

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE LECTINAS ASSOCIADAS A NANOTUBOS DE CARBONO EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON (HT-29)

BJÖRKNESJÖ, Stéphanie¹; NEDEL, Fernanda¹; 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, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

stephanie.caruccio@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

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 terapias mais eficientes permanece (Plattner *et al.*, 2008). Assim, se faz necessário à procura por drogas citotóxicas com maior especificidade às células cancerosas, e dentre as abordagens disponíveis, a utilização de lectinas como mediadoras do ataque às células alvo parece ser bastante promissora (Plattner *et al.*, 2008). Neste mesmo contexto, a correlação de terapias específicas à adesão de novas estruturas derivadas da nanotecnologia, como nanotubos de carbono, estima aprimorar ainda mais a efetividade e a diminuição dos efeitos colaterais de tratamentos contra o câncer (Kievit *et al.*, 2011).

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) associadas a nanotubos de carbono na linhagem celular de adenocarcinoma de colorretal (HT-29). Para tanto, foi estabelecido um *screening* para análise da citotoxicidade das mesmas quando em contato com as células tumorais. O efeito citotóxico dos nanotubos também foi avaliado na linhagem não tumoral de ovário de hamster chinês (CHO-K1).

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Cultivo Celular: As células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) e de adenocarcinoma de colorretal (HT-29) 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 CO₂ por 24 h. Após o meio foi aspirado e substituído por volumes iguais de DMEM/SFB condicionados com diferentes concentrações de lectinas (5 µg/mL - 100 µg/mL) por 24, 48 e 72 h ou nanotubos de carbono (2,5 a 50 µg/mL) por 48h. 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 HT-29 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 CO₂ por 24 h. Após foram acrescentados 10 µg de lectina (1mg/mL) em 100µL de DMEM/SFB e 25 µg/mL de nanotubos de carbono. Após a incubação por 3 h 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 HT-29 nos períodos de 24, 48 e 72 horas, demonstraram efetivas taxas de inibição celular no período de 48 e 72 horas na concentrações de 100µg/mL, visto que a porcentagem de inibição celular foi superior a 50%. No período de 72 h todas as lectinas apresentaram uma efetiva citotoxicidade na concentração de 50µg/mL. No entanto, o tempo de 24 horas não propiciou um efeito citotóxico na linhagem tumoral HT-29 nas lectinas testadas, onde a porcentagem inibitória ficou abaixo de 50% até mesmo nas maiores concentração de lectinas (Fig. A).

Após verificar a efetividade das lectinas ConA, ConBr e ConBol em promoverem efeitos citotóxicos nas células tumorais HT-29, foi avaliado se o acréscimo de nanotubos de carbono poderia aumentar a efetividade de tais componentes. Para tanto foi primeiramente avaliado se os nanotubos de carbono poderiam induzir efeitos citotóxicos sobre as células normais (CHO-K1). No gráfico 4 (Fig. A), observa-se que as nanoestruturas, quando incubados por um período de 48 horas, não demonstraram efeito citotóxico, onde as porcentagens inibitórias permaneceram abaixo de 25%.

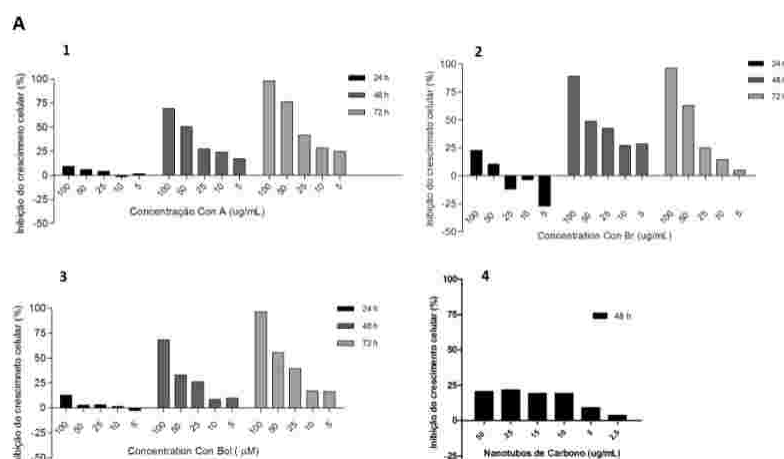


Figura A: Os gráficos 1, 2 e 3 demonstram a inibição do crescimento celular (%) da linhagem tumoral HT-29 quando em contato com diferentes concentrações de lectinas ConA, ConBr e ConBol respectivamente, em três diferentes tempos (24, 48 e 72 horas). O gráfico 4 demonstra a inibição do crescimento celular (%) da linhagem CHO-K1 quando em contato com nanotubos de carbono por 48 horas.

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 1b, 2b e 3b demonstram em campo escuro, a ausência (visualizada nas imagens 1b e 2b) ou presença (visualizada na imagem 3b) de fluorescência. Demonstrando que a lectina ConBol possui capacidade de ligar-se aos carboidratos ou glicoconjugados presentes nas células tumorais HT-29 em um período curto de tempo (3h) ao contrário das demais lectinas (ConA e ConBr).

Quando avaliado a fluorescência proveniente da associação das lectinas correspondentes com os nanotubos de carbono, houve um aumento considerável da intensidade da fluorescência. Estes resultados indicam que os nanotubos de carbono potencializam a capacidade das lectinas de ligarem-se aos carboidratos ou glicoconjugados presentes nas células tumorais HT-29.

B

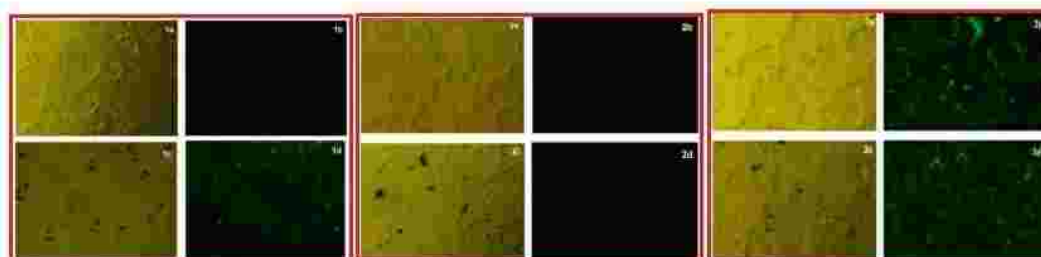


Figura B: As figuras 1a, 2a e 3a demonstram imagens em campo claro das lectinas ConA, ConBr e ConBol, respectivamente, em contato com a linhagem tumoral HT-29. As figuras 1b, 2b e 3b correspondem ao campo escuro das lectinas fluoresceïnadas ConA, ConBr e ConBol, respectivamente. As figuras 1c, 2c e 3c, demonstram as imagens em campo claro das lectinas ConA, ConBr e ConBol, respectivamente, com a linhagem HT-29 acrescidas de nanotubos de carbono. As figuras 1d, 2d e 3d corresponde ao campo escuro das lectinas fluoresceïnadas ConA, ConBr e ConBol, respectivamente, associadas a nanotubos de carbono.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que as lectinas ConA, ConBr e ConBol possuem o potencial de induzir efeitos citotóxicos nas células tumorais HT-29 no período de 48 e 72 h em concentrações de 100 - 50 $\mu\text{g/mL}$. Os nanotubos de carbono não demonstraram efeitos citotóxicos frente à linhagem de células normais (CHO-K1), sendo, porém capazes de aumentar substancialmente a fluorescência das lectinas ConA e ConBol. Entretanto, faz-se necessário investigar os mecanismos pelos quais estas nanoestruturas permitem uma maior interação entre as lectinas e a células alvo (HT-29).

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 Toxicol**. 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.

KIEVIT, F.M.; ZHANG, M. Cancer Nanotheranostics: Improving Imaging and Therayoy Delivery across Biological Barriers. **Adv Mater**. 2011.

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.