

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LECTINA EXTRAÍDA DE *Abelmoschus esculentus* (AES) NA INTEGRIDADE CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE MAMA**

**REIS, Larissa Brussa<sup>1</sup>; MONTE, Leonardo Garcia<sup>2</sup>; SANTI-GADELHA, Tatiane<sup>4</sup>;  
<sup>3</sup>BRAGANHOL, Elizandra, <sup>5</sup>BEIRA, Fátima Alves; PINTO, Luciano<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas, Bacharelado em Biotecnologia; <sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico; <sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos; <sup>4</sup> Universidade Federal da Paraíba, Laboratório de Biologia Molecular. <sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia  
laribrussa@yahoo.com.br

### **1 INTRODUÇÃO**

O câncer, também chamado de neoplasia maligna, é uma das doenças mais comuns e graves vistas na medicina. Essa neoplasia é o reflexo da proliferação anormal de células decorrente de diversos fatores, tais como o acúmulo de mutações de genes cruciais nos processos de replicação/reparo do DNA e proliferação celular (DAVIES et al., 2002). A malignização do câncer depende especialmente da aquisição de mutações em genes que contribuam para a angiogênese, evasão da apoptose, capacidade replicativa ilimitada/invasiva, formação de metástase, desregulação do metabolismo energético, proteção contra o sistema imune e instabilidade genômica. Além disso, processos epigenéticos também estão reconhecidamente envolvidos no processo de carcinogênese (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea do ponto de vista clínico e histopatológico (VANG; TAVASSOLI, 2003) e atualmente é o segundo tipo mais frequente no mundo, sendo a maior causa de mortalidade entre as mulheres. Por este motivo, os mecanismos básicos envolvidos na biologia e controle do câncer de mama são aspectos fundamentais para que os pacientes se beneficiem de tratamentos adjuvantes (MARGOLIN; LINDBLOM, 2006). Devido à importância para saúde pública, diversos estudos buscam agentes terapêuticos para o controle ou diagnóstico desse tipo de anomalia celular, sendo as lectinas uma alternativa neste sentido.

Lectinas são proteínas de origem não imune capazes de ligar especificamente a polissacarídeos e glicoconjugados. (HATAKEYAMA; NAGATOMO; YAMASAKI, 1995). Nos últimos anos, os efeitos de lectinas vegetais têm sido o foco para aplicação em terapias contra o câncer (PARK et al., 2000) pois demonstram atividade antitumoral (efeito inibitório sobre o crescimento de tumores) e anticarcinogênica (efeito inibitório na indução de câncer por carcinógenos) (DHUNA et al., 2005). Sabendo-se que cada lectina é única em sua especificidade por carboidratos, lectinas de diferentes fontes têm sido utilizadas contra uma variedade de linhagens celulares (KAUR et al., 2006). Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi investigar o efeito citotóxico de uma lectina extraída de *Abelmoschus esculentus* (AES) em adenocarcinoma de mama humano.

### **2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)**

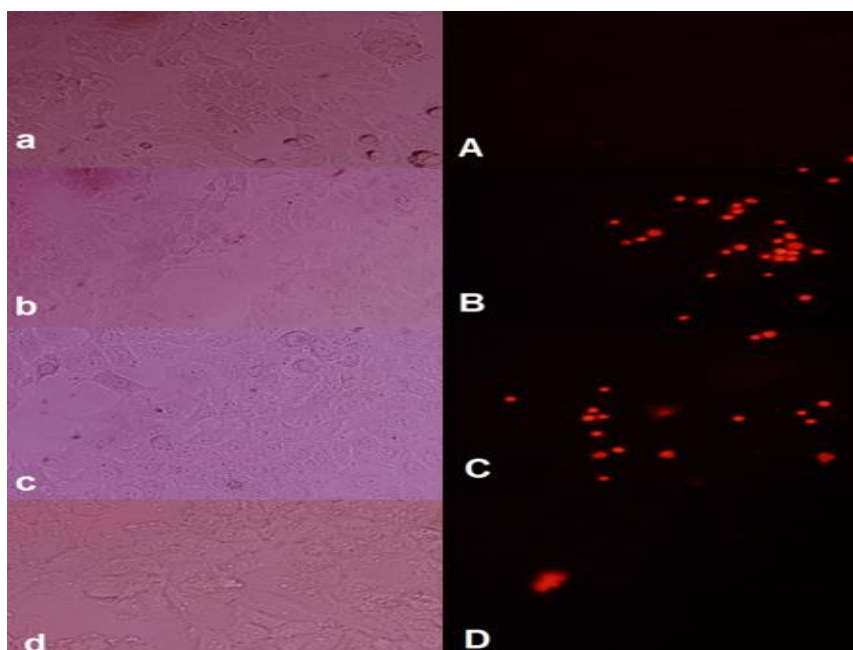
A lectina AES de *A. esculentus* (popularmente conhecido como quiabo) foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba. Antes de todos os ensaios, a lectina foi previamente caracterizada por SDS-PAGE 12% e quantificada por Kit BCA Protein Assay Reagent (GE).

Para a avaliação da atividade da lectina AES sob a integridade de membrana das células de adenocarcinoma de mama (MCF-7), placas com 24 cavidades foram semeadas com  $10^4$  células por poço e incubadas com diferentes concentrações de AES ( $0,0125 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Para verificar se a ação da lectina dava-se realmente por seu sítio de ligação a carboidrato, foi utilizado AES na concentração de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  inibida por seu ligante específico (lactose) por 1 hora e  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Como controle negativo foi utilizada albumina sérica bovina (BSA). Após 24/48 e 72h horas de incubação com os tratamentos mencionados, as células foram incorporadas com iodeto de propídeo (IP) e visualizadas a 480 nm em microscópio de fluorescência (Olympus BX51). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, e o ensaio realizado em duplicata.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora muitas lectinas venham sendo testadas quanto à sua atividade tumoral, não existe nenhuma evidência envolvendo especificamente AES e seu efeito de morte celular por necrose. A morte celular por necrose é caracterizada por um colapso na membrana plasmática externa e na carioteca, o que ocasiona o extravasamento do seu conteúdo intracelular. A integridade da membrana pode ser detectada por retenção ou exclusão de corantes, sendo o marcador nuclear fluorescente Iodeto de Propídeo (PI) uma importante ferramenta nessa análise, por possui a propriedade de se intercalar em qualquer DNA, e por seu tamanho não permitir a transposição na membrana intacta.

As lectinas, por serem proteínas que se ligam aos resíduos de carboidratos com certa especificidade, podem interagir com glicoproteínas de superfície celular que são expressas intensamente em determinadas células tumorais, podendo levar a mudanças significativas nas respostas relacionadas à transdução de sinais intracelulares (PARK *et al.*, 2000). A ligação reversível e específica da lectina aos glicocomponentes presentes na superfície de células e tecidos provenientes dos mais diversos seres vivos já foi elucidada (GUZMÁN-PARTIDA *et al.*, 2004), e no presente estudo foi possível evidenciar danos de membrana causados por AES com a menor concentração ( $0,0125 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) a partir de 48h. A maioria das lectinas de plantas são hololectinas, ou seja, possuem múltiplos sítios de ligação a carboidratos, e a hipótese da morte celular ter sido ocasionada por outros componentes da proteína, senão sua afinidade por carboidratos foi descartada, devido aos resultados de pouca ou nenhuma injúria celular quando administrado o controle positivo AES inibida e o controle negativo BSA (Fig.1).



**Figura 1:** Avaliação da integridade de membrana de MCF-7 através da incorporação de IP. Painéis “A”, “B”, “C” e “D”: controle negativo (BSA), AES 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>, AES 0,0125 mg.ml<sup>-1</sup> e AES inibida 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Painéis “a”, “b”, “c” e “d” observação celular em campo claro.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que os tratamentos com as diferentes concentrações de AES causaram danos de membrana em adenocarcinoma de mama nas duas concentrações testadas, e não causaram injúria significativa quando inibidas. Entretanto, investigações posteriores serão realizadas para elucidar os mecanismos de citotoxicidade de AES, como a avaliação da morte celular por apoptose tardia por Citometria de Fluxo e técnica de RT-PCR.

#### 5 REFERÊNCIAS

- DAVIES, A.; BRAILSFORD, S.; BROADLEY, K.; BEIGHTON, D. Resistance amongst yeasts isolated from the oral cavities of patients with advanced cancer. **Palliat.Med.**, v.16, n.6, p.527-531, 2002.
- DHUNA, V.; BAINS, J. S.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J.; KAMBOJ, S.; SAXENA, A. K. Purification and characterization of a lectin from *Arisaema tortuosum* Schott having in-vitro anticancer activity against human cancer cell lines. **J.Biochem.Mol.Biol.**, v.38, n.5, p.526-532, 2005.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, p.646-674, 2011.

HATAKEYAMA, T.; NAGATOMO, H.; YAMASAKI, N. Interaction of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* with the erythrocyte membrane. **J.Biol.Chem.**, v.270, n.8, p.3560-3564, 1995.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J.; SAXENA, A. K.; KHAN, R. H.; ASHRAF, M. T.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell lines. **Arch.Biochem.Biophys.**, v.445, n.1, p.156-165, 2006.

MACKLIS, J. D.; MADISON, R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **J.Neurosci.Methods**, v.31, n.1, p.43-46, 1990.

MARGOLIN, S.; LINDBLOM, A. Familial breast cancer, underlying genes, and clinical implications: a review. **Crit Rev.Oncog.**, v.12, n.1-2, p.75-113, 2006.

PARK, R.; KIM, M. S.; SO, H. S.; JUNG, B. H.; MOON, S. R.; CHUNG, S. Y.; KO, C. B.; KIM, B. R.; CHUNG, H. T. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in mistletoe lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. **Biochem.Pharmacol.**, v.60, n.11, p.1685-1691, 2000.

VANG, R.; TAVASSOLI, F. A. Risk for subsequent development of breast cancer. **Am.J.Surg.Pathol.**, v.27, n.2, p.268-271, 2003.

WIEST, I.; SELIGER, C.; WALZEL, H.; FRIESE, K.; JESCHKE, U. Induction of apoptosis in human breast cancer and trophoblast tumor cells by galectin-1. **Anticancer Res.**, v.25, n.3A, p.1575-1580, 2005.