

## AVALIAÇÃO IN VITRO DOS EFEITOS MIGRATÓRIOS DE UMA LECTINA RECOMBINANTE DE BANANA BANLEC-TYPE (rBTL) POR SCRATCH ASSAY

ISABELA BOLDRINI DUTRA RASCH<sup>1</sup>; Danilo de Oliveira Della Senta<sup>2</sup>; Misael Gomes Dias<sup>3</sup>; Chrystian Nunes Gonçalves<sup>4</sup>; Luciano da Silva Pinto<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [boldrinirasch@gmail.com](mailto:boldrinirasch@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [danillo.senta@gmail.com](mailto:danillo.senta@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - [misaalgomesdias7@gmail.com](mailto:misaalgomesdias7@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - [chrystiannq@gmail.com](mailto:chrystiannq@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [ls\\_pinto@hotmail.com](mailto:ls_pinto@hotmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Cicatrização é um processo biológico complexo e essencial que envolve eventos celulares e mediadores bioquímicos, os quais atuam em conjunto para reparar uma área lesionada. Condições como infecções, idade avançada, comorbidades, obesidade, entre outros, que podem comprometer gravemente esse processo (ANDERSON; HAMM, 2012;). Além disso, os tratamentos convencionais, como antibióticos e anti-inflamatórios, têm se mostrado cada vez menos eficientes e de maior custo. Por isso, observa-se a crescente demanda por tratamentos mais eficazes e novas abordagens terapêuticas mais seguras e regenerativas para acelerar e melhorar a qualidade da regeneração tecidual (PANG ET AL., 2017).

Lectinas são proteínas bioativas amplamente distribuídas na natureza, as quais interagem com carboidratos por meio de sítios de ligação para formar complexos (VAN DAMME, 2022). Estudos recentes exploram o potencial de reparo tecidual, regeneração e cicatrização de feridas crônicas dessa molécula (de Sousa et al., 2019). Na cicatrização, lectinas podem atuar modulando a resposta inflamatória, promovendo a proliferação celular e acelerando a regeneração tecidual, por meio da ligação específica, reversível e não covalente a glicoconjugados (VAN HOLLE e VAN DAMME, 2017). Portanto, seu potencial como ferramenta biotecnológica voltada para a cicatrização, unido à construção de moléculas recombinantes, torna possível o aprimoramento das suas propriedades naturais com maior aplicabilidade.

Nesse trabalho objetivou-se verificar a capacidade da lectina recombinante Banlec-Type (rBTL), em estimular a migração de fibroblastos L929 de camundongos em um ensaio de ranhura.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1. Expressão recombinante da BanLecType (rBTL)

O plasmídeo contendo o gene sintético para a expressão heteróloga da lectina rBTL foi previamente construído por CAMARGO e colaboradores (CAMARGO et al., 2024) O vetor foi introduzido por choque térmico em *Escherichia coli*, cepas C41 e RIL e a expressão induzida com IPTG (Isopropil β-D-1- tiogalatopiranosídeo) por 3 h. A proteína resultante foi purificada utilizando

o sistema de cromatografia líquida por afinidade ao níquel AKTA-purifier. A amostra final purificada foi submetida à diálise em tampão PBS (Phosphate Buffer Saline) e quantificada por kit Pierce/ThermoFisher.

## 2.2 Ensaio de ranhura

Para realização do ensaio de cicatrização *in vitro*, células previamente cultivadas foram submetidas à tripsina por 5 minutos, logo depois ocorreu a troca com meio fresco, e a suspensão celular foi centrifugada a 1.200 rpm por 10 minutos. Após a homogeneização, as células foram coradas com azul de tripan (0,4%) e contadas em um microscópio de fluorescência invertido DI-FLUO3 B-G-V-UV. A partir da contagem, uma suspensão de  $2 \times 10^6$  células/mL foi preparada e semeada em placas de cultura de 12 poços (densidade de 5.000 células/cm<sup>2</sup>), sendo incubada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> até atingir 100% de confluência. Em seguida, foi realizada uma ranhura linear com ponteira de 200 µL estéril em cada poço. Os resíduos celulares foram removidos com PBS, e as células foram tratadas com a lectina rBTL, diluída em meio nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL. As placas foram mantidas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade, e as imagens foram capturadas nos tempos 0, 4, 24, 28, 48 e 144 horas, utilizando objetiva de 10X. As imagens foram analisadas no *software* ImageJ, calibrado com 1 µm, com 10 medições por ranhura para cálculo da média de fechamento. O protocolo seguiu adaptações do método descrito por Pinto et al. (2019), visando padronização nas análises de migração e viabilidade celular frente às diferentes concentrações de rBTL.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

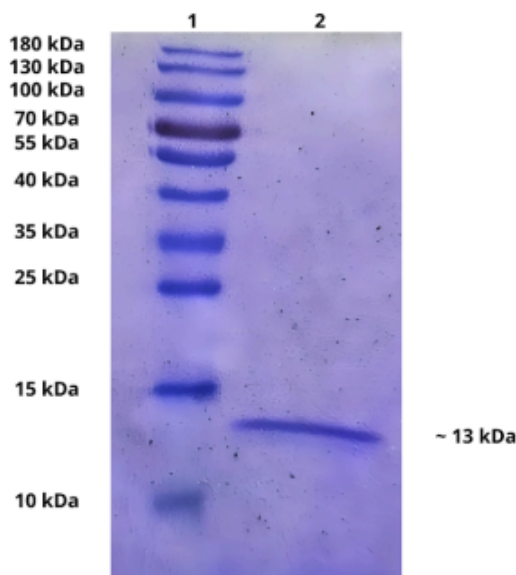
A proteína recombinante Banlec-Type foi expressa com sucesso em sistema heterólogo, sendo confirmada por SDS-PAGE a 15%, que revelou uma banda bem definida de aproximadamente 13 kDa, compatível com o peso molecular esperado, como é possível observar na figura 1. A purificação via cromatografia de afinidade com níquel resultou em uma amostra de alta pureza, evidenciando a eficiência do protocolo de expressão e purificação da lectina.

No ensaio de ranhura observou-se que a concentração de 12,5 µg/mL foi a mais eficaz, apresentando um fechamento de 82,05% da ferida após 144 horas. Concentrações superiores (25, 50 e 100 µg/mL) apresentaram taxas de fechamento progressivamente menores (52,65%, 34,87% e 39,81%, respectivamente), enquanto o grupo controle apresentou retração da ferida (-5,75%), sugerindo que, na ausência de estímulos mitogênicos, as células na borda da ranhura podem ter sofrido descolamento ou apoptose, um fenômeno por vezes observado em ensaios de longa duração (tabela 1). Nas concentrações de 25 e 12,5 µg/mL, observou-se maior atividade migratória e preservação da morfologia celular, com células alongadas na borda da ferida. Em contrapartida, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, a migração foi mais lenta e as alterações morfológicas menores o que pode indicar que altas concentrações de rBTL interferem negativamente em sinais de migração. Esses resultados sugerem que a lectina atua de forma dose-dependente, apresentando maior eficácia em baixas concentrações para estimular a migração e proliferação de fibroblastos, o que é essencial para o fechamento inicial de feridas. A ação da rBTL pode estar

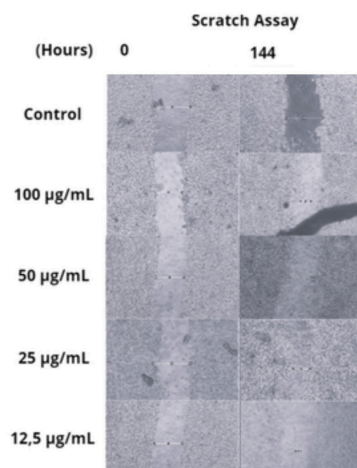
relacionada à sua capacidade de se ligar a resíduos de manose e outros carboidratos específicos na membrana celular, desencadeando vias de sinalização celular como TGF- $\beta$ /SMAD3 e PI3K/AKT, que são conhecidas por modular a proliferação celular, a síntese de matriz extracelular e a migração tecidual. Entretanto, o fechamento incompleto da ferida mesmo nas melhores condições sugere que a rBTL pode atuar de forma indireta, promovendo um ambiente favorável à cicatrização, mas dependente da atuação coordenada de outros tipos celulares, como queratinócitos e células endoteliais, que não estavam presentes neste modelo monocelular.

| Tratamento  | Concentração<br>( $\mu$ g/mL) | Comprimento da ranhura ( $\mu$ m) |       |       |       |     |             | Porcentagem do<br>fechamento |
|-------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-----|-------------|------------------------------|
|             |                               | 0                                 | 4     | 24    | 28    | 48  | 144 (Horas) | 144 Horas                    |
| Controle    | -                             | 261                               | 258   | 252   | 252   | 252 | 276         | -5,75 %                      |
| Banlec-Type | 100                           | 211                               | 208   | 184,5 | 176   | 133 | 127,5       | 39,81 %                      |
|             | 50                            | 238,5                             | 235,5 | 210   | 202,5 | 180 | 155         | 34,87 %                      |
|             | 25*                           | 264                               | 261,5 | 223,5 | 200,5 | 141 | 125,5       | 52,65 %                      |
|             | 12,5                          | 234                               | 228   | 207   | 192   | 156 | 42          | 82,05 %                      |

**Tabela 1.** Efeito da Banlec-Type no ensaio de ranhura in vitro utilizando fibroblastos L929 . Os valores representam a média  $\pm$  D.P. (Desvio Padrão). (O mesmo desvio padrão foi observado em todos os períodos, sendo a significância estatística indicada nas concentrações).



**Figura 1:** SDS-PAGE (15%). 1 - Marcador de peso molecular (*Thermo Scientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder*). 2 - Banlec-Type purificada por cromatografia de afinidade ao níquel.



**Figura 2:** Medição da migração celular por *scratch assay in vitro*

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a lectina recombinante Banlec-Type apresenta potencial significativo para estimular a migração de fibroblastos L929, especialmente em baixas concentrações, com destaque para 12,5 µg/mL, que promoveu o maior fechamento da ferida no ensaio de ranhura. Esses resultados indicam que a rBTL tem a capacidade de atuar sobre vias de sinalização relacionadas com a proliferação celular. Os achados do estudo comprovam o potencial da rBTL na cicatrização celular, proporcionando o desenvolvimento de novas abordagens no reparo tecidual de lesões.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CÂMARGO, L. J. de; MAIA, M. A. C.; WOLOSKI, R. dos S.; RIZZI, C.; MOREIRA, G. M. S. G.; PICH, C. T.; PINTO, L. da S. Characterization of a Molecularly Engineered Banlec-Type Lectin (rBTL). **Molecular Biotechnology**, 66: 288–299, 2024.
2. ANDERSON, K.; HAMM, R. L. Factors That Impair Wound Healing. **Journal of the American College of Clinical Wound Specialists**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 84–91, 2012.
3. PANG, C. et al. An overview of the therapeutic potential of regenerative medicine in cutaneous wound healing. **International Wound Journal**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 450–459, 2017.
4. VAN DAMME EJM. 35 years in plant lectin research: a journey from basic science to applications in agriculture and medicine. **Glycoconjugate Journal**, 39: 83-97, 2022.
5. SINGH S.S, DEVI S.K, et al. Banana lectin: a brief review. **Molecules**, 19(11): 18817–18827, 2014.
6. VAN HOLLE S., DE SCHUTTER K., EGGERMONT L., TSANEVA M., DANG L., VAN DAMME E. J. M. Comparative Study of Lectin Domains in Model Species: New Insights into Evolutionary Dynamics. **Int J Mol Sci**, 18(6): 1136, 2017.