

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE LECTINAS EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA (MG-63)

BJÖRKNESJÖ, Stéphanie¹; NEDEL, Fernanda¹; BILHALVA, Alexandre¹; COLLARES, Tiago¹; CAVADA, Benildo²; SEIXAS, Fabiana Kömmling¹

¹Grupo de Oncologia Celular e Molecular, Laboratório de Genômica Funcional, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

² Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. stephanie.caruccio@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A terapia anticâncer apresenta a falta de especificidade às células cancerosas como o maior desafio a ser superado (Hong *et al.*, 2012). Ao longo dos anos muitos avanços foram alcançados no diagnóstico e tratamento do câncer, resultando em um aumento da sobrevivência dos pacientes, porém a busca por estratégias mais eficientes permanece (Plattner *et al.*, 2008). Assim, dentre as abordagens disponíveis ao estabelecimento de fármacos citotóxicos, a utilização de lectinas como mediadoras do ataque às células alvo parece ser bastante promissora (Plattner *et al.*, 2008).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune capazes de ligarem-se especificamente e reversivelmente a carboidratos ou glicoconjugados (Guzman-Partida *et al.*, 2004). De acordo com Faheina-Martins *et al.* (2011) as mesmas promovem a inibição da adesão e proliferação celular e apresentam efeitos citotóxicos em células tumorais humanas (Faheina-Martins *et al.*, 2011). Isto pode ser explicado pela capacidade de internalização das lectinas nas células cancerígenas, promovendo aglutinação e / ou agregação das mesmas (De Mejía *et al.*, 2005). Neste sentido, tais moléculas interagem melhor com linhagens tumorais do que com linhagens normais possivelmente pelo maior número de receptores de lectina alterados ou devido à distribuição de receptores de lectina na superfície das células de câncer (Faheina-Martins *et al.*, 2011).

Desta forma, o objetivo do trabalho em questão foi avaliar a atividade antiproliferativa e a indução de apoptose das lectinas Concanavalin A (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Canavalia boliviana* (ConBol) na linhagem celular de Osteossarcoma (MG-63). Para tanto, foi estabelecido um *screening* para análise da citotoxicidade das mesmas, quando em contato com as células tumorais, e análises de fluorescência quando adicionadas às devidas células.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Cultivo Celular: As células de Osteossarcoma (MG-63) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As mesmas foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco's – DMEM (Vitrocell Embriolife, Brasil), e suplementadas com 10% de soro fetal bovino - SFB (Gibco, USA). As células foram incubadas em estufa a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ (Heal Force ®, China) até atingirem o estágio de sub-confluência (~80%).

Determinação da Citotoxicidade: A viabilidade celular foi determinada pela mensuração da redução do MTT, (sal tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-

difeniltetrazolium brometo]) solúvel em água, em formazan. A suspensão de células foi preparada em uma densidade de 2×10^4 e distribuída em uma placa de cultura de 96 poços. A placa foi então incubada a 37°C , 95% de umidade e 5% de CO_2 por 24 h. Após o meio foi aspirado e substituído por volumes iguais de DMEM/SFB condicionados com diferentes concentrações de lectinas (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24, 48 e 72 h. Nos poços controles foram adicionados 200 μL de DMEM/SFB. Após a remoção dos meios condicionados, foram adicionados 180 μL de DMEM/SFB e 20 μL de MTT em cada poço e mantido na incubadora por 2 horas a 37°C . O meio contendo MTT foi aspirado e 200 μL de DMSO foram adicionados. Subseqüentemente, a absorbância a 492 nm foi medida usando um espectrofotômetro (Thermo Plate TP-Reader). A inibição do crescimento celular foi calculada utilizando a fórmula: inibição do crescimento celular = $(1 - \text{Abs}_{492\text{células tratadas}} / \text{Abs}_{492\text{células controle}}) \times 100\%$.

Avaliação da Fluorescência: A suspensão de células MG-63 foi preparada em uma densidade de 2×10^4 e distribuída em uma placa de cultura de 96 poços. A placa foi então incubada a 37°C , 95% de umidade e 5% de CO_2 por 24 h. Após foram acrescentados 10 μg de lectina (1mg/mL) em 100 μL de DMEM/SFB. Após a incubação por 1, 2 ou 6h, as células foram lavadas duas vezes com PBS e visualizadas em um microscópio invertido com fluorescência Olympus IX71 (Olympus Optical Co., Ltd. Tokyo, Japan).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vem crescendo o interesse nas últimas décadas em lectinas que possam exibir atividades antiproliferativas, antitumorais e apoptóticas. De acordo com Liu *et al.* (2009), a lectina Concanavalin A (ConA) foi capaz de induzir a morte de células de Melanoma Humano (A375) de uma maneira caspase-dependente, bem como através de uma via mitocondrial de apoptose (Liu *et al.*, 2009). Já Barbosa *et al.* (2001), demonstrou que a lectina *Canavalia brasiliensis* (ConBr) promoveu uma apoptose *in vivo* de células de camundongos (Barbosa *et al.*, 2001). Segundo Cavalcante *et al.* (2011), a lectina *Canavalia boliviana* (ConBol) mostrou atividade inibitória sobre o crescimento do patógeno oral *S. mutans*, fato que deixa lacunas sobre a possível ação de ConBol na inibição de células tumorais (Cavalcante *et al.*, 2011).

No presente estudo, a análise da citotoxicidade das lectinas ConA, ConBr e ConBol frente às células tumorais MEG-63 nos períodos de 24, 48 e 72 horas, demonstraram efetivas taxas de inibição celular no período de 48 e 72 horas nas concentrações de 100 μM , visto que a porcentagem de inibição celular foi superior a 50%. No entanto, o tempo de 24 horas não propiciou nenhum efeito citotóxico na linhagem tumoral MG-63, onde a porcentagem inibitória ficou abaixo de 50% até mesmo nas maiores concentração de lectinas (Fig. A).

Na análise de fluorescência podem ser visualizadas as respectivas lectinas fluoresceinadas que foram internalizadas ou mantiveram-se ligadas às células tumorais, após sucessivas lavagens (Fig. B). As figuras A2, B2 e C2 ou A3, B3 e C3 demonstram em campo misto e escuro, respectivamente, a ausência ou presença de fluorescência. A ausência de fluorescência pode ser visualizada nas imagens da lectina Con A no tempo de 1 hora, bem como nas imagens da lectina Con Br nos

tempos de 2 e 6 horas. Já a presença de fluorescência pode ser estabelecida em todas as imagens de Con Bol, bem como no tempo de exposição de 2 e 6 horas de Con A e no tempo de 1 hora de Con Br. Demonstrando que a lectina ConBol possui capacidade de ligar-se aos carboidratos ou glicoconjugados presentes nas células tumorais MG-63 com maior intensidade que as demais lectinas, em todos os períodos de tempo analisados (1, 2 e 6 horas), sendo a fluorescência mais intensa após 6 horas de exposição com as células.

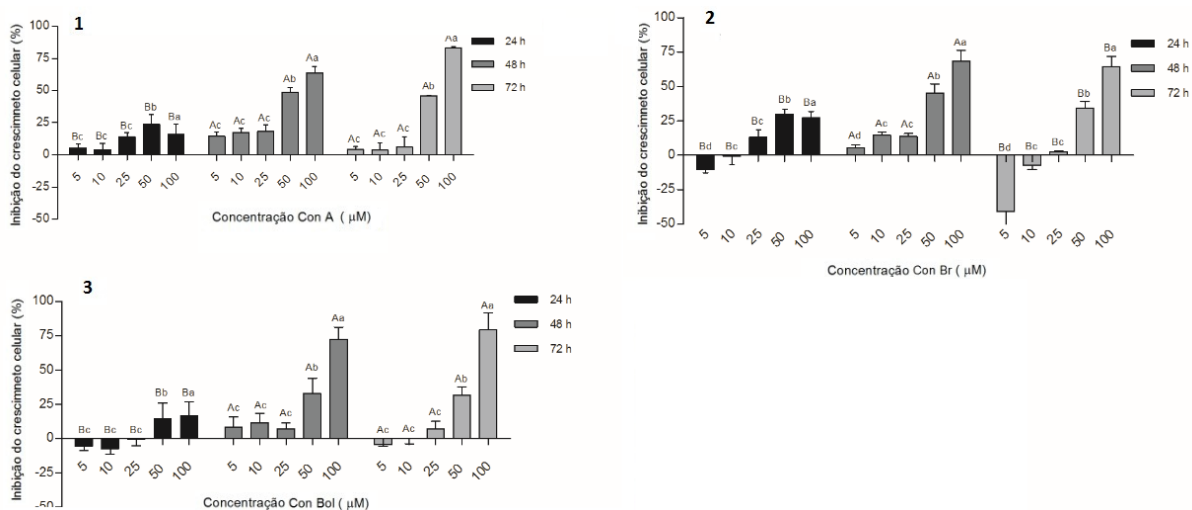


Figura A: Os gráficos 1, 2 e 3 demonstram a inibição do crescimento celular (%) da linhagem tumoral MG-63 quando em contato com diferentes concentrações de lectinas ConA, ConBr e ConBol respectivamente, em três diferentes tempos (24, 48 e 72 horas).

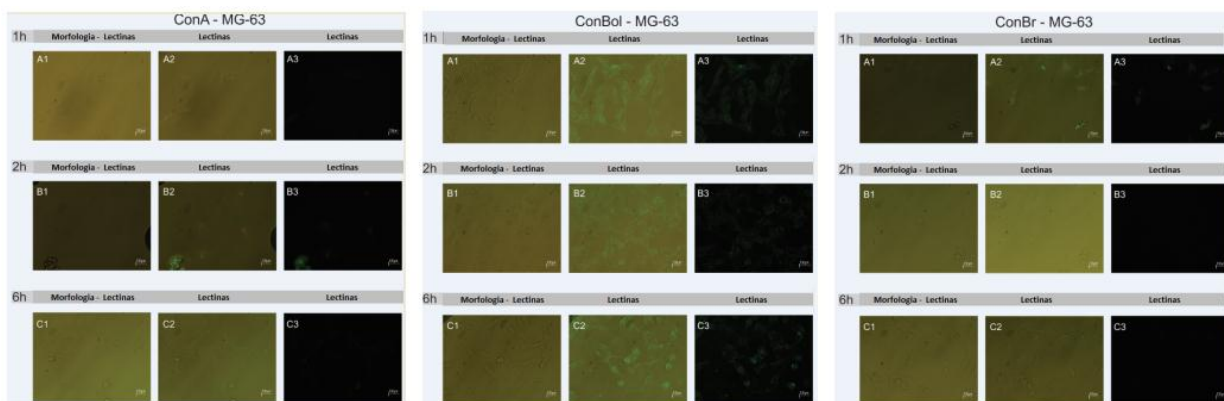


Figura B: As figuras A1, B1 e C1 demonstram imagens em campo claro das lectinas ConA, ConBol e ConBr, respectivamente, em contato com a linhagem tumoral MG-63. As figuras A2, B2 e C2 correspondem ao campo misto, e A3, B3 e C3 ao campo escuro das lectinas fluoresceïnadas ConA, ConBol e ConBr, respectivamente, em contato com as células MG-63. As análises foram estabelecidas nos tempos de 1,2 e 6 horas.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que as lectinas ConA, ConBr e ConBol possuem o potencial de induzir efeitos citotóxicos nas células tumorais MG-63 nos períodos de 48 e 72 h na concentração de 100uM. A análise de fluorescência demonstrou que a lectina Con Bol se salientou das demais, por apresentar a

capacidade de ligar-se aos carboidratos ou glicoconjugados presentes nas células tumorais MG-63 com maior intensidade que as demais lectinas, em todos os períodos de tempo analisados (1,2 e 6 horas). Entretanto, faz-se necessário investigar os mecanismos que estão intermediando a interação entre as lectinas e a células alvo (MG-63).

5 REFERÊNCIAS

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; BARBOSA, T. G.; FREITAS, L.A.R.F.; BARRAL-NETTO, M. In Vivo Lymphocyte Activation and Apoptosis by Lectins of the Diocleinae Subtribe. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 96(5): 673-678. 2001.

CAVALCANTE, T.T.; ROCHA, A.M.B.; CARNEIRO, A.; ARRUDA, V.S., Effect of lectins from Diocleinae subtribe against oral Streptococci. **Molecules**. Apr 27;16(5):3530-43. 2011.

DE MEJÍA, E.G.; PRISECARU, V.I. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. **Crit Rev Food Sci Nutr**. 45(6):425-45. 2005.

FAHEINA-MARTINS, G. V.; SILVEIRA, A.L.; RAMOS, M.V.; MARQUES-SANTOS, L.F.; ARAUJO, D.M. Influence of Fetal Bovine Serum on Cytotoxic and Genotoxic Effects of Lectins in MCF-7 Cells. **Biochem Molecular Toxicology**. 00-0. 2011.

GUZMAN-PARTIDA, A.M.; ROBLES-BURGUENO, M.R.; ORTEGA-NIEBLAS, M.; VAZQUEZ-MORENO, I. Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. **Biochimie**, 86, 335-42. 2004.

HONG, C.W; ZENG, Q. Awaiting a New Era of Cancer Immunotherapy. **Cancer Res**. 2012.

LIU, B.; MIN, M.W.; BAO, J.K. Induction of apoptosis by concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. **Autophagy**. 5:3, 432-433. 2009.

PLATTNER, V.E.; WAGNER, M.; RATZINGER, G.; GABOR, F.; WIRTH, M. Targeted drug delivery: binding and uptake of plant lectins using human 5637 bladder cancer cells. **Eur J Pharm Biopharm**, 70, 572-6. 2008.