

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA LECTINA ISOLADA DE SEMENTES DE *Canavalia oxyphylla* Standl. & L.O. Williams SOBRE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA DA LINHAGEM MCF-7

¹Evandro Moreira de Almeida; ¹Hugo Jefferson Ferreira; ²Leonardo Barbosa da Silva; ²Luiz Gonzaga do Nascimento Neto; ^{2,*}Edson Holanda Teixeira

¹Centro Universitário Christus (Unichristus) - evandro.graduado@gmail.com; hugo.jheff@gmail.com; ²Universidade Federal do Ceará (UFC) - leonardo.postagens@gmail.com; ziullec@gmail.com; edson@ufc.br; *Orientador

1. INTRODUÇÃO

Câncer é uma palavra genérica usada para designar um grande grupo de doenças caracterizadas por células que deixaram de responder a vários estímulos fisiológicos importantes (HANAHAN; WEIBERG, 2011). Em suma, essas células adquirem a capacidade de proliferar-se de forma autossustentada, não são responsivas a estímulos supressores de crescimento e podem invadir outros tecidos, em um processo chamado de metástase (RASTOGI *et al.*, 2014).

O câncer, por exemplo, é considerado uma doença heterogênea e complexa, constituindo-se como um dos principais problemas de saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), apenas em 2012 foram registrados 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas. Com base no relatório mundial sobre o câncer, recentemente divulgado, a OMS solicitou que governos, autoridades e sociedade em geral, empreendam ações urgentes para evitar a ampliação do número de vítimas dessas patologias.

Nesse sentido, diversas terapias biológicas e tecnologias alternativas tem emergido para tratar efetivamente alguns tipos de câncer e/ou alvos específicos que são expressos por diferentes tipos de tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Dentre esses alvos, carboidratos assumem um papel crucial para a metastatização ou como antígenos associados a tumores (TACA) que podem servir como biomarcadores. Dessa forma, moléculas que possam reconhecer carboidratos na superfície de células tumorais podem ter potencial importante como agentes terapêuticos (PADLER-KARAVANI, 2014).

Lectinas são proteínas encontradas em todos os organismos vivos e partículas, como os vírus. Essas moléculas são capazes de se ligar a mono ou oligossacarídeos sem modificar sua estrutura (PEUMANS *et al.*, 2001) e vêm sendo bastante estudadas nos últimos anos demonstrado um potencial biotecnológico promissor no diagnóstico e até mesmo tratamento das neoplasias (FIGUEIRÔA *et al.*, 2017). Graças a sua atividade citotóxica contra células tumorais, as lectinas de

leguminosas são consideradas moléculas ainda mais promissoras na terapia anticâncer, pois sua capacidade de induzir apoptose, autofagia e/ou inibição do crescimento tumoral tem sido demonstrada em vários estudos (LAGARDA-DIAZ et al, 2017)).

Nesse contexto, o presente trabalho almejou avaliar a ação da lectina isolada de sementes de *Canavalia oxyphylla* (CoxyL) sobre linhagens de células de adenocarcinoma mamário (MCF-7).

2. METODOLOGIA

2.1 Purificação da lectina

A purificação da lectina ocorreu conforme previamente descrito por Santiago *et al.*, 2014.

2.2 Linhagem Celular e Condições de Cultivo

Células MCF-7, foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC), cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) inativado pelo calor, 100 U/mL de penicilina G, 0,1 mg/mL de estreptomicina. Em seguida foram levadas a incubadora com atmosfera contendo 5% de CO₂ a temperatura de 37°C. As células em fase de crescimento logarítmico foram empregadas em todos os ensaios referentes ao presente trabalho.

2.3 Ensaio de Viabilidade Celular

Células MCF-7 wt e STn (1,5 x 10⁴ células/poço), foram cultivadas em DMEM contendo 10% de SFB e semeados separadamente em placas de poliestireno de 96 poços de fundo plano e incubadas durante 24h. Após esse período, as células serão crescidas na presença da lectina em diferentes concentrações. Os ensaios foram realizados de acordo com protocolo sugerido por Yan e colaboradores (2009). Entretanto, o efeito de CoxyL na proliferação celular foi estimado pela determinação da atividade metabólica celular através do Kit *MTS cell proliferation*, seguindo as instruções do fabricante após 24, 48 e 72h. Os resultados foram obtidos com auxílio de um leitor de microplacas a uma absorbância de 490nm e o IC₅₀ foi calculado a partir das curvas dose-resposta.

2.4 Determinação da apoptose por Anexina V

Para aprofundar esses estudos sobre a atividade antitumoral de CoxyL, células MCF-7 wt e STn (2,5x10⁵ /mL) foram cultivadas em placas de 6 poços de fundo plano, tratadas com CoxyL, nas concentrações equivalentes à IC₅₀ determinada, por 72 h. Após isso, as células foram colhidas, lavadas com tampão PBS pH 7,4 e coradas com anexina V (APC) (*Immunotools, Germany*) e 7-AAD (*BD Biosciences*). A determinação da população de células vivas, necróticas e

apoptóticas foi analisada por técnica de citometria de fluxo (*Acoustic Focusing Cytometer, Appliede Biosystems*).

2.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm SEM. Comparações estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad[®] para Microsoft Windows, através do Teste t de Student. Quando $P < 0,05$ (* ou **) ou $P < 0,01$ (***), os dados foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

3.1 Efeito antiproliferativo de CoxyL

O efeito de CoxyL sobre a viabilidade das células MCF-7 foi avaliada através do ensaio MTS. O tratamento das MCF-7 não sialiladas (wt) não apresentou redução na viabilidade celular estatisticamente significativa nas concentrações de 62,5, 125, e 250 $\mu\text{g/mL}$ em nenhum dos intervalos de tempo avaliados. No entanto, na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, após 72h de tratamento, houve redução significativa da viabilidade celular para $80,72 \pm 0,7\%$ ($P < 0,05$) (Figura 1). Com relação ao tratamento de células MCF-7 sialiladas (STn), o tratamento com 62,5 $\mu\text{g/mL}$ de CoxyL, nos períodos de 24 e 48h, induziu redução na viabilidade celular de 13,8 % e 30,8 %, respectivamente. A mesma concentração em 72h causou redução de 49,60 %. Já na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ observou-se que, nos intervalos de 24 e 48h, a lectina causou redução na viabilidade das células MCF-7 STn em 25% e 30%, respectivamente. Após 72 horas, observou-se redução de mais de 50 % da viabilidade celular. Nas concentrações 250 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$, o tratamento com a lectina reduziu em menor proporção a viabilidade celular nos períodos de 24 e 48 horas. Contudo, após 72 horas de exposição obtiveram uma redução da viabilidade maior que 50 % (Figura 2).

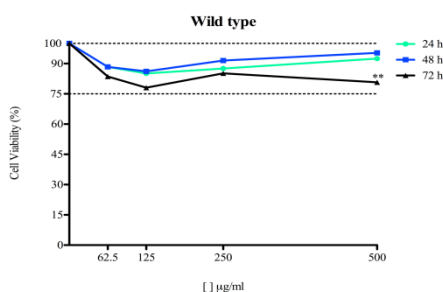


Figura 1: Efeito de CoxyL sobre a viabilidade celular em células MCF-7 não sialiladas

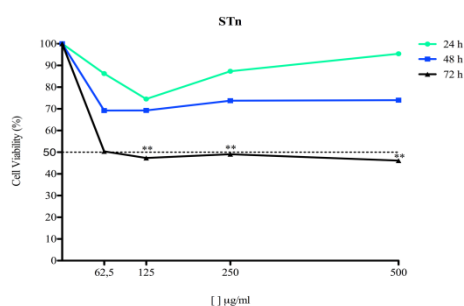


Figura 2: Efeito de CoxyL sobre a viabilidade celular em células MCF-7 sialiladas

3.2 Efeito de CoxyL sobre a apoptose de células MCF-7

Para avaliar a capacidade de indução apoptótica da *CoxyL*, as MCF-7 foram coradas com Annexin V e 7-AAD, seguidas de análise de citometria de fluxo. Conforme mostrado na Figura 3A a indução de um estágio inicial de apoptose foi de aproximadamente 44% das células não sialiladas com 50µg/mL de *CoxyL* e 63% com 100µg/mL. Sendo este último resultado estatisticamente significativo ($P < 0,01$), em relação ao controle das células viáveis. Já nas células MCF-7 com o antígeno STn na superfície da membrana plasmática a *CoxyL* na concentração de 50µg/mL pouco mais de 20% das células permaneciam viáveis, enquanto quase 60% delas estavam em estado apoptose inicial. Quando tratadas com 100µg/mL o número de células em apoptose inicial aumentou aproximadamente 70% ($P < 0,01$), enquanto menos de 20% permaneciam viáveis (Figura 3B)

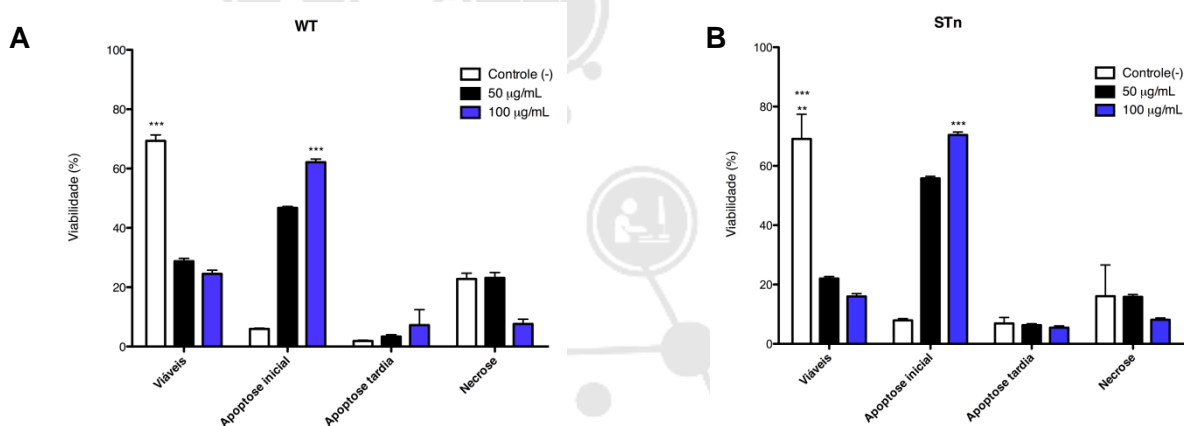


Figura 3: CoxyL provoca apoptose inicial de células MCF-7 não-sialiladas (A) e (B) sialiladas.

4. DISCUSSÃO

As células tumorais podem possuir um padrão aberrante de glicosilação na membrana plasmática, incluindo a síntese exacerbada de alguns carboidratos, que são essenciais para a progressão do tumor (BÜLL; BROK; ADEMA, 2014). Uma das diversas mudanças que acontecem na glicosilação das células neoplásicas é a expressão do antígeno Sialyl-Thomsen-nouveau (STn ou Sialyl-Tn), o qual raramente é visto em tecidos normais, mas é abundantemente expresso em muitos tipos de câncer epitelial humano (MUNKLEY, 2016). A presença de STn na superfície celular nos

tumores, segundo Julien e colaboradores (2012) está associada à tumorigênese, potencial metastático, supressão imune e quimiorresistência, o que colabora para o mau prognóstico da doença.

Nos últimos anos, observou-se que diversas lectinas isoladas de plantas das famílias *Fabaceae*, *Lamiaceae* e *Moraceae* possuem a capacidade de se ligar a STn e apresentam atividade antitumoral promissora sobre essas células (POIROUX, 2017). Além disso, um grupo de lectinas da família *Diocleinae* como *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Canavalia marítima* (ConM) e *Dioclea sclerocarpa* (DSclerL) demonstraram propriedades antiproliferativas e pró-apoptóticas em várias linhagens de células tumorais (FAHEINA-MARTINS, 2012). Algumas lectinas tem a capacidade de se ligar ao antígeno sialil-Tn (STn) e induzir apoptose, inibir sua capacidade proliferativa ou ambos. (YAU *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2015). Diversas lectinas já demonstraram atividade antiproliferativa e pró-apoptótica, como a lectina de *Bauhinia forticata* (BFL), que conseguiu induzir a morte e a inibição da adesão de células de câncer de mama (SILVA, 2014). A Riproximina, uma lectina inativadora de ribossomo do tipo II, também induziu apoptose em células de câncer de mama (PERVAIZ, 2016). CoxyL é uma lectina ligadora de glicose, manose e α -metil-D-manosídeo, (SANTIAGO *et al.*, 2014) e não apresenta qualquer afinidade a ácidos sialícos. Contudo, lectinas são proteínas caracterizadas por ligações reversíveis em relação a carboidratos, o que pode explicar uma maior afinidade pelos “ramos” de Sialil-Tn presentes na linhagem MCF-7 sialilada.

5. CONCLUSÃO

O estudo mostrou que a lectina isolada de sementes de *Canavalia oxyphylla* possui atividade antitumoral contra células de adenocarcinoma mamário, da linhagem MCF-7, impedindo a proliferação dessas células através da indução do processo apoptótico. Principalmente, quando essas células expressam o antígeno Sialil-Tn em sua superfície. Propomos para estudos futuros, a busca de possíveis mecanismos moleculares envolvidos nesse processo, assim como testes com outras linhagens de células neoplásicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BÜLL C, BROK M H. d, ADEMA G J. Sweet escape: Sialic acids in tumor immune evasion. **Biochimica et Biophysica Acta** 1846 (2014) 238–246.

FAHEINA-MARTINS, G. V. *et al.* Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**. v. 26, n. 7, p. 1161-9. out 2012.

FIGUEIRÔA, E. O.; de OLIVEIRA FIGUEIRÔA E; DA CUNHA CRA, ALBUQUERQUE PBS; DE PAULA RA; ARANDA-SOUZA MÂ; DA SILVA MA; ZAGMIGNAN A; CARNEIRO-DA-CUNHA MG; DA SILVA LCN; DOS SANTOS CORREIA MT.. Lectin-Carbohydrate Interactions: Implications for the Development of New Anticancer Agents. **Current Medicinal Chemistry**. v. 24, p. 1-14. 2017.

JIANG Q.-L.; ZHANG S; TIAN M; ZHANG S.-Y; XIE T , CHEN D.-Y; CHEN Y.-J; HE J; LIU J; OUYANG L; JIANG X. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. **Cell Proliferation**. v. 48, n. 1, p. 17-28. fev 2015.

JULIEN S., VIDEIRA P.A., DELANNOY P. Sialyl-Tn in cancer: (How) did we miss the target? **Biomolecules**. v. 2, n. 4, p. 435-466, out 2012.

MUNKLEY, J. The role of Sialyl-Tn in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**. v.17, n. 3, p. 2-9. fev, 2016.

PERVAIZ, A.; ZEPP, M.; ADWAN, H.; BERGER, M. R. Riproximin modulates multiple signaling cascades leading to cytostatic and apoptotic effects in human breast cancer cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. v. 142, n. 1, p. 135-47. jan 2016.

PEUMANS, W. J. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 491, p. 27-54. 2001.

POIROUX, G.; BARRE, A.; VAN DAMME, E.J.M.; BENOIST, H.; ROUGÉ, P. Plant lectins targeting *O*-glycans at the cell surface as tools for cancer diagnosis, prognosis and therapy. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 18, n. 6, p. 1-30. jun 2017.

RASTOGI, S; RASTOGI S; GULIA S; BAJPAI J; GHOSH J; GUPTA S. Oligometastatic breast cancer: A mini review. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**, v. 35, n. 3, p. 203-6, jul 2014.

SANTIAGO, M. Q; LEITÃO, C. C. F; PEREIRA-JUNIOR, F. N; PINTO-JUNIOR, V. R; OSTERNE, V. J. S; LOSSIO, C. F; CAJAZEIRAS, J. B; SILVA, H. C; ARRUDA, F. V. S; PEREIRA, L. P; ASSREUY, A. M. S; NASCIMENTO, K. S; NAGANO, C. S; CAVADA, B. S. (2014), Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. *J. Mol. Recognit.*, 27: 117–123.

LAGARDA-DIAZ I, GUZMAN-PARTIDA A. VAZQUEZ-MORENO L. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017 Jun; 18(6): 1242.

SILVA, M. C. de PAULA CA; FERREIRA JG; PAREDES-GAMERO E; VAZ AM; SAMPAIO MU; CORREIA MT; OLIVA ML. *Bauhinia forficata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1840, n. 7, p. 2262-71. jul 2014.

YAN QJ, LI YX, JIANG ZQ, YAN S, ZHU LF, DING ZF. Antiproliferation and apoptosis of human tumor cell lines by a lectin (AMML) of *Astragalus mongholicus*, *Phytomedicine*. 2009; 16:586-593

YAU, T; DAN, X; NG, C. C.; NG, T. B. Lectins with potential for anti-cancer therapy. **Molecules**. v. 20, n. 3, p. 3791-810. fev 2015