

# DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE LECTINAS DE FOLHAS DE *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* E *CALLIANDRA SURINAMENSIS* FRENTE À CÉLULAS NORMAIS E MALIGNAMENTE TRANSFORMADAS

Leydianne Leite de Siqueira Patriota<sup>1</sup>; Thiago Henrique Napoleão<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Biomedicina- CCB – UFPE; E-mail: leydianne.patriota@hotmail.com,

<sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Bioquímica – CCB – UFPE. E-mail: thiago86@yahoo.com.br.

**Sumário:** O objetivo do trabalho foi avaliar a citotoxicidade de lectinas purificadas das folhas de *Schinus terebinthifolius* (SteLL) e de *Calliandra surinamensis* (CasuLL) frente a células humanas normais (células mononucleares de sangue periférico, PBMCs) e malignamente transformadas (K562: leucemia eritrocítica crônica; e T47D: câncer de mama). SteLL foi isolada seguindo protocolo previamente estabelecido, consistindo em extração de proteínas em solução salina (NaCl 0,15 M) seguida de cromatografia em coluna de quitina. Já o procedimento para purificação de CasuLL foi determinado durante o desenvolvimento do presente trabalho e compreendeu extração de proteínas em NaCl 0,15 M, precipitação de proteínas com sulfato de amônio (60% de saturação) e cromatografias de gel filtração e de troca iônica. Esse procedimento resultou em CasuLL com elevado fator de purificação (43,4). Nos testes de citotoxicidade, SteLL e CasuLL não foram tóxicas para PBMCs nem para células K562. Contudo, CasuLL foi capaz de reduzir a viabilidade de células T47D, com IC<sub>50</sub> de 58,73±2,59 µg/mL. Em conclusão, SteLL não apresentou potencial antitumoral enquanto CasuLL, purificada eficientemente pelo procedimento estabelecido nesse trabalho, apresentou citotoxicidade seletiva para células de câncer de mama, apresentando potencial para futuros estudos visando sua aplicação como agente quimioterápico.

**Palavras-chave:** lectina; atividade antitumoral; aroeira da praia; espanador de índio; câncer de mama.

## INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas que interagem com carboidratos de forma específica e reversível, aglutinando células e precipitando polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos. A capacidade de ligação a carboidratos presentes em superfícies celulares resulta em uma gama de propriedades biológicas, as quais têm sido exploradas com diversos fins biotecnológicos (PAIVA *et al.*, 2011; SILVA & CORREIA, 2014). Lectinas vegetais têm apresentado notáveis propriedades anticancerígenas *in vivo* e *in vitro* e, em estudos de casos humanos, demonstraram que podem funcionar como terapia alternativa contra o câncer (MEJIA & PRISECARU, 2005; LIU *et al.*, 2010; YAU *et al.*, 2015). *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) é uma árvore conhecida como aroeira da praia, estando incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. *Calliandra surinamensis* (“esponjinha rosa” ou “espanador de índio”) é um arbusto tropical perene pertencente à subfamília Mimosoideae da família Fabaceae, utilizado principalmente para fins ornamentais. O trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de lectinas purificadas das folhas de *Schinus terebinthifolius* (SteLL) e de *Calliandra surinamensis* (CasuLL) frente a células humanas normais (células mononucleares de sangue periférico, PBMCs) e malignamente transformadas (K562: leucemia eritrocítica crônica; e T47D:

câncer de mama). O procedimento para purificação de CasuLL foi estabelecido durante o desenvolvimento do projeto.

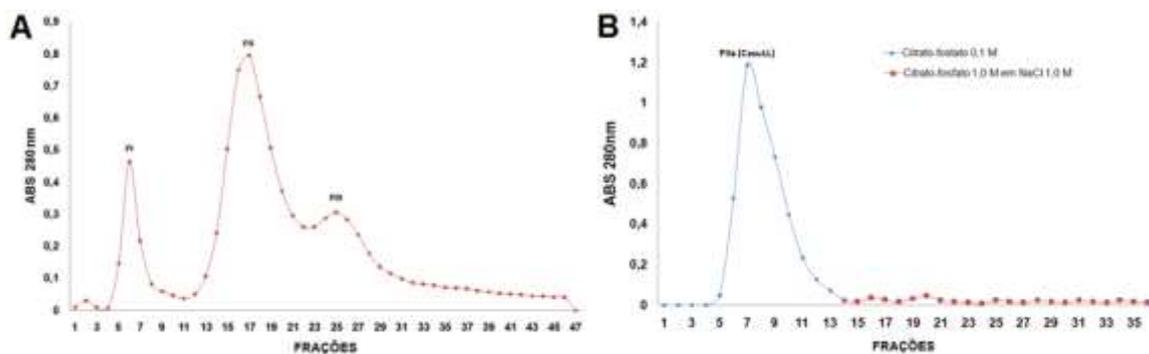
## MATERIAIS E MÉTODOS

- **Material vegetal:** Folhas de *S. terebinthifolius* e *C. surinamensis* foram coletadas no campus da UFPE). As folhas foram secas a 28°C por 3 dias e, em seguida, trituradas em multiprocessador até obtenção de uma farinha.
- **Determinação de atividade hemaglutinante (AH):** A presença de lectinas em uma amostra foi avaliada através do ensaio de AH, de acordo com Paiva & Coelho (1992), utilizando eritrócitos de coelho. Atividade hemaglutinante específica (AHE) foi definida pela razão entre a AH e a concentração de proteínas (mg/mL). Ensaio de inibição da AH do extrato de folhas de *C. surinamensis* foi realizado incubando o a amostra com os monossacarídeos (200 mM) manose, glicose, frutose ou *N*-acetilglicosamina por 15 min a 28 °C antes da determinação da AH.
- **Estimativa da concentração de proteínas:** A concentração de proteínas foi estimada de acordo com Lowry *et al.* (1951), utilizando curva padrão de albumina sérica bovina (31,25 a 500 µg/mL).
- **Purificação de SteLL:** SteLL foi isolada de acordo com Gomes *et al.* (2013). A farinha de folhas de *S. terebinthifolius* foi homogeneizada (16 h, 4°C) com NaCl 0,15 M na proporção de 10% (p/v). O extrato, obtido após centrifugação (15 min, 3.000 g, 4°C), foi cromatografado em coluna de quitina equilibrada com NaCl 0,15 M. SteLL foi eluída com ácido acético 1,0 M, dialisada contra água destilada (4 h) para remoção do eluente e avaliada quanto à concentração de proteínas e AH.
- **Purificação de CasuLL:** Extrato proteico foi obtido a partir da homogeneização (16 h, 28°C) da farinha de folhas de *C. surinamensis* em solução salina (NaCl 0,15 M), na proporção de 10% (p/v), utilizando agitador magnético. A suspensão foi filtrada em gaze e papel de filtro e centrifugada (15 min, 9.000 g, 4°C). O extrato foi então submetido ao tratamento com sulfato de amônio a uma saturação de 60% (GREEN e HUGHES, 1955) durante 4 h a 28 °C. Após centrifugação (3.600 rpm, 15 min), foram obtidas as frações de proteínas precipitadas (FP) e a fração sobrenadante (FS). FP e FS foram dialisadas contra água destilada (2 h) e NaCl 0,15 M (2 h) para remoção do sal. FP foi então cromatografada em coluna de Sephadex G-75, resultando na separação em 3 picos (PI, PII e PIII). PII foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de CM-celulose. CasuLL correspondeu ao *pool* de proteínas que não adsorveram a essa matriz.
- **Avaliação de citotoxicidade:** A citotoxicidade de SteLL e CasuLL foi avaliada por meio do teste do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio). PBMCs ou células tumorais (K562 e T47D) foram incubadas em placas de microtitulação com a lectina (1–100 µg/mL) por 72 h em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e 95% de umidade. Em seguida, foi adicionado o MTT e as placas foram mantidas na estufa por 3 h. Logo após esse período, foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolução dos cristais de formazan, sendo então realizada a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro para microplacas. Como controle negativo (100% de viabilidade), as células foram incubadas com água destilada (NaCl 0,15 M). PBMCs foram coletados de doadores voluntários não-fumantes e que não fizeram uso de nenhum medicamento durante no mínimo 15 dias antes da coleta. Os doadores preencheram termo de consentimento e o procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da UFPE (CEP/CCS/UFPE 145/09).
- **Análise estatística:** A concentração necessária para reduzir em 50% a viabilidade das células (IC<sub>50</sub>) foi calculada por análise de probitos utilizando o software GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

## RESULTADOS

SteLL foi obtida em quantidades miligramas e com atividade hemaglutinante (1.024) através da reprodução de protocolo previamente estabelecido. Os ensaios de citotoxicidade utilizando SteLL revelaram que essa lectina não foi tóxica para PBMCs nem para as células tumorais.

O extrato de folhas de *C. surinamensis* apresentou concentração de proteínas de 5,9 mg/mL e promoveu aglutinação de eritrócitos (Tabela 1). Tanto a fração precipitada (FP) quanto a fração sobrenadante (FS) foram capazes de promover aglutinação dos eritrócitos (Tabela 1). Após diálise, a fração de proteínas precipitadas (FP) apresentou maior AHE específica que o extrato. FP foi então cromatografada em matriz de gel filtração (Sephadex G-75). O perfil cromatográfico (Figura 1A) demonstrou a separação de três picos (PI, PII e PIII) e apenas PII apresentou AH. PII foi então submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de CM-celulose, onde a maioria das proteínas presentes não adsorveu à matriz e foi coletada na etapa de lavagem, correspondendo ao pico PIIa (Figura 1B). PIIa foi capaz de promover aglutinação de eritrócitos, apresentando alto fator de purificação (Tabela 1), sendo então denominado CasuLL. No teste de citotoxicidade, CasuLL não se apresentou tóxica para células normais e para as células K562. Por outro lado, CasuLL foi capaz de reduzir a viabilidade de células T47D, com IC<sub>50</sub> de 58,73±2,59 µg/mL.



**Figura 1.** Purificação da lectina de folhas de *Calliandra surinamensis* (CasuLL). (A) Cromatografia de PF em coluna de Sephadex G75 equilibrada NaCl 0,15 M. (B) Cromatografia de PII em matriz de troca iônica CM-celulose, previamente equilibrada com citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5. A coluna foi eluída com citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5 contendo NaCl 1,0M.

**Tabela 1.** Sumário da purificação da lectina de folhas de *C. surinamensis* (CasuLL).

Amostra	Concentração de proteínas (mg/mL)	AH	AHE	Purificação (vezes)
Extrato	5,9	512	86,7	1,0
FP	3,4	512	150,5	1,74
PII	0,5	64	128	1,47
CasuLL	0,017	64	3.764	43,4

## DISCUSSÃO

A notável propriedade anticancerígena determinada para lectinas incita a busca por novas proteínas desse grupo com potencial para uso quimioterápico (YAU *et al.*, 2015). Esse não foi o caso de SteLL, que não apresentou atividade citotóxica. Já a lectina CasuLL pode ser considerada uma boa alternativa para futuros estudos, uma vez que foi tóxica para células de câncer de mama, mas não reduziu a viabilidade de células normais. Similarmente, a

lectina de rizoma de *Microgramma vacciniifolia* apresentou efeito citotóxico seletivo para células de carcinoma mucoepidermoide pulmonar (IC<sub>50</sub>: 25,23 µg/mL), não sendo tóxica para PBMCs humanas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). Essa seletividade está relacionada com o fato das células malignamente transformadas apresentarem glicoconjugados de superfície distintos em relação às células normais, o que constitui uma vantagem das lectinas como agentes antitumorais. O protocolo estabelecido para purificação de CasuLL se revelou bastante eficiente, fornecendo a lectina com elevado fator de purificação.

### CONCLUSÕES

Em conclusão, SteLL não apresentou potencial antitumoral enquanto CasuLL, purificada eficientemente pelo procedimento estabelecido nesse trabalho, apresentou citotoxicidade seletiva para células de câncer de mama, apresentando potencial para futuros estudos visando sua aplicação como agente quimioterápico.

### AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: PIBIC-UFPE, CNPq, FACEPE, CAPES, MCTI e PPSUS/MS. Os autores agradecem às estudantes Tamara Figueiredo Procópio e Lidiane Vasconcelos do Nascimento Carvalho pela participação na realização dos experimentos e ao Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto do Melo Rêgo do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas do NUPIT-UFPE.

### REFERÊNCIAS

- Albuquerque, L. P., Pontual, E. V., Santana, G. M. S. *et al.* 2014. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. *Acta Tropica* 138: 23-27.
- Gomes, F. S., Procópio, T. F., Napoleão, T. H., Coelho, L. C. B. B. & Paiva, P. M. G. 2013. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *Journal of Applied Microbiology* 114: 672-679.
- Green, A. A. & Hughes, W. L. 1955. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents. In: *Methods in Enzymology* v. 1 (S. Colowick & N. Kaplan, eds.). Academic Press, New York, p. 67-90.
- Liu, B., Bian, H. J. & Bao, J. K. 2010. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters* 287: 1-12.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Mejia, E. G. & Prisecaru, V. I. 2005. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. *Food Science and Nutrition* 45: 425-445.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Paiva, P. M. G., Coelho, L. C. B. B. 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 36: 113-118.
- Paiva, P. M. G., Napoleão, T. H., Santos, N. D. L., Correia, M. T. S., Navarro, D. M. A. F. & Coelho, L. C. B. B. 2011. Plant compounds with *Aedes aegypti* larvicidal activity and other biological properties. In: Liang, M-T. (Ed.) *Bioprocess Sciences and Technology*. New York: Nova Science Publishers, pp. 269-294.
- Silva, L. C. N., Correia, M. T. S. 2014. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. *Frontiers in Microbiology* 5: 20.
- Yau, T., Dan, X., Ng, C. C. W., Ng, T. B. 2015. Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules* 20: 3791-3810.