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2014, v. 1840, n. 7, p. 2262-2271,

SILVA, M; et al. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin of *Bauhinia forficata* seeds. **Process Biochemistry**, n. 47, p. 1049-1059, 2012

SINGH J, KAMBOJA SS. A novel mitogenic and antiproliferative lectin from a wild cobra lily, *Arisaema flavum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2004; 318:1057-65.

CECCATO, V. M.; et al. Purification and partial characterization of a lectin from *Canavalia grandiflora* Benth. seeds. **Protein and Peptide Letters**, v. 9, n. 1, p. 67-73, 2002

INCA, **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro; 2015. Acessado em 09 de agosto de 2016, online <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>