

Avaliação do potencial antiproliferativo de lectinas recombinantes em linhagem celular tumoral de adenocarcinoma colorretal humano

CHRYSTIAN NUNES GONÇALVES¹; GUILHERME SOUSA FEIJÓ²; CAMILA GARCIA DE SOUZA²; DANILLO DE OLIVEIRA DELLA SENTA²; LUCIANO DA SILVA PINTO³

¹Universidade Federal de Pelotas – chrystianng@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – guima.sousa07@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – kaka.garcia.2010@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – danillo.senta@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – ls_pinto@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Câncer é um termo abrangente que engloba mais de 100 tipos diferentes de doenças malignas, caracterizadas pelo crescimento anormal de células desprovidas de função útil e com a capacidade de se disseminar para células vizinhas, órgãos ou outras regiões do corpo (WANG; LEI; HAN, 2018). O câncer de colorretal é o terceiro câncer mais comum e a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer em todo o mundo, representando assim um problema de saúde considerável (WHO, 2023). Segundo dados do INCA, o câncer colorretal é o terceiro mais frequente em homens, e o segundo mais incidente nas mulheres (INCA, 2023). A HT-29 é uma das linhagens mais utilizadas para estudar diferentes aspectos da biologia deste tipo de câncer. No Brasil, o Governo Federal gastou somente no ano de 2022 cerca de R\$ 4.000.000,00 em tratamentos oncológicos. Este valor pode ser reduzido com o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes e menos custosos.

Lectinas são uma classe de proteínas com a capacidade de se ligarem reversivelmente a vários tipos de carboidratos. Essas proteínas estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontrada em diversos organismos com diferentes níveis de complexidade, como em animais, bactérias, vírus, fungos e plantas (AKKOUH et al., 2015). Possuem aplicações biotecnológicas por conta da sua propriedade de reconhecer sítios de ligação a carboidratos que identificam glicanos presentes em receptores de superfície celular, glicoconjugados ou açúcares livres, detectando, assim, células anormais relacionadas a diversas doenças. As lectinas ligadoras de manose são uma das classes que apresentam diversas atividades conhecidas, incluindo atividade antitumoral (SINGH, S.; DEVI; NG, 2014). A via apoptótica de células cancerígenas, mecanismo natural de morte programada, podem ser ativadas através da ligação da lectina com o receptor de carboidratos presente na membrana celular (GAUTAM et al., 2019).

Neste trabalho utilizamos uma lectina recombinante ligadora de manose, engenheirada para conter mutações visando aumentar sua avidéz frente a linhagem tumoral HT-29. A atividade da lectina foi comparada a outras proteínas recombinantes da mesma origem, mas com mutações diferentes. A lectina demonstrou ser segura, sem provocar toxicidade indesejada sobre células não tumorais, diferenciando-se da ação da quimioterapia.

2. METODOLOGIA

2.1 Expressão das proteínas recombinantes: Para a expressão das três proteínas (Lectina de interesse engenheirada pelo grupo - rLec3, proteína controle positivo - rLec1 e proteína controle negativo - rLec2, mutada para não ter atividade), os plasmídeos contendo os genes das lectinas foram inseridos em

cepas de expressão de *Escherichia coli*, que foi então induzida com IPTG para a produção das proteínas. Após o cultivo, as células foram recolhidas, lisadas e as porções solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação. As proteínas recombinantes presentes na fração solúvel foram purificadas por cromatografia de afinidade a íons metais níquel, dialisadas contra água destilada. A concentração das proteínas foi determinada com teste colorimétrico comercial BCA. Após a quantificação foi feita a caracterização da proteína recombinante por SDS-PAGE e pela técnica de Western Blot.

2.2 Cultivo celular: Para os ensaios de atividade antitumoral, células da linhagem HT-29 (Adenocarcinoma Colorretal Humano) foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo Dulbecco (D-MEM) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas a 37 °C em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂ e 95% de ar. Células normais da linhagem MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney Cells) foram utilizadas nos testes de citotoxicidade da proteína, elas foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo Earle (E-MEM) suplementado com 10% de SFB em garrafas de cultivo celular em estufa com temperatura 37 °C.

2.3 Teste de atividade das lectinas: Para a utilização nos ensaios elas foram retiradas das garrafas pelo processo de tripsinização e cultivadas em placas de 96 cavidades até a formação da monocamada celular. O ensaio 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo (MTT) foi feito para medir o efeito das lectinas na viabilidade das células tumorais. Os testes foram realizados em triplicata, utilizando diferentes concentrações de lectinas, para testar sua efetividade, e incubados em diferentes momentos sob as mesmas condições até a leitura. Como controles, foram utilizadas células mantidas em meio de cultivo sem lectinas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi testado a ação de uma lectina recombinante frente a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon retal humano e a comparamos com outras duas lectinas semelhantes. Todas as proteínas foram obtidas por processos de engenharia genética e produção heteróloga em sistema procarioto. As lectinas foram expressas com sucesso, solubilizadas, purificadas, liofilizadas e caracterizadas. Realizou-se um *Western blot* que confirmou a presença de apenas uma única banda, demonstrando a eficácia do método de purificação empregado, como ilustrado na Figura 1. Após, as proteínas foram quantificadas usando o método colorimétrico de BCA, resultando em um rendimento aproximado de 710 µg/mL da proteína rLec1, 750 µg/mL da proteína rLec2 e 630 µg/mL da proteína rLec3.

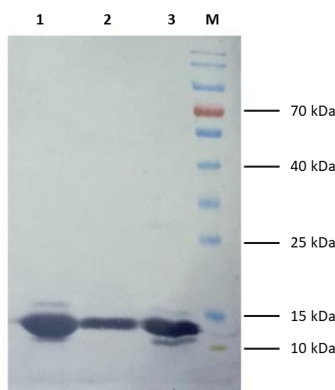


Figura 1. Western blot utilizando o anticorpo anti-histidina conjugado com peroxidase, demonstrando a purificação das lectinas recombinantes, onde (M) representa o Marcador de Peso Molecular (*Rainbow protein marker full range –BioRad®*); (1) rLec 3, (2) rLec 2 e (3) rLec 1.

A atividade frente a linhagem celular HT-29 foi confirmada (Figura 2), sendo a ação da proteína semelhante a sua homóloga, usada como controle positivo (rLec2). Destaca-se também que nenhuma das lectinas apresentou toxicidade frente às células da linhagem normal MDBK, todos tratamentos mantiveram mais de 80% de viabilidade celular (dados não mostrados). No que diz respeito a rLec1, observou-se uma notável supressão da proliferação celular após 4 dias de tratamento, levando à apoptose de até 76% das células. Em contraste, durante o mesmo período, a rLec3 demonstrou uma taxa de mortalidade celular em torno de 62,6%, confirmando sua eficácia nas propriedades antitumorais. Quanto à rLec2, sua eficácia foi relativamente menor, registrando uma taxa de 35,59% após 4 dias de tratamento. É importante destacar que essa lectina possui uma afinidade reduzida na ligação a carboidratos, o que resulta em uma atividade biológica mais fraca. A partir de duas horas do dia 0 foi possível detectar uma diferença estatística no tratamento rLec1 em relação ao controle ($p < 0,05$). Por outro lado, no dia 4, todos os grupos experimentais apresentaram diferença estatística significativa ao comparar com o controle ($p < 0,05$).

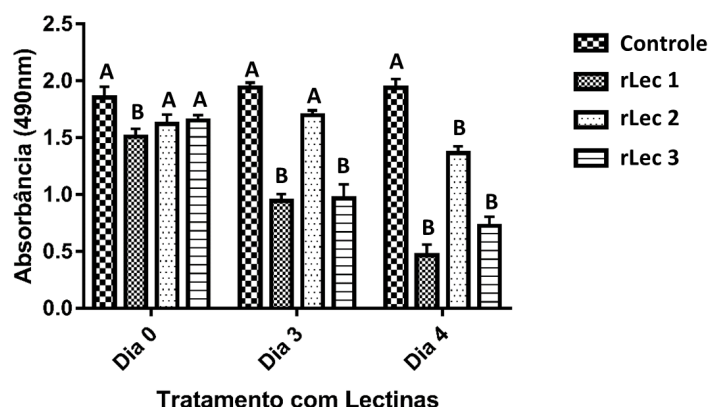


Figura 2. Avaliação da morte celular da linhagem HT-29 em relação às lectinas rLec 1, rLec 2 e rLec 3 nos dias 0, 3 e 4 após o tratamento, na concentração de 300 µg/mL, sendo DMEM como controle. ANOVA seguido por *post hoc* de Tukey. Para todos $p < 0,05$. Letras diferentes demonstram diferença significativa.

Após o período de 4 dias de tratamento, foi possível notar o arredondamento das células, o que sugere a ocorrência de possíveis modificações no citoesqueleto e a formação de lacunas na matriz celular, características associadas à morte celular. Enquanto isso, as células de controle que não foram submetidas a nenhum tratamento mantiveram sua morfologia padrão com o formato fusiforme e presença de projeções da membrana plasmática.

Os resultados do trabalho estão em concordância com outros estudos feitos anteriormente sobre a ação antitumoral das lectinas, como no caso da lectina do quiabo *Abelmoschus esculentus* que possui uma efetividade de 63% na inibição da proliferação de células cancerígenas no câncer de mama (MONTE et al., 2014).

4. CONCLUSÕES

A expressão das lectinas recombinantes foi feita com êxito, uma vez que elas mantiveram a sua atividade biológica. A morte programada é induzida seletivamente nas células de cultivo HT-29.

A partir dos resultados, conclui-se então, que as lectinas ligantes de manose apresentam um grande potencial como tratamento para o câncer colorretal, embora ainda seja necessário mais estudos e testes em modelos *in vivo* para compreender os efeitos citotóxico, os resultados indicam que elas podem ser utilizadas com sucesso para diversos fins terapêuticos e diagnósticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKKOUH, Ouafae et al. Lectins with anti-HIV activity: A review. **Molecules**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 648–668, 2015.
2. FOGH, J.; FOGH, J. M.; ORFEO, T. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. **Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 221–226, 1977.
3. FORGUE-LAFITTE, Marie Elisabeth et al. Proliferation of the Human Colon Carcinoma Cell Line HT29: Autocrine Growth and Deregulated Expression of the c-myc Oncogene. **Cancer Research**, [s. l.], v. 49, n. 23, p. 6566–6571, 1989.
4. GAUTAM, Ajay Kumar et al. Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the Cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], 2019.
5. MONTE, Leonardo G. et al. Lectin of *Abelmoschus esculentus* (okra) promotes selective antitumor effects in human breast cancer cells. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 461–469, 2014.
6. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, Netherlands, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
7. SINGH, Senjam Sunil; DEVI, Sanjenbam Kunjeshwori; NG, Tzi Bun. Banana lectin: A brief review. **Molecules**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 18817–18827, 2014.
8. WANG, J. J.; LEI, K. F.; HAN, F. Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 3855–3864, 2018.