

AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DE ROTAS DE SINALIZAÇÃO POR LECTINAS RECOMBINANTES EM LINHAGEM CELULAR TUMORAL DE ADENOCARCINOMA COLORRETAL HUMANO VIA RT-qPCR

**CHRYSTIAN NUNES GONÇALVES¹; GUILHERME FEIJÓ DE SOUSA²;
ISABELA BOLDRINI DUTRA RASCH³; MISael GOMES DIAS⁴; RAFAEL
RODRIGUES RODRIGUES⁵; LUCIANO DA SILVA PINTO⁶**

¹ Universidade Federal de Pelotas – chrystianng@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – guilhermefejodesousa@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – boldrinirrasch@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – misaelgomesdias7@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – rafaelr458@gmail.com

⁶ Universidade 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). Entre eles, o câncer colorretal é o terceiro mais comum e a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer em todo o mundo, representando um problema de saúde considerável (WHO, 2023). No Brasil, é o terceiro mais frequente em homens e o segundo mais incidente em mulheres (INCA, 2023). O modelo celular HT-29 é amplamente utilizado em estudos voltados à compreensão da biologia deste tipo de câncer e na avaliação de novas abordagens terapêuticas. O tratamento do câncer ainda representa um grande desafio, tanto pela eficácia limitada de algumas terapias quanto pelo elevado custo associado. Em 2022, o Governo Federal gastou aproximadamente R\$ 4.000.000,00 em tratamentos oncológicos, valor que evidencia a necessidade de alternativas mais eficientes e acessíveis. Nesse contexto, a busca por moléculas bioativas com potencial antitumoral tem se destacado como estratégia relevante.

As lectinas constituem uma classe de proteínas com capacidade de se ligarem reversivelmente a diferentes carboidratos. Estão amplamente distribuídas na natureza, presentes em animais, plantas, bactérias, vírus e fungos (AKKOUH et al., 2015). Sua importância biotecnológica decorre da habilidade de reconhecer glicanos em receptores de superfície celular, glicoconjungados ou açúcares livres, permitindo a detecção de células anormais relacionadas a diversas doenças. Entre suas subclasses, as lectinas ligadoras de manose apresentam diversas atividades conhecidas, incluindo efeitos antitumorais (SINGH, S.; DEVI; NG, 2014). A ativação da via apoptótica, mecanismo natural de morte celular programada, pode ocorrer a partir da interação entre lectinas e receptores de carboidratos presentes na membrana de células cancerígenas (GAUTAM et al., 2019). Em destaque, nosso grupo tem estudado a atividade antitumoral de lectinas recombinantes manose específicas, engenheiradas para melhorar sua atividade frente a linhagens celulares cultivadas *in vitro*.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar as vias de ação de duas lectinas recombinantes frente a uma linhagem tumoral. A análise foi realizada por meio de RT-qPCR, com foco nas principais rotas de sinalização envolvidas na apoptose dessas células.

2. METODOLOGIA

2.1 Expressão das proteínas recombinantes: Para a expressão das proteínas (lectina de interesse engenheirada pelo grupo – rLec1 e lectina com atividade tumoral conhecida – rLec2), os plasmídeos contendo os genes das lectinas previamente construídos 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: Células da linhagem tumoral HT-29 foram cultivadas em Meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ em garrafas de cultivo.

2.3 Análise da expressão gênica: Para os experimentos, as células foram tripsinizadas e semeadas em placas de 12 poços, em concentração de aproximadamente 5×10^5 células por poço. Após a adesão celular, as culturas foram tratadas com lectinas recombinantes (100 µg/mL) pelos períodos de 24h e 48h. Em seguida, o RNA total foi extraído com TRIzol® e tratado com DNase para remoção de contaminantes de DNA. A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA purificado, que foi posteriormente utilizado nas reações de RT-qPCR. Para garantir a confiabilidade das análises, foram realizados testes de eficiência dos primers em diferentes concentrações, de modo a selecionar a condição mais adequada para cada gene. A quantificação gênica foi realizada no sistema QuantStudio™ 1 (Applied Biosystems) com o reagente SYBR® Green. Para a análise dos dados, a expressão relativa dos marcadores da via apoptótica (Bax, Bcl-2, Caspase 8 e Caspase 3) foi determinada pelo método de *Fold Change* de Pfaffl, utilizando o gene GAPDH como normalizador endógeno. O grupo controle não tratado foi empregado como amostra de referência para todos os cálculos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em trabalhos anteriores, nosso grupo confirmou a atividade antitumoral das lectinas utilizadas neste trabalho, porém os mecanismos de ação ainda não haviam sido confirmados. Dessa forma, para investigar os mecanismos de ação antitumoral destas lectinas, realizamos análises de RT-qPCR.

Na via mitocondrial, verificou-se modulação significativa na expressão dos genes Bax e Bcl-2. Em células tratadas com rLec1, Bax apresentou discreta indução tardia, passando de valores reduzidos em 24 horas para níveis superiores ao controle em 48 horas, enquanto Bcl-2 manteve-se reprimido, ainda que próximo ao valor basal. Já a rLec2 promoveu um aumento robusto de Bax, especialmente em 48 horas, acompanhado de uma redução consistente de Bcl-2.

em ambos os tempos avaliados. Esse desequilíbrio entre os fatores pró-apoptótico (Bax) e antiapoptótico (Bcl-2), mais evidente no tratamento com rLec2, favorece a permeabilização da membrana mitocondrial externa, considerada um ponto de não retorno no processo apoptótico (LOPEZ; TAIT, 2015; KALKAVAN; GREEN, 2018). A ativação de Bax em paralelo à supressão de Bcl-2 tem sido amplamente associada à indução de apoptose em células tumorais e à redução da resistência celular frente a estímulos terapêuticos.

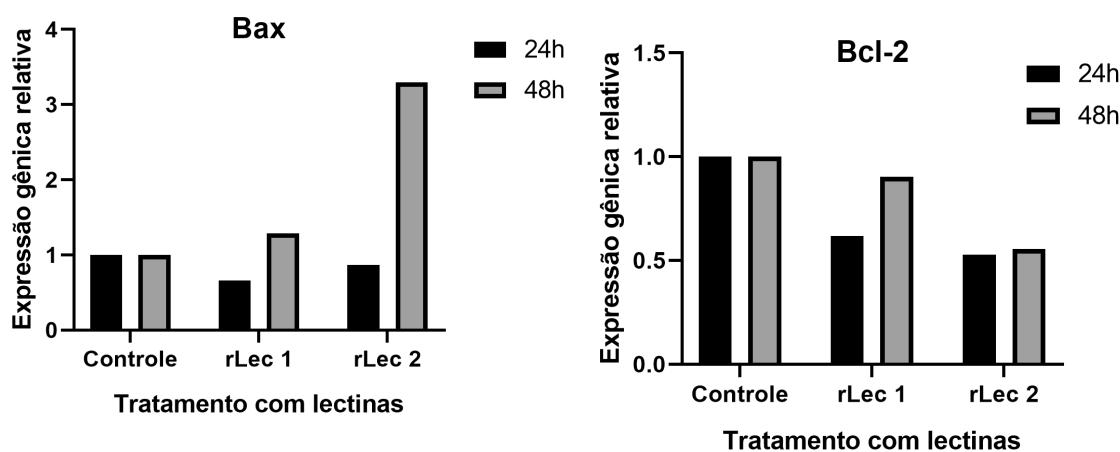


Figura 1. Expressão relativa dos genes Bax e Bcl-2 em células HT-29. As células foram tratadas com as lectinas recombinantes rLec 1 e rLec 2 (100 µg/mL) por 24 horas (barras pretas) e 48 horas (barras cinzas). Os níveis de expressão foram normalizados pelo gene de referência GAPDH e calculados em relação ao grupo controle não tratado (valor = 1).

Na via extrínseca, observou-se uma modulação da expressão de caspase-8, enzima iniciadora deste mecanismo. Em células tratadas com a rLec2, verificou-se indução em 24 horas, seguida de queda nos níveis de expressão em 48 horas, enquanto para rLec1 os valores permaneceram abaixo do controle ao longo do período. Esse comportamento sugere uma ativação inicial da cascata extrínseca, possivelmente de caráter transitório, coerente com o papel da caspase-8 como sinalizador precoce da apoptose mediada por receptores de morte (KALKAVAN; GREEN, 2018).

Quanto à caspase-3, principal caspase executora que atua no desmantelamento final da célula (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020), os níveis de expressão mantiveram-se abaixo do controle em todas as condições, mas em rLec1 foi possível observar um aumento relativo entre 24 e 48 horas, indicando o início de uma possível ativação da fase executora da apoptose. Apesar disso, os resultados sugerem que o tempo de avaliação pode ter sido insuficiente para a plena detecção desse marcador, uma vez que a caspase-3 costuma apresentar picos de expressão em tempos mais tardios.

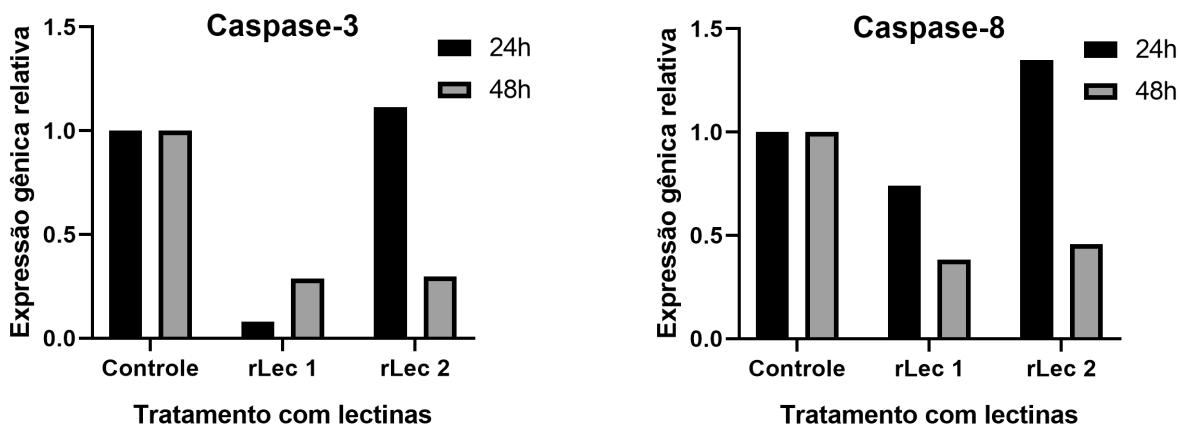


Figura 2. Expressão relativa dos genes Caspase 3 e Caspase 8 em células HT-29. As células foram tratadas com as lectinas recombinantes rLec 1 e rLec 2 (100 µg/mL) por 24 horas (barras pretas) e 48 horas (barras cinzas). Os níveis de expressão foram normalizados pelo gene de referência GAPDH e calculados em relação ao grupo controle não tratado (valor = 1).

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, os achados indicam que rLec2 possui maior potencial como agente indutor de apoptose em comparação à rLec1, embora sua eficácia pareça depender da dinâmica temporal da resposta celular. De qualquer forma, as duas lectinas apresentam ação antitumoral estimulando vias apoptóticas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKOUH, Ouafae et al. Lectins with anti-HIV activity: A review. **Molecules**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 648–668, 2015.
- CARNEIRO, Benedito A.; EL-DEIRY, Wafik S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 17, n. 7, p. 395-417, 2020.
- 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.
- KALKAVAN, Halime; GREEN, Douglas R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 46-55, 2018.
- LOPEZ, Jonathan; TAIT, S. W. G. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. **British journal of cancer**, v. 112, n. 6, p. 957-962, 2015.
- 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.
- 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.