

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Tese de Doutorado

Lectina quimérica biespecífica: estratégia terapêutica para o câncer de pâncreas

Alessandra Neis

Pelotas, 2024

Alessandra Neis

Lectina quimérica biespecífica: estratégia terapêutica para o câncer de pâncreas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências (Biotecnologia)

Orientador: Luciano da Silva Pinto

Coorientador: Frederico Schmitt Kremer

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

N416l Neis, Alessandra

Lectina quimérica biespecífica [recurso eletrônico] : estratégia terapêutica para o câncer de pâncreas / Alessandra Neis ; Luciano da Silva Pinto, orientador ; Frederico Schmitt Kremer, coorientador. — Pelotas, 2024.

144 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Engenharia de proteínas. 2. Expressão recombinante. 3. Bioinformática. 4. Atividade antitumoral. 5. Apoptose e autofagia. I. Pinto, Luciano da Silva, orient. II. Kremer, Frederico Schmitt, coorient. III. Título.

CDD 616.99437

Alessandra Neis

Lectina quimérica biespecífica: estratégia terapêutica para o câncer de pâncreas

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 09 de agosto de 2024

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto (Orientador)

Doutor em Ciências (Biotecnologia) pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Frederico Schmitt Kremer

Doutor em Ciências (Biotecnologia) pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a Fabiana Kömmling Seixas

Doutor em Ciências (Biotecnologia) pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a Karina Machado

Doutora em Ciência da Computação pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

**Dedico este trabalho a meus pais Jandir e Adelaide,
sem eles meus sonhos não seriam possíveis**

Agradecimentos

Sou grata aos meus pais, Jandir e Adelaide, pelo apoio inesgotável. A conclusão desta etapa só foi possível graças a vocês!

Aos meus mestres Luciano e Frederico, agradeço por fazerem o possível para que eu tornasse minhas ideias realidade, garantirem que eu seguisse os padrões científicos e metodologias adequadas e por acreditarem em mim.

Ao meu namorado, que vivenciou os momentos mais desafiadores da minha trajetória comigo, sempre sendo paciente e amoroso. Não tenho palavras para te agradecer.

Aos amigos que fiz durante estes anos de pós-graduação, sou grata por garantirem horas infinitas de cumplicidade e parceria, me escutar e acolher, compartilhar dúvidas, lágrimas, alegrias e vitórias.

À minha família, que sempre se orgulhou de mim e me incentivou a seguir em frente.

À todos do laboratório BioPro, Laboratório Markovitz e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, que auxiliaram de muitas maneiras para que esta tese fosse concluída e também no meu processo científico.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil

Resumo

NEIS, Alessandra. **Lectina quimérica biespecífica: estratégia terapêutica para o câncer de pâncreas**. Orientador: Luciano da Silva Pinto. 2024. 144 p. Tese (Doutorado em Ciências - Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

Células tumorais apresentam glicanos modificados em sua superfície, que não estão presentes em células saudáveis, decorrentes das mutações que afetam o metabolismo celular. As lectinas, proteínas que interagem com carboidratos de forma altamente específica e seletiva, reconhecem os glicanos modificados e induzem a morte celular. Frequentemente, os N-glicanos (como a *high mannose*) e O-glicanos (como os antígenos T e Tn) modificados estão presentes em diversos tipos de cânceres. Neste estudo, análises de bioinformática e tecnologia do DNA recombinante foram empregados para construir, caracterizar e testar uma lectina quimérica com atividade antitumoral. Esta quimera é constituída de um mutante da lectina de banana (*Musa acuminata*) e a lectina do cogumelo *Xerocomus chrysenteron* (XCL) e apresenta afinidade tanto por *high mannose* quanto pelos antígenos T e Tn. Estudos de *docking* contribuíram para a análise da afinidade de interação com os ligantes descritos, sendo que a quimera apresentou maior afinidade pelo antígeno T e a *high mannose* com cinco ramificações. A dinâmica molecular por 100 ns permitiu avaliar a estabilidade da macromolécula, que demonstrou pouca variação nas métricas de RMSD, RMSF e raio de giro na temperatura testada, mantendo também a conformação esperada. Testou-se a produção recombinante da quimera em diferentes cepas, temperaturas e concentrações de agente indutor. A nova proteína de 32 kDa foi produzida em *E. coli* na cepa Origami e suas porções isoladas foram produzidas na cepa RIL. O protocolo de indução da expressão a 16 °C *overnight* produziu a maior quantidade da lectina quimérica, sendo solúvel em D-PBS após a diálise. Sua atividade antitumoral foi testada em cultivo celular 2D e 3D em células de câncer de pâncreas CFPAC-1 e demonstrou acentuado efeito antiproliferativo no cultivo 2D, embora sua ação seja reduzida no cultivo 3D. As prováveis vias de ação da lectina quimérica foram avaliadas utilizando marcadores conhecidos de apoptose e autofagia por *Western Blotting*, revelando que a quimera estimula a morte celular através de um mecanismo distinto daquele apresentado por suas porções isoladas. Este estudo é pioneiro na área de lectinologia e apresenta uma possível terapia antitumoral de amplo espectro derivada de fontes naturais e produzida em grandes quantidades através de expressão recombinante.

Palavras-chave: engenharia de proteínas; expressão recombinante; bioinformática; atividade antitumoral; apoptose e autofagia.

Abstract

NEIS, Alessandra. **Bispecific chimeric lectin: therapeutic strategy for pancreatic cancer**. Advisor: Luciano da Silva Pinto. 2024. 144 p. Thesis (PhD in Sciences - Biotechnology) – Center for Technological Development, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2024.

Tumor cells present modified glycans on their surface, resulting from mutations that affect cellular metabolism and that are not present in healthy cells. Lectins, proteins that interact specifically and selectively with carbohydrates, recognize modified glycans and induce cell death in several types of cancer. Some frequently modified glycans include N-glycans (such as high mannose) and O-glycans (such as T and Tn antigens). In this study, bioinformatics analyses and recombinant DNA technology were used to construct, characterize and test a chimeric lectin with antitumor activity. This chimera consists of a mutant of the banana lectin (*Musa acuminata*) and *Xerocomus chrysenteron* mushroom lectin (XCL), presenting affinity for both high mannose and T and Tn antigens. Docking studies contributed to the interaction affinity analysis with the described ligands, and the chimera presented greater binding affinity towards T antigen and high mannose with five branches. Molecular dynamics allowed the evaluation of the stability of the macromolecule for 100 ns, which demonstrated little variation in RMSD, RMSF and radius of gyration at the tested temperature, also maintaining the expected conformation. The best protocol for recombinant production included testing in different strains, temperatures and concentrations of the inducing agent. The 32 kDa chimeric protein was produced in the *E. coli* Origami and RIL strains and its isolated portions were produced in the RIL strain. The expression induction protocol at 16 °C overnight produced the highest amount of the chimera, which was soluble in D-PBS after dialysis. Its antitumor activity was tested in 2D and 3D cell cultures using the CFPAC-1 lineage of pancreatic cancer, demonstrating a marked antiproliferative effect in the 2D culture and reduced action in the 3D culture. Likely pathways of action of the chimeric lectin were evaluated using known markers of apoptosis and autophagy, which revealed that the chimera acts on cell death by a distinct mechanism from that presented by its isolated portions. This is a pioneer study in the field of lectinology and presents a potential broad-spectrum antitumor therapy derived from natural sources and produced in large quantities through recombinant expression.

Keywords: protein engineering; recombinant expression; bioinformatics; antitumor activity; apoptosis and autophagy.

Lista de Figuras

Figura 1	Padrões de glicosilação em células normais e malignas	24
Figura 2	Mecanismos de morte celular por apoptose.....	28
Figura 3	Morte celular por macroautofagia.....	30
Figura 4	Fluxograma das análises de bioinformáticas desenvolvidas neste estudo .	49
Figura 5	Desenho esquemático da melhor configuração da quimera H84T-XCL. As sequências da H84T-Banlec (azul) e XCL (verde) estão conectadas por um linker flexível (vermelho) e inseridas no vetor pET-24a (+); a cauda de histidina (His6x) está localizada na porção C-terminal.	54
Figura 6	Fluxograma da metodologia utilizada para as análises experimentais.....	55
Figura 7	Estrutura modelada da quimera H84T-XCL conforme a configuração das proteínas, <i>linker</i> e cauda de histidina mais favorecidos após as análises bioinformáticas	61
Figura 8	Análise de qualidade do modelo da quimera no software ProSA-web	63
Figura 9	Análise de qualidade do modelo da quimera no software ModFold9	64
Figura 10	Gráfico de Ramachandran para a quimera H84T-XCL	65
Figura 11	Gráfico de Ramachandran da conformação favorável dos resíduos para a quimera H84T-XCL	66
Figura 12	Medida de compactação da quimera, calculada através do raio de giro em relação ao tempo da simulação.....	67
Figura 13	Medida do desvio médio quadrático da raiz (RMSD) em nanômetros em relação ao tempo da simulação (100 nanossegundos)	68
Figura 14	Medida da flutuação média quadrática da raiz (RMSF) dos resíduos que formam a quimera	69
Figura 15	<i>Docking</i> molecular da quimera e suas porções isoladas com os respectivos carboidratos.....	74
Figura 16	Validação da dimerização das proteínas isoladas H84T e XCL pelo <i>software</i> ClusPro	76
Figura 17	Análise de dimerização da quimera H84T-XCL pelo <i>software</i> ClusPro.....	77
Figura 18	Arranjos dos complexos oligoméricos modelados pelo AlphaFold3.....	78

Figura 19	Gel de agarose 1% relativo a (A) digestão plasmidial com a enzima de restrição HindIII e (B) obtenção dos plasmídeos a partir da cepa de clonagem DH5α .	80
Figura 20	Teste de colônia com as cepas RIL (A) e Origami (B).	82
Figura 21	Teste de colônia com as cepas RIL e Origami	83
Figura 22	Gel de SDS-PAGE contendo as cepas transformadas de RIL (à esquerda do marcador de peso molecular) e Origami (à direita do marcador de peso molecular), testadas com diferentes concentrações de IPTG, entre 1 e 0,062 mM	84
Figura 23	Indução da expressão recombinante da quimera na cepa RIL a 37 °C por 5h, representada por gel de SDS-PAGE e o respectivo Western Blot.	85
Figura 24	Caracterização da expressão da quimera a 16 °C overnight na cepa RIL	86
Figura 25	Perfil de purificação da quimera recombinante na cepa Origami em diferentes temperaturas	87
Figura 26	Visualização da quimera após diálise produzida em 2 diferentes temperaturas e cepas por gel SDS-PAGE (painel superior) e WB (painel inferior)	88
Figura 27	Análise bioquímica do arranjo estrutural da quimera, XCL e H84T em tampão D-PBS	89
Figura 28	Ensaio de proliferação celular em células de câncer de pâncreas CFPAC-1	91
Figura 29	Avaliação da atividade antiproliferativa das lectinas em esferoides da linhagem de câncer de pâncreas CFPAC-1	92
Figura 30	Intensidade da fluorescência de GFP após tratamento das células de câncer de pâncreas e do estroma (A) CFPAC-1 e (B) PANC-1 com as lectinas. As proteínas foram incubadas com as células por até 7 dias e a intensidade foi medida no equipamento Incucyte Live imaging™. As linhas coloridas referem-se às diluições realizadas com a proteína em estudo e o controle positivo utilizado foi a construção CAR T cell H84T-Banlec. NT: células T não transduzidas.	93
Figura 31	Avaliação do mecanismo de morte celular através de proteínas presentes no extrato celular das células de câncer de pâncreas CFPAC-1	95

Lista de Tabelas

Tabela 1. Mecanismo de morte celular induzido por diversas lectinas em células tumorais.....	33
Tabela 2- Ligantes utilizados para o <i>docking</i> molecular.....	51
Tabela 3 – Resultados da validação estereoquímica do modelo 3D da quimera.....	62
Tabela 4 - Média das energias de afinidade (kcal/mol) das poses em diferentes programas.....	71
Tabela 5 - Interações formadas com os ligantes no <i>docking</i> molecular.....	73
Tabela 6 - Energias de afinidade (kcal/mol) obtidas no programa UDock em relação à formação da interface proteína-proteína entre as porções da quimera.....	79
Tabela 7 - Características das diferentes cepas utilizadas para a expressão recombinante das lectinas quimera, H84T e XCL.....	81

Abreviações

AKT	Proteína quinase B
ATG7	Proteína relacionada à autofagia 7
Banlec	Lectina de banana (<i>Musa acuminata</i>)
BAX	Proteína X associada a Bcl-2
BCL-2	Linfoma de células B 2
BEL	Lectina de <i>Boletus edulis</i>
BhL	Lectina de <i>Benincasa hispida</i>
BID	Agonista de morte de domínio de interação BH3
BME	β -mercaptoetanol
CAR T	Receptor antigênico quimérico de célula T
CBS	Sítio de ligação a carboidrato
ConA	Lectina Concanavalina A (<i>Canavalia ensiformis</i>)
Dil9	Lectina de <i>Datura innoxia</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DsbC	Dissulfeto isomerase C
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP	Proteína verde fluorescente

GlcNAc	N-acetilglicosamina
GST	Glutathione S-transferase
IGFR	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LAMP1	Proteína de membrana 1 associada ao lisossomo
LC3B	Proteínas associadas a microtúbulos 1A/1B cadeia leve 3B
MBP	Proteína de ligação à maltose
MTT	Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NusA	Substância de utilização de NA
P38	Proteína quinase 38 ativada por mitógeno
P53	Proteína tumoral 53
PARP-1	Poli ADP-ribose polimerase 1
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCL	Lectina de <i>Polygonatum cyrtonema</i>
POL	Lectina de <i>Polygonatum odoratum</i>
PSC	Células pancreáticas estelares
Rab7	Proteína relacionada a Ras 7
RMSD	Desvio médio quadrático da raiz
RMSF	Flutuação média quadrática da raiz
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPX	Lectina Riproximina (<i>Ximenia americana</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecilsulfato de sódio (SDS)
SRL	Lectina de <i>Sclerotium rolfsii</i>

SUMO	Proteína modificadora semelhante à ubiquitina
tRNAs	RNA transportador
TrxA	Tiorredoxina A
XCL	<i>Xerocomus chrysenteron</i>

Sumário

1	Introdução	16
2	Hipótese/Objetivo	19
3	Revisão de literatura	21
3.1.	Câncer de pâncreas	21
3.2.	Glicosilação aberrante	23
3.3.	Lectinas como agentes antitumorais	24
3.4.	Mecanismos de morte celular	26
3.5.	Vias de morte celular estimuladas pelas lectinas	32
3.6.	Engenharia de lectinas	36
3.7.	Estratégias de bioinformática	38
4	Desenvolvimento	48
4.1.	Análises bioinformáticas	48
4.1.1.	Modelagem molecular, validação dos modelos e parâmetros bioquímicos	48
4.1.2.	Arranjo quaternário	50
4.1.3.	<i>Docking</i> lectina-açúcar	50
4.1.4.	Dinâmica molecular.....	52
4.2.	Obtenção e propagação dos plasmídeos pET-24 quimera e pET-24 XCL.....	53
4.3.	Caracterização da expressão recombinante	54
4.4.	Expressão e purificação das proteínas recombinantes quimera e XCL em <i>E. coli</i> 56	
4.5.	Atividade antiproliferativa.....	57
4.5.1.	Cultivo 2D	57
4.5.2.	Cultivo 3D e ensaio com esferóides.....	58
4.6.	Viabilidade celular e análise dos dados.....	58
4.7.	Determinação das vias de ação	59
5	Resultados e Discussão.....	61
5.1.	Análises bioinformáticas	61
5.1.1.	Modelagem da estrutura tridimensional e avaliação da qualidade.....	61
5.1.2.	Dinâmica molecular.....	66
5.1.3.	<i>Docking</i> molecular lectina-açúcar	70
		14

5.1.4.	Análise <i>in silico</i> do arranjo quaternário	75
5.2.	Obtenção e propagação dos plasmídeos pET-24 quimera e pET-24 XCL.....	79
5.1.	Caracterização da expressão recombinante	80
5.2.	Expressão e purificação das proteínas recombinantes quimera e XCL em <i>E. coli</i> 88	
5.1.	Atividade antiproliferativa.....	90
5.1.1.	Cultivo 2D	90
5.1.2.	Cultivo 3D	92
5.2.	Determinação das vias de ação	94
6	Conclusões	98
	Referências	99
	Apêndices.....	113
	Apêndice A – resultados complementares	114
	Apêndice B – Patente.....	116

1 Introdução

O câncer de pâncreas apresenta a maior relação mortalidade/incidência entre todas as doenças malignas. Apenas em 2022, o câncer de pâncreas foi responsável por 4,8% das mortes no mundo, ocupando o sexto lugar neste *ranking*, segundo a Organização Mundial da Saúde (BRAY et al., 2024). A sobrevida média de 5 anos é de apenas 9% (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020). Esse número aterrador decorre principalmente da resistência aos atuais tratamentos, sendo que a remoção cirúrgica é a melhor alternativa para a cura completa do câncer de pâncreas, porém, só é possível em apenas 15% dos pacientes (BRAY et al., 2024; HALBROOK et al., 2023).

As drogas mais utilizadas na clínica atualmente são os inibidores de tirosina quinases (ITQ), que se ligam especificamente à proteínas mutadas na superfície tumoral para impedir sua atividade, como é o caso dos receptores de membrana que enviam sinais de proliferação e crescimento (URIBE; MARROCCO; YARDEN, 2021). O grande desafio apresentado pelo câncer de pâncreas é justamente a inexistência destas mutações alvo dos ITQs, e, conseqüentemente, as opções de tratamento diminuem consideravelmente. De fato, as alterações genômicas mais representativas no câncer de pâncreas são similares às que ocorrem nos cânceres em geral, porém, não são alvos de grande parte das drogas disponíveis (PELOSI; CASTELLI; TESTA, 2017).

Uma alternativa que ganhou atenção recentemente são os açúcares modificados abundantes na superfície celular. Células de câncer apresentam glicanos modificados denominados “aberrantes”, por não serem processados adequadamente. Destes, as principais modificações incluem a ocorrência dos N-glicanos (açúcares ligados à asparagina) e O-glicanos (açúcares ligados à hidroxila de uma serina ou treonina) (PINHO; REIS, 2015). Os N-glicanos ramificados – como a *high mannose* – e O-glicanos truncados – como os antígenos T e Tn – são modificações frequentes e são abundantes em diversos tipos de tumores, o que faz com que sejam alvos promissores em relação às terapias atualmente utilizadas (MCDOWELL et al., 2020; PAN et al., 2014). A superfície de uma célula pancreática tumoral, por exemplo, apresenta grande quantidade de ambos glicanos modificados em sua superfície (MUNKLEY, 2019).

Nesse sentido, destaca-se o papel das lectinas, proteínas capazes de se ligar a carboidratos de forma específica e seletiva. O potencial terapêutico das lectinas é

determinado principalmente pela capacidade de reconhecimento de carboidratos e pela especificidade de sua ligação. Sua especificidade fina as torna muito diversas: o sítio de ligação aos carboidratos (CBS) pode acomodar tanto açúcares simples quanto complexos. A eficiência das lectinas como agentes antitumorais é demonstrada pela inibição da proliferação em diversos tipos de câncer, sendo que essas proteínas são capazes de reconhecer de forma seletiva os glicanos aberrantes, mas não interagem com glicanos de células saudáveis. Associado ao reconhecimento específico, as lectinas são capazes de induzir a morte celular das células tumorais através de mecanismos de apoptose e autofagia (BARRE et al., 2019; MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020; POIROUX et al., 2017).

Uma estratégia inovadora no campo da lectinologia é a combinação de lectinas com diferentes especificidades, formando quimeras ou lectinas ciborgues. Esse tipo de estudo foi realizado anteriormente com a inserção CBS da lectina de *Lens culinaris* na sequência da lectina de *Bauhinia purpurea*, tornando-a uma proteína quimérica duplo-específica (ou biespecífica) que tem a capacidade de se ligar tanto a manose, quanto a galactose (YAMAMOTO; KONAMI; OSAWA, 2000).

Duas lectinas que apresentam potencial como agente antitumoral incluem a lectina de *Xerocomus crisenteron* (XCL) e a lectina de banana (Banlec – *Musa acuminata*), que se ligam a galactose e manose, respectivamente. A XCL é uma lectina de cogumelo da família das actinoporinas, que interage com os antígenos T e Tn e estimula a perturbação da adesão celular (DAMIAN et al., 2005; MARTY-DETRAVES et al., 2004). A Banlec faz parte da família das jacalinas (JRL) e reconhece o glicano aberrante *high mannose* (MEAGHER et al., 2005; SINGH et al., 2005). O grande desafio de utilização da Banlec é seu potente estímulo à proliferação de linfócitos T, resposta que foi desacoplada através do desenvolvimento do mutante H84T-Banlec. Este, por sua vez, mantém a atividade antiviral e antitumoral características, porém, sem gerar a resposta mitogênica característica (SWANSON et al., 2015).

Os quimioterápicos mais utilizados contra o câncer de pâncreas dependem de mutações específicas; portanto, ter como alvo os glicanos aberrantes permite uma abordagem de amplo espectro, vista sua ampla distribuição que independe de mutações em receptores específicos do ciclo celular. Assim, as lectinas se apresentam como uma

alternativa terapêutica de grande relevância, devido a reconhecerem diferentes glicanos aberrantes expostos na superfície. Considerando o exposto, o objetivo deste estudo foi produzir e caracterizar uma nova lectina quimérica duplo-específica, composta das lectinas H84T-Banlec e XCL. Foram realizadas análises de bioinformática, expressão recombinante em *Escherichia coli* e testes em cultivo celular para produzir, caracterizar e elucidar a atividade antitumoral da quimera.

2 Hipótese/Objetivo

Hipótese:

É possível combinar a afinidade de ligação de lectinas com especificidades diferentes para reconhecer glicanos na superfície de células tumorais a partir de estudos de bioinformática e expressão recombinante, testando sua ação antiproliferativa em baixas doses.

Objetivo geral

O projeto visa construir e caracterizar uma nova lectina quimérica com dupla especificidade através de análises *in silico*, como modelagem, *docking* e dinâmica molecular. Após confirmação de sua interação com os ligantes e estabilidade, a quimera será produzida e caracterizada *in vitro* através de expressão recombinante em *E. coli* e seu potencial antiproliferativo será avaliado em uma linhagem celular de câncer de pâncreas que apresente *high mannose* e antígeno T e Tn.

Objetivos específicos:

- Determinar a melhor configuração da quimera a ser construída através de *softwares* de modelagem molecular e realizar análises de bioinformática como *docking* e dinâmica molecular, a fim de obter a afinidade de ligação predita a *high mannose* e antígenos T e Tn, assim como os dados de estabilidade da molécula;
- Construir e expressar a quimera H84T-XCL recombinante e XCL recombinante em *Escherichia coli*;
- Determinar as melhores condições de produção da lectina quimérica, testando diferentes cepas, temperaturas e concentrações do agente indutor;
- Avaliar a capacidade da XCL e quimera de se ligarem a açúcares simples e complexos e a manutenção de sua atividade;
- Testar a toxicidade das novas proteínas em linhagens celulares normais (não-tumorais);

- Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* da quimera e suas porções isoladas em linhagens celulares de câncer de pâncreas que apresentem os glicanos aberrantes na superfície, especialmente *high mannose*, o antígeno T, Tn.

3 Revisão de literatura

3.1. Câncer de pâncreas

O câncer de pâncreas é considerado o câncer mais agressivo por apresentar a maior relação mortalidade/incidência entre todas as doenças malignas. Apenas em 2022, o câncer de pâncreas foi responsável por 4,8% das mortes no mundo, ocupando o sexto lugar no *ranking*, segundo a Organização Mundial da Saúde (BRAY et al., 2024). Dentre os diversos tipos de câncer de pâncreas, o adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC, do inglês, *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*) é o mais comum e responsável pela baixa perspectiva prognóstica, sendo a sobrevida de 5 anos de apenas 9% (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020). Os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer incluem o tabagismo, alcoolismo, obesidade, diabetes, fatores genéticos e infecção pelos vírus da hepatite B e C, sendo também mais comum em pessoas de 60 a 80 anos (RAWLA; SUNKARA; GADUPUTI, 2019).

O adenocarcinoma ductal pancreático infiltrante é marcado pela presença de células glandulares neoplásicas epiteliais, envoltas por uma reação estromal desmoplástica intensa. O microambiente tumoral é composto por células do estroma, colágeno, células inflamatórias e vasos sanguíneos comprimidos, resultando em um ambiente hipóxico e de baixa perfusão, o que dificulta a distribuição eficaz de tratamentos terapêuticos no tumor. O adenocarcinoma pancreático pode surgir a partir de três tipos distintos de lesões precursoras: neoplasia intraepitelial pancreática (pequenas proliferações microscópicas com potencial de se transformar em câncer, mas ainda não detectáveis), neoplasias mucinosas papilares intraductais (lesões císticas presentes nos ductos pancreáticos) e neoplasias mucinosas císticas (lesões císticas com estroma semelhante ao ovariano, mais comuns em mulheres, com cerca de 30% de risco de evoluir para adenocarcinoma) (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020).

O adenocarcinoma pancreático torna-se tão agressivo devido à falta de biomarcadores para a detecção do câncer em estágios iniciais, podendo inclusive ocorrer metástase já nessa fase, os sintomas se apresentarem em estágios avançados da doença, a recorrência tumoral e a resistência natural aos tratamentos quimioterápicos e radioterapia. A remoção cirúrgica posa como a melhor alternativa de recuperação, porém, é possível em apenas 15% dos pacientes devido à intensa irrigação recebida

pelo órgão (BRAY et al., 2024). Nos casos em que a cirurgia é impossibilitada, é possível recorrer à radioterapia e ao tratamento quimioterápico, podendo inclusive ser utilizadas de forma combinada. A quimioterapia de primeira linha é FOLFIRINOX (uma combinação de 5-fluorouracil (5-FU), leucovorina, irinotecano e oxaliplatina) ou de segunda linha (gemcitabina e um conjugado de nanopartículas de albumina de paclitaxel) (HALBROOK et al., 2023). Novas estratégias incluem a imunoterapia - que emprega inibidores de checkpoint imunológico (ICI), tendo como alvo as proteínas PD1 e PDL1; indutores de morte celular e quimioterapia de letalidade sintética, em que compostos já sabidamente eficazes acabam por sensibilizar a célula tumoral que apresenta diversas mutações (CHEN et al., 2021). Infelizmente, nenhum destes tratamentos é efetivamente capaz de curar o câncer de pâncreas.

Em geral, as drogas antitumorais utilizadas na quimioterapia baseiam-se majoritariamente em mutações-chave que alteram o funcionamento de proteínas que auxiliam na tumorigenicidade. Os inibidores de tirosina quinases (ITQ) são os mais empregados e podem se apresentar como pequenos compostos, anticorpos monoclonais ou ainda conjugados anticorpo-droga. Os ITQs se ligam especificamente à proteínas mutadas na membrana celular, como o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) e a proteína de transição mesenquimal-epitelial (MET) (URIBE; MARROCCO; YARDEN, 2021). Esses receptores iniciam uma cascata complexa de sinalização intracelular relacionada à proliferação tumoral e metástase. Um resultado indesejado da utilização dos ITQs é a resistência adquirida, e novas alternativas vêm sendo descobertas ainda em um ritmo lento (WU et al., 2022).

O grande desafio apresentado pelo câncer de pâncreas é justamente não apresentar as mutações-alvo dos ITQs, conseqüentemente, as opções de tratamento diminuem consideravelmente. As alterações genômicas mais representativas no câncer de pâncreas são similares às que ocorrem nos cânceres em geral - KRAS, CDKN2A, TP53 e SMAD4 (PELOSI; CASTELLI; TESTA, 2017) - porém, não são alvos tratáveis com a maioria das drogas disponíveis atualmente. Os genes-alvo de diversas vias de sinalização, como EGFR, não apresentam as mutações necessárias para que os ITQs sejam utilizados, sendo indicada a quimioterapia sistêmica ou inibidores da síntese de DNA (LIGORIO et al., 2019; THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2017; WU et al., 2022).

Uma alternativa aos tratamentos convencionais encontra-se amplamente distribuída na superfície de células tumorais e independe de mutações específicas: os açúcares modificados, chamado glicanos “aberrantes”. A modificação mais comum em cânceres são os N-glicanos ramificados (açúcares ligados à asparagina) e O-glicanos truncados (açúcares ligados à hidroxila de uma serina ou treonina). Estas moléculas não sofreram o processamento adequado pelas enzimas de processamento pós-traducional, e estão amplamente presentes em diversos tipos de câncer de pâncreas (MUNKLEY, 2019). A grande quantidade de glicanos aberrantes, principalmente os O-glicanos truncados e os N-glicanos ramificados, faz com que sejam alvos promissores em relação às terapias utilizadas atualmente (MCDOWELL et al., 2020; PAN et al., 2014).

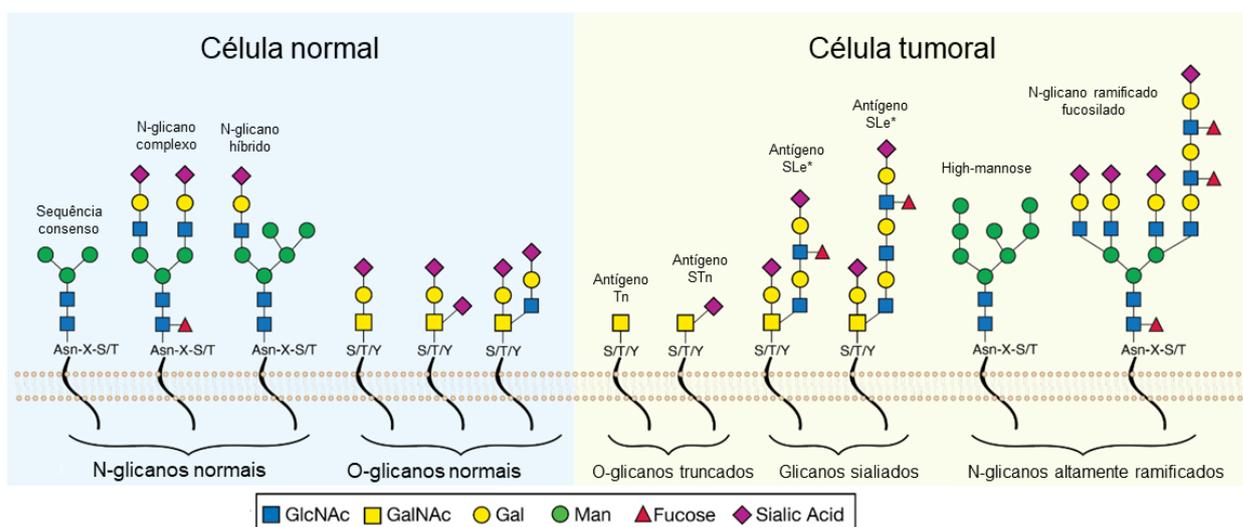
3.2. Glicosilação aberrante

Células tumorais apresentam glicanos modificados em sua superfície, comumente chamados de glicanos aberrantes. Os glicanos aberrantes que ocorrem em células tumorais estão geralmente ligados a proteínas glicosiladas e receptores de membrana, como o EGFR. Mais interessante, estes glicanos modificados não são encontrados em células saudáveis, uma vez que surgem a partir da atividade de enzimas específicas responsáveis pelas modificações pós-traducionais, que encontram-se sub- ou super-expressas devido às alterações promovidas pela tumorigênese (PINHO; REIS, 2015).

A glicosilação aberrante medeia uma miríade de processos associados ao desenvolvimento tumoral, incluindo adesão célula-célula, invasão e metástase, vigilância imunológica e metabolismo do câncer (PINHO; REIS, 2015). As células malignas exibem profundas alterações no seu glicoma, uma parte essencial da oncogênese. Em células normais e saudáveis, carboidratos como a *high mannose* (na qual 5-9 moléculas de manose estão ligadas a uma asparagina – N-glicosilação) são cortados no percurso através do retículo endoplasmático (RE) e do complexo de Golgi; no entanto, as células cancerosas não realizam esta clivagem. Por isso, a manose ramificada não processada tem especial relevância. Alguns tipos de câncer já bastante estudados quanto à N-glicosilação aberrante incluem câncer de mama, cólon, pâncreas, pulmão, próstata e fígado (LIN; LUBMAN, 2024).

A O-glicosilação refere-se à ligação de moléculas de açúcar ao átomo de oxigênio da serina ou treonina e, menos frequentemente, tirosina, que são apresentados na superfície celular das células cancerosas como formas anormalmente truncadas (DE LEOZ et al., 2011; FERREIRA et al., 2017; LIU et al., 2013). Descobriu-se que os O-glicanos como o antígeno T (também denominado TF, um dissacarídeo formado por Gal β (1 \rightarrow 3)GalNAc) e o antígeno Tn (monossacarídeo formado por GalNAc- α 1-Ser/Thr) decoram a superfície celular dos cânceres de cólon, colo do útero, mama, pulmão, bexiga, ovário, estômago e próstata, enquanto as células normais não abrigam essas estruturas (FU et al., 2016). Outras modificações identificadas nas células cancerígenas incluem aumento da fucosilação e alterações nos padrões de sialilação (Figura 1).

Figura 1 - Padrões de glicosilação em células normais e malignas. O painel esquerdo representa padrões de glicosilação encontrados em glicoproteínas de superfície celular normais, como a N-glicosilação, que ocorre através de ligações de nitrogênio em resíduos de asparagina (Asn) na sequência de consenso Asn-X-Serina (onde X é qualquer aminoácido exceto prolina). Já a O-glicosilação ocorre através de ligações de oxigênio em grupos hidroxila de resíduos de serina (Ser) ou treonina (Thr). O painel direito mostra padrões de glicosilação anormais encontrados em células cancerígenas, incluindo os O-glicanos truncados Tn e STn, glicanos sialilados incluindo SLea e SLex, e N-glicanos altamente ramificados incluindo high mannose a aqueles fucosilados



Fonte: imagem concedida por David Markovitz.

3.3. Lectinas como agentes antitumorais

Lectinas são proteínas de origem não imune que se ligam especificamente a mono-, di- e oligossacarídeos, bem como a glicanos complexos. Essas moléculas estão

amplamente distribuídas em vários reinos, porém as lectinas vegetais são de longe as mais bem caracterizadas quanto à sua atividade biológica, especialmente as lectinas de leguminosas (VAN DAMME, 2022). O potencial terapêutico das lectinas é determinado principalmente pela capacidade de reconhecimento de carboidratos e sua especificidade de ligação. As lectinas são muito diversas, especialmente em termos de especificidade fina: o sítio de ligação aos carboidratos (CBS) pode acomodar açúcares simples e complexos, como manose, glicose, galactose, quitina, ácido siálico e fucose, por exemplo (TSANEVA; VAN DAMME, 2020).

Está bem estabelecido que as lectinas têm uma preferência natural para reconhecer glicanos e glicoconjugados em relação à açúcares simples, o que pode ser explicado pelo fato de que as superfícies celulares são ricas em moléculas complexas (GABIUS et al., 2011; HENDRICKSON; ZHERDEV, 2018). Essa capacidade pode ser empregada no reconhecimento de modificações específicas frequentemente associadas a metabolismo anormal e/ou doença, embora os glicanos também desempenhem papéis essenciais em células normais, inclusive na motilidade celular, inflamação, transdução de sinal e interações patógeno-hospedeiro (REILY et al., 2019; WORMALD; DWEK, 1999). Devido à sua capacidade de reconhecer os glicanos encontrados em vírus e células cancerosas, mas não em células saudáveis, as lectinas apresentam-se como promissores agentes antitumorais, além de esta capacidade permitir às mesmas apresentar atividade antiviral, antibacteriana, inseticida, fungicida e anti- ou pró-inflamatória (CAGLIARI, 2018).

As lectinas se tornam ainda mais relevantes por reconhecerem seletivamente as modificações de glicosilação na superfície do câncer, devido à abundância de glicanos aberrantes presentes minimamente nas células saudáveis (BOYAVAL et al., 2021; ŠČUPÁKOVÁ et al., 2021). Diversas lectinas de origem fúngica e vegetal também são capazes de se ligar a O-glicanos modificados (antígenos T e Tn ou glicolipídeos de Lewis) (POIROUX et al., 2017) e podem levar à morte celular por mecanismos de apoptose e/ou autofagia (BHUTIA et al., 2019).

Estruturas ricas em manose não estão apenas presentes nas membranas das células cancerígenas, mas também nos vírus, onde as lectinas atuam através da ligação ao envelope viral e bloqueando a entrada viral. A atividade antiviral das lectinas foi

relatada para uma série de vírus importantes na saúde pública (GONDIM et al., 2019; MARTINEZ et al., 2021; MITCHELL; RAMESSAR; O'KEEFE, 2017), entretanto, nenhuma lectina terapêutica ainda chegou à fase clínica, sendo apenas três ensaios clínicos conduzidos com a lectina Griffithsin (BRAND, 2021; POPULATION COUNCIL, 2018) e Cianovirin (TSAI et al., 2004), como agentes antivirais, e a lectina Aviscumín, como agente antitumoral (BERGMANN et al., 2008).

Testes em células não cancerosas e ensaios *in vivo* são imperativos para determinar a segurança no uso das lectinas. Uma das maiores dificuldades na aplicação de lectinas como agentes antitumorais na clínica se dá devido à toxicidade. Como exemplo, têm-se a lectina de Concanavalina A, que, embora extremamente efetiva contra células de câncer de hepatoma, apresenta alta toxicidade para hepatócitos saudáveis (LEIST; WENDEL, 1996; MIYAGI et al., 2004). Por esse motivo, muitas lectinas têm sido sugeridas para uso na clínica como moléculas de detecção e diagnóstico do câncer, mas não como moléculas terapêuticas (BHUTIA et al., 2019).

3.4. Mecanismos de morte celular

O uso de lectinas como agentes antitumorais vem se destacando como uma alternativa às terapias convencionais. Lectinas de diversos reinos já foram caracterizadas quanto à sua atividade antiproliferativa e se apresentam eficazes em doses nanomolares (BARRE et al., 2019; MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020; POIROUX et al., 2017). Sabe-se que as lectinas exibem diversos mecanismos de ação quando em contato com células tumorais e podem desencadear eventos de morte celular relacionados principalmente à apoptose, autofagia, e em muitos casos, ambas as vias. O mecanismo pelos quais estas vias são ativadas são diversos e podem incluir as vias conhecidas de sinalização celular e regulação gênica (e.g. PI3K-Akt-mTOR, Ras-Raf-MEK-ERK, ROS-p38-p53). Outros mecanismos menos comuns, como a ativação de ribossomos e a regulação de miRNAs, também podem ocorrer (YAU et al., 2015). Aqui, revisaremos os pontos principais em relação às vias da apoptose e autofagia e sua relação com a célula tumoral.

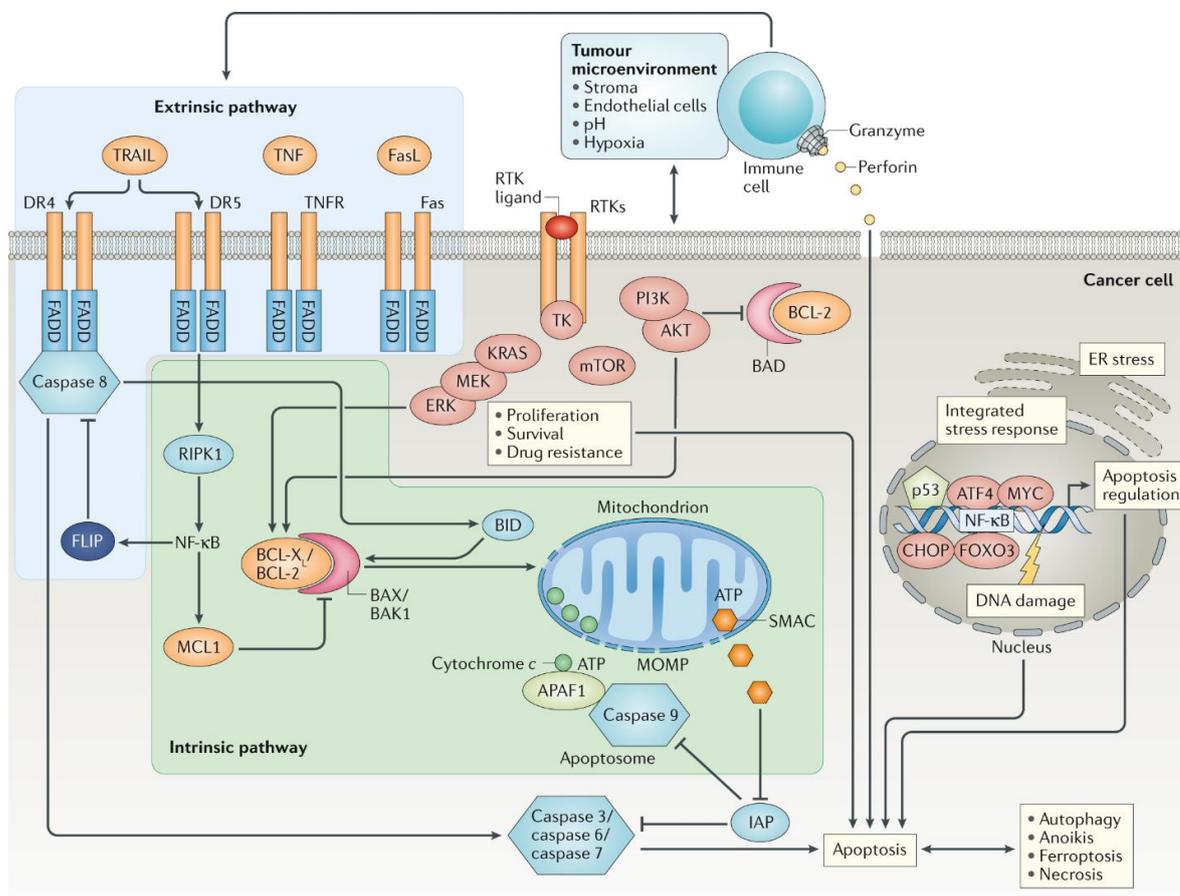
A apoptose é um mecanismo de morte celular programada, em que a partir de um estímulo interno (intrínseca) ou externo (extrínseca), desencadeia-se uma complexa

sinalização intracelular (Figura 2). Morfologicamente, ocorre o encolhimento celular, as células ficam arredondadas, com citoplasma denso e organelas compactadas. A picnose é o resultado da condensação da cromatina, em que material nuclear fica agregado na periferia da célula sob a membrana nuclear. Há uma extensa formação de bolhas na membrana, seguida de separação dos componentes celulares nos corpos apoptóticos, processo denominado “brotamento”. Os corpos apoptóticos compactam o citoplasma e as organelas, ainda íntegras. Estes serão posteriormente fagocitados, sem estimular uma resposta inflamatória (ELMORE, 2007).

A apoptose intrínseca ocorre da ausência de estímulos negativos (hormônios, citocinas) ou presença de estímulos positivos (radiação, radicais livres, etc.) que permeabilizam a membrana mitocondrial e levam à liberação do citocromo c (Cyt c). A liberação do Cyt c é estimulada por membros pró-apoptóticos da família BCL-2 – BAX, BAK1, BIM, BID e PUMA – e inibida por membros anti-apoptóticos – BCL-2 e BCL-XL. As proteínas ativadoras (BIM, BID e PUMA) ligam-se e ativam diretamente BAX e/ou BAK1, efetores centrais da apoptose, que oligomerizam e formam um poro na membrana mitocondrial e causando sua permeabilização. O Cyt c e a proteína adaptadora APAF-1 se ligam para formar o apoptossomo, que inibem a proteína anti-apoptótica XIAP e ativam a caspase-9, conseqüentemente, clivando e ativando as caspases efetoras 3, 6 e 7 (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020).

A apoptose extrínseca caracteriza-se pela ligação de uma molécula a receptores celulares (e.g., FasL/FasR, TNF- α /TNF-R) que induzem a ligação de adaptadores (FADD e TRADD, respectivamente) e a formação do complexo de morte (DISC), que por sua vez, ativa a caspase iniciadora 8. Essa protease cliva e ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7, que darão início aos processos de alteração nas características morfológicas e bioquímicas. Ambas as vias convergem na ativação das caspases efetoras, que ativam endonucleases e proteases para degradar o material nuclear e citoesqueleto, levando também à exposição de fosfatidilserina na membrana celular - um marco do estágio final da apoptose (ELMORE, 2007; XI et al., 2022).

Figura 2 – Mecanismos de morte celular por apoptose. A apoptose intrínseca é marcada pela liberação do citocromo c após a permeabilização da membrana mitocondrial, enquanto a apoptose extrínseca ocorre a partir do recebimento de um sinal extracelular que inicia a formação do complexo de morte. Ambas as vias convergem na ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7, que iniciam as modificações morfológicas típicas da apoptose.



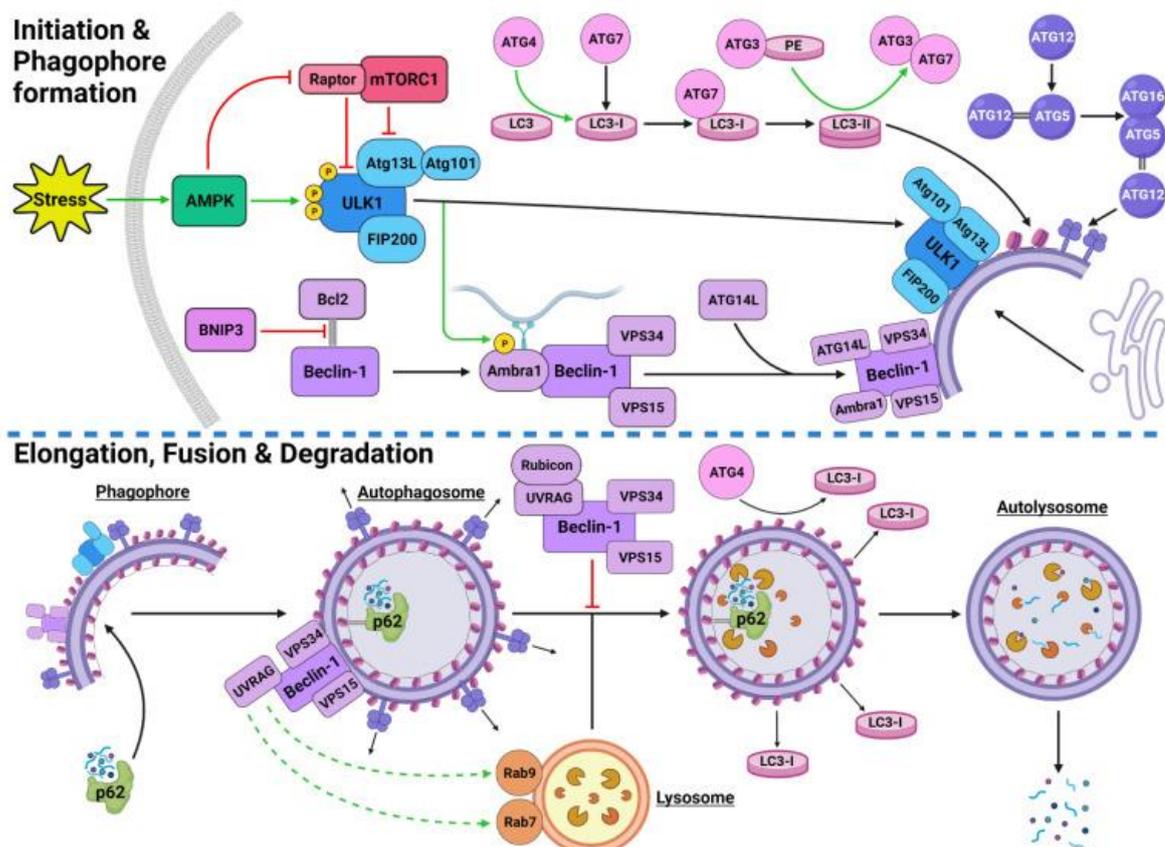
Fonte: CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020.

A autofagia é um processo de renovação celular caracterizado pela degradação específica ou não de proteínas e até organelas inteiras. A autofagia está aumentada em situações de privação de nutrientes, no remodelamento celular do crescimento e desenvolvimento, e durante estresse oxidativo. Existem três tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. Neste estudo, o foco será o primeiro. A autofagia inicia-se a partir de um sinal recebido à montante da cascata de sinalização, podendo ser associado às vias (1) mTORC1, um regulador central do crescimento celular da via PI3K-AKT-mTOR; (2) MAPK; (3) AMPK; e (4) Bcl-2 (GILLSON et al., 2022).

A partir de condições de estresse, mTORC1 é inibida e inicia-se o processo autofágico. Quando formado o complexo ULK1, composto pelas proteínas ULK1-FIP200-ATG13-ATG101, uma série de sinais para iniciar a formação de uma membrana de isolamento – o fagóforo – é desencadeada (Figura 3). O complexo PI3KC3-C1 é ativado por ULK1 com a fosforilação de AMBRA1 ou Beclin-1 e VPS34, que se liga à ATG14. Juntos, os complexos PI3KC3-C1 (AMBRA1-Beclin1-VPS34-VPS15) e ULK1 localizam-se na membrana de isolamento no RE e complexo de Golgi e facilitam o alongamento em autofagossomo. As proteínas ATG5-ATG12-ATG16 e as proteínas associadas a microtúbulos LC3 são recrutadas para se ligar à membrana e iniciar a formação do autofagossomo. LC3 é convertido em LC3-I por ATG4, e, com a ligação de fosfatidiletanolamina, é convertido em LC3-II. A maturação decorre da interação de LC3-II e p62, que estabiliza a proteína-alvo na membrana e permite que se feche ao redor da mesma (GILLSON et al., 2022; PARZYCH; KLIONSKY, 2014).

Com a formação do autofagossomo, parte de LC3-II está na membrana externa e parte está ligada à p62 internamente, enquanto o complexo ATG é liberado progressivamente. Agora, os autofagossomos se fundem aos lisossomos após a formação do complexo PI3KC3-C2 (PI3KC3-C1 e UVRAG), que medeia a atração das GTPases ligadas ao lisossomo Rab7 e Rab9. Após a formação do autolisossomo, hidrolases e proteases dissolvem o conteúdo e as proteínas restantes, e os produtos são liberados no citoplasma para serem reutilizados. A degradação de LC3-II e p62 internos indica o fluxo autofágico normal, enquanto o LC3-II externo é delipidado e pode então ser reutilizado no próximo ciclo autofágico (GILLSON et al., 2022; PARZYCH; KLIONSKY, 2014).

Figura 3 – Morte celular por macroautofagia. A partir de um sinal, a célula inicia a degradação de componentes e organelas para reciclar nutrientes. O complexo ULK ativa a formação do complexo PI3KC3-C1 que, juntos, facilitam o alongamento do autofagossomo. A família de proteínas ATG ativa LC3 e gera suas formas ativas, LC3-I e LC3-II, que compõe as membranas interna e externas no autofagossomo. O autofagossomo se funde a um lisossomo através da ligação das proteínas UVRAG e recrutamento de Rab7 e Rab9. Finalmente, o autolisossomo procede a degradação do material através de hidrolases e proteases.



Fonte: Gillson et al., 2022.

A interação entre apoptose e autofagia ainda não é bem compreendida por ser um mecanismo complexo de regulação, envolvendo diversas moléculas relacionadas à sinalização. Sabe-se a interação entre Beclin-1 e BCL-2 é capaz de regular os mecanismos de apoptose e autofagia. As proteínas da família BCL-2 regulam de forma intrincada ambos os mecanismos de apoptose, obedecendo aos sinais do supressor tumoral p53. A Bcl-2 normalmente atua inibindo a apoptose ao se ligar aos domínios BH3 de proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK para proteger as mitocôndrias. Beclin-1 também contém esse domínio e é regulada negativamente por BCL-2, o que leva à inibição da

autofagia iniciada por Beclin-1. Assim, a apoptose aumenta, já que BCL-2 não está se ligando as proteínas pró-apoptóticas. Beclin-1 pode ser dissociada de BCL-2 via (1) JNK1; (2) outros membros da família BCL-2 (BNIP3, Bad, Noxa, Puma, etc); e (3) proteínas que promovem a autofagia (UVRAG e ATG14L) (GILLSON et al., 2022; XI et al., 2022). BNIP3, por exemplo, é uma proteína BH3 que pode induzir tanto a autofagia quanto a apoptose. Também foi reportado que a ausência das proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK leva a um aumento na autofagia (MAIURI et al., 2007).

Outro mecanismo pelo qual ambas as vias se relacionam é a degradação de uma das subunidades da caspase-8 no autofagossomo. Isso faz com que a disponibilidade de caspase-8 seja diminuída e a apoptose, portanto, inibida. Ao testar a inibição da autofagia, relatou-se que a disponibilidade e atividade de caspase-8 aumentaram no citoplasma (HOU et al., 2010). As caspases podem ainda agir clivando Beclin-1 e estimulando a apoptose em células normais e tumorais (WIRAWAN et al., 2010; ZHU et al., 2010). Outro exemplo é ATG5, que normalmente induz a autofagia, mas pode sofrer clivagem da protease calpaína e perder sua ação, tornando-se uma molécula pró-apoptótica, ou ainda interagir com FADD e caspase-8, promovendo a apoptose (PYO et al., 2005; YOUSEFI et al., 2006). Durante a apoptose, Ambra1 também pode ser clivada por caspases, o que diminui a capacidade da célula de promover autofagia e favorece a apoptose (PAGLIARINI et al., 2012).

Especificamente, no caso de tumores, que apenas proliferam devido à incapacidade da célula de induzir a morte celular, a regulação entre apoptose e autofagia é complexa. A inibição da apoptose é um marco no desenvolvimento tumoral. Nem todas as células malignas inibem a apoptose - existe uma perda substancial de células tumorais, o que pode contribuir com a instabilidade genômica e criação de clones resistentes. Sabe-se que a apoptose em excesso também contribui para um prognóstico ruim (FENG et al., 2017; MORANA; WOOD; GREGORY, 2022; XI et al., 2022).

A autofagia é inibida em estágios iniciais de desenvolvimento do tumor, mas é essencial para a sua manutenção quando já estabelecido (XI et al., 2022). É importante ressaltar que quando a autofagia está inibida, corpos apoptóticos não são removidos e podem induzir mutações, contribuindo com um *feedback* negativo na apoptose e ativando vias anti-apoptóticas (PAGLIARINI et al., 2012).

3.5. Vias de morte celular estimuladas pelas lectinas

As lectinas inibem a proliferação tumoral principalmente através de apoptose e autofagia, não sendo incomum que estimulem mais de uma via de ação ao mesmo tempo (BHUTIA et al., 2019; MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020). A atividade antiproliferativa das lectinas se dá por mecanismos complexos e ainda a serem elucidados em sua totalidade. Mecanismos menos comuns podem estar associadas ao tratamento com lectinas, como a inativação ribossômica seguida de apoptose reportada para a ricina, abrina e a lectina de visco (VCA) (LIU et al., 2010; POIROUX et al., 2017; SATO et al., 2016) e regulação por microRNAs (miRNAs) (LUAN et al., 2017; OUYANG et al., 2014). Alguns exemplos de lectinas já bem caracterizadas quanto ao mecanismo de morte celular encontram-se na Tabela 1.

A atividade citotóxica de lectinas em células de câncer de pâncreas ainda não foi completamente explorada. O único relato inclui duas lectinas de plantas, demonstraram atividade antiproliferativa em células CFPAC-1, Panc-1 e MIAPaca-2: as lectinas de *Benincasa hispida* (BhL) e *Datura innoxia* (DiL9), que reconhecem especificamente GlcNAc. Sua atividade ocorreu ao estimular a via apoptótica através da ativação da caspase-9 dependente da via mitocondrial (SINGH et al., 2016). A seguir, será relatada a atividade de lectinas com afinidade à manose e galactose, objetos deste estudo, em diferentes linhagens celulares.

Diversas lectinas de plantas que se ligam à manose ativam as vias de apoptose e autofagia, sendo possível a mesma lectina ativar diferentes mecanismos em diferentes cânceres. É o caso da lectina de *Polygonatum odoratum* (POL) ativa tanto apoptose quanto autofagia em células de câncer de mama e pulmão - a apoptose através da via mitocondrial e da inibição da via Ras-Raf-MEK-ERK mediada por EGFR. Em células de câncer de pulmão, duas moléculas de micro-RNA (miR) tem papel fundamental: miR-15a-3p regula a geração de ROS, induzindo apoptose e autofagia, enquanto miR-1290 regula a via Wnt/ β -catenina (WU et al., 2016). Entretanto, em cultivo celular de melanoma, POL apenas induziu autofagia mediada por Beclin-1 (LUAN et al., 2017; OUYANG et al., 2014).

A lectina Riproximina (Rpx), isolada da planta *Ximenia americana*, tem afinidade com N-glicanos complexos bi e tri-antenários, assim como unidades repetitivas de

GalNAc, e inicia sua atuação ao inibir a atividade ribossomal. Sua atividade antiproliferativa contra a linhagem pancreática ASML culmina ao estimular a apoptose através de modesta ativação das caspases 3, 8 e 9 (MURTAJA et al., 2018).

A lectina de banana (Banlec) também apresenta atividade antitumoral. Essa lectina é parte da família das jacalinas (JRL) e reconhece os glicanos aberrantes de *high mannose* (MEAGHER et al., 2005; SINGH et al., 2005). Sua atividade antiproliferativa foi extensivamente revisada em diversos tipos de câncer, como hepatocarcinoma (HepG2), câncer de mama (MCF-7), câncer cervical (HeLa), cólon (HT-29) e leucemia (K562, L1210) (SINGH; DEVI; NG, 2014; SRINIVAS; SHIVAMADHU; JAYARAMA, 2021). Infelizmente, a potente resposta mitogênica das células T dificulta a sua utilização terapêutica.

Para evitar esta característica indesejada e prejudicial aos seres humanos e animais, foi desenvolvida uma variação da Banlec denominada H84T-BanLec, trocando-se a treonina da posição 84 por uma histidina. Esse mutante mantém sua atividade, porém não são observados os efeitos mitogênicos *in vivo* e, conseqüentemente, a resposta imune é bastante reduzida (COVÉS-DATSON et al., 2019, 2020; SWANSON et al., 2015). O desacoplamento representa a exclusão de um grande obstáculo à aplicação de lectinas em estratégias terapêuticas. A atividade antitumoral também foi preservada: a H84T-Banlec é capaz de induzir a autofagia em células de câncer de pulmão (CHAN et al., 2024).

Tabela 1. Mecanismo de morte celular induzido por diversas lectinas em células tumorais.

Lectina	Ligação	Proteínas ativadas	Via de ativação	Células	Referência
<i>Polygonatum odoratum</i> (POL)	Manose	MOMP e da inibição da via Ras-Raf-MEK-ERK, mediada por EGFR	Apoptose	Câncer de mama e pulmão	OUYANG et al., 2014
		Beclin-1	Autofagia	Melanoma	LUAN et al., 2017
<i>Polygonatum cyrtonema</i> (PCL)	Manose	Beclin, LC3B II, p38, p53 e clivagem das Caspases 3 e 9	Aumento de ROS e supressão da atividade antioxidante	Fibrossarcoma murino, melanoma e câncer de pulmão	LIU et al., 2009, 2016; LIU; WANG; XU, 2010

				, apoptose e autofagia		
Concanavalina A (ConA)	Manose	ATG3, 12 e 16	Apoptose e autofagia mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS).	Glioblastoma	PRATT; ROY; ANNABI, 2012	
		Conversão de LC3B-I em LC3B-II	Autofagia sem aumento de beclin-1	Hepatocarcinoma	CHANG et al., 2007	
ConA e <i>Sophora flavescens</i> (SFL)		Caspases 3 e 9 e aumento de Bax e Bid	Apoptose	Câncer de mama	SHI et al., 2014	
<i>Arisema heterophyllum</i> Blume (AHA)	Manose	Caspases 3 e 9 Bax, ATG7 e LC3B-II	Apoptose e autofagia	Câncer de pulmão	FENG et al., 2016	
Artocarpin	Manose		Apoptose mediada por ROS e ativação da via da p53 e akt	Câncer de pulmão	TSAI et al., 2017	
<i>Dioclea lasiocarpa</i> (DLasiL)	Manose	Caspase 9	Apoptose	Câncer de ovário	GONDIM et al., 2017	
<i>Sclerotium rolfsii</i> (SRL)	Galactose	Caspases 8 e 9	Apoptose extrínseca e intrínseca	Câncer de mama, ovário e cólon	ELIGAR et al., 2012; 933 INAMDAR et al., 2012; SAVANUR et al., 2014	
<i>Boletus edulis</i> (BEL)	Galactose	Bax, PARP, Caspase-8, Bcl-2 e Bid	Apoptose	Câncer de pulmão	ZHANG et al., 2021	
<i>Benincasa hispida</i> (BhL) e <i>Datura innoxia</i> (DiL9)	Glicose	Caspase-9	Apoptose intrínseca	Câncer de pâncreas (CFPAC-1, panc-1 e miapaca-2)	SINGH et al., 2016	
Riproximina (Rpx) (<i>Ximenia americana</i>)	N-glicanos complexos bi e tri-antênários e GalNAc	Caspases 3, 8 e 9 (modesta ativação)	Inibe a atividade ribossomal e estimula a apoptose	Câncer de pâncreas (ASML)	MURTAJA et al., 2018	

Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

A lectina PCL (*Polygonatum cyrtonema*) também induz tanto apoptose quanto autofagia em células de fibrossarcoma murino, melanoma e câncer de pulmão. Isso ocorre através do aumento de ROS e supressão da atividade antioxidante, assim como aumento de Beclin, LC3B II, p38, p53 e clivagem das caspases 3 e 9 (LIU et al., 2009, 2016; LIU; WANG; XU, 2010).

A lectina Concanavalina A (ConA) induz apoptose e autofagia mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumento dos níveis de proteínas autofágicas ATG3, 12 e 16 em cultivo de glioblastoma. Entretanto, induz a apoptose em células de câncer de mama pela ativação das caspases 3 e 9 e aumento de Bax e Bid, sendo o mesmo resultado encontrado para a lectina de *Sophora flavescens*. Em contraste, ao avaliar células de hepatocarcinoma tratadas com ConA, foi induzida a conversão de LC3B-I em LC3B-II – indicativo de autofagia – porém, sem aumento de Beclin-1, indicando uma possível via autofágica alternativa (CHANG et al., 2007; PRATT; ROY; ANNABI, 2012; SHI et al., 2014).

Outras lectinas ligadoras de manose que foram avaliadas por *Western Blotting* incluem a lectina de *Arisema heterophyllum Blume*, que atua clivando as caspases 3 e 9 e aumentando os níveis de Bax, ATG7 e LC3B-II em células de câncer de pulmão (FENG et al., 2016); a lectina Artocarpin, que estimula a apoptose mediada por ROS e ativação da via da p53 e AKT (TSAI et al., 2017); e a lectina de *Dioclea lasiocarpa*, responsável pelo efeito apoptótico mediado pela clivagem da caspase 9 (GONDIM et al., 2017).

Lectinas de plantas com afinidade a galactose exercem sua atividade antiproliferativa pela interação com os O-glicanos, especialmente aqueles constituídos de galactose ou GalNAc. Alguns exemplos destas lectinas que não apresentam toxicidade incluem: BFL (*Bauhinia forficata*) (DA SILVA PINTO et al., 2019), BVL (*Bauhinia variegata*) (REIS et al., 2014), BUL (*Bauhinia unguolata*) (SILVA et al., 2014), PLUN (*Phaseolus lunatus*) (LACERDA et al., 2017). A lectina AEL exerceu seu efeito antiproliferativo em células de câncer de mama majoritariamente através de apoptose, aumentando a expressão das caspases 3, 9 e do gene p21 (MONTE et al., 2014).

Lectinas de fungos com afinidade à galactose estimulam mecanismos similares. A lectina SRL (*Sclerotium rolfsii*), embora apresente afinidade a GalNAc e GlcNAc, demonstrou ativar as vias de apoptose extrínseca e intrínseca pela ativação das

caspases 8 e 9, respectivamente, em células de câncer de mama, ovário e cólon (ELIGAR et al., 2012; INAMDAR et al., 2012; SAVANUR et al., 2014). A lectina BEL, ligadora de antígeno T do cogumelo *Boletus edulis*, inibiu o crescimento de células de câncer de pulmão por apoptose mediada pela regulação positiva de Bax e regulação negativa de PARP, Caspase-8, Bcl-2 e Bid (ZHANG et al., 2021).

A lectina de *Xerocomus criserteron* (XCL) é uma lectina de 140 aminoácidos específica para GalNAc e parte de uma nova família de lectinas similar às actinoporinas (BIRCK et al., 2004; DAMIAN et al., 2005). Sua interação com células tumorais se dá principalmente pela afinidade aos antígenos T e Tn, e, após internalizada, induz eventos que acarretam no desligamento da célula tumoral do suporte e na perda das interações célula-célula (DAMIAN et al., 2005; MARTY-DETRAVES et al., 2004). A principal característica da XCL reside no fato de não desencadear eventos mitogênicos ou toxicidade para células normais. O pequeno tamanho, a falta de atividade mitogênica e a ligação ao O-glicano modificado são características desejadas a serem implementadas em conjunto com novas tecnologias terapêuticas, incluindo aquelas que visam a atividade antiproliferativa (DAMIAN et al., 2005).

A diversa gama de ações das lectinas dependem do tipo de câncer e sua afinidade – fica claro que a mesma lectina pode induzir diferentes vias de morte celular em diferentes cânceres, o que também depende das características específicas do tipo de tumor. A complexidade da ação das lectinas demonstra a necessidade de extensa caracterização dos mecanismos de morte celular para a compreensão de sua atividade antiproliferativa em sua totalidade.

3.6. Engenharia de lectinas

A fim de explorar de maneira mais eficaz o potencial natural de moléculas identificadas previamente, visando uma atividade antiproliferativa aprimorada para diversos tipos de câncer, utilização de concentrações reduzidas e diminuição da resposta mitogênica, uma estratégia inovadora no campo da lectinologia é a combinação de lectinas com diferentes especificidades, construindo quimeras ou lectinas ciborgues (YAMAMOTO; KONAMI; OSAWA, 2000).

Esse tipo de estudo foi realizado anteriormente com a inserção de um nonapeptídeo da lectina de *Lens culinaris* na sequência de lectina de *Bauhinia purpurea*, tornando a proteína quimérica biespecífica para manose e galactose, ao contrário da proteína selvagem, específica apenas para galactose (YAMAMOTO et al., 1992; YAMAMOTO; KONAMI; OSAWA, 2000). Recentes avanços na engenharia de lectinas lançam luz sobre modificações modulares e mutações pontuais em sítios ativos, mas nenhum implementou especificidade dupla para uso terapêutico direcionado a glicanos complexos (LUDWIG et al., 2019).

A ocorrência de lectinas biespecífica na natureza não é comum; geralmente, o sítio ativo das lectinas pode acomodar carboidratos de configuração similar, mas é altamente específico e possui maior afinidade pela ligação à glicanos complexos (artigo estrutura banana, estruturas lectinas). Uma exceção é o cogumelo *Boletopsis grisea*, em que dois sítios separados apresentam especificidade para galactose e glicose, embora sua atividade antiproliferativa não tenha sido testada (GANATRA et al., 2021).

Uma lectina quimérica específica para fucose e ácido siálico foi construída recentemente utilizando a lectina de *Ralstonia solanacearum* e a sialidase NanI de *Clostridium perfringens*. Esta quimera foi testada quanto ao reconhecimento da hipersialização apresentada por células tumorais, entretanto, a lectina em si não foi avaliada por seu potencial antitumoral, mas como um mecanismo de entrega de medicamentos antitumorais (SIUKSTAITE et al., 2021).

Uma nova lectina denominada Lectina Tipo-Balec (BTL), engenheirada a partir de análises *in silico* das sequências de nove outras lectinas relacionadas à família JRL foi construída. A BTL manteve sua atividade antiproliferativa contra linhagem de melanoma, demonstrando que o sítio de ligação a carboidrato e sua atividade de inibição do crescimento tumoral foram preservados (DE CAMARGO et al., 2024).

A união de lectinas a importantes efetores do sistema imune também tem sido bastante estudada. Uma construção que tem como alvos os glicanos de *high mannose* são os *lectibodies*, que consistem em parte anticorpo e parte lectina. Especificamente, as lectinas se encontram na porção Fab, enquanto a porção Fc é mantida. Resultados promissores foram observados ao se utilizar o *lectibody* da lectina Avaren (AvFc) em câncer de pulmão NSCLC, em que se observou a ligação de AvFc a diversas

glicoproteínas da matriz extracelular, como EGFR e o receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina (IGF1R) (OH et al., 2022).

Outro *lectibody* foi desenvolvido recentemente, incorporando um fragmento de anticorpo anti-CD3 à subunidade B da toxina Shiga. Este foi capaz de recrutar linfócitos citotóxicos e reconhecer o marcador de desenvolvimento maligno Gb3 nas células tumorais, redirecionando a citotoxicidade das células T de maneira altamente seletiva e levando à lise quase completa das células tumorais (ROSATO et al., 2022)

O desenvolvimento de CAR T *cells* modificados contendo uma lectina de banana ancorada a um receptor de antígeno quimérico (CAR), expresso em células T, também demonstrou resultados promissores. O CAR T *cell* da Banlec mutante foi capaz de reconhecer seletivamente e se ligar especificamente à *high mannose* de diversas linhagens de câncer de pâncreas, assim como romper a arquitetura das células do estroma em cultivo 3D, outro empecilho apresentado pelos tumores sólidos. Além disso, foram efetivas também nos estudos *in vivo*, penetrando especificamente no tumor. Por fim, não apresentaram toxicidade para células saudáveis (MCKENNA et al., 2023)

O potencial das lectinas como moléculas de amplo reconhecimento fica claro a partir destes estudos, uma vez que interagem com uma gama de glicanos modificados expostos na superfície tumoral e induzem a morte celular. Como alvos, estes glicanos aberrantes permitem desenvolver uma abordagem terapêutica de amplo espectro, já que não sofrem interferência direta de mutações, como é o caso dos receptores de membrana alvo dos quimioterápicos mais comumente utilizados.

3.7. Estratégias de bioinformática

Estrutura tridimensional e modelagem molecular

A estrutura tridimensional (3D) que uma proteína assume está intimamente ligada à sua função, como reportado pelos estudos de Anfinsen com a ribonuclease A (ANFINSSEN, 1973). Encontrar a conformação 3D de uma proteína pode revelar insights preciosos sobre a interação com ligantes, co-fatores, cargas, regiões flexíveis ou rígidas, estrutura secundária e organização quaternária. Além disso, é possível utilizar a estrutura 3D em diversas outras análises, como *docking* e dinâmica molecular. Estima-se que

existam em torno de 1700 e 3000 conformações possíveis - esse número limitado de conformações que uma molécula pode adotar na natureza foi a estratégia utilizada por *softwares* de bioinformática para realizar a predição estrutural (LIU; LV; GUO, 2011; SCHAEFFER; DAGGETT, 2011).

Para a predição de estrutura, geralmente empregam-se três estratégias principais: a modelagem baseada em *template*, modelagem baseada em aprendizado de máquina e a modelagem *ab initio*. Destas estratégias, as mais comumente utilizadas são as duas primeiras, que são compostas por diferentes métodos. A modelagem baseada em *template* pode ser realizada através de homologia de sequência ou *threading*. A modelagem por homologia utiliza a similaridade entre as sequências de aminoácidos a partir de 40% ou mais de resíduos idênticos em um alinhamento de qualidade. Partindo deste alinhamento, é possível encontrar o homólogo mais próximo que apresente uma sequência resolvida experimentalmente, e a modelagem é realizada a partir desta estrutura. Esse método auxilia na obtenção de um modelo estrutural quase completo e de qualidade boa o suficiente para interpretar a função da proteína, demandando pouco tempo para obter o resultado. Quanto maior a similaridade entre essas sequências, mais preciso é o modelo, sendo uma estratégia seja muito vantajosa para esses casos (PAIVA et al., 2022).

Em situações em que não há um homólogo próximo, a modelagem por homologia pode não ser a melhor opção, já que estruturas não representativas podem ser modeladas devido à erros no empacotamento da cadeia lateral, no alinhamento, distorções de uma região que não possui equivalente e estrutura mal dobrada resultante de o modelo ser incorreto (FISER, 2010). Nestes casos, a modelagem por *threading* se torna uma ótima alternativa. Este tipo de modelagem baseia-se na busca por uma estrutura similar à pequenos pedaços da sequência, ao invés de utilizar a sequência completa. Isso faz com que haja maior precisão na modelagem destes pequenos fragmentos e posterior união em uma estrutura *decoy*, que passa por diversos passos de filtragem e refinamento até a estrutura final (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010).

Com os avanços recentes da inteligência artificial mais precisão tem sido alcançada na modelagem 3D através do uso de algoritmos de aprendizado máquina supervisionado e não supervisionado, constituindo um terceiro tipo de modelagem que

surgiu recentemente. Um grande salto ocorreu na predição de proteínas com o desenvolvimento do *software* AlphaFold. Na primeira avaliação CASP, o AlphaFold apresentou um *score* GDT próximo de 60. O *score* GDT é calculado como uma medida em porcentagem de similaridade entre proteínas modeladas, sendo considerada mais precisa que o RMSD por considerar os carbonos α e ser menos sensível às alterações locais (OLECHNOVIC et al., 2019). Este *score* GDT estava próximo dos valores apresentados por outros *softwares* na época, que compara a posição dos da estrutura da proteína com a estrutura determinada experimentalmente (JUMPER et al., 2021). Em seu segundo ano de avaliação, após modificações nos algoritmos de predição, o AlphaFold2 atingiu uma acurácia similar à obtida em estruturas experimentais, revolucionando o campo da bioinformática estrutural ao demonstrar um *score* GDT de 92,4 (JUMPER et al., 2021). Atualmente, o AlphaFold3 está pode ser acessado gratuitamente, porém, seu código não está disponível (ABRAMSON et al., 2024).

A entrada para o AlphaFold é a sequência de aminoácidos da proteína alvo. Essa sequência é submetida a um alinhamento múltiplo de sequências (MSA) em diversos bancos de dados, o que serve de entrada primária ao *software*. Ao identificar sequências similares e conservadas, encontrando correlação evolutiva entre aminoácidos, é possível compreender quais aminoácidos sofrem mutação e como resíduos próximos se comportam diante dessa mudança (coevolução). Em seguida, inicia-se a representação de pares, em que o *software* busca por dados estruturais e identifica como os aminoácidos interagem entre si, também inferindo se outros aminoácidos na sequência estão próximos. Ambos os resultados do MSA e a representação de pares são usados para continuamente alimentar o Evoformer, que os refina ao utilizar o MSA para verificar a relação entre as colunas e linhas com a representação por pares (avalia a conservação dos resíduos em relação aos pares de resíduos próximos). Para isso, o Evoformer utiliza o mecanismo de atenção, identificando as partes que devem ser priorizadas. Com este novo MSA atualizado, a primeira representação 3D do modelo é gerada através da triangulação com a representação de pares atualizada, e leva em conta a distância e ângulo dos aminoácidos também através de um mecanismo de atenção. Estes resíduos são colocados no espaço 3D utilizando grafos e prevendo a rotação e translação, assim obtendo a estrutura inicial do *backbone*. Esta etapa realiza apenas 10 iterações da estrutura. Por fim, o AlphaFold gera uma métrica de confiança para cada resíduo predito,

o pLDDT (*predicted Local Distance Difference Test*), que indica a precisão esperada da predição. No geral, espera-se que valores mais altos de pLDDT indiquem maior confiança na predição da estrutura local (JUMPER et al., 2021).

O mecanismo por trás da eficácia do AlphaFold reside na utilização de dois *transformers* que utilizam o mecanismo de atenção que constituem o Evoformer, que conta com 48 camadas de redes neurais. Outro mecanismo de atenção é utilizado para testar triangulações e obter as primeiras representações 3D do polipeptídeo. Brevemente, o modelo foca em partes específicas da entrada enquanto processa cada elemento da sequência. Para entender a ordem dos elementos na sequência, são utilizadas codificações posicionais e em seguida os dados são processados por redes neurais comuns a fim de extrair características adicionais (BOUATTA; SORGER; ALQURAIISHI, 2021). O algoritmo foi treinado utilizando todas as entradas disponíveis no banco de dados de estruturas resolvidas RCSB PDB, que é a base de sua acurácia e hoje é considerado o padrão ouro na predição de complexos proteicos (JUMPER et al., 2021). Como o AlphaFold2 não era acessível em um primeiro momento, seu código foi simplificado e disponibilizado através do Google Colab com algumas modificações, sendo criado o ColabFold (MIRDITA et al., 2022).

Antes de utilizar um modelo predito é necessário validar suas características e conformação (ADIYAMAN; MCGUFFIN, 2019). Diversos *softwares* avaliam métricas globais e locais de qualidade da estrutura, como posicionamento dos aminoácidos, flexibilidade (*B-factor*) e um score de qualidade global e local. O gráfico de Ramachandran é outra análise imprescindível, pois demonstra o posicionamento permitido dos átomos em relação aos ângulos Phi (ϕ) e Psi (Ψ). Existe um número limitado de rotações disponíveis permitidas aos aminoácidos nos ângulos ϕ (N-C α) e Ψ (C α -C'), sendo essencial analisar qual porcentagem dos aminoácidos de uma proteína estão em regiões permitidas. Usualmente, esse número deve ser de no mínimo 90% (LASKOWSKI et al., 1993; RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963).

***Docking* molecular**

A obtenção de um modelo 3D é apenas o primeiro passo para análises bioinformáticas mais sofisticadas. O *docking* molecular encontra a conformação mais

estável entre duas moléculas, sejam elas pequenos ligantes ou complexos proteicos, e fornece sua energia de interação em kcal/mol (PAIVA; GOMES; NAPOLEÃO, 2010). Isso auxilia na descoberta de drogas, *virtual screening*, estudo de inibidores, mutagênese, formação de complexos macromoleculares e outros (KONTOYIANNI, 2017; MENG et al., 2011).

Realizar um *docking* molecular passa por duas etapas essenciais: o algoritmo de busca e o algoritmo de ranqueamento (*scoring*). O primeiro testa as conformações possíveis no sítio de ligação, considerando a flexibilidade e impedimentos estéricos do ligante; já o segundo prediz a força de interação entre as moléculas. O procedimento de amostragem realizado pelo algoritmo de busca explora o espaço de poses possíveis buscando a melhor avaliação da função de pontuação. A função de pontuação avalia uma pose de ligação proposta para o composto e estima a energia de ligação, partindo do pressuposto de que essa pose é válida (PAGGI; PANDIT; DROR, 2024).

O Autodock Vina é um dos programas mais utilizados para o *docking* proteína-ligante. O algoritmo de busca utiliza o método de busca estocástico, realizando uma busca local iterada. Isso significa que o algoritmo combina mutações (modificações aleatórias na conformação do ligante) com otimizações locais, visando localizar a mínimo global da função de pontuação. Cada etapa da busca é aprovada ou descartada de acordo com o critério de Metropolis, uma técnica frequentemente usada em métodos de Monte Carlo que determina se um estado menos favorável pode ser aceito com base na temperatura do sistema (PAGGI; PANDIT; DROR, 2024; TROTT; OLSON, 2010).

O algoritmo de pontuação emprega uma função semiempírica, ou seja, combina elementos de uma função de força com termos empíricos para modelar as interações entre o ligante e o receptor. Cada conformação gerada durante a amostragem é avaliada pela função de pontuação e a energia livre de ligação é estimada, o que indica a probabilidade de essa conformação ser estável e biologicamente relevante. Cada termo na função de pontuação tem um peso que indica sua importância na determinação da afinidade de ligação, pois nem todas as interações podem ser relevantes em cada contexto. Estes pesos são definidos com base em dados experimentais de afinidade de ligação e os resultados são comparados ao *docking*. Os termos utilizados pelo Vina incluem:

- As interações de Van der Waals, que descreve as forças de atração e repulsão entre átomos que não estão ligados por ligações covalentes e modelam a compatibilidade espacial entre o ligante e o receptor;

- As interações eletrostáticas, que indicam a atração ou repulsão entre cargas elétricas no ligante e no receptor e é crucial para a orientação correta do ligante na cavidade de ligação;

- O termo de desolvatação estima o custo energético de remover moléculas de água ao redor do ligante e do receptor durante a ligação.

- O termo de penalidade por torção, que leva em consideração a flexibilidade do ligante, o que pode influenciar sua energia livre de ligação (LI; FU; ZHANG, 2019).

O algoritmo de otimização no AutoDock Vina ajusta as conformações do ligante de forma que a função de pontuação seja minimizada e corresponda ao estado mais estável e, portanto, mais provável de ocorrer. É utilizada a abordagem de Busca Local Iterada, que combina mutações (alterações aleatórias na conformação do ligante) com otimizações locais, a fim de encontrar a mínima global da função de pontuação. Cada passo da busca é aceito ou rejeitado com base no critério de Metropolis. Por fim, as conformações com as pontuações mais baixas, que indicam interações mais favoráveis, são selecionadas para otimização adicional e refinamento. O Vina utiliza o método Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) para a otimização local, que incorpora os valores da função de pontuação e seu gradiente para acelerar a convergência para um mínimo local (TROTT; OLSON, 2010).

A avaliação de um *docking* inclui o desvio quadrático médio (RMSD) entre as posições dos átomos obtidos experimentalmente (disponíveis em bancos de dados como PDB ou realizados através de *redocking*, *i.e.*, *docking* com o mesmo do ligante da estrutura resolvida, serve como um controle do método) em comparação àquelas previstas pelo programa. A diferença entre as poses que apresentem um RMSD <2 Å indicam um bom resultado. Nesse sentido, quanto menor o RMSD, menor a distância entre os átomos, e, por isso, mais próximos do observado experimentalmente. Também deve-se avaliar se os doadores/aceptores de hidrogênio estão satisfeitos, se os grupos

carregados no ligante estão interagindo com cadeias laterais de carga oposta no receptor e se o ligante está posicionado corretamente no sítio ativo (MORRIS; LIM-WILBY, 2008).

Uma modificação do *software* Autodock Vina é o Vina-Carb, específico para carboidratos. Essa implementação ocorreu ao adicionar duas funções de energia (energia CHI) para computar as contribuições energéticas das torções glicosídicas ω dos açúcares, de forma a não interferir na afinidade de ligação (NIVEDHA et al., 2016). Assim, é possível não apenas realizar o *docking* com pequenos ligantes de proteína, mas também carboidratos.

O *docking* proteína-proteína segue a mesma lógica do *docking* proteína-ligante, sendo a principal diferença o tamanho da interface. As superfícies de contato onde duas proteínas interagem são significativamente diferentes e as interfaces são relativamente planas, aliado ao dinamismo das proteínas, que interagem ao converter constantemente estados ativos e inativos. O grande número de graus de liberdade eleva consideravelmente o custo computacional dos algoritmos de busca para o *docking* proteína-proteína (STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021).

O *webserver* ClusPro utiliza o método de *docking* rígido. A estrutura tridimensional serve como *input* para este *software*, que utiliza o algoritmo PIPER e a abordagem *Fast Fourier Transform* (FFT) para gerar mais de um bilhão de conformações possíveis. Uma das moléculas é mantida em uma grade rígida, enquanto a outra é móvel e sua energia de interação é calculada rapidamente pela FFT, que considera também funções de pontuação que inclui termos de energia complexos, como interações eletrostáticas e dessolvatação. As mil poses de menor energia são selecionadas para processamento. A pontuação do algoritmo PIPER leva em conta as contribuições repulsivas e atrativas para a energia de interação de van der Waals e a energia eletrostática, então o servidor gera quatro tipos de pontuação ao alternar estes termos: (1) balanceado, (2) eletrostático favorecido, (3) hidrofóbico favorecido e (4) van der Waals + eletrostático (KOZAKOV et al., 2017).

A segunda etapa ocorre através da seleção de clusters com maior quantidade de membros das estruturas de baixa energia. É calculado o valor RMSD da interface de *docking* entre as 1000 estruturas, encontrando aquelas com maior número de vizinhos dentro do raio de 9 Å, sendo esta o centro do primeiro cluster. Em seguida, a energia é

minimizada por 300 passos e *backbone* fixo utilizando o campo de força Charmm. Embora uma pontuação de energia seja disponibilizada, a métrica mais relevante é a estrutura central do cluster e o tamanho do mesmo (KOZAKOV et al., 2017).

Dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular (MD) são ferramentas valiosas que permitem obter dados sobre a movimentação de uma macromolécula em solução por um período relevante biologicamente (de pico a nanosegundos). Atualmente, é o método mais acurado de visualização e obtenção de informações sobre o comportamento de uma molécula em solução. As estruturas resolvidas, os modelos preditos e o *docking* fornecem uma visão estática das estruturas; já as simulações de MD possibilitam observar sua movimentação, que é inerente à todas proteínas e átomos, a partir da física que rege as interações atômicas (BADAR et al., 2022). Alguns processos que podem ser analisados durante a MD incluem mudanças conformacionais, interação com ligantes e dobramento de proteínas, previsão da resposta a mutações, fosforilação, protonação, adição ou remoção de um ligante e formação de ligações de hidrogênio (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018).

A simulação de MD calcula a força exercida em um átomo por todos os outros átomos usando as equações de movimento da mecânica clássica para prever a posição espacial de cada átomo em função do tempo. São levadas em conta na equação 1: o alongamento da ligação ($E_{Stretch}$), a energia de deformação dos ângulos (E_{Bend}), a torção das ligações covalentes ($E_{Torsion}$), cargas parciais de Coulomb ($E_{Electrostatic}$), forças interatômicas de van der Waals ($E_{Van\ der\ Walls}$) e pontes de hidrogênio ($E_{Hydrogen\ Bond}$). Esses valores estão definidos no campo de força e são as funções energéticas determinam a energia associada à interação entre os átomos (BADAR et al., 2022).

$$E_{total} = E_{stretch} + E_{bend} + E_{torsion} + E_{electrostatic} + E_{van\ der\ Walls} + E_{hydrogen\ bond} \quad (1)$$

Como se calcula repetidamente essa força, o resultado é a trajetória dos átomos, ou seja, a configuração em nível atômico do sistema em cada ponto durante o intervalo de tempo simulado. Geralmente, a duração de uma simulação de MD envolve milhões ou bilhões de *timesteps* que duram apenas poucos femtosegundos (10–15 s), enquanto as alterações biológicas de relevância ocorrem em escalas de tempo de nano a

microssegundos. Isto explica por que simulações de MD demandam grande poder computacional (MONTICELLI; TIELEMAN, 2013).

O algoritmo de simulação de MD, especificamente, utiliza um mecanismo de integração através das leis de movimento de Newton. Esse algoritmo integra essas forças primeiro dividindo-a em etapas menores, de modo que a força total de uma determinada partícula é calculada em uma escala de tempo como a soma de sua interação e outras partículas. Algoritmos como *Verlet*, *Velocity-Verlet* e *Leapfrog* são exemplos que aplicam esse mecanismo (BADAR et al., 2022).

Usualmente, a dinâmica molecular consiste de uma etapa preparatória de escolha do modelo, definição da caixa e solvatação do sistema e adição de íons. A minimização de energia é o passo seguinte e garante que não haja impedimentos estéricos ou geometria inadequada. É realizada uma busca pelas conformações de baixa energia e uma das estratégias mais utilizadas é o *Steepest Descent*. O equilíbrio do sistema (geralmente 5000 passos) faz com que os íons e o solvente estejam equilibrados em torno da proteína, a temperatura e pressão são estabilizadas pelo conjunto isotérmico-isobárico onde são mantidas constantes (LEMKUL, 2019).

Diversas lectinas já foram analisadas por dinâmica molecular e *insights* preciosos podem ser obtidos, como a formação de pontes de hidrogênio entre lectina-açúcar, flutuação atômica com e sem ligante, superfície acessível ao solvente, o comportamento da estrutura secundária e estabilidade molecular. As simulações de MD auxiliam na determinação de parâmetros bioquímicos ideais (como pH, por exemplo), na descoberta de mutações que levam a uma maior afinidade ao ligante de interesse e até mesmo a avaliação da interação de complexos macromoleculares, sendo um método de bastante relevância na análise profunda de interações atômicas (CAVADA et al., 2022; DINGJAN et al., 2017; HESSEL et al., 2023; LIMA et al., 2022; NASCIMENTO et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2017; VIEIRA NETO et al., 2019).

De forma a ser pioneiro na área, o objetivo deste estudo é unir duas lectinas completas com diferentes especificidades: a H84T-Banlec - específica para o N-glicano modificado *high mannose* - e a lectina de cogumelo XCL, com afinidade para os antígenos T e Tn, O-glicanos truncados. Para isso, são realizadas análises *in silico* com diversas ferramentas de bioinformáticas, assim como métodos *in vitro* de produção e

caracterização do potencial antiproliferativo. Portanto, espera-se aumentar a atividade antiproliferativa e especificidade das lectinas em conjunto em comparação às suas formas isoladas, e, preferencialmente, diminuindo a concentração necessária para a efetividade.

4 Desenvolvimento

4.1. Análises bioinformáticas

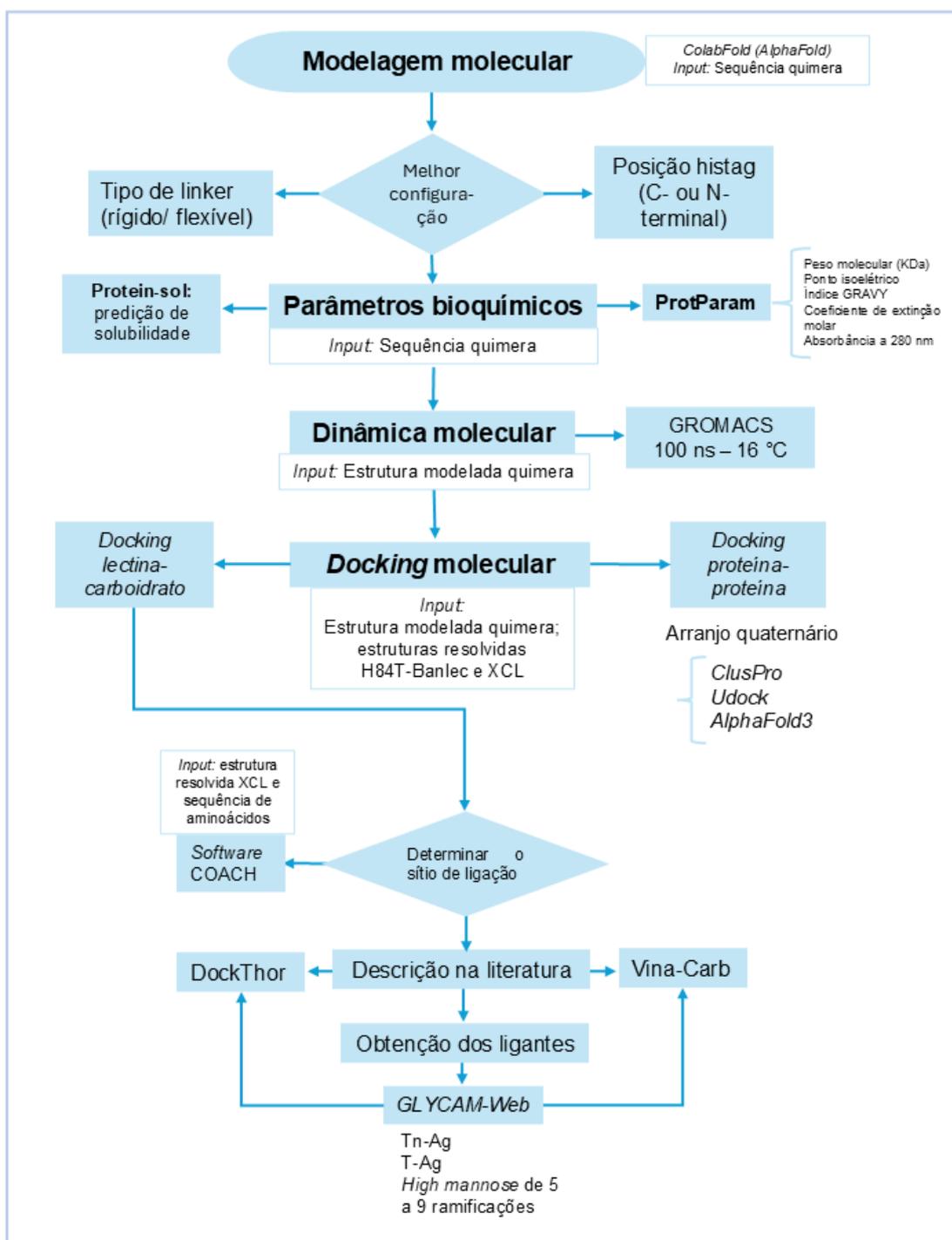
4.1.1. Modelagem molecular, validação dos modelos e parâmetros bioquímicos

Os estudos *in silico* desenvolvidos neste trabalho estão sumarizados na Figura 4. A estrutura da quimera recombinante foi modelada utilizando uma versão simplificada do *software* AlphaFold2 disponível através do ColabFold (MIRDITA et al., 2022). A estrutura foi analisada visualmente através do programa PyMol (versão 2.5.5, Schrodinger LLC).

A validação do modelo se deu através da análise do gráfico de Ramachandran gerado no *software* PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993). A qualidade global e local foi fornecida pelos *softwares* ProSA-Web (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007) e ModFold9 (MCGUFFIN; ALHARBI, 2024)

Os parâmetros bioquímicos foram obtidos através do *software* ProtParam (WILKINS et al., 1999), que fornece informações como o peso molecular, ponto isoelétrico (pI), índice GRAVY, coeficiente de extinção molar e absorvância a 280 nm de 1 mg/ml. A possível solubilidade da quimera foi verificada no *software* Protein-sol (HEBDITCH et al., 2017), que determina que o ponto de corte para uma proteína ser solúvel é de 0,45.

Figura 4 – Fluxograma das análises de bioinformáticas desenvolvidas neste estudo. Diferentes configurações e tipos de linker foram avaliados por modelagem 3D. A estrutura foi gerada no ColabFold. Foi realizado o *docking* proteína-proteína e proteína-carboidrato a partir desta estrutura, assim como a dinâmica molecular. A análise dos parâmetros bioquímicos e dos potenciais sítios de ligação foi realizada a partir da sequência de aminoácidos da quimera.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

4.1.2. Arranjo quaternário

Para avaliar o possível arranjo quaternário, diferentes estratégias foram utilizadas com as três proteínas de interesse, nomeadamente, a quimera, H84T-Banlec (PDB ID: 4PIU) e XCL (PDB ID: 1XI0). A primeira estratégia contou com o *docking* proteína-proteína com o *webserver* ClusPro (KOZAKOV et al., 2017) no modo *multimer*, onde foram avaliados os tamanhos dos *clusters*. A segunda estratégia contou com o uso do AlphaFold3 (ABRAMSON et al., 2024) ao modelar as proteínas em seus arranjos diméricos e comparar com as estruturas resolvidas. Já a terceira estratégia baseou-se no uso do programa UDock (PLATEAU-HOLLEVILLE et al., 2023) com 10 mil passos de otimização. Este programa permite ao usuário manipular as estruturas e formar as interfaces, obtendo a respectiva energia de afinidade.

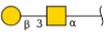
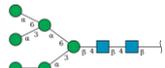
4.1.3. *Docking* lectina-açúcar

A interação entre lectina e carboidrato foi avaliada através dos programas Vina-Carb (*docking* proteína-ligante), específico para o *docking* com carboidratos (NIVEDHA et al., 2016), utilizando 32 *rounds* de *seeding*. O programa DockThor (GUEDES et al., 2021) também foi utilizado. A *grid box* foi preparada no programa Autodock tools (parte integrante do pacote MGLtools (v. 1.5.7), *Molecular Graphics Lab*) nas dimensões que englobassem os sítios de reconhecimento de carboidratos (Tabela I - Apêndices), com espaçamento atômico 0.375. Para a construção da *grid box*, é necessário indicar o CBS. No caso da H84T-Banlec, estes dados foram obtidos da estrutura co-cristalizada com o ligante (PDB ID: 4PIT) (MEAGHER et al., 2005). Já no caso da XCL, em que não há estrutura resolvida com ligante, duas abordagens foram utilizadas: prever o CBS com o *software* COACH (YANG; ROY; ZHANG, 2013a, 2013b) e utilizar os sítios sugeridos pelos autores no artigo da estrutura (BIRCK et al., 2004), a fim de comparar os resultados. As coordenadas utilizadas para os *dockings* com as três proteínas encontra-se na Tabela II - Apêndices.

Os carboidratos utilizados para o *docking* com as proteínas obedeceram às afinidades das respectivas lectinas. As sequências *Glycam* foram obtidas a partir do banco de dados GlyConnect (v1.2.0, Swiss Institute of Bioinformatics - ExPASy) e as estruturas 3D minimizadas foram obtidas através do *software* GLYCAM-Web

(KIRSCHNER et al., 2008). Os ligantes foram utilizados sem os aminoácidos incorporados e sua descrição completa encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2- Ligantes utilizados para o *docking* molecular. Tn-Ag:antígeno Tn; T-Ag: antígeno T; Man(n): high mannose contendo n manoses.

Ligante	Nome	IUPAC	Glycam	GlyConnect	GlyTouCan/ GlyCosmos
	T-Ag	Gal(b1-3)GalNAc	DGalpb1-3DGalNAca1-OH	1947	G00031MO
	Tn-Ag	a-GalNAc	DGalpNAca1-OH	2305	G57321FI
	Man5	Man(a1-3)[Man(a1-6)]Man(a1-6)[Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc	DManpa1-3[DManpa1-3[DManpa1-6]DManpa1-6]DManpb1-4DGlcNAcb1-4DGlcNAcb1-OH	1443	G55220VL
	Man6	Man(a1-3)[Man(a1-6)]Man(a1-6)[Man(a1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc	DManpa1-2DManpa1-3[DManpa1-3[DManpa1-6]DManpa1-6]DManpb1-4DGlcNAcb1-4DGlcNAcb1-OH	2039	G80966KZ
	Man7	Man(a1-2)Man(a1-6)[Man(a1-3)]Man(a1-6)[Man(a1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc	DManpa1-2DManpa1-3[DManpa1-3[DManpa1-2DManpa1-6]DManpa1-6]DManpb1-4DGlcNAcb1-4DGlcNAcb1-OH	654	G83161QT
	Man8	Man(a1-2)Man(a1-3)[Man(a1-2)Man(a1-6)]Man(a1-6)[Man(a1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc	DManpa1-2DManpa1-3[DManpa1-2DManpa1-3[DManpa1-2DManpa1-6]DManpa1-6]DManpb1-4DGlcNAcb1-4DGlcNAcb1-OH	1387	G89864BN

4)GlcNAc

	Man9	Man(a1-2)Man(a1-3)[Man(a1-2)Man(a1-6)]Man(a1-6)[Man(a1-2)Man(a1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc	DManpa1-2DManpa1-2DManpa1-3[DManpa1-2DManpa1-3[DManpa1-2DManpa1-6]DManpa1-6]DManpb1-4DGlcNAcb1-4DGlcNAcb1-OH	2472	G60230HH
	Dimannose	Man(a1-2)a-Man	PDB ID PRD_900111	2440	G53402KW

Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Para a proteína H84T-Banlec, empregou-se a dimanose para o *redocking*. Em seguida, diversas configurações de *high mannose* foram utilizadas entre 5 a 9 manoses. Para o *docking* da proteína XCL, foram utilizados o antígeno Tn (α -GalNAc) e antígeno TF ou T (Gal(β 1-3) GalNAc). O *docking* da lectina quimérica seguiu a mesma lógica, sendo a *grid box* posicionada na porção do CBS de cada uma das porções. As interações químicas foram analisadas a partir do *software* PLIP (ADASME et al., 2021).

4.1.4. Dinâmica molecular

A dinâmica molecular permite simular com acurácia a movimentação atômica de estruturas. Realizamos a simulação com a estrutura 3D da quimera por 100 ns, sem presença de ligante, utilizando a ferramenta GROMACS (versão 2023.3) (<https://www.gromacs.org/>) e campo de força CHARMM36m (JORGENSEN et al., 1983). O sistema foi gerado através do *website* CHARMM-GUI, aplicação *Solution Builder* (JO et al., 2008). Uma caixa retangular (distância das extremidades = 10) foi construída com modelo de água TIP3P. A molécula foi solvatada, sendo 33 íons K^+ e 35 íons Cl^- adicionados na concentração de 0,15 M (pH 7, 16 °C). A minimização ocorreu por 5000 *steps* de 1 fs (5 ps) após definir as condições de contorno periódicas (*periodic boundary conditions*) através do método *Particle Mesh Ewald (PME) FFGGrid*. O equilíbrio foi

realizado em 125 ps com volume e temperatura constantes (NVT) e termostato Noose-hover.

A estabilidade da molécula foi avaliada a partir do cálculo do RMSD (*Root Mean Square Deviation*), RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) e raio de giro, obtidos através do comando *gmx* incorporado ao GROMACS (*gyrate*, *rsm* e *rmsf*) a partir dos arquivos de trajetória. Os gráficos foram gerados através de um *script* em Python utilizando as bibliotecas *plotly*, *pandas*, *numpy* e *os*. Os programas VMD e PyMol foram aplicados para visualizar a trajetória e gerar as figuras.

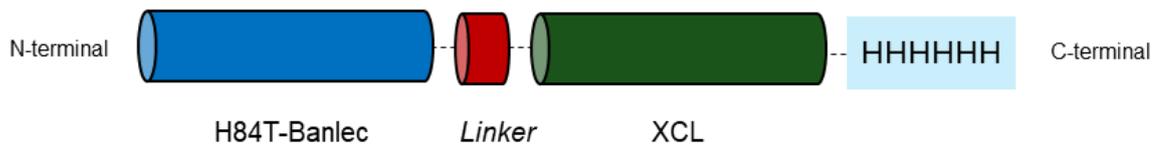
4.2. Obtenção e propagação dos plasmídeos pET-24 quimera e pET-24 XCL

A construção dos modelos revelou que os sítios de ligação a carboidrato (CBS) estão localizados em locais distintos das duas moléculas, e, quando unidas, tais sítios continuam separados, tanto na utilização de um *linker* flexível GGGS ou rígido EAAAK. A fim de manter o dinamismo da molécula, permitindo sua interação com glicanos modificados que podem se localizar a certa distância na superfície celular, o *linker* escolhido foi flexível com duas repetições. Diversos arranjos em relação à posição das lectinas e da cauda de histidina foram avaliados, variando a localização em N ou C-terminal. O plasmídeo utilizado para a expressão permite à Histag se localizar em ambas as extremidades, sendo mais vantajoso adicioná-la na porção C-terminal. Isso permite a separação do gene da H84T e expressão apenas da XCL, tendo em apenas um plasmídeo a possibilidade de obter duas proteínas diferentes, após tratamento com enzimas de restrição.

A quimera H84T-XCL foi construída utilizando as sequências de H84T-Banlec (Uniprot ID: O22321) e da lectina de *Xerocomus chrysenteron* (XCL) (Uniprot ID: Q8WZC9), conectadas por dois linkers flexíveis GGGS e contendo sítios de restrição para a enzima HindIII. Através do *software* Vector NTI (Thermo Fisher Scientific, Inc.), a cauda de histidina (His6x-tag) foi adicionada na porção C-terminal para permitir a recuperação de proteínas recombinantes através de cromatografia de afinidade (Figura 5). As sequências da quimera e do gene XCL recombinante foram expressas através de

uma construção sintética obtida junto a empresa Epoch Life Sciences®, inserida no vetor pET-24(+) e transformada em *Escherichia coli*.

Figura 5 - Desenho esquemático da melhor configuração da quimera H84T-XCL. As sequências da H84T-Banlec (azul) e XCL (verde) estão conectadas por um *linker* flexível (vermelho) e inseridas no vetor pET-24a (+); a cauda de histidina (His6x) está localizada na porção C-terminal.

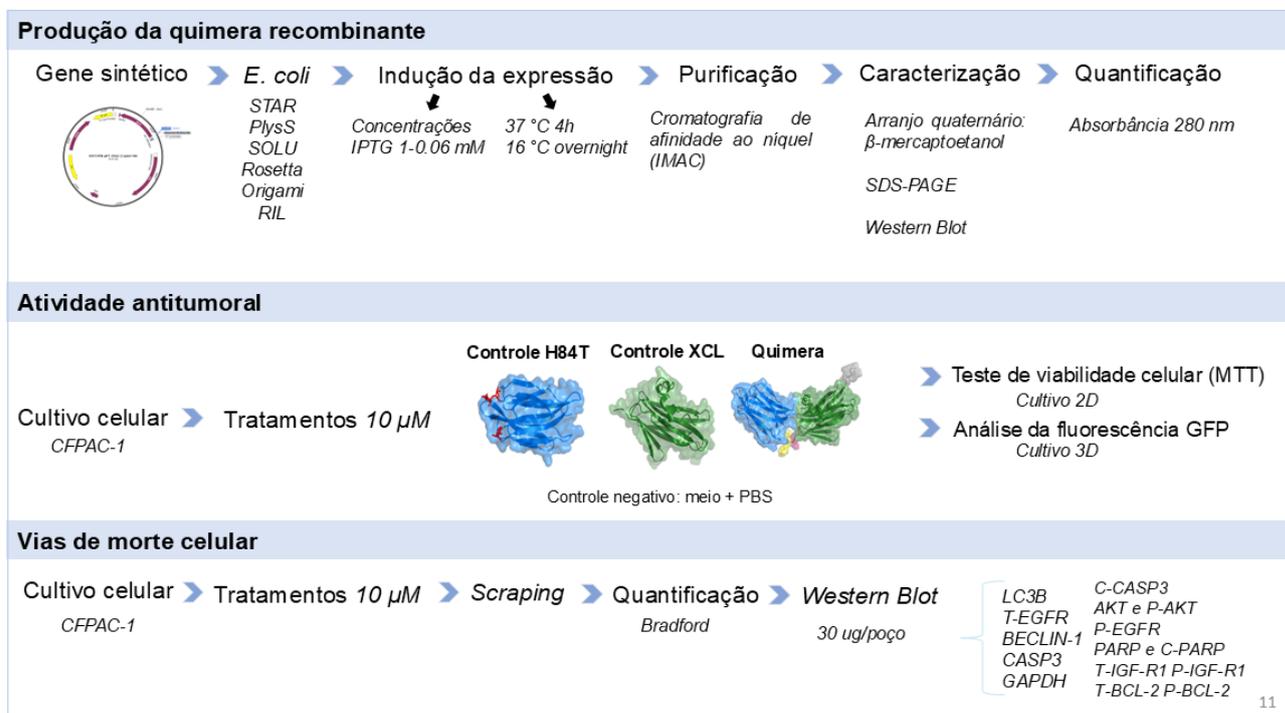


Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

4.3. Caracterização da expressão recombinante

As análises experimentais realizadas neste estudo estão sumarizadas na Figura 6. A cepa de clonagem DH5a foi utilizada para a propagação do plasmídeo sintético contendo o gene completo da quimera quanto apenas o gene da XCL após a separação com a enzima de restrição HindIII HF (NEB). O plasmídeo foi incubado por 30 min com a enzima de restrição a 37 °C, seguido de inativação por 20 min a 80 °C. Para a ligação das extremidades foi utilizada a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen™, Catalog #15224017) por 10 min a 25 °C seguida de inativação a 65 °C. As amostras foram analisadas através de gel de agarose 1% em tampão TAE.

Figura 6. Fluxograma da metodologia utilizada para as análises experimentais. Foram testadas seis cepas de expressão, diferentes temperaturas de indução e concentração do agente indutor. A lectina quimérica foi purificada e seu arranjo quaternário foi avaliado. Após quantificação, a atividade antitumoral da quimera e suas porções isoladas foram testadas em cultivo 2D e 3D de células de câncer de pâncreas CFPAC-1. Por fim, proteínas das vias de apoptose e autofagia foram detectadas por *Western Blotting* para determinar qual o mecanismo de morte celular estimulado pelo tratamento com as lectinas.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Previamente à expressão em maior quantidade, foi realizada a caracterização da melhor cepa, temperatura e tempo de indução da expressão e concentração do agente indutor (IPTG) para a produção da quimera e XCL. A avaliação da expressão ocorreu através de SDS-PAGE e *Western Blotting*, verificando-se em qual condição se produziu mais proteínas recombinantes após o processamento das frações solúvel e insolúvel.

Testes de colônia e cepa

A caracterização da melhor cepa para expressão da quimera ocorreu utilizando-se diferentes mutantes de *E. coli* BL21 (DE3), nomeadamente STAR, DE(3), PlysS, SOLU, Rosetta (dados não publicados), RIL (Agilent Technologies®) e Origami™ 2 (Sigma Aldrich®). Cada uma das colônias foi colocada em 5 mL de meio LB líquido contendo os respectivos antibióticos para o crescimento dos transformados. Ao atingir a

DO de 0.6 a 0.8, foi adicionado IPTG a 1 mM. A indução ocorreu *overnight* a 25 °C, sob agitação de 100 rpm.

Testes de temperatura

Os testes de temperatura ocorreram após o crescimento das cepas RIL e Origami em 500 mL de cultivo atingir a DO de 0.6 a 0.8. Neste momento, os cultivos foram induzidos com 1 mM de concentração final de IPTG e mantidos sob agitação de 100 rpm a 37 °C por 5h – protocolo sugerido para a H84T – ou 16 °C *overnight*, protocolo sugerido para expressão da XCL (FRANCIS et al., 2003; SWANSON et al., 2015).

Testes de concentração de IPTG

A fim de determinar a melhor concentração do agente indutor de expressão para a quimera e XCL, concentrações decrescentes de IPTG foram testadas em cultivos líquidos de RIL e Origami. As cepas transformadas foram cultivadas em 2 mL de LB líquido contendo canamicina e cloranfenicol a 50 mg/mL (no caso da cepa RIL), e canamicina (50 mg/ml) e tetraciclina (5 mg/mL) para a cepa Origami. Quando as culturas atingiram a DO de 0,6-0,8, concentrações decrescentes de IPTG foram adicionadas através de diluição seriada, de 1 a 0,062 mM. A indução ocorreu *overnight* a 25 °C, sob agitação de 100 rpm.

4.4. Expressão e purificação das proteínas recombinantes quimera e XCL em *E. coli*

As bactérias foram cultivadas a 37 °C até atingirem a densidade óptica (DO) de 0,6 a 0,8, quando foram induzidas na concentração final de 1 mM IPTG (Isopropil β-d-1-tiogalactopiranosídeo). A indução ocorreu *overnight* a 16 °C, seguida de centrifugação dos cultivos a 20.000 x g por 20 min.

A purificação seguiu os protocolos estabelecidos para a H84T-Banlec com os *buffers* padrão de cromatografia de afinidade IMAC (46 mM Na₂HPO₄; 3 mM NaH₂PO₄; 290 mM NaCl; 3,07 mM, azida sódica (NaN₃); pH 8). O primeiro passo incluiu a utilização do tampão IMAC sem imidazol adicionado de 0,04g de lisozima (Sigma Aldrich) e 80 µL de DNase I (Thermo Fisher Scientific), agitando-se por 30 min a 25 °C. Em seguida, adicionou-se o buffer IMAC-50 (mesma composição, adicionado de 50 mM imidazol), no

qual as amostras foram incubadas em gelo por 10 min. A sonicação foi realizada com as amostras em gelo por 4 vezes, sendo 30 segundos a 50% de potência e 60 segundos de intervalo. As amostras sonicadas foram centrifugadas a 38 000 x g por 40 min a 4 °C. Para a fração insolúvel, o pellet foi ressuspenso em IMAC-25 adicionado de 8M de ureia a fim de obter as proteínas dos corpos de inclusão.

Para a remoção de quaisquer agentes que pudessem interferir nos ensaios celulares, 12 a 14 trocas de tampão foram feitas por meio de diálise em tampão D-PBS (Gibco, Catalog #21600069, 2,66 mM Cloreto de Potássio (KCl), 1,47 mM fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), 137,93 mM Cloreto de Sódio (NaCl), 8 mM Fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄)).

Para determinar o arranjo quaternário das formas ativas, bem como a produção das proteínas recombinantes, ambas foram avaliadas através de eletroforese SDS-PAGE em géis MiniProtean Gel 4-20% (BioRad), em condições desnaturantes (presença de β-mercaptoetanol) ou não desnaturantes. A fim de confirmar a presença da proteína recombinante, foram realizados *Western Blottings* com anticorpo anti-histidina na proporção de 1:10000 (Qiagen, #34460).

4.5. Atividade antiproliferativa

4.5.1. Cultivo 2D

A atividade antiproliferativa foi testada em células de câncer de pâncreas CFPAC-1 (CRL-1918). A linhagem foi mantida em garrafas de 175 cm² (T-125) em meio de cultivo IMDM (25 mM hepes + L-glutamina, Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de soro fetal bovino até atingirem a confluência, em atmosfera controlada de 5% CO₂ e temperatura de 37 °C. Foram semeadas 3x10⁴ células por poço em placas de 48 poços para a obtenção de dados em triplicata. Como controle, utilizaram-se as células adicionadas de D-PBS estéril a fim de igualar a quantidade àquele presente nos tratamentos com as proteínas.

As proteínas foram adicionadas no meio de cultivo na concentração final de 10 μM para análise da atividade (considerando as proteínas como dímeros funcionais) e incubadas com as células durante 6 dias. A atividade antiproliferativa das proteínas foi medida indiretamente diariamente através de atividade metabólica celular pelo ensaio de MTT (Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio). No dia do tratamento

(dia 0) e a partir do terceiro dia, 200 μ L do reagente MTT (12 mM) acrescido do meio foram adicionados em cada poço e incubados por 3 h. Após remoção cuidadosa, as células foram incubadas por 10 min com 100 μ L de DMSO a fim de solubilizar os cristais de formazan para a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro.

4.5.2. Cultivo 3D e ensaio com esferóides

As linhagens celulares PANC-1 e CFPAC-1 foram utilizadas para avaliação da atividade antiproliferativa da quimera, H84T-Banlec e XCL em cultivo 3D. A construção CAR T cell realizada pelo Laboratório Markovitz foi utilizada como controle positivo, conforme descrito previamente (MCKENNA et al., 2023). De forma resumida, as linhagens celulares CFPAC-1 e PANC-1 expressam GFP-FfLuc e foram geradas por transdução com retrovirus gama. A linhagem de células tumorais PANC-1 foi mantida em meio de Eagle modificado por Dulbecco (EMEM) e 2 mmol/L L-glutamina; já as células CFPAC-1 foram mantidas em meio Dulbecco modificado de Iscove (IMDM). Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, Massachusetts, EUA). As células foram testadas rotineiramente para a presença de micoplasma usando o kit de detecção MycoAlert (Lonza; Basal, Suíça).

Placas de cultura de tecidos de 96 poços foram revestidas com agarose a 1% para permitir a suspensão forçada de células tumorais. 2×10^3 células tumorais e 8×10^3 PSCs foram semeadas em 50 μ L, proporção de células necessária para que a formação dos esferóides ocorresse em 48 h. As lectinas foram adicionadas em diluição seriada de 10 μ M a 0,31 μ M. O controle positivo utilizado foi a construção CAR T H84T. Os esferóides foram monitorados pela análise de imagens de células Incucyte Live™ a cada 2h nos primeiros 3 dias, e então nos dias 5 e 7, sendo então lida a intensidade verde associada ao GFP do esferoide tumoral.

4.6. Viabilidade celular e análise dos dados

A partir da obtenção das absorbâncias foi subtraído do valor de *background* do DMSO e calculada a porcentagem de células viáveis normalizadas de cada triplicata em relação à média das triplicatas do dia 0. Esse cálculo pode ser sumarizado pela equação (1):

$$\% \text{ células viáveis} = \left(\frac{|\text{Abs das células tratadas} - \text{background}|}{\text{Média Abs triplicatas dia 0} - |\text{Abs células} - \text{background}|} \right) * 100 \quad (1)$$

Onde *Abs* é a absorbância, medida a 540 nm.

Os valores de cada triplicata foram incluídos no *software* GraphPad Prism 10 (Versão 10.1.2) e a análise de variância ANOVA 2-way foi realizada para identificar diferenças entre grupos com teste *post-hoc* de Tuckey para identificação de quais grupos diferem entre si.

4.7. Determinação das vias de ação

A fim de determinar por qual via as lectinas expressas exercem sua atividade antiproliferativa, foi realizada uma série de *Western Blots* utilizando o extrato celular de CFPAC-1. As células foram mantidas como mencionado anteriormente até atingirem confluência, sendo então semeadas 2×10^6 , 5×10^5 e $1,25 \times 10^5$ células por placa (referente a cada *timepoint* de coleta – 24, 72 e 120h) em placas de cultura de 100 mM de diâmetro (Thermo Fisher Scientific). Após 24 h, as células foram tratadas com as proteínas. Os extratos foram recuperados por *scraping* com PBS 1x a 4 °C estéril nos *timepoints* 24 h, 72 h e 120 h após o início do tratamento. O extrato total foi centrifugado a 1500 rpm a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e prosseguiu com a extração de proteínas totais. As células foram lisadas com tampão CHAPS (150 mM KCl, 50 mM HEPES, 0.1% CHAPS) suplementado com coquetel inibidor de fosfatase 1% e coquetel inibidor de protease com EDTA 1X, por 30 min a 4 °C, sob agitação leve seguida de centrifugação a 13.3 rpm por 10 min a 4 °C. O extrato celular foi quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e uma concentração de 20 ug de proteína total foi adicionada por poço.

Anticorpos específicos para diversas proteínas relacionadas tanto a apoptose quanto à autofagia foram utilizados na caracterização das vias de ação: T-AKT (#9272), P-AKT (#4056), T-EGFR (#4267), P-EGFR (#3777), T-IGFR (#9750), P-IGFR (#80732), CASP3 (#9662), C-CASP3 (#9664P), T-BECLIN-2 (#3738S), P-BECLIN-2 (#84966P), BCL-2 (#15071), P-BCL-2 (#P2827), LC3B (#3868), C-PARP (5625), PARP-1 (#9542), GAPDH (camundongo #2118,), Anti-rabbit (cabra #31462, Thermo Fisher Scientific), Anti-mouse (cavalo #7076), anti-mouse (cabra #A2554, Sigma-Aldrich). Todos os

anticorpos foram comprados junto à Cell Signaling® e foram produzidos em coelho, exceto se o contrário seja indicado.

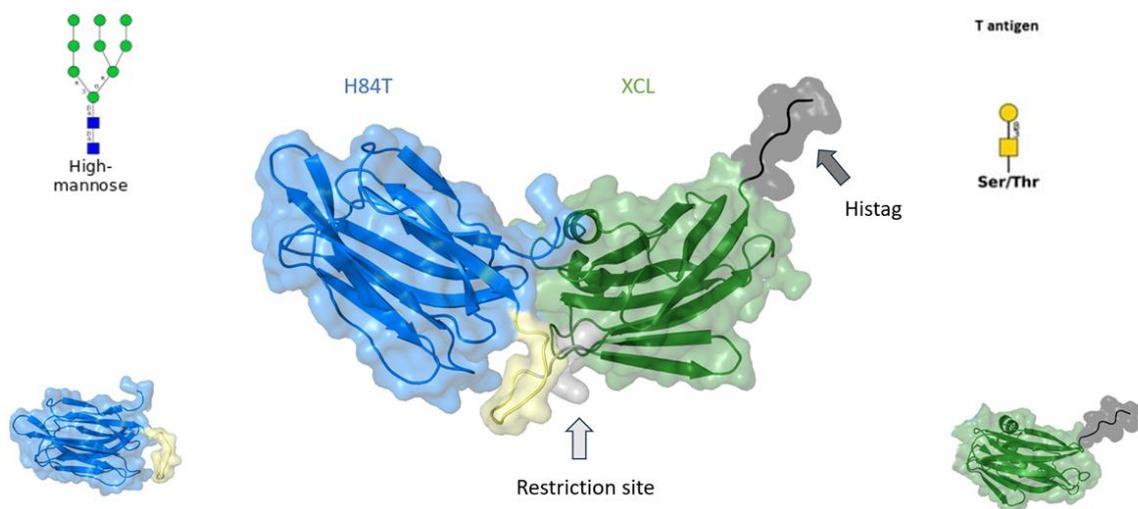
5 Resultados e Discussão

5.1. Análises bioinformáticas

5.1.1. Modelagem da estrutura tridimensional e avaliação da qualidade

O critério de escolha baseou-se na utilização do plasmídeo pET-24 (+), que permite tal variação na localização da cauda de histidina. A configuração da proteína quimérica a ser expressa foi escolhida para possibilitar também a inserção de dois sítios de restrição para a enzima HindIII, que permite obter duas construções a partir do mesmo plasmídeo. Desse modo, a melhor configuração para essa estratégia contou com a H84T-Banlec na porção N-terminal, seguida do *linker* flexível GGGS e o sítio de restrição para HindIII (Figura 7). A lectina XCL e a cauda de histidina foram posicionadas na porção C-terminal. A sequência deste gene sintético foi construída levando em consideração esse arranjo.

Figura 7 – Estrutura modelada da quimera H84T-XCL conforme a configuração das proteínas, *linker* e cauda de histidina mais favorecidos após as análises bioinformáticas. A porção em azul refere-se a H84T, com afinidade para high mannose, enquanto a porção em verde representa a XCL, com afinidade para os antígenos T e Tn. Um sítio de restrição para a enzima HindIII foi inserido entre as porções a fim de facilitar a produção da XCL recombinante.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

A validação estereoquímica da qualidade do modelo levou em conta um *score* global e local de qualidade, assim como o posicionamento favorável ou desfavorável dos resíduos obtido no gráfico de Ramachandran (Tabela 3). De modo geral, o modelo apresenta a conformação correta, com exceção apenas da região do *linker*, que em ambos os *softwares* apresentam o menor *score* de qualidade local. Isso já é esperado, visto que regiões flexíveis apresentam conformação em *loop* e uma maior dificuldade de predição computacional.

Tabela 3 – Resultados da validação estereoquímica do modelo 3D da quimera. Os *softwares* ModFold9 e ProSA-Web fornecem um *score* de qualidade, enquanto o gráfico de Ramachandran fornece as regiões permitidas de posicionamento dos aminoácidos.

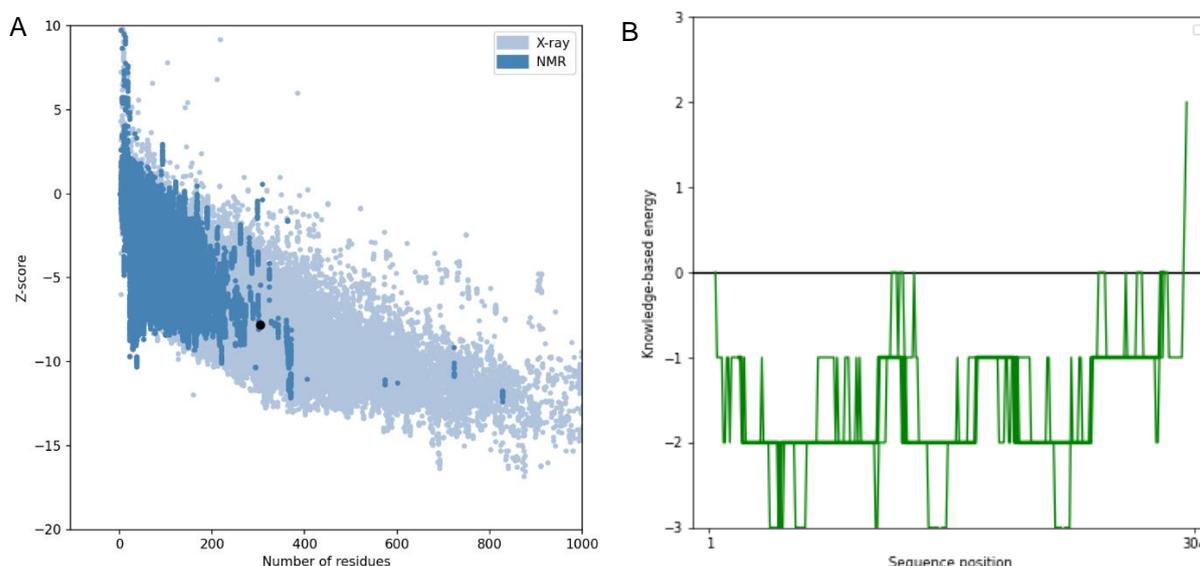
Software	Score	Resíduos em regiões mais favorecidas	Resíduos em regiões permitidas favoráveis	Resíduos em regiões não permitidas	Resíduos em conformações não favoráveis
ModFold9	0.8633	-	-	-	
ProSA-web	-7,81	-	-	-	
Gráfico Ramachandran (PROCHECK)	-	217 (90%)	24 (10%)	0	Tyr47, Thr84, Lys98, Gly147, Ser151, Lys152, His301-302

Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

O *software* ProSA-web utiliza a estrutura da proteína como *input* e leva em conta o *score z*, que indica a qualidade geral do modelo em relação às cadeias proteicas determinadas experimentalmente no PDB. Isso permite verificar se a qualidade da estrutura corresponde ao *score* normalmente encontrado para proteínas nativas de tamanho semelhante, sendo que um valor fora de uma faixa característica para proteínas nativas indica estruturas errôneas. Nesta análise, é possível verificar que a qualidade da estrutura definida pelo z-score encontra-se em conformidade com a qualidade das estruturas definidas experimentalmente (Figura 8A). O gráfico de energia mostra a qualidade do modelo ao considerar as energias em função da posição da sequência de aminoácidos (Figura 8B). É possível notar que a linha verde suave (janela de 10 resíduos) denota maior energia nas regiões N e C-terminal e em torno de resíduo 150,

onde está o *linker* flexível. Isso ocorre pois essas regiões apresentam *score* próximo de 0 ou positivos, enquanto resíduos com energia negativa representam estruturas mais consistentes com os parâmetros de uma proteína típica (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). O modelo da quimera está em conformidade com o esperado para uma proteína típica, demonstrando poucas regiões de maior energia.

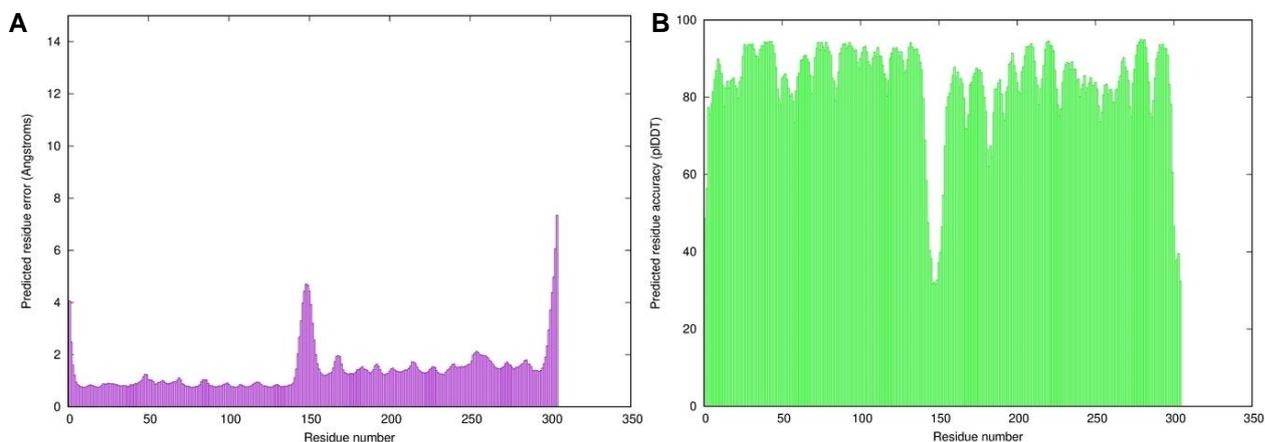
Figura 8 – Análise de qualidade do modelo da quimera no software ProSA-web. Em A, o *score* de qualidade global; ponto em preto indica a localização da quimera em relação às estruturas semelhantes no RCSB PDB. Em B, a análise de qualidade local por resíduo; a linha verde intensa representa uma janela de 40 resíduos, enquanto a linha suave representa uma janela de 10 resíduos.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

O *software* ModFold9 fornece as pontuações de qualidade do modelo global, que variam entre 0 e 1. Pontuações superiores a 0,4 geralmente indicam modelos mais completos, confiáveis e altamente semelhantes à estrutura nativa. O valor de P foi de 7.538E-5, o que demonstra que o modelo tem menos de 1/1000 de chance de estar incorreto (MCGUFFIN; ALHARBI, 2024) (Figura 9A). As pontuações por resíduo indicam a distância prevista (em Å) entre o carbono α do resíduo no modelo e o equivalente na estrutura nativa. Já a análise local demonstra a qualidade de cada resíduo modelo e em concordância com o resultado do ProSA-web, que as regiões do *linker* e cauda de histidina apresentam menor *score* de confiança (Figura 9B).

Figura 9 – Análise de qualidade do modelo da quimera no software ModFold9. Em A, o erro por resíduo versus número de resíduos. Em B, a acurácia predita por resíduo.



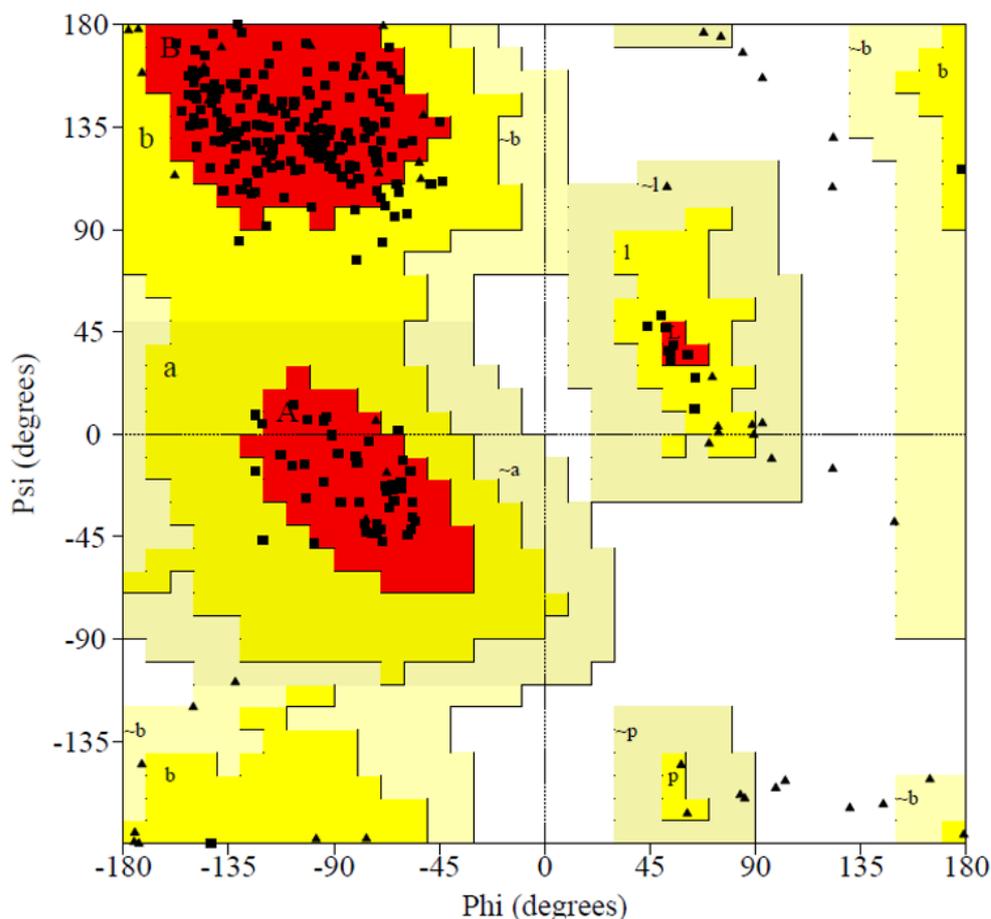
Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

O gráfico Ramachandran demonstra a qualidade geral do modelo ao analisar as torções dos ângulos phi (φ) e psi (ψ). Os aminoácidos têm um número limitado de torções possíveis sem gerar impedimento estérico e esta análise é imprescindível pois fornece quantas destas conformações estão de acordo com o esperado. Espera-se um mínimo de 90% dos aminoácidos em regiões favorecidas para um modelo de boa qualidade. O modelo da quimera demonstrou atingir este número, não apresentando nenhum aminoácido em regiões não permitidas (Figura 10). Isso demonstra que o modelo corresponde bem ao que é esperado em estruturas resolvidas e não possui impedimentos estéricos graves.

Figura 10 – Gráfico de Ramachandran para a quimera H84T-XCL, demonstrando a porcentagem de aminoácidos em regiões favorecidas e não favorecidas de acordo com as torções dos ângulos ϕ e ψ .

PROCHECK

Ramachandran Plot



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	217	90.0%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	24	10.0%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	241	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	53	
Number of proline residues	8	

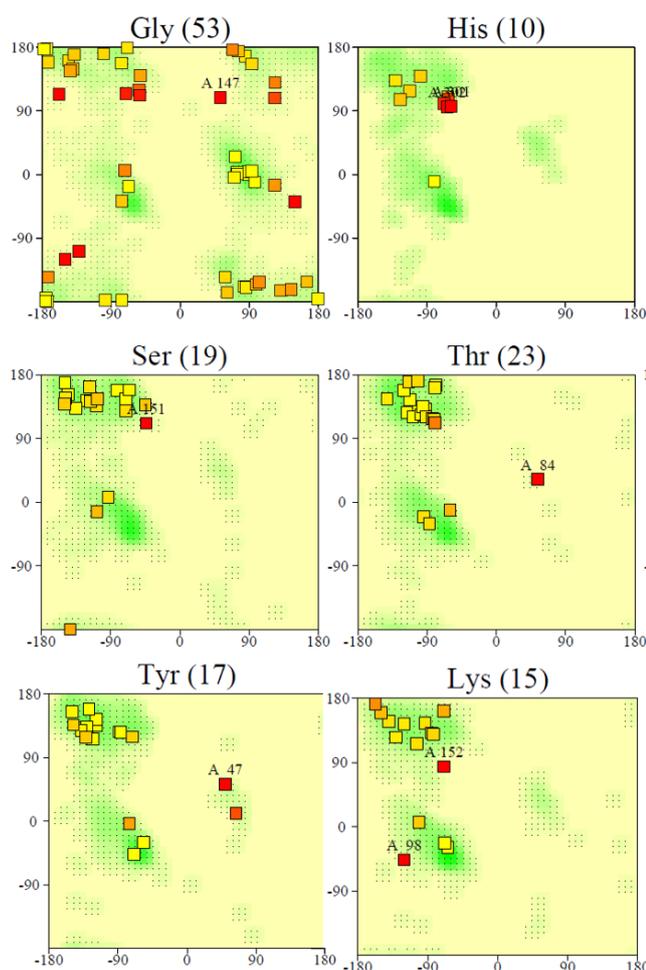
Total number of residues	304	

Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

De forma complementar, é possível analisar os aminoácidos de forma local, onde percebe-se quais resíduos estão em conformações não favoráveis. Resíduos da região dos *loops* que formam o CBS na porção H84T-Banlec encontram-se em conformações

não favoráveis, assim como resíduos do *linker* e da cauda de histidina (Figura 11). Visto a flexibilidade de regiões em loop como sítios de ligação, o linker, e as porção terminal, é natural que esta sejam mais difíceis de prever computacionalmente, demonstrando maior chance de erro durante a modelagem (FISER, 2010).

Figura 11 – Gráfico de Ramachandran da conformação favorável dos resíduos para a quimera H84T-XCL. Neste recorte, são mostrados apenas os resíduos em posições desfavoráveis, nomeadamente Tyr47, Thr84, Gly147, Ser151, Lys152, His301 e 302, que fazem parte do sítio de ligação a carboidrato, *linker* e cauda de histidina.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

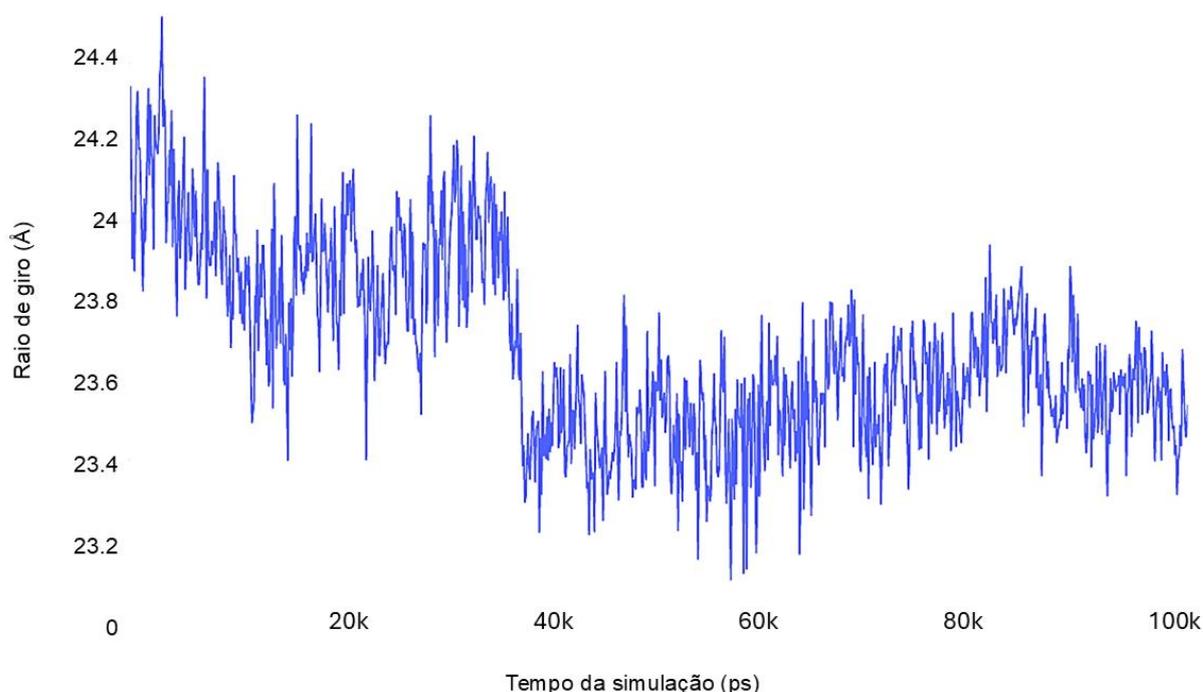
5.1.2. Dinâmica molecular

A dinâmica molecular permite avaliar o comportamento de uma macromolécula durante um determinado período e em ambiente com temperatura e pressão controlados. As simulações foram realizadas 16 °C, a temperatura de indução da expressão utilizada

in vitro, em que verificou-se a estabilidade da quimera por 100 ns, sem a presença de ligante.

O raio de giro de uma proteína é um indicativo de compactação - quanto maior o raio de giro, maior a instabilidade da proteína. Essa métrica é calculada a partir do giro atômico nos eixos x, y e z em relação ao centro de massa do átomo, em razão do tempo. O raio de giro descreve se uma molécula está mais compactada ou dispersa em torno do seu centro de massa, sendo que quanto maior essa variação, maior a distância da posição do átomo de seu centro de massa. A quimera foi estabilizada após 40 ns de simulação, o que é demonstrado por uma baixa variação no raio de giro e continua até o final da simulação. Embora ainda se apresentasse elevado, a variação no raio de giro é similar ao reportado para a lectina *Dioclea lasiophylla*, de aproximadamente 17 Å (CAVADA et al., 2022) (Figura 12). Essa alta variação pode ocorrer devido às regiões altamente flexíveis do *linker* e cauda de histidina, que acabam elevando esta métrica.

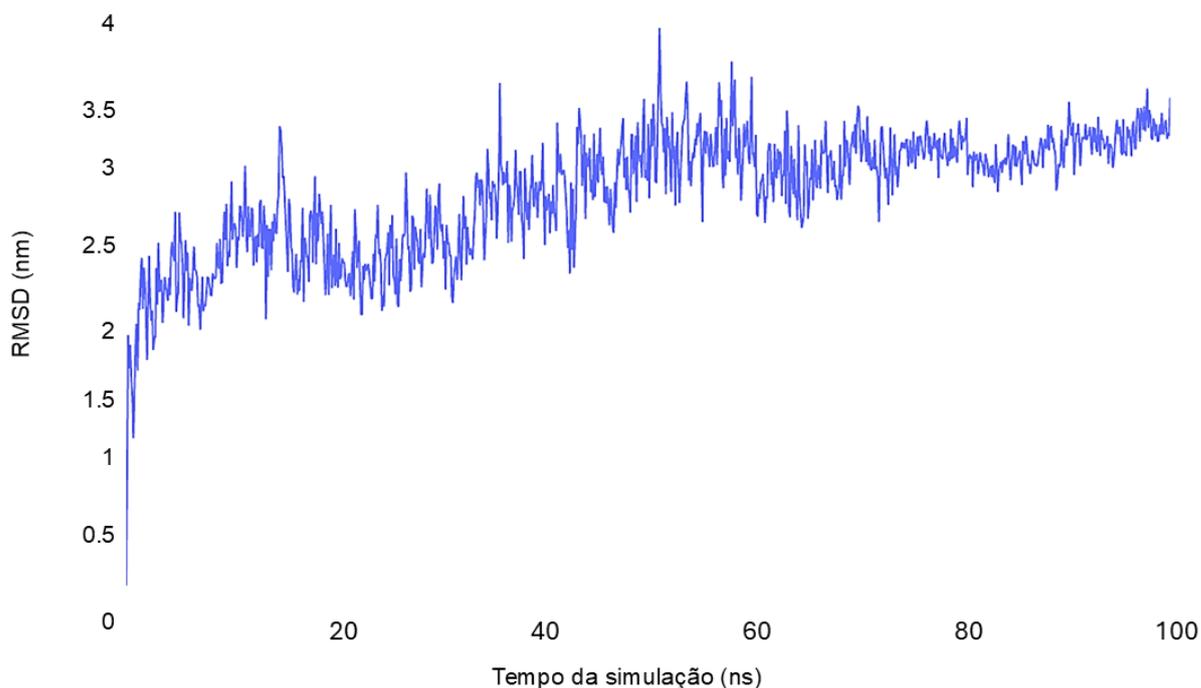
Figura 12 - Medida de compactação da quimera, calculada através do raio de giro em relação ao tempo da simulação. O raio de giro descreve o quão compacta está uma molécula em torno do seu centro de massa, sendo que quanto maior essa variação, maior a distância da posição do átomo de seu centro de massa. A quimera apresenta raio de giro similar a outras lectinas. No eixo x, o tempo em picossegundos (ps); no eixo y, a medida em angstroms (Å).



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Outra medida de importância para determinar a estabilidade referente às movimentações atômicas é o RMSD, que indica as variações atômicas da estrutura em relação ao tempo da simulação. Para este fim, ocorre um *fitting* do *backbone* de ambas as estruturas para obter o valor dessa variação. Esse parâmetro permite verificar o quanto a estrutura foi modificada em relação ao início da simulação. Observou-se que o valor de RMSD durante a simulação é bastante baixo, indicando pouca variação na distância entre os átomos, principalmente após os 60 ns, em que a simulação consegue atingir a estabilidade (Figura 13). Este é um comportamento normal para biomoléculas e um valor de RMSD baixo indica que a estrutura está estável.

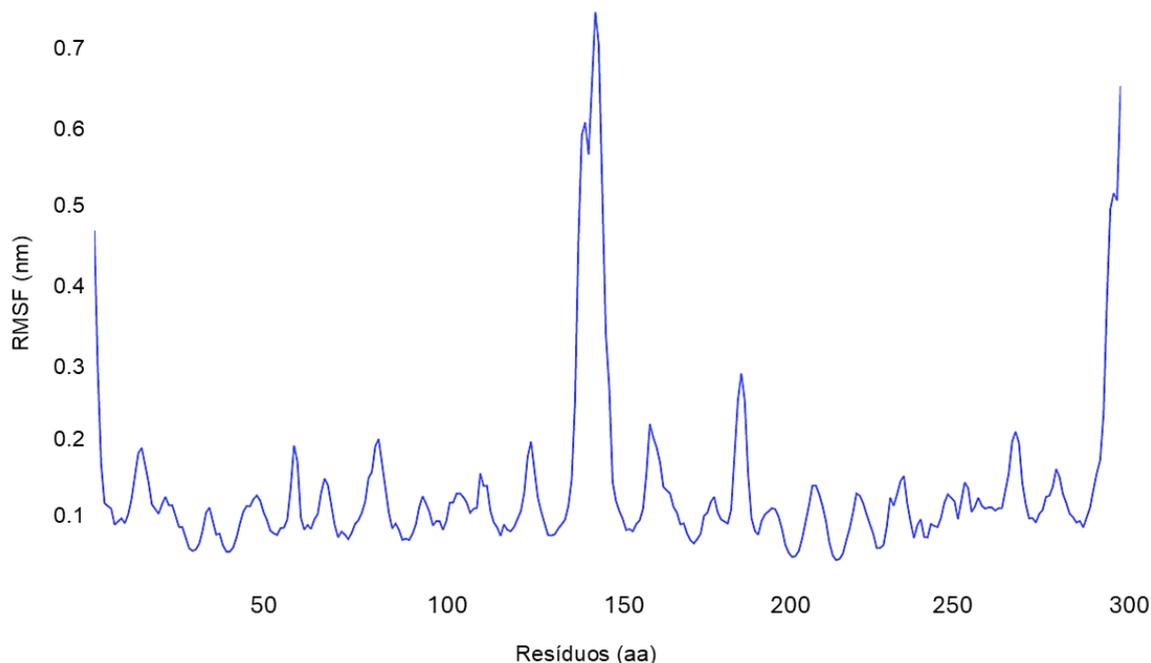
Figura 13 - Medida do desvio médio quadrático da raiz (RMSD) em nanômetros em relação ao tempo da simulação (100 nanossegundos). É computada a variação na posição atômica durante a simulação, sendo que uma maior variação indica uma molécula instável. A quimera apresentou pouca variação de RMSD, sendo considerada estável na temperatura testada. No eixo x, o tempo de simulação em nanossegundos (ns); no eixo y, o valor de RMSD em nanômetros (nm),



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

A análise do RMSF demonstra a variação na posição atômica ao longo da simulação em relação cada resíduo. Isso permite compreender quais regiões sofrem maior oscilação, e, conseqüentemente, acabam sendo mais flexíveis. Observamos que houve pouca variação na distância atômica dos resíduos em relação à sua posição inicial nas cadeias das lectinas em si (Figura 14). Porém, percebeu-se que a região do *linker* flexível (resíduos 142-150) foi a que apresentou maior variação, de aproximadamente 1 nanômetro. Mesmo se tratando de um valor relativamente alto, é esperado que uma região rica em glicinas e serinas apresente maior movimentação atômica. A cauda de histidina (resíduos 299-304) e os resíduos iniciais da porção N-terminal também apresentaram flutuação significativa. As cadeias das lectinas apresentaram um RMSF baixo (em torno de 0,2 nm), em concordância com o esperado para proteínas estáveis, compactadas e biologicamente ativas.

Figura 14 - Medida da flutuação média quadrática da raiz (RMSF) dos resíduos que formam a quimera. As regiões mais flexíveis são as extremidades e o *linker*, as regiões das lectinas apresentam pouca variação na flutuação atômica, indicando que se mantém estáveis durante o tempo da simulação. No eixo x, os resíduos da lectina quimérica; no eixo y, a medida em nanômetros (nm) da flutuação atômica.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

As pequenas variações nas métricas analisadas confirmam que uma indução de expressão a 16 °C gera menor movimentação atômica, afeta pouco a compactação da

quimera e sua conformação é mantida, especialmente as porções das lectinas. Desse modo, a dinâmica molecular oferece dados preliminares que serão úteis para os passos experimentais visando obter uma lectina funcional e dobrada corretamente.

5.1.3. *Docking* molecular lectina-açúcar

Previamente a realização do *docking* lectina-açúcar, foi necessário definir os sítios de ligação a carboidratos (CBS) para então definir as coordenadas da *grid box*. A lectina XCL não pôde ser resolvida experimentalmente complexada com o ligante, assim, os autores sugerem que o CBS seja constituído pelos seguintes resíduos: 49–53, 70–79, 97–98 (PDB ID 1XI0, Brick et al., 2005). Avaliamos também possíveis CBS através do *software* COACH, que revelou dois possíveis sítios: um para GalNAc e outro para GlcNAc. O possível CBS para GalNAc foi identificado a partir do alinhamento com a lectina de *Boletus edulis* (PDB ID 3QDV-A), que contém o ligante A2G (N-acetil- α -D-galactosamina, α -GalNAc) (Tabela I – Apêndices). O outro possível CBS é específico para GlcNAc (NDG, N-acetil- α -D-glicosamina) e foi reconhecido com base na mesma proteína resolvida, porém na cadeia B. Sabe-se, porém, que ambas as glicoses e manose não inibem a atividade hemaglutinante da XCL experimentalmente (DAMIAN et al., 2005), portanto, apenas o sítio para GalNAc foi considerado.

O *docking* molecular da porção XCL foi performedo levando em consideração o CBS para GalNAc proveniente do *software* COACH, assim como os resíduos sugeridos a partir da estrutura cristalográfica. Não foi observada diferença significativa na energia de afinidade, assim como nas conformações das poses. As *grid boxes* foram construídas levando em conta os resíduos descritos anteriormente para H84T-Banlec (MEAGHER et al., 2005). Para a quimera, as coordenadas das proteínas isoladas foram adaptadas à sua localização (Tabela II – Apêndices).

Energias de afinidade

Os *dockings* realizados levaram em conta os ligantes já descritos para cada uma das porções. No caso da porção H84T, sabe-se que esta lectina não possui afinidade por galactose, mas por manose e glicanos de manose, como a *high mannose* em suas diversas ramificações (CHAN et al., 2022; MO et al., 2001). A porção XCL é capaz de se ligar a galactose, GalNAc (quando ligada à proteína chama-se antígeno Tn) e o antígeno

T (DAMIAN et al., 2005). Nesse sentido, ao realizar o *docking* se estabeleceu que cada uma das porções seriam *dockadas* apenas com seus respectivos ligantes.

O *redocking* da H84T com a dimanose foi realizado como validação do método. Ao realizar o *redocking* da H84T com a dimanose, carboidrato com o qual foi resolvida experimentalmente (MEAGHER et al., 2005), observou-se que as interações de hidrogênio ocorreram com aminoácidos reconhecidamente parte do sítio ativo no protômero 2 da estrutura resolvida (PDB ID: 4PIT, cadeia C) com uma boa energia de afinidade. Isso permite que os *dockings* sejam analisados com maior confiança, servindo como um controle positivo.

O *docking* da XCL isolada com os antígenos T e Tn revelou maior afinidade pelo dissacarídeo (Tabela 4), como demonstrado experimentalmente (DAMIAN et al., 2005) e resultados similares foram observados no caso da quimera, que demonstrou ainda maior afinidade ao antígeno T comparada à sua porção isolada. Quando o *docking* foi realizado com carboidratos simples, como os dissacarídeos, o *software* Vina-Carb se demonstrou adequado, provavelmente devido ao pequeno número de ligações rotáveis da estrutura.

Tabela 4 - Média das energias de afinidade (kcal/mol) das poses em diferentes programas. Tn-Ag: antígeno Tn; T-Ag: antígeno T; Man(n): high mannose contendo n manoses.

Proteína	Ligante	VINA-CARB	Energia chi	Afinidade - chi	DockThor
XCL	Tn-Ag	-4.7	0	-4.7	-6,267
	T-Ag	-5.5	0.3	-5.8	-7,1
Quimera	Tn-Ag	-5.8	0	-5.8	-6,835
	T-Ag	-6.4	0.4	-6.8	-7,821
H84T	Dimanose	-4.8	0.32	-5.08	-6,564
	Man5	-0.8	2.7	-3.5	-8.262
	Man6	-1.9	2.3	-4.2	4,81
	Man7	-0.4	3.1	-3.5	-
	Man8	0.5	3.9	-3.4	-

	Man9	2.9	5.5	-2.7	-
	Man5	-2.2	2.1	-4.3	-7,807
	Man6	-1.8	3.3	-5.1	-4,966
Quimera	Man7	-1.1	2.1	-3.2	-
	Man8	0.9	4.1	-3.2	-
	Man9	0.8	4.5	-3.7	-

Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Ambas a H84T-Banlec e a quimera demonstraram fraca energia de interação com as diferentes ramificações de *high mannose* (Tabela 4), provavelmente devido às altas penalizações de energia das ligações glicosídicas pelo *software* Vina-Carb. Estes são glicanos grandes com muitas ligações rotáveis, e a energia de afinidade (kcal/mol) pode ter sido mascarada erroneamente pela contribuição das ligações glicosídicas. Isso foi relatado anteriormente como algo comum, além de não haver diferença entre os *softwares* Vina-Carb e Vina neste sentido, embora as energias de ligação não fossem mencionadas durante essa avaliação (NIVEDHA et al., 2016).

Como alternativa, realizou-se o *docking* proteína-ligante no *software* DockThor, que fornece além da energia de afinidade outras informações sobre as interações formadas (Tabela III – Apêndices). Embora não seja específico para carboidratos, o *software* apresenta outras contribuições energéticas interessantes, como energia van der Waals, energia total da interação e energia eletrostática. Os resultados foram similares aos obtidos no Vina-Carb.

Interação com os ligantes

As características bioquímicas dos aminoácidos envolvidos na ligação entre XCL e antígeno T estão conforme reportado para outras lectinas de fungos ligadoras de galactose (POIROUX et al., 2017). Foram formadas mais ligações de hidrogênio no *docking* com o dissacarídeo (oito) comparado ao antígeno Tn (cinco), devido ao maior número de átomos interagindo no antígeno T (Tabela 5).

As interações hidrofóbicas contribuindo para empilhamento π - π envolveram o aminoácido Phe, enquanto os aminoácidos formadores de pontes de hidrogênio foram

Asn, Asp, Arg para o antígeno Tn. No caso do antígeno T, estes aminoácidos foram Gly, Asn, Asp e Arg para o antígeno T. O sítio indicado pelos autores engloba os aminoácidos 49–53, 70–79, 97–98 e o *docking* demonstrou a interação dos ligantes com estes resíduos ou resíduos muito próximos. Neste estudo, encontrou-se o valor de -5,5 kcal/mol de energia livre quando a lectina XCL está ligada ao antígeno T; um estudo experimental de calorimetria de titulação isotérmica relatou o valor de -6,81 kcal/mol (DAMIAN et al., 2005).

Tabela 5 - Interações formadas com os ligantes no *docking* molecular.

Complexo proteína-ligante	Interação hidrofóbica (π - π)	Ligação de hidrogênio
XCL+ Tn-Ag	Phe31	Asn101, Asn102, Asp106, Arg109
XCL + T-Ag	-	Ala32, Ser51, Gly52, Asn75, Arg109
Quimera +Tn-Ag	Tyr24	Lys120, Glu140, Met154, Ser202, Tyr227
Quimera + T-Ag	-	Tyr24, Ser202, Glu140, Pro141, Gly143, Ser151, Lys152, Met154, Tyr227
<i>Redocking</i> H84T + dimanose	-	Gly34, Asp35, Val36, Asp38, Gly60, Thr61, Tyr83
Estrutura resolvida H84T+ dimanose (PDB ID: 4pit):	-	Protômero I: Gly15, Thr84, Val87, Gly129, Lys130, Phe131 Protômero II: Gly34, Asp35, Val36, Asp38, Gly60, Thr61, Tyr83
H84T + Man5	-	Gly12, Asn79, Thr81, Gly82, Lys127, Phe128, Asp130
H84T + Man6	Lys127	Gly12, Asp32, Val33, Asp35, Tyr80, Thr81, Gly82, Thr104, Lys127, Phe128, Asp130

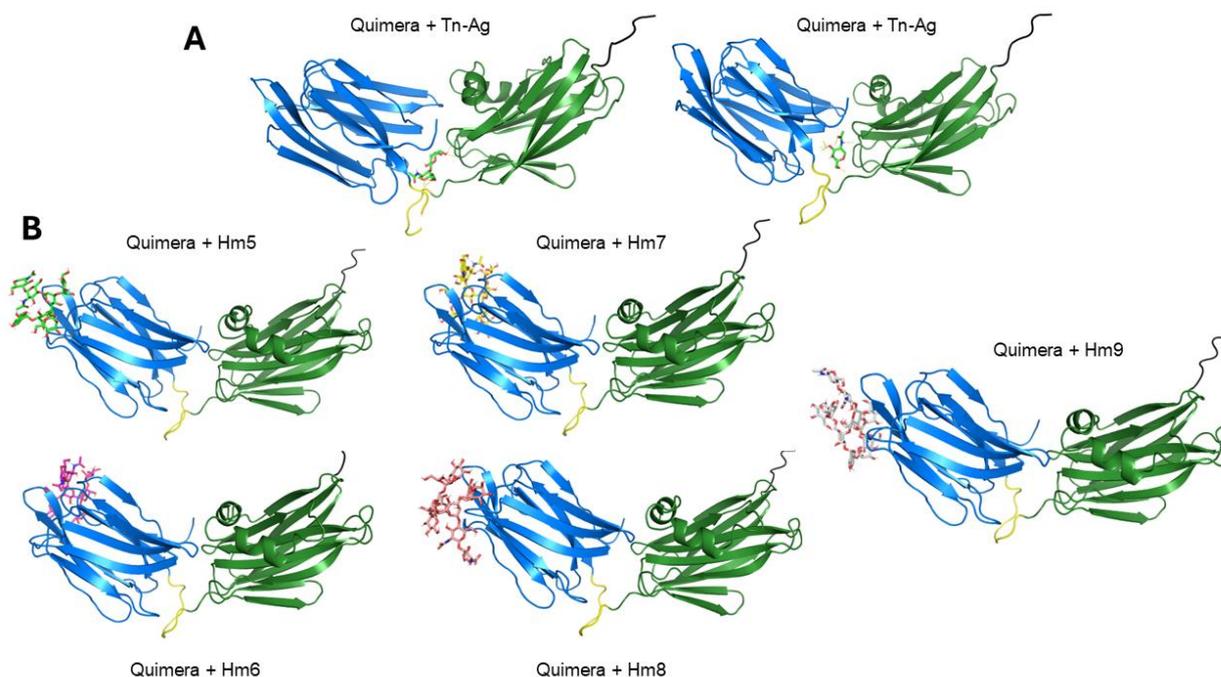
Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

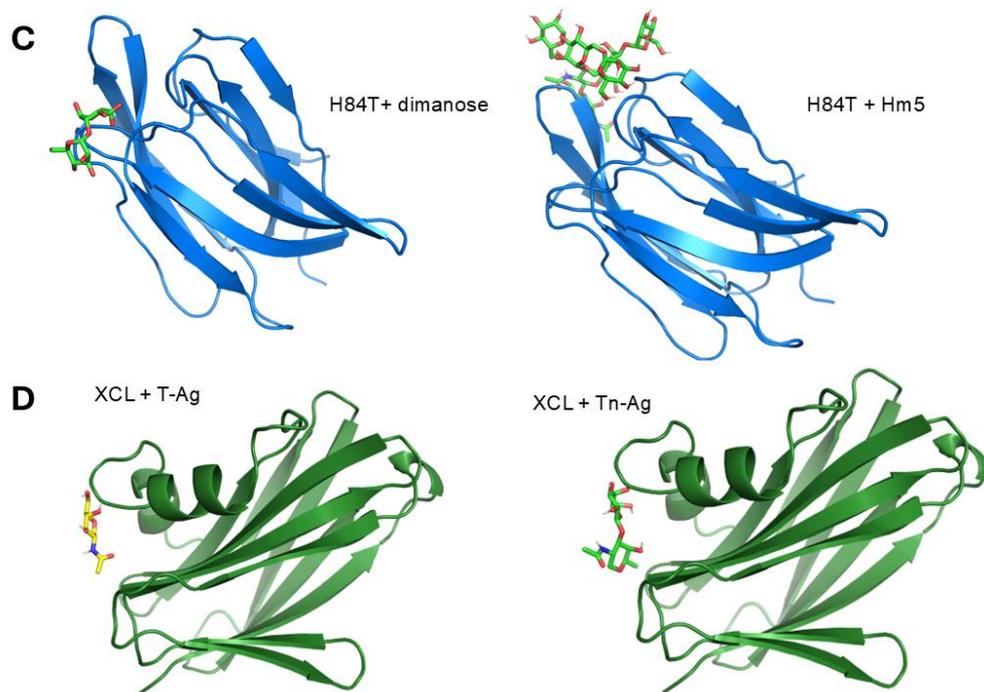
No caso da porção XCL da quimera, os aminoácidos formadores de pontes de hidrogênio com o antígeno Tn foram Ser, Glu, Met, Tyr e Lys, enquanto houve apenas uma interação hidrofóbica do tipo π - π com Tyr24, o que corrobora com evidências

anteriores de estruturas resolvidas com monossacarídeos (BARRE et al., 2019; POIROUX et al., 2017) (Tabela 5).

No caso do antígeno T, os resíduos Tyr, Ser, Glu, Pro, Gly, Met e Lys formaram pontes de hidrogênio e não foram observadas interações hidrofóbicas (π - π), o que também foi reportado para estruturas similares resolvidas com dissacarídeos (CARRIZO et al., 2005). Percebe-se que mesmo a *grid box* englobando a mesma região na quimera e na XCL isolada, houve diferença na característica bioquímica dos resíduos envolvidos na interação com os O-glicanos. O valor de energia livre obtido pelo Vina-Carb foi de -6,4 kcal/mol para ligação do antígeno T, valor bastante próximo do que foi reportado para a XCL (DAMIAN et al., 2005). Os ligantes ancorados às proteínas podem ser visualizados na Figura 15.

Figura 15 - *Docking* molecular da quimera e suas porções isoladas com os respectivos carboidratos. As poses representadas referem-se às maiores energias de afinidade ranqueadas no *software* Vina-Carb. A: *docking* da quimera com o antígeno Tn (Tn-Ag) e antígeno T (T-Ag). B: *docking* da quimera com as diferentes configurações de *high mannose*, sendo que Man(n) são *n* manoses. C: *redocking* da porção H84T com a dimanose. D: *docking* da porção XCL com os antígenos T e Tn.



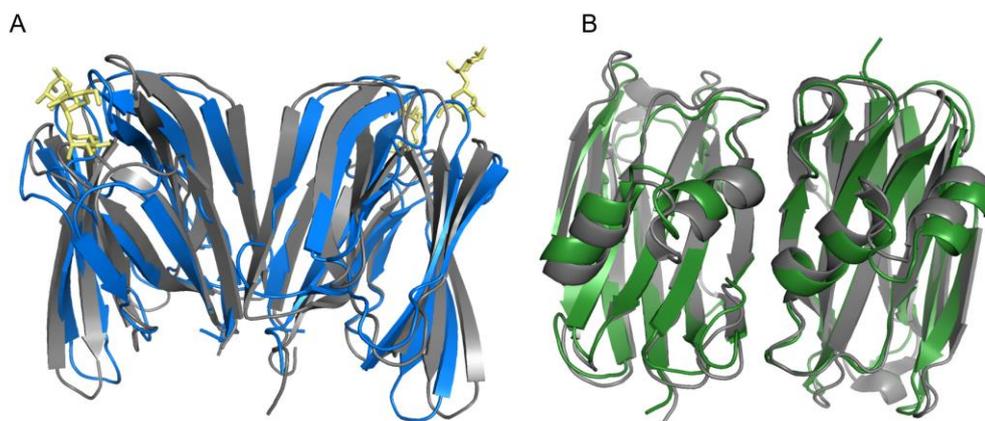


Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

5.1.4. Análise *in silico* do arranjo quaternário

Antes de iniciar a análise de arranjos quaternários, foi realizado o *redocking* no software ClusPro para as porções isoladas da quimera Banlec-H84T e XCL no modo *multimer* (Figura 16). Em seguida, as estruturas resolvidas foram sobrepostas no programa PyMol para obter o valor RMSD. No caso da H84T-Banlec, ao alinhar o modelo gerado pelo ClusPro com a estrutura dimerizada obtida experimentalmente a distância entre os átomos foi de 2,7 Å, um valor aceitável. As cadeias estarem corretamente posicionadas para formar a interface de subunidade também contribui com a confiabilidade da análise. Para a XCL, esse valor foi de 1,9 Å. valores de RMSD são reportados como dentro da normalidade para o modo *multimer* (KOZAKOV et al., 2017).

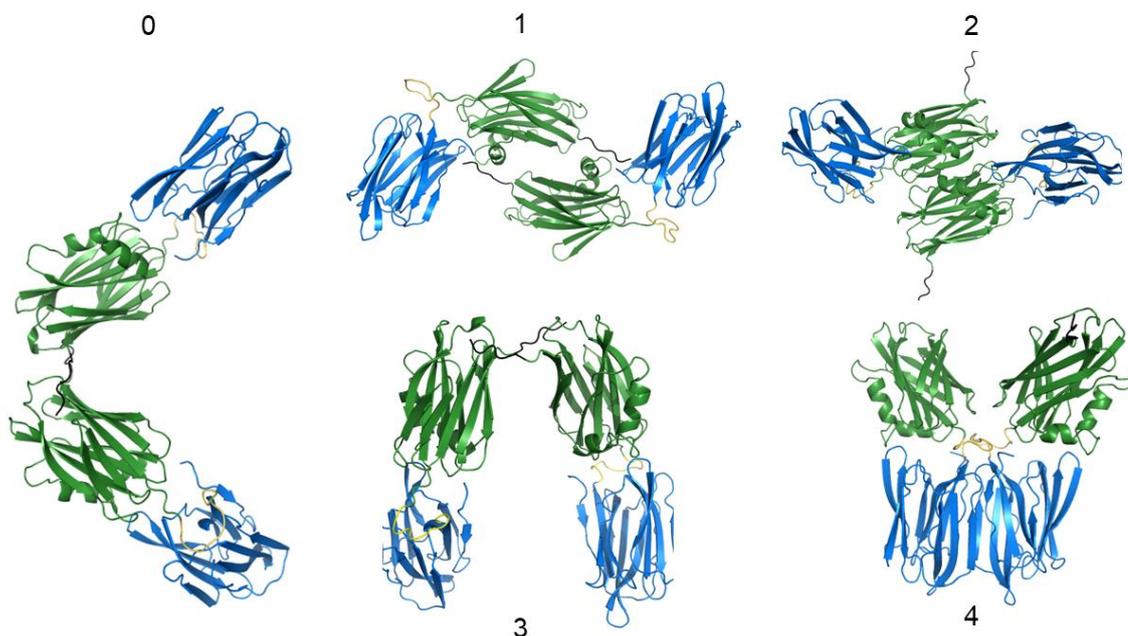
Figura 16 - Validação da dimerização das proteínas isoladas H84T e XCL pelo *software* ClusPro. A: Modelo de dímero da H84T-Banlec gerado pelo ClusPro sobreposto com a estrutura cristalizada PDB ID: 4PIU; B: Modelo de dímero da XCL gerado pelo ClusPro sobreposto com a estrutura cristalizada PDB ID: 1XI0. A sobreposição foi realizada no programa PyMol.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Assim, os cinco primeiros *clusters* gerados para a quimera foram avaliados quanto aos possíveis arranjos da estrutura funcional. A principal interação ocorreu na porção C-terminal entre as caudas de histidina e entre a porção XCL (Figura 17). Apenas um dos 5 maiores *clusters* demonstrou possível dimerização na porção N-terminal (H84T-Banlec). Esses resultados evidenciam que há maior chance de a dimerização estar ocorrendo na interface das subunidades da região C-terminal, mas pode haver dimerização na porção N-terminal. O número de membros e os *scores* de energia utilizados pelo programa estão disponíveis na Tabela IV - Apêndices.

Figura 17 - Análise de dimerização da quimera H84T-XCL pelo *software* ClusPro. Diferentes possíveis arranjos são mostrados em 0, 1, 2, 3 e 4, de acordo com a quantidade de membros do *cluster* e *score*.



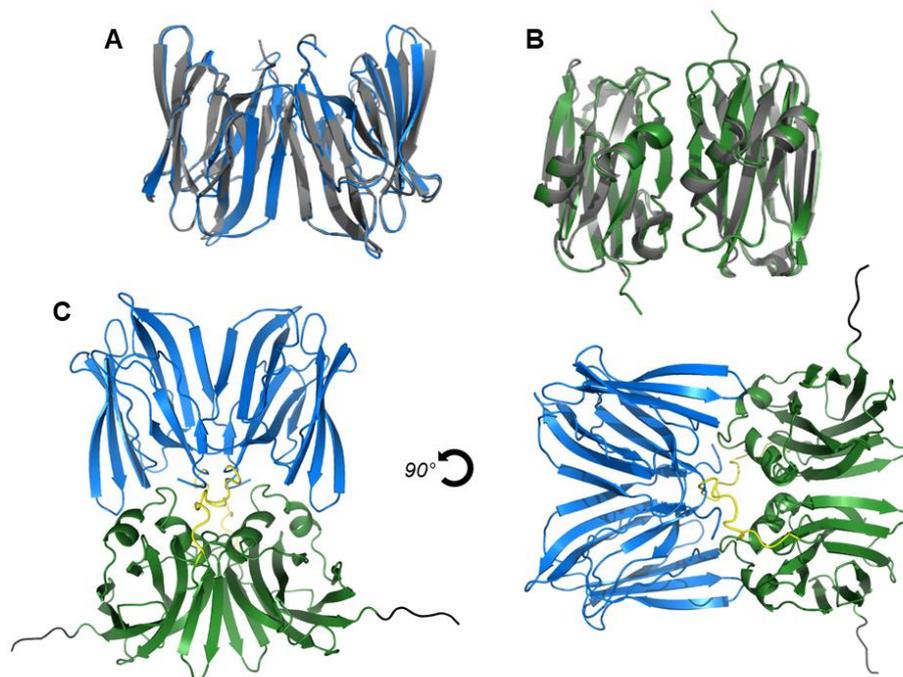
Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Em vista de testar outros algoritmos de *score* e posicionamento, o *software* AlphaFold3 (ABRAMSON et al., 2024) foi utilizado para verificar o possível arranjo funcional da quimera e das lectinas isoladas. É importante destacar que este é um programa destinado originalmente para a modelagem molecular, mas que permite a modelagem de complexos oligoméricos com alta precisão.

As proteínas H84T-Banlec e XCL foram modeladas isoladamente, a fim de a verificar a concordância do complexo oligomérico modelado com a estrutura resolvida através da sobreposição (Figura 18). As proteínas formaram seu arranjo dimérico em conformidade com o reportado para as estruturas resolvidas experimentalmente: o dímero modelado da H84T-Banlec apresentou RMSD de 0,467 em relação à estrutura dimérica resolvida (PDB ID: 4PIU). O dímero modelado XCL apresentou RMSD de 0,373 em relação à estrutura dimérica resolvida (PDB ID: 1XI0). Na Figura 18C, é possível observar a dimerização da quimera onde ambas as lectinas formam sua interface com a proteína correspondente, indicando que seu arranjo favorecido consistiria do que é visto

em estruturas resolvidas e experimentalmente para a H84T-Banlec e XCL (BIRCK et al., 2004; MEAGHER et al., 2005).

Figura 18 - Arranjos dos complexos oligoméricos modelados pelo AlphaFold3. A: H84T-Banlec (azul) sobreposta com PDB ID: 4PIU (cinza); B: XCL (verde) sobreposta com PDB ID: 1XI0 (cinza); C: vista frontal da quimera em arranjo dimérico.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Por fim, testou-se ainda o programa UDock (PLATEAU-HOLLEVILLE et al., 2023), um programa interativo desenvolvido para que o usuário posicione as moléculas e obtenha o *score* de interação (Tabela 6). Diferentemente dos outros programas utilizados, as interfaces são definidas pelo usuário, o que pode tornar laboriosa a busca pela interface mais adequada. Neste sentido, foram testados os posicionamentos previamente reportados para as estruturas resolvidas e, no caso da quimera, pelos *softwares* já utilizados. Os resultados foram semelhantes ao que foi encontrado anteriormente, em que a quimera demonstra maior energia e interação quando a mesma ocorre na porção C-terminal (XCL), em relação à N-terminal (H84T-Banlec).

Tabela 6 - Energias de afinidade (kcal/mol) obtidas no programa UDock em relação à formação da interface proteína-proteína entre as porções da quimera.

Configuração das lectinas	Energia de afinidade
H84T-Banlec (dímero)	-68.44
XCL (dímero)	-77.77
Quimera	
Porção N-terminal (H84T) + porção N-terminal (H84T)	-52.5
Porção C-terminal (XCL) + porção C-terminal (XCL)	-77.83
Porção N-terminal (H84T) + porção C-terminal (XCL)	-82.27

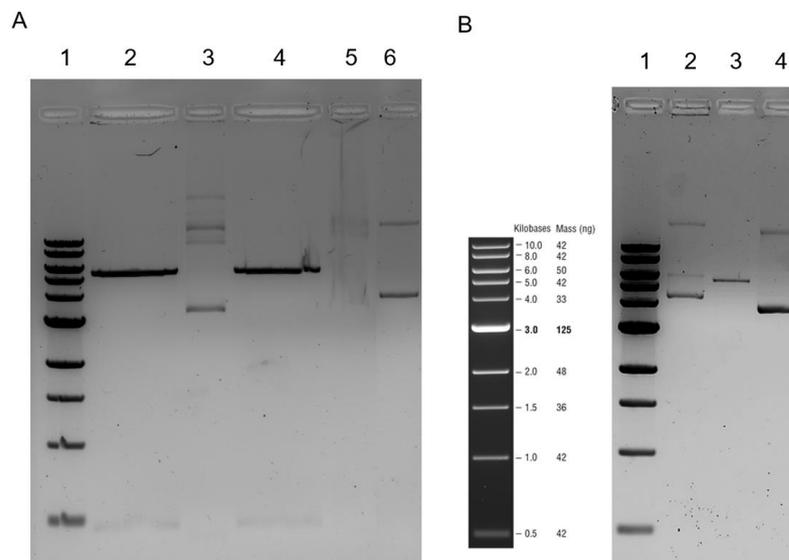
Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

5.2. Obtenção e propagação dos plasmídeos pET-24 quimera e pET-24 XCL

Os plasmídeos se mostraram íntegros após recuperação e transformação na cepa de propagação DH5 α , em que são visualizadas as bandas no tamanho esperado para o plasmídeo contendo o gene da quimera (6131 bp) e para o plasmídeo contendo apenas o gene da XCL (5672 bp). O plasmídeo pET-24 XCL foi tratado com enzima de restrição HindIII, o que permitiu a remoção da sequência da H84T- Banlec (459 bp) (Figura 19A).

A obtenção do plasmídeo contendo apenas a sequência da XCL separada do restante da quimera foi bem-sucedida. É possível verificar o plasmídeo digerido por 30 min (poço 2) e 60 min (poço 4), que contém apenas uma banda em sua forma linear. Os respectivos fragmentos lineares religados com a enzima T4 DNA ligase (poços 3 e 5), demonstradas por fragmentos de tamanhos variados, e o plasmídeo total contendo a sequência da quimera (poço 6). Estes plasmídeos foram obtidos em grandes quantidades através da propagação em DH5 α (Figura 19B). Os fragmentos de diferentes tamanhos dos plasmídeos purificados correspondem aos diferentes enovelamentos apresentados pelo DNA plasmidial. Dependendo do kit utilizado, uma ou mais bandas podem ser visíveis devido ao estado de superenrolamento do plasmídeo. O plasmídeo superenrolado migra mais lentamente, enquanto a forma circular e a forma linear migram mais rapidamente, respectivamente.

Figura 19. Gel de agarose 1% relativo a (A) digestão plasmidial com a enzima de restrição HindIII e (B) obtenção dos plasmídeos a partir da cepa de clonagem DH5 α . A - Poço 1: representa o marcador de peso molecular NEB 1kb plus; 2: digestão por 30 min com a enzima HindIII; 3: ligação das extremidades com T4 DNA ligase; 4: digestão por 60 min, 5: ligação com T4 DNA ligase, 6: plasmídeo não digerido (pET-24 quimera). B: Plasmídeos obtidos pela extração utilizando os kits Mini e Maxiprep (Invitrogen). Poço 1: refere-se ao mesmo marcador de peso molecular, 2: pET-24 quimera extraído com kit Maxiprep; 3: pET-24 XCL extraído com kit Miniprep; 4: pET-24 XCL extraído através do kit Maxiprep.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

5.1. Caracterização da expressão recombinante

Os plasmídeos purificados foram transformados em diversas cepas de expressão derivadas da *E. coli* BL21 (DE3), sendo elas DE (3), STAR, PlysS, SOLU, Rosetta (dados não publicados), RIL e Origami2. A cepa BL21 (DE3) é a cepa mais utilizada para expressão recombinante, mas nem todas as proteínas são expressas em sua forma funcional nesta cepa. Com isso, outras cepas foram criadas a partir da BL21(DE3) por alteração genômica ou incorporação de plasmídeos a fim de melhorar a produção de proteínas recombinantes (Tabela 7). A *E. coli* BL21 (DE3) apresenta a deficiência nos genes *lon* e *ompT*, proteases citoplasmáticas e da membrana externa, respectivamente, o que impede a degradação de proteínas recombinantes nestes dois compartimentos celulares. Além disso, inclui o sistema de expressão T7, baseado no promotor e RNA polimerase T7, que tornam a expressão do gene exógeno bastante controlada e facilitada.

Através das cepas tradicionalmente utilizadas derivadas da BL21(DE3) obtivemos as proteínas de forma insolúvel. A cepa STAR possui modificações no gene *rne131*, que diminui os níveis de RNAses e a degradação de mRNA. A cepa pLysS possui um plasmídeo especial que diminui a expressão basal de outros processos celulares e disponibiliza tRNAs para códons raros. A cepa SOLU produz uma maior quantidade de proteínas solúveis e aceita transformação com DNA metilado. Os genes da cepa Rosetta produzem tRNAs para códons raros geralmente não produzidos em *E. coli*, possibilitando uma tradução universal. A cepa RIL teve os genes *argU*, *ileY* e *leuW* inseridos, o que possibilita uma maior disponibilidade de tRNAs que reconheçam os códons para arginina, leucina e isoleucina. A cepa Origami foi modificada para possibilitar o enovelamento de proteínas que contém pontes dissulfeto pela adição dos genes das enzimas tioredoxina redutase (*trxR*) e glutatona redutase (*gor*) ao seu genoma, que aumentam a formação de pontes dissulfeto no citoplasma.

Tabela 7 - Características das diferentes cepas utilizadas para a expressão recombinante das lectinas quimera, H84T e XCL.

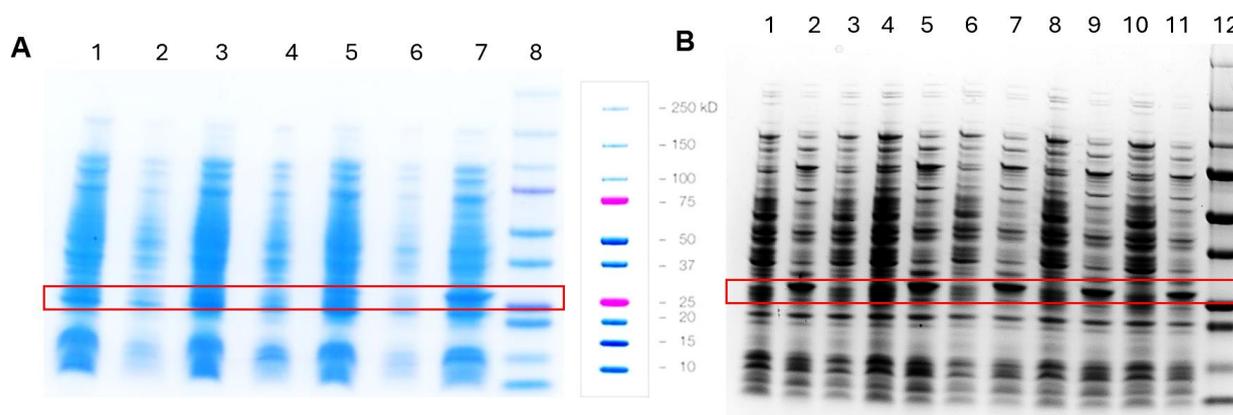
Cepa	Gene	Característica
STAR	<i>lon⁻</i> , <i>ompT⁻</i> , <i>rne131</i> , <i>hsdS</i>	melhora na transformação de DNA não-metilado, redução da degradação de proteínas pela deficiência de proteases, níveis reduzidos de RNAses e maior estabilidade de mRNA
pLysS	<i>lon⁻</i> , <i>ompT⁻</i> , plasmídeo pLysSRARE, <i>hsdS</i>	plasmídeo que diminui a expressão basal, melhora na transformação de DNA não-metilado, redução da degradação de proteínas pela deficiência de proteases
SOLU	<i>ompT⁻</i> , <i>hsd SB (rB- mB-)</i>	maior quantidade de proteínas solúveis produzidas, melhora na transformação de DNA metilado
Rosetta	multiple mutations	disponibilidade de tRNAs códons raros de arginina, isoleucina, leucina e glicina, possibilitando tradução universal
RIL	<i>argU</i> , <i>ileY</i> , <i>leuW</i>	disponibilidade de tRNAs para os códons arginina, leucina e isoleucina

Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Teste de colônia

As cepas RIL e Origami foram testadas tanto para a quimera quanto para a XCL. A cepa Origami provou expressar a quimera em maiores quantidades, visto pela banda proeminente no gel de SDS-PAGE (Figura 20). Ainda assim, a cepa RIL foi considerada nos experimentos seguintes a fim de determinar se a temperatura e tempo de indução interfeririam na produção recombinante e elegeu-se a colônia 3; no caso da cepa Origami, foi escolhida a colônia 2.

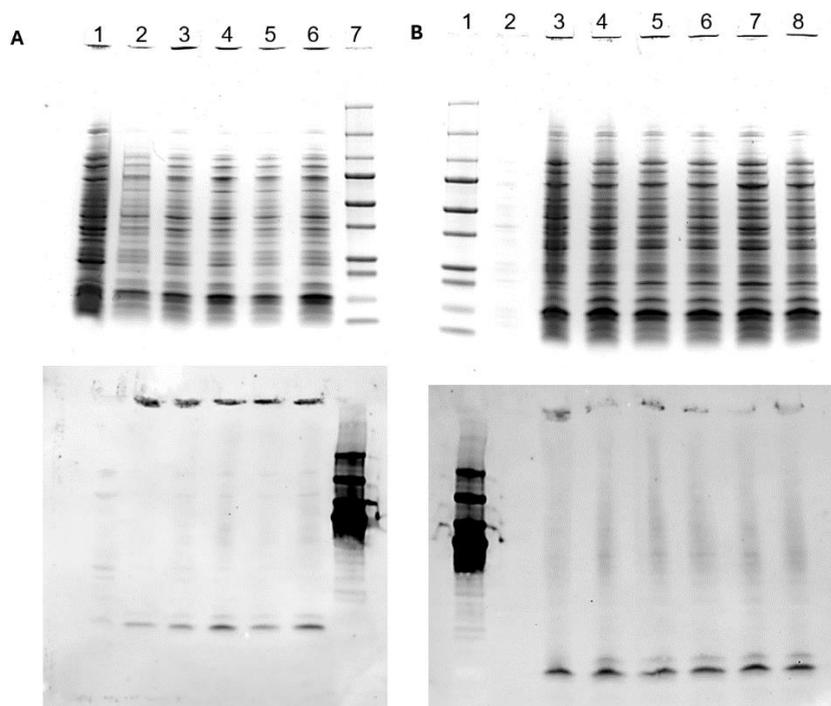
Figura 20 - Teste de colônia com as cepas RIL (A) e Origami (B). O quadrado vermelho denota a região do marcador de peso molecular entre 25 e 37 KDa, onde pode ser encontrada a quimera recombinante (32 KDa). A: Teste de expressão com a cepa RIL. Poço 1: Colônia 1 não induzida; 2: colônia 1 induzida; 3: colônia 2 não induzida; 4: colônia 2 induzida; 5: colônia 3 não induzida; 6: colônia 3 induzida B: Teste de expressão com a cepa Origami. Poço 1: Extrato celular da bactéria não transformada; 2: Colônia 1 induzida com 1 mM de IPTG; 3: Colônia 1 não induzida; 4: Colônia 2 não induzida; 5: Colônia 2 induzida; 6: Colônia 3 não induzida; 7: Colônia 3 induzida; 8: Colônia 4 não induzida; 9: Colônia 4 induzida; 10: Colônia 5 não induzida; 11: Colônia 5 induzida; 12: Marcador de peso molecular BioRad All Blue 1KB.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Em relação à XCL, a mesma metodologia foi utilizada (Figura 21) realizando-se WB com anti-Histag para comprovar a produção da proteína. Escolheu-se continuar os testes apenas com a colônia 5 da cepa RIL.

Figura 21 - Teste de colônia com as cepas RIL e Origami. A XCL recombinante possui 15 kDa. (A) Gel SDS-PAGE e WB da expressão na cepa RIL. Poço 1: RIL não transformada; 2: colônia 1 induzida; 3: colônia 2 induzida; 4: colônia 3 induzida; 5: colônia 4 induzida; 6: colônia 5 induzida 7: Marcador de peso molecular BioRad 1Kb plus. (B) Gel SDS-PAGE e WB da expressão na cepa Origami. Poço 1: Marcador de peso molecular; 2: Origami não transformada; 3: Colônia 1 não induzida; 4: Colônia 1 induzida; 5: Colônia 2 induzida; 6: Colônia 3 induzida; 7: Colônia 4 induzida; 8: Colônia 5 não induzida.

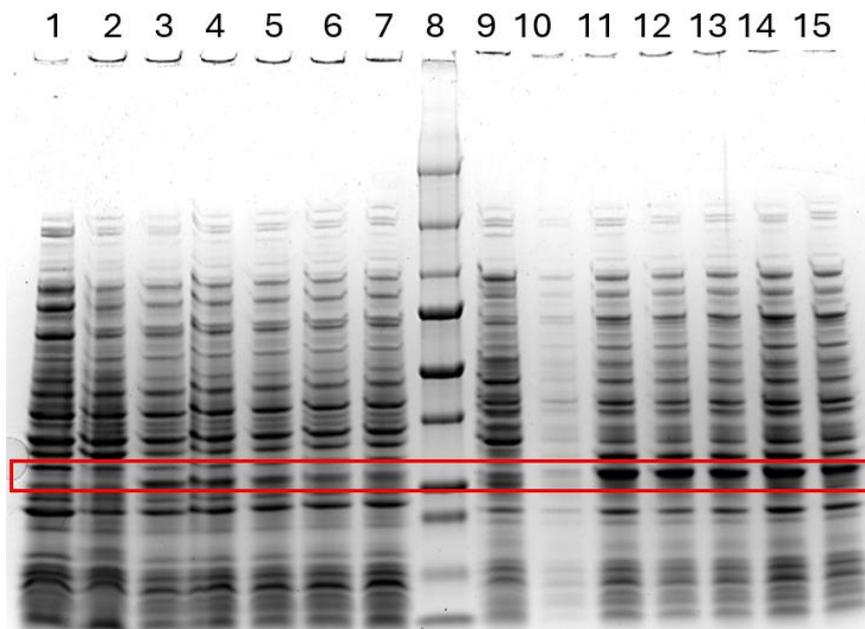


Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Concentração de IPTG

Diferentes concentrações de IPTG podem afetar a produção de proteínas recombinantes, como é possível observar na Figura 22. Além do teste com diferentes cepas, um teste de indução com diferentes concentrações de IPTG foi realizado nas cepas RIL e Origami da quimera H84T-XCL. As concentrações de IPTG utilizadas foram de 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,062 mM. Quanto menor a concentração do análogo à lactose, menor a quantidade de proteína expressa, especialmente no caso da cepa RIL. No caso da cepa Origami, menos de 1 mM de IPTG parece não afetar a expressão. Assim, a cepa Origami foi determinada como melhor cepa para expressão por apresentar maior produção da quimera recombinante.

Figura 22 - Gel de SDS-PAGE contendo as cepas transformadas de RIL (à esquerda do marcador de peso molecular) e Origami (à direita do marcador de peso molecular), testadas com diferentes concentrações de IPTG, entre 1 e 0,062 mM. O quadrado vermelho denota o marcador de peso molecular entre 25 e 37 KDa. A quimera recombinante tem massa de 32 KDa. Poço 1: RIL não transformada; 2: RIL não induzida; 3: indução com 1 mM; 4: 0,5 mM; 5: 0,25 mM; 6: 0,125 mM; 7: 0,062 mM. 8: marcado de peso molecular BioRad 1kb plus All Blue. 9: Origami não transformada; 10: Origami não induzida; 11: indução com 1 mM; 12: 0,5 mM; 13: 0,25 mM; 14: 0,125 mM; 15: 0,062 mM.

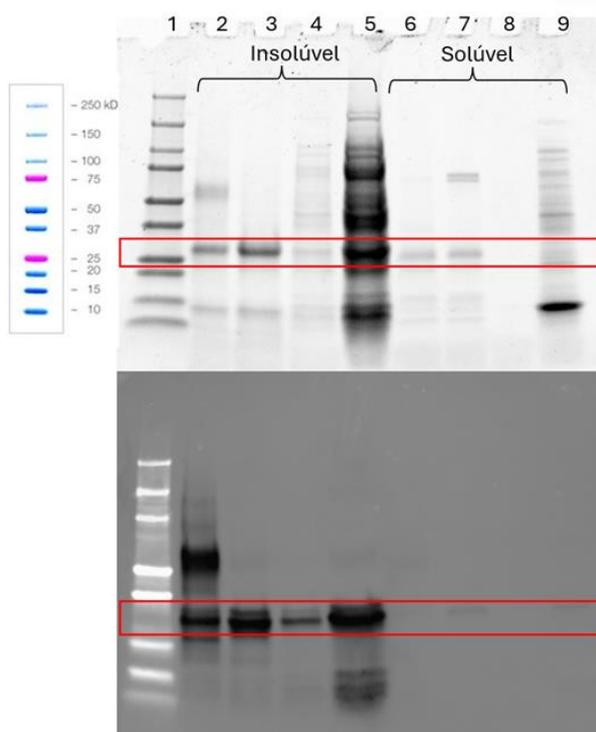


Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Temperatura de indução

A temperatura de indução pode interferir na expressão de proteínas recombinantes, fazendo com que seus produtos sejam mais ou menos expressos, ou ainda expressos em formas truncadas. Foram testadas as temperaturas de indução de 37 °C por 5 h (Figura 23) e 16 °C *overnight* (Figura 24), conforme reportado na literatura para a produção de H84T e XCL, respectivamente. Todas as etapas de produção foram caracterizadas. A purificação das frações solúvel e insolúvel revelou que a quimera é produzida majoritariamente nos corpos de inclusão, sendo obtida após uso de ureia 8 M. A proteína também é encontrada no *flowthrough*. Esse perfil se repetiu nos dois protocolos de temperatura. Quando induzida a 16 °C *overnight* na cepa RIL, a fração solúvel apresentou maior quantidade de proteínas, enquanto no mesmo protocolo a cepa Origami não apresentou quantidades significativas de quimera solúvel.

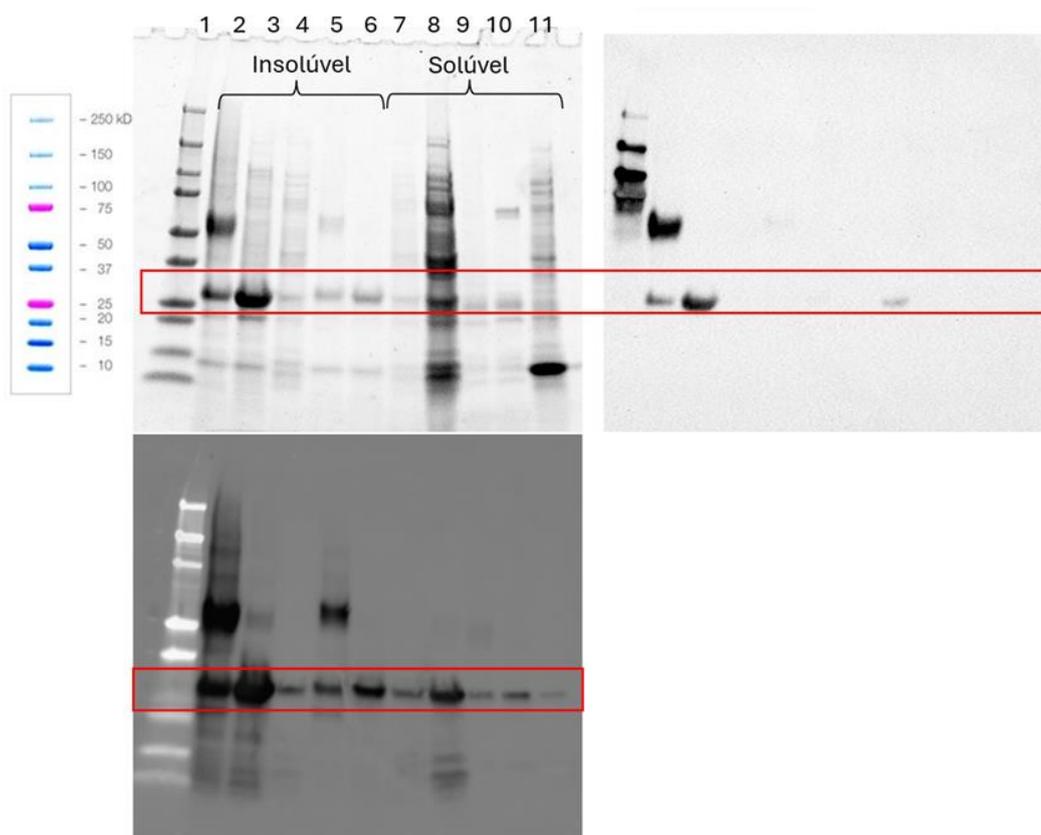
Figura 23 - Indução da expressão recombinante da quimera na cepa RIL a 37 °C por 5h, representada por gel de SDS-PAGE e o respectivo Western Blot. A: Expressão a 37 °C por 5h. Poço 1: Marcador de peso molecular BioRad Dual Color Plus; 2 e 3: fração insolúvel após purificação na ausência e presença do agente desnaturante, respectivamente; 4: lavagem da coluna; 5: *flowthrough*; 6 e 7: fração solúvel após purificação, na presença e ausência do agente desnaturante, respectivamente. 8: lavagem; 9: *flowthrough* da fração solúvel. O painel inferior representa o WB das mesmas amostras utilizando o anticorpo anti-Banlec.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Além da quantidade reduzida de proteína na fração solúvel, outro resultado interessante foi o reconhecimento das frações insolúveis exclusivamente pelo anticorpo anti-histag, algo que foi observado para ambas as cepas (Figura 24). As amostras eluídas na fração solúvel produzida pela cepa RIL só foram reconhecidas pelo anticorpo anti-Banlec (painel inferior), com exceção da banda detectada no *flowthrough*, que também foi detectada fracamente pelo anticorpo anti-histag. Em contraste, a maior parte da quimera recombinante armazenada nos corpos de inclusão em ambas as cepas foi detectada com o anticorpo anti-Histag.

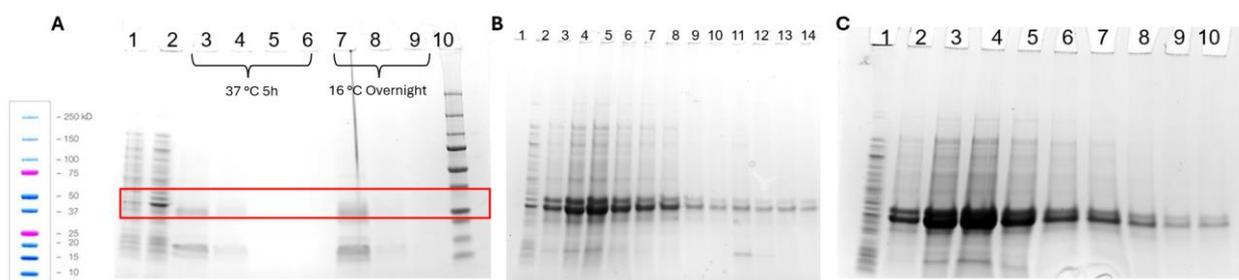
Figura 24 – Caracterização da expressão da quimera a 16 °C overnight na cepa RIL. Poço 1: Marcador de peso molecular; 2 e 3: fração insolúvel após purificação na ausência e presença do agente desnaturante, respectivamente; 4: lavagem; 5 e 6: fração insolúvel após purificação na ausência e presença do agente desnaturante; 7: outra lavagem da fração solúvel; 8: *flowthrough* da fração insolúvel; 9 e 10: fração solúvel na ausência e presença do agente desnaturante; 11: *flowthrough* da fração solúvel. O painel à direita do gel representa o WB das mesmas amostras utilizando o anticorpo anti-histag, já o painel inferior representa o WB das mesmas amostras utilizando o anticorpo anti-Banlec.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Ao analisar o perfil de purificação da quimera na cepa Origami, fica evidente uma maior quantidade de proteínas produzidas nesta cepa, principalmente no protocolo de 16 °C *overnight* (Figura 25). Com base nestes resultados, pode-se concluir que a quimera é expressa em maiores quantidades quando induzida *overnight* a 16 °C na cepa Origami.

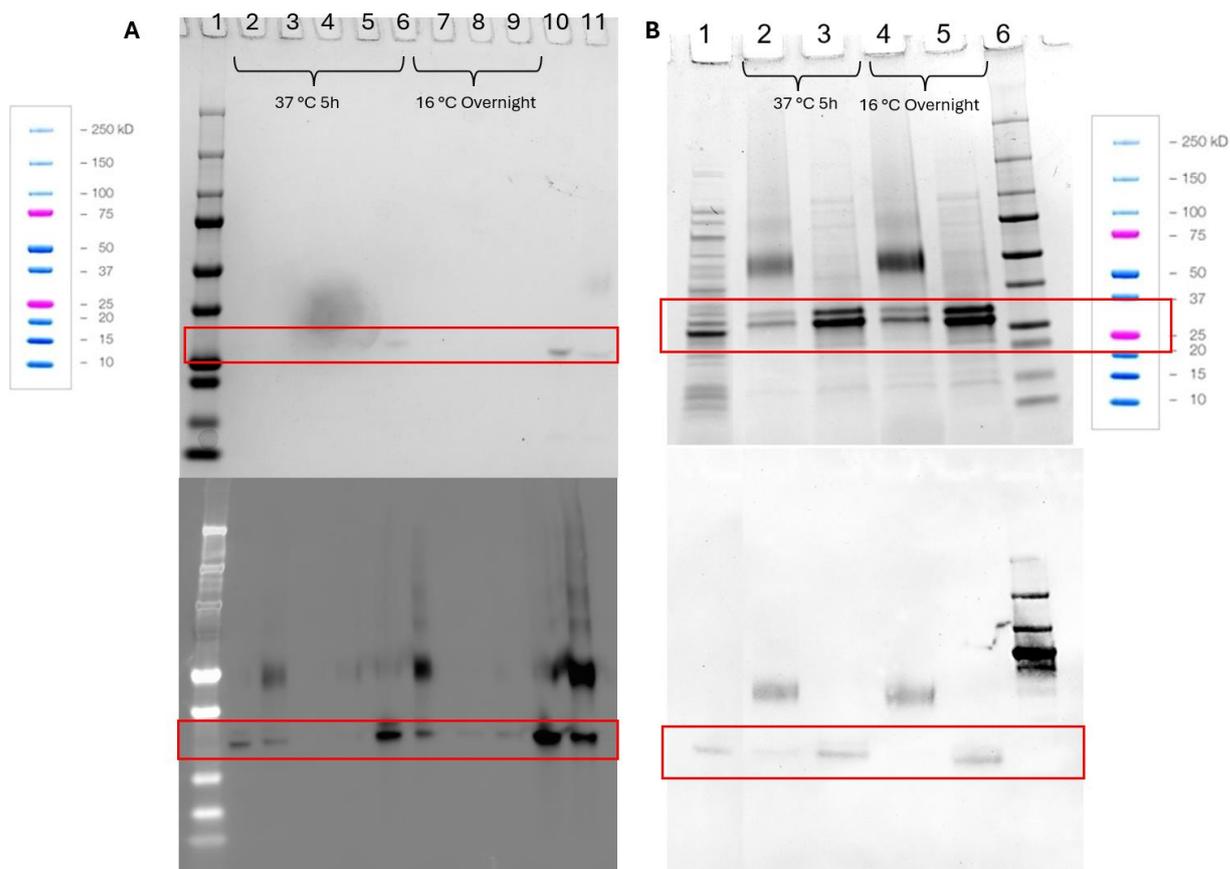
Figura 25 – Perfil de purificação da quimera recombinante na cepa Origami em diferentes temperaturas. (A) Fração solúvel referentes a cada um dos protocolos de temperatura testados. Poço 1: extrato da cepa Origami não transformada; 2: extrato total da cepa induzida com 1 mM de IPTG; os poços restantes representam a eluição sequencial em cada um dos protocolos de temperatura. (B) Fração insolúvel obtida da indução a 37 °C por 5h. Poço 1: extrato de *E. coli* Origami induzida com 1 mM de IPTG; os poços restantes representam a eluição sequencial da fração insolúvel. (C) Fração insolúvel obtida da indução a 16 °C overnight. Poço 1: extrato de *E. coli* induzida com 1 mM de IPTG; os poços restantes representam a eluição sequencial da fração insolúvel.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Após a diálise em D-PBS (Figura 26), observou-se que a estrutura e os arranjos quaternários foram mantidos, conforme avaliado utilizando β -mercaptoetanol como agente desnaturante. Os arranjos formados pela proteína na presença e ausência do agente desnaturante apontam para a formação de dímeros de 64 kDa em ambas as cepas e temperaturas de indução, mesmo após a retirada da ureia na diálise. É importante ressaltar que o mesmo padrão de bandas da fração solúvel na cepa RIL é observado para a fração insolúvel.

Figura 26 - Visualização da quimera após diálise produzida em 2 diferentes temperaturas e cepas por gel SDS-PAGE (painel superior) e WB (painel inferior). A: Quimera produzida pela cepa RIL, onde apenas as proteínas insolúveis podem ser visualizadas no gel, com e sem agente desnaturante, respectivamente. No painel inferior, WB utilizando anticorpo anti-Banlec permite visualizar todas as proteínas obtidas. Poço 1: Marcador de peso molecular BioRad Dual Color Plus; 2 - 7: quimera 37 °C por 5h, com e sem agente desnaturante, sendo os poços 2-3 e 6-7 referentes à fração insolúvel. 8 e 9: quimera solúvel induzida overnight a 16°C, com e sem agente desnaturante. 10 e 11: quimera insolúvel no protocolo overnight nas mesmas condições. B: Quimera produzida pela cepa Origami na fração insolúvel induzida 37 °C por 5h (poços 2 e 3) ou overnight 16 °C (poços 4 e 5). No painel inferior, WB com anticorpo anti-histag.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

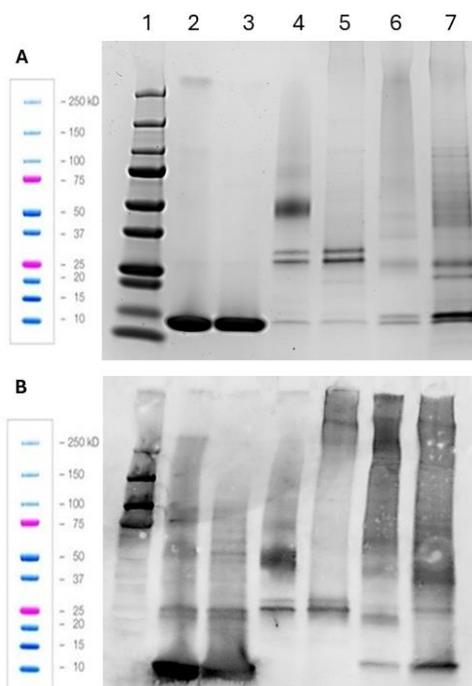
5.2. Expressão e purificação das proteínas recombinantes quimera e XCL em *E. coli*

Com a caracterização da melhor forma de produção da quimera H84T-XCL, concluiu-se que a quimera é expressa em maiores quantidades na cepa Origami, com indução *overnight* a 16 °C, sem perder a habilidade de formação seu arranjo quaternário após a remoção da ureia. No caso da XCL, a cepa utilizada foi RIL e as condições de indução ideais foram *overnight* a 16 °C, com a mesma concentração de agente indutor

(Figura 27). A massa molecular da quimera é 32 kDa, enquanto a H84T-Banlec apresenta aproximadamente 15 kDa e a XCL, 16 kDa.

Na ausência de agentes desnaturantes, é possível observar duas bandas na quimera dialisada: uma de 32 kDa e outra próxima do marcador de 50 kDa, o que corrobora com a formação de um dímero de 64 kDa. Já no caso da XCL, uma banda de 30 kDa é observada na ausência do agente redutor. Este padrão está de acordo com o reportado na literatura para ambas as proteínas (BIRCK et al., 2004; SWANSON et al., 2015). A maior porção de quimera e XCL é recuperada após tratamento com 8M de Ureia, estando solúvel e funcional após diálise em D-PBS e em concentrações suficientes para sua aplicação em posteriores testes.

Figura 27 - Análise bioquímica do arranjo estrutural da quimera, XCL e H84T em tampão D-PBS. (A) SDS-PAGE e (B) Western Blot da quimera e suas proteínas componentes (H84T e XCL) em comparação com BSA (1 mg/ml). Poço 1: Marcador de peso molecular BioRad Dual Color Plus; 2 e 3: H84T em condições não desnaturantes e desnaturantes; 4 e 5: quimera em condições não desnaturantes e desnaturantes (presença de beta-mercaptoetanol no tampão de amostra), respectivamente; 6 e 7: XCL em condições não desnaturantes e desnaturantes. O anticorpo primário utilizado foi anti-histidina (1:10000) e secundário anti-mouse (1:10000), sendo a membrana revelada com o composto quimioluminescente Pierce ECL Western Blotting Substrate™.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

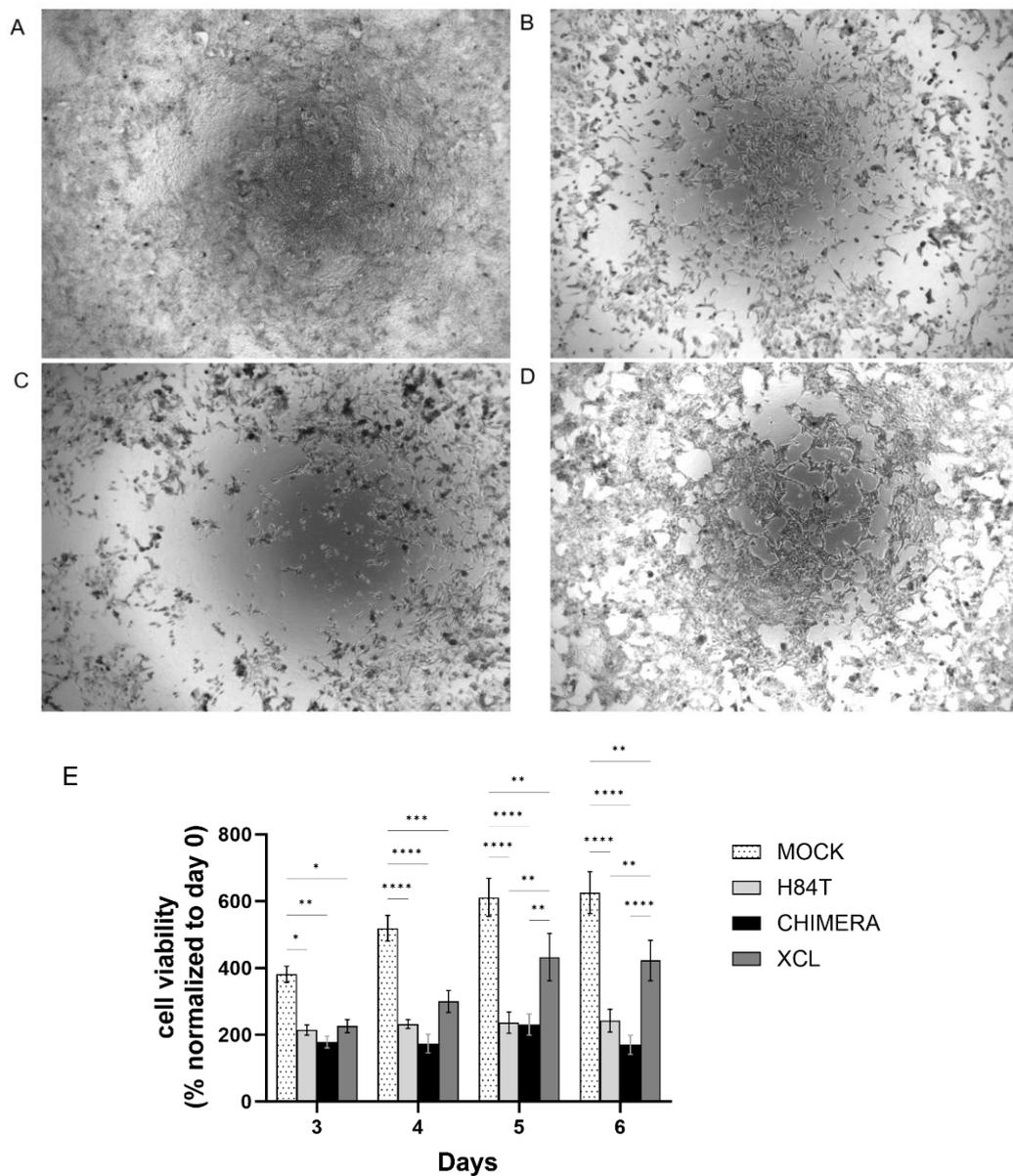
A partir dos perfis obtidos da expressão das proteínas e considerando que as cepas possuem diferentes características genéticas que auxiliam no enovelamento proteico, algumas questões ainda devem ser melhor elucidadas: (1) a presença de uma banda de aproximadamente 30 kDa na produção pela cepa Origami; (2) a banda em torno de 15 kDa, produzida em ambas as cepas e reconhecida no *Western Blot* quando utilizado o anticorpo anti-Banlec, fruto possivelmente de alguma clivagem; e por fim, (3) a incapacidade do anticorpo anti-Histag de reconhecer a quimera produzida na fração solúvel. Uma possível explicação é o dobramento incorreto, que pode interferir no reconhecimento da cauda de histidina. Isso é sugerido pelo fato de que na fração solúvel apenas o anticorpo anti-Banlec reconheceu a proteína, sendo a mesma encontrada no *flowthrough*. É possível que esse resultado possa estar relacionado com a formação da interface proteína-proteína, vista no *docking* da quimera no programa ClusPro, onde as regiões C-terminais contendo a cauda de histidina estão envolvidas na interação.

5.1. Atividade antiproliferativa

5.1.1. Cultivo 2D

Avaliamos a atividade antiproliferativa da quimera e seus constituintes isolados (H84T ou XCL) *in vitro*. Observamos um efeito significativo de morte celular a partir do terceiro dia de ensaio semelhante ao observado para H84T, alcançando o valor máximo de morte celular nos dias cinco e seis após o tratamento (Figura 28). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada pelo teste de MTT em 3 ensaios independentes. O efeito de 10 μ M da quimera demonstrou maior atividade antiproliferativa no dia 6 em relação às proteínas testadas isoladamente, porém, é estatisticamente igual ao efeito da H84T isoladamente. Nestes ensaios, a XCL isolada apresentou moderada atividade antiproliferativa em relação às outras duas proteínas.

Figura 28 - Ensaio de proliferação celular em células de câncer de pâncreas CFPAC-1. As proteínas foram incubadas com as células por até 6 dias, quando foram capturadas as imagens em magnificação 4x (EVOS Microscope, Invitrogen). A: Controle de tratamento apenas com D-PBS. B: H84T. C: Quimera. D: XCL. As concentrações são de 10 uM considerando as proteínas funcionais como dímeros. Imagens obtidas através do microscópio EVOS™ (Invitrogen). E: Porcentagem da viabilidade celular normalizada em relação ao dia 0. Lectinas testadas a 10 uM. Média de 3 experimentos independentes utilizando triplicatas dos tratamentos e considerando a quimera ativa como um dímero, na concentração de 10 µM. Os dados foram gerados no programa GraphPad aplicando 2-way ANOVA e teste post hoc de Tuckey. Os asteriscos indicam diferença estatística significativa entre os grupos (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001); as barras de erro foram geradas a partir do erro padrão da média (SEM).

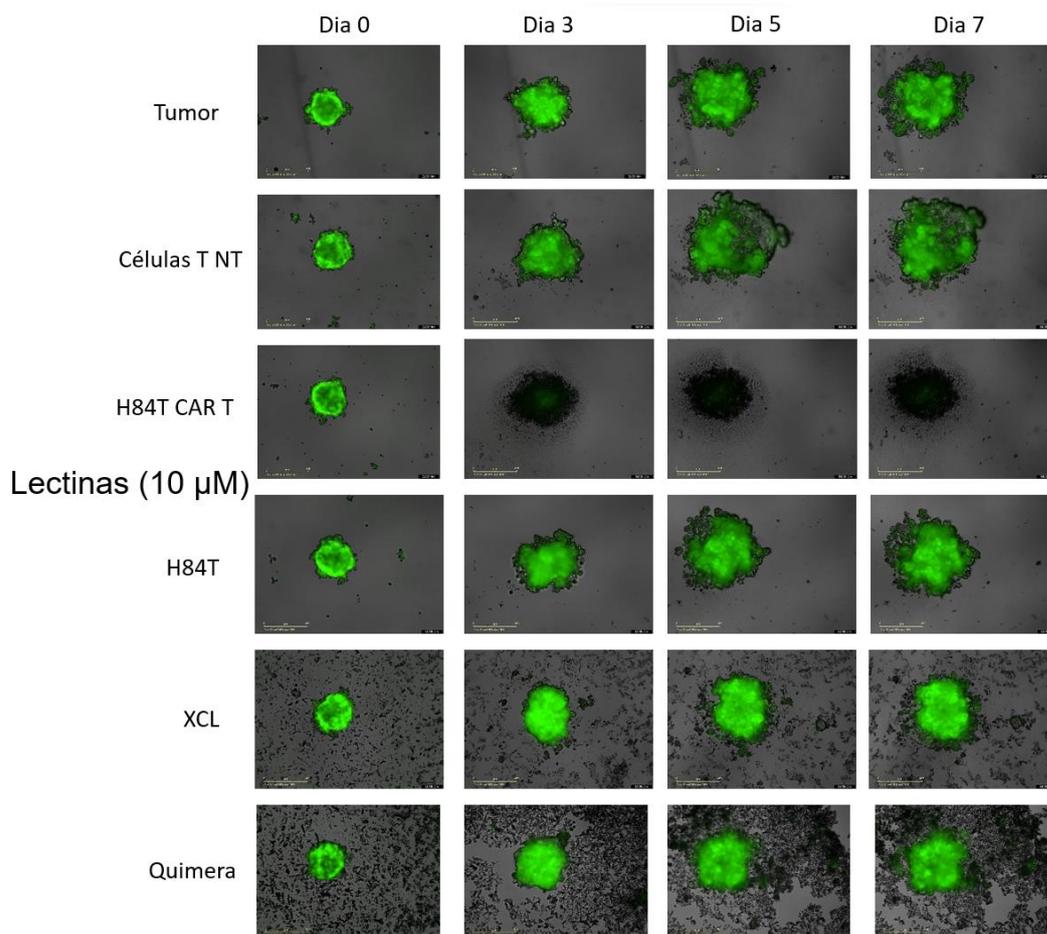


Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

5.1.2. Cultivo 3D

Em seguida, foi avaliada a atividade antiproliferativa das lectinas a cultivos 3D das células CFPAC-1 (mesma linhagem utilizada no cultivo 2D) e PANC-1, acrescidas de células pancreáticas esteladas (PSCs). Este ensaio foi realizado em um laboratório parceiro do Laboratório Markovitz. O tamanho dos esferoides foi avaliado por 7 dias em relação ao controle positivo CAR T H84T (Figura 29) (MCKENNA et al., 2023). Notamos uma pequena redução no tamanho do tumor das células CFPAC-1 no sétimo dia nos tratamentos com a quimera e XCL em relação aos controles não tratados e células T NT, porém, não foram realizadas medições além da fluorescência GFP. A atividade antiproliferativa da XCL não demonstrou redução no tamanho esferoide em nenhum tipo celular.

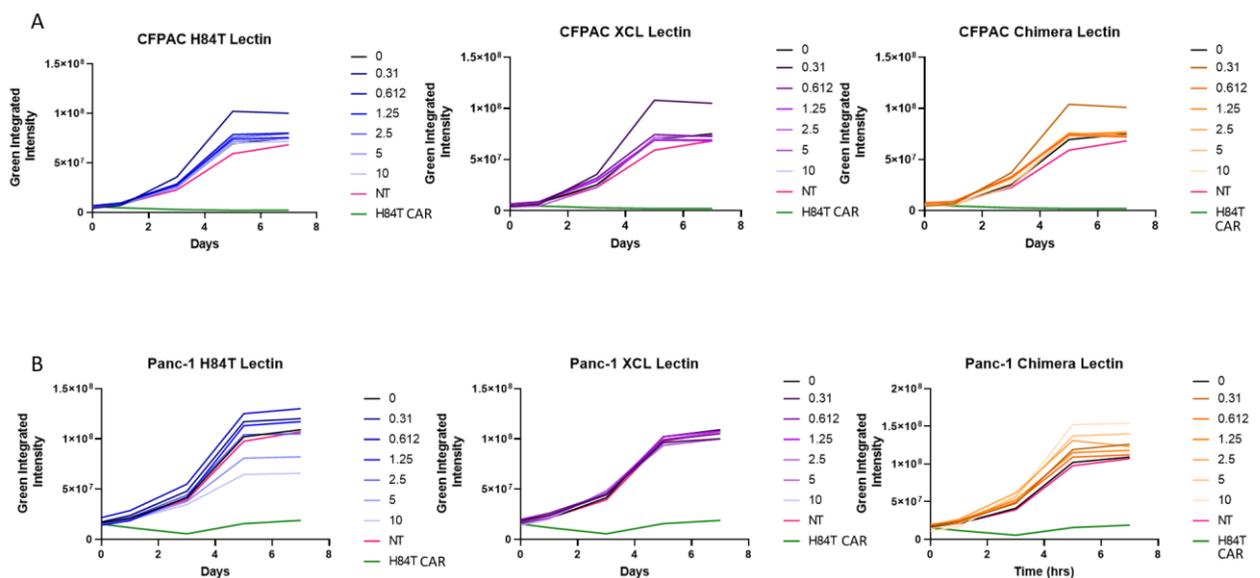
Figura 29 - Avaliação da atividade antiproliferativa das lectinas em esferoides da linhagem de câncer de pâncreas CFPAC-1. A coloração verde indica a fluorescência detectada com GFP. As células CFPAC-1 foram tratadas com as lectinas (10 μ M) por até 7 dias. O controle positivo utilizado foi a construção CAR T cell H84T-Banlec. NT: células T não transduzidas.



Fonte: imagem concedida por Mary McKenna (2023).

As células de cultivo 3D são modificadas para produzir GFP, sendo possível associar um baixo nível de fluorescência verde à menor viabilidade celular (MCKENNA et al., 2023). Apenas o controle positivo CAR T H84T que causou redução substancial da formação dos tumores e PSCs pela redução na intensidade da fluorescência verde e, conseqüentemente, no número de células viáveis em ambas as linhagens celulares. Mesmo a H84T, que em cultivo 2D demonstra acentuada atividade antiproliferativa, demonstrou moderada redução do crescimento das células PANC-1 (Figura 30B). No tratamento das células PANC-1, a lectina quimérica parece estimular a proliferação pelo aumento da fluorescência detectada, enquanto as células CFPAC-1 não demonstraram nenhuma redução. A atividade antiproliferativa da XCL não demonstrou redução da fluorescência em relação ao controle em nenhum tipo celular.

Figura 30 - Intensidade da fluorescência de GFP após tratamento das células de câncer de pâncreas e do estroma (A) CFPAC-1 e (B) PANC-1 com as lectinas. As proteínas foram incubadas com as células por até 7 dias e a intensidade foi medida no equipamento Incucyte Live imaging™. As linhas coloridas referem-se às diluições realizadas com a proteína em estudo e o controle positivo utilizado foi a construção CAR T cell H84T-Banlec. NT: células T não transduzidas.



Fonte: imagem concedida por Mary McKenna (2023).

Uma possível explicação pode ser a dificuldade das proteínas se infiltrarem no esferoide, onde as células tumorais estão protegidas pela arquitetura das PSCs. As PSCs apresentam um conteúdo de *high mannose* menor que as células tumorais; ainda

assim, representam em torno de 75% dos N-glicanos expressos (McKenna et al., 2023), podendo ser sua atividade prejudicada pelo fato de não conseguirem interagir adequadamente com as células tumorais em si.

5.2. Determinação das vias de ação

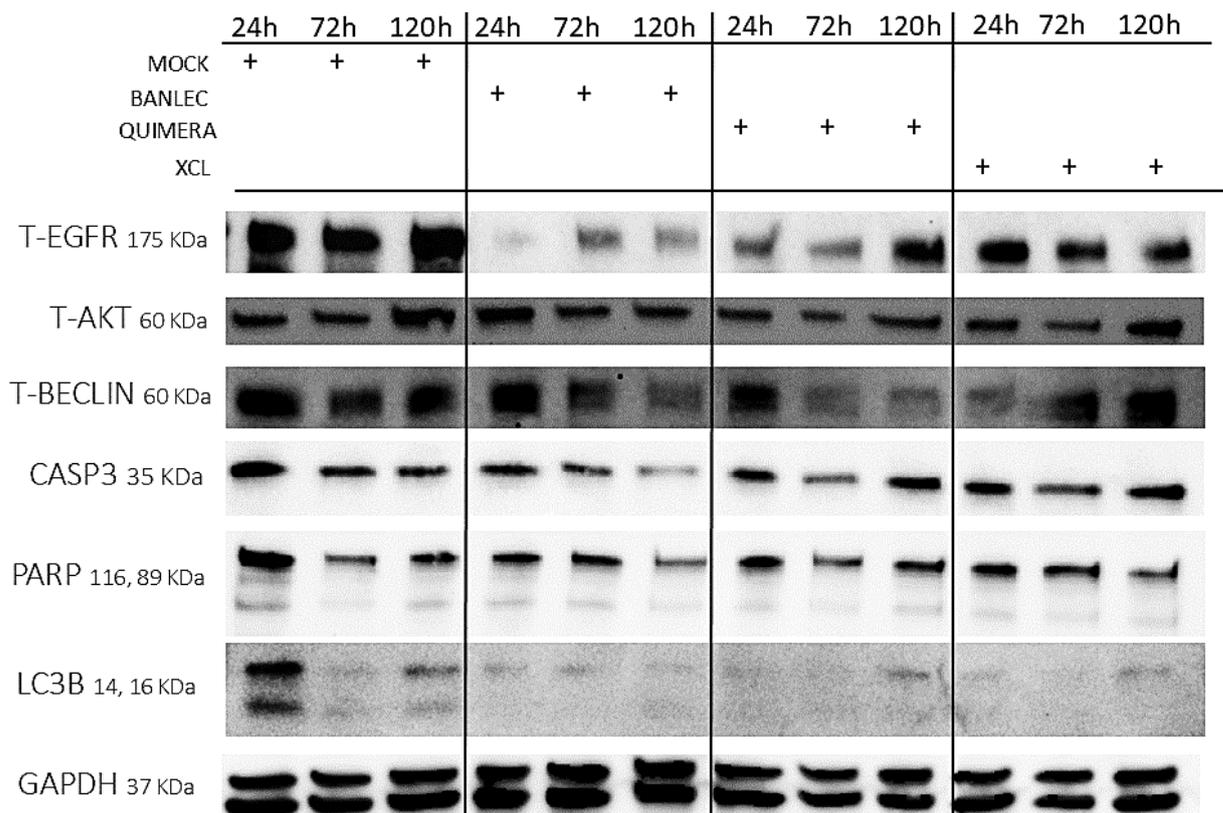
A fim de elucidar por qual mecanismo a quimera induz a morte celular, empregou-se uma série de proteínas marcadoras das vias de apoptose e autofagia. As proteínas analisadas que revelaram resultados distintos entre os tratamentos foram EGFR total (T-EGFR), Beclin-1 total (T-BECLIN), LC3B e Caspase-3 (CASP3) não clivada. Estas proteínas estão envolvidas em vias já conhecidas de morte celular causadas por lectinas (BARRE et al., 2019; BHUTIA et al., 2019). Os tratamentos com as proteínas H84T-Banlec e XCL isoladas e a quimera mostram diferenças marcantes entre si e em relação ao controle (Figura 31). Essa análise é de extrema importância, pois há indicação de que a quimera age de forma diferente das proteínas isoladas. Entretanto, o mecanismo de morte celular envolvido na atividade antiproliferativa da quimera ainda deve ser estudado em profundidade.

EGFR é um dos principais iniciadores de uma complexa cascata de sinalização celular que estimula a proliferação tumoral e metaplasia, sendo essencial para o desenvolvimento tumoral dependente do oncogene KRAS e pode ativar ambas as vias de morte celular. No câncer de pâncreas, o EGFR está superexpresso, embora não apresente as mutações-alvo dos inibidores de tirosina quinases (MAITRA; HRUBAN, 2008; PELOSI; CASTELLI; TESTA, 2017). EGFR é um receptor de membrana altamente N-glicosilado que apresenta *high mannose* em abundância. Sabe-se que a H84T-Banlec se liga a este receptor em câncer de pulmão e diminui os níveis de EGFR total e fosforilado significativamente, ativando a via autofágica. Isso está de acordo com o resultado obtido, em que os níveis de T-EGFR se encontram drasticamente diminuídos no tratamento com H84T-Banlec. A ação da H84T-Banlec acarreta na fosforilação da AKT, diminuindo sua forma ativa fosforilada de forma significativa, mas sua forma total permanece praticamente inalterada (CHAN et al., 2024), o que também observamos em todos os tratamentos.

A quimera induziu diminuição significativa nos níveis totais de EGFR até 72h, demonstrando que a porção H84T pode estar atuando na fase inicial de morte celular. A

XCL apresentou um perfil distinto das outras duas lectinas, sem interferência relevante nos níveis de T-EGFR, o que era esperado pelo seu mecanismo de atuação de rompimento da adesão celular (MARTY-DETRAVES et al., 2004). Outra lectina, POL, foi capaz de ativar tanto apoptose quanto autofagia em linhagens de câncer de mama e pulmão através da via mitocondrial e da inibição da sinalização Ras-Raf-MEK-ERK, mediada por EGFR (WU et al., 2016). Isso pode indicar um mecanismo de controle e interação entre as duas vias distinto. A lectina de *Phaseolus acutifolius*, específica para manose, induziu a apoptose pela diminuição dos níveis de EGFR total e fosforilado em células de câncer de cólon (DENA-BELTRÁN et al., 2023).

Figura 31 - Avaliação do mecanismo de morte celular através de proteínas presentes no extrato celular das células de câncer de pâncreas CFPAC-1. Foram analisados marcadores comumente empregados para detecção de autofagia e apoptose em três *timepoints*: EGFR total (T-EGFR), AKT total (T-AKT), Beclin-1 total (T-BECLIN), Caspase-3 (CASP3) não clivada, PARP e LC3B (a banda de 16 kDa representa LC3-I e a banda de 14 kDa LC3). A proteína GAPDH foi utilizada como controle.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Beclin-1 é um dos primeiros iniciadores da cascata autofágica e tem uma regulação intrincada com efetores de outras vias e apresenta-se em altos níveis no câncer de pâncreas, justamente devido ao processo autofágico reciclar componentes intracelulares e manter a proliferação tumoral (GILLSON et al., 2022). No caso do tratamento com H84T-Banlec, há uma drástica redução nos níveis totais de Beclin-1 em relação ao controle nos três *timepoints* analisados (24, 72, 120h). O tratamento com a quimera revelou diminuição nos níveis de T-BECLIN a partir do terceiro dia, 24h antes do encontrado para a H84T isoladamente. Como a XCL induziu a redução nos níveis de Beclin já no primeiro dia de tratamento, é possível que as lectinas estejam agindo em conjunto na inibição da via autofágica. Este resultado é determinante para compreender como ambas as lectinas podem estimular a morte celular atuando em sinergia. De forma interessante, a lectina ConA atua de forma distinta ao induzir a autofagia sem ativar Beclin-1 em células de hepatocarcinoma, o que pode sugerir que outras proteínas estejam atuando nestas vias de sinalização (CHANG et al., 2007).

Um relevante efector da cascata apoptótica, a caspase-3, inicia a fase de degradação celular e é um marcador padrão em estudos que avaliam a apoptose (CHEN et al., 2021). É possível observar uma sutil redução na caspase-3 total em 72h do tratamento com a quimera, porém H84T-Banlec apresenta efeito proeminente apenas em 120h. XCL, que não induz apoptose, praticamente não demonstra nenhuma interferência nos níveis de caspase-3, como esperado. É notável que a quimera esteja agindo de maneira distinta, uma vez que apresenta um perfil diferente dos tratamentos isolados. A H84T-Banlec não foi avaliada em estudos anteriores em relação à caspase-3. As lectinas de *Dioclea lasiocarpa* e *Dioclea lasiophylla* – específicas para manose – induzem tanto apoptose quanto autofagia (LEAL et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2017), enquanto isso, a lectina de visco, com afinidade para galactose, ativou apenas a via apoptótica através da caspase-3 (LYU; CHOI; PARK, 2002).

As proteínas LC3-I e II são encontradas na membrana autofagossômica em diferentes momentos, sendo a clivagem de LC3-I em LC3-II um indicativo da formação dos autofagossomos (GILLSON et al., 2022). A proporção LC3-I/II é considerada o padrão ouro na detecção de autofagia, mas é afetada por processos de formação e degradação simultâneos e seus níveis devem ser considerados cuidadosamente (Xi et al., 2022). Observou-se ambas as formas de LC3 fracamente, que foi um marcador difícil

de detectar em diversas repetições deste WB. O tratamento com H84T em células NSCLC revelou apenas uma banda bastante proeminente (CHAN et al., 2024), porém, definitivamente esta via é ativada após a inibição do sinal de EGFR. O ponto mais importante foi a diferença dos tratamentos em relação ao controle: nos cinco dias de cultivo, o controle apresentou as formas ativas de LC3 de maneira bastante evidente, com exceção do dia três, o que é esperado pois a autofagia é um processo essencial para a manutenção da célula tumoral. Em todos os tratamentos, apenas uma banda fraca correspondente à LC3-I é visível, o que ainda é insuficiente para indicar a formação dos autofagossomos. Contrastando a esses achados, a lectina ConA, que não ativou Beclin-1 em células de hepatocarcinoma, induz efetivamente a conversão de LC3, indicando um possível mecanismo alternativo da via autofágica (CHANG et al., 2007).

PARP-1 tem seu papel principal do mecanismo de reparo celular após quebra de DNA, porém, é parte do processo apoptótico ao servir como substrato da caspase-3. A clivagem de PARP-1 em sua subunidade de 89 kDa é uma marca registrada do início irreversível da apoptose (CHEN et al., 2022). Nossos resultados demonstram que os níveis de PARP-1 total (116 kDa) são sutilmente reduzidos nos três tratamentos, com destaque para o quinto dia em que as células estão incubadas com H84T-Banlec e XCL. A redução apresentada no terceiro dia pela quimera é semelhante ao controle não tratado. Mais importante, a clivagem de PARP-1 não é evidenciada em nenhum dos tratamentos. Outros marcadores de apoptose devem ser testados para afirmar se a via é ou não ativada. A lectina de visco apresentou clivagem proeminente de PARP-1 em linhagem celular endotelial venosa humana imortalizada. Em conjunto com o ensaio de anexina V, confirmou a indução da apoptose, o que poderia explicar seus efeitos anti-angiogênicos (VAN HUYEN et al., 2002). A lectina de *Phaseolus acutifolius*, por sua vez, demonstrou efeitos apoptóticos marcados pela clivagem de PARP-1, caspase-3 e diminuição dos níveis totais e fosforilados de EGFR (DENA-BELTRÁN et al., 2023).

Uma limitação deste estudo foi a dificuldade de detecção de diversos marcadores importantes para as vias de apoptose e autofagia, mesmo utilizando 20 µg do extrato celular por poço. Não foi possível detectar as formas ativas fosforiladas de EGFR e IGF-R1, as formas clivadas de PARP-1, BCL-2 e caspase-3, e BCL-2 total. Estratégias como a utilização de anticorpos que tem como alvo outras mutações e diferentes tempos de

exposição da membrana ao reagente quimioluminescente foram testadas, porém sem sucesso.

Percebemos que pode haver uma tendência de um mecanismo misto de morte celular no tratamento com a quimera, onde há ativação das vias de autofagia e apoptose, como inicialmente hipotetizado, embora mais testes ainda sejam necessários para determinar precisamente qual é este mecanismo. A diversidade de vias ativadas pelas lectinas em diferentes tumores, que possuem diferentes glicanos modificados apresentados em sua superfície, demonstra a complexidade na determinação dos mecanismos de morte celular.

6 Conclusões

A partir das análises realizadas, conclui-se que a maior parte do projeto foi efetivamente realizada. Através de métodos *in silico*, foi possível modelar a lectina quimérica em diferentes configurações e avaliar sua interação com os ligantes, sendo as maiores energias de interação com os antígenos T e a *high mannose* de 5 ramificações. A análise de dinâmica molecular demonstrou que a quimera é estável e mantém sua conformação a 16 °C, mesma temperatura de indução da expressão. A quimera H84T-XCL e a porção XCL sozinha foram produzidas nas cepas de *E. coli* Origami e RIL após definir o melhor protocolo de indução da expressão, que ocorreu a 16 °C *overnight*. Após a diálise em D-PBS, foi possível recuperar ambas as proteínas solúveis e íntegras para o teste de atividade antiproliferativa. A quimera afetou o crescimento celular de células de câncer de pâncreas de forma igual ou melhor que as lectinas isoladamente em cultivo 2D, levando a uma viabilidade celular de aproximadamente 20% após o tratamento. Em cultivo 3D, as lectinas não demonstraram redução no crescimento do esferoide. Os mecanismos de morte celular após o tratamento com a quimera demonstram-se distintos dos apresentados pelas porções isoladas, o que possivelmente deve-se a mecanismos compartilhados de apoptose e autofagia ainda a serem confirmados.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Referências

- ABRAMSON, J. et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. **Nature**, v. 630, n. 8016, p. 493–500, jun. 2024.
- ADASME, M. F. et al. PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W530–W534, 2 jul. 2021.
- ADIYAMAN, R.; MCGUFFIN, L. J. Methods for the Refinement of Protein Structure 3D Models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2301, 9 maio 2019.
- ANFINSEN, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. **Science**, v. 181, n. 4096, p. 223–230, 20 jul. 1973.
- BADAR, M. S. et al. Molecular Dynamics Simulations: Concept, Methods, and Applications. Em: REZAEI, N. (Ed.). **Transdisciplinarity**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 131–151.
- BARRE, A. et al. Overview of the structure–Function relationships of mannose-specific lectins from plants, Algae and Fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, 2019.
- BERGMANN, L. et al. Phase I trial of r viscummin (INN: aviscumine) given subcutaneously in patients with advanced cancer: a study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC protocol number 13001). **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 44, n. 12, p. 1657–1662, ago. 2008.
- BHUTIA, S. K. et al. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological Research**, v. 144, p. 8–18, 1 jun. 2019.
- BIRCK, C. et al. A new lectin family with structure similarity to actinoporins revealed by the crystal structure of *Xerocomus chrysenteron* lectin XCL. **Journal of Molecular Biology**, v. 344, n. 5, p. 1409–1420, 10 dez. 2004.
- BOUATTA, N.; SORGER, P.; ALQURAIISHI, M. Protein structure prediction by *AlphaFold* 2: are attention and symmetries all you need? **Acta Crystallographica Section D Structural Biology**, v. 77, n. 8, p. 982–991, 1 ago. 2021.

- BOYAVAL, F. et al. N-Glycomic Signature of Stage II Colorectal Cancer and Its Association With the Tumor Microenvironment. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 20, p. 100057, 2021.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248–254, 1976.
- BRAND, R. **A Randomized, Double-Blind Phase 1 Safety and Pharmacokinetic Study of Q-Griffithsin Enema Administered Rectally to HIV-1 Seronegative Adults**. [s.l.] clinicaltrials.gov, 9 dez. 2021. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04032717>>. Acesso em: 17 jul. 2022.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024.
- CAGLIARI, R. **Prospecção e análise in vitro de enzimas celulases de espécies de fungos fitopatogênicos com potencial aplicação na produção de biocombustíveis**. [s.l.] Universidade Federal de Pelotas, 2018.
- CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 395–417, jul. 2020.
- CARRIZO, M. E. et al. The Antineoplastic Lectin of the Common Edible Mushroom (*Agaricus bisporus*) Has Two Binding Sites, Each Specific for a Different Configuration at a Single Epimeric Hydroxyl*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 11, p. 10614–10623, 18 mar. 2005.
- CAVADA, B. S. et al. In depth analysis on the carbohydrate-binding properties of a vasorelaxant lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart Ex. Benth seeds. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 15, p. 6817–6830, 29 ago. 2022.
- CHAN, J. F.-W. et al. A molecularly engineered, broad-spectrum anti-coronavirus lectin inhibits SARS-CoV-2 and MERS-CoV infection in vivo. **Cell Reports Medicine**, v. 3, n. 10, p. 100774, 29 set. 2022.
- CHAN, S. M. et al. A molecularly engineered lectin destroys EGFR and inhibits the growth of non-small cell lung cancer. **bioRxiv: The Preprint Server for Biology**, p. 2024.03.18.585535, 20 mar. 2024.
- CHANG, C.-P. et al. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. **Hepatology**, v. 45, n. 2, p. 286–296, 2007.

CHEN, Q. et al. Truncated PARP1 mediates ADP-ribosylation of RNA polymerase III for apoptosis. **Cell Discovery**, v. 8, n. 1, p. 1–19, 18 jan. 2022.

CHEN, X. et al. Cell death in pancreatic cancer: from pathogenesis to therapy. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 11, p. 804–823, nov. 2021.

COVÉS-DATSON, E. M. et al. Inhibition of Ebola Virus by a Molecularly Engineered Banana Lectin. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007595, jul. 2019.

COVÉS-DATSON, E. M. et al. A molecularly engineered antiviral banana lectin inhibits fusion and is efficacious against influenza virus infection in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 4, p. 2122–2132, 28 jan. 2020.

DA SILVA PINTO, L. et al. Heterologous expression and characterization of a new galactose-binding lectin from Bauhinia forficata with antiproliferative activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 877–884, 1 maio 2019.

DAMIAN, L. et al. Determination of thermodynamic parameters of Xerocomus chrysenteron lectin interactions with N-acetylgalactosamine and Thomsen-Friedenreich antigen by isothermal titration calorimetry. **BMC Biochemistry**, v. 6, n. 1, p. 11, 1 jun. 2005.

DE CAMARGO, L. J. et al. Characterization of a Molecularly Engineered Banlec-Type Lectin (rBTL). **Molecular Biotechnology**, v. 66, n. 2, p. 288–299, 1 fev. 2024.

DE LEOZ, M. L. A. et al. High-mannose glycans are elevated during breast cancer progression. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 10, n. 1, p. M110.002717, jan. 2011.

DENA-BELTRÁN, J. L. et al. EGFR and p38MAPK Contribute to the Apoptotic Effect of the Recombinant Lectin from Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) in Colon Cancer Cells. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 2, p. 290, fev. 2023.

DINGJAN, T. et al. Molecular Simulations of Carbohydrates with a Fucose-Binding Burkholderia ambifaria Lectin Suggest Modulation by Surface Residues Outside the Fucose-Binding Pocket. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 393, 21 jun. 2017.

ELIGAR, S. M. et al. Sclerotium rolfsii lectin inhibits proliferation and induces apoptosis in human ovarian cancer cell line PA-1. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 5, p. 397–403, out. 2012.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

FENG, L.-X. et al. Agglutinin isolated from *Arisema heterophyllum* Blume induces apoptosis and autophagy in A549 cells through inhibiting PI3K/Akt pathway and inducing ER stress. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 14, n. 11, p. 856–864, 1 nov. 2016.

FENG, X. et al. Dying glioma cells establish a proangiogenic microenvironment through a caspase 3 dependent mechanism. **Cancer letters**, v. 385, p. 12–20, 28 jan. 2017.

FERREIRA, J. A. et al. Protein glycosylation in gastric and colorectal cancers: Toward cancer detection and targeted therapeutics. **Cancer Letters**, v. 387, p. 32–45, 28 fev. 2017.

FISER, A. Template-Based Protein Structure Modeling. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 673, p. 73–94, 2010.

FRANCIS, F. et al. Fungal lectin, XCL, is internalized via clathrin-dependent endocytosis and facilitates uptake of other molecules. **European Journal of Cell Biology**, v. 82, n. 10, p. 515–522, 1 out. 2003.

FU, C. et al. Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. **HLA**, v. 88, n. 6, p. 275–286, 2016.

GABIUS, H.-J. et al. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n. 6, p. 298–313, jun. 2011.

GANATRA, M. B. et al. A bi-specific lectin from the mushroom *Boletopsis grisea* and its application in glycoanalytical workflows. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 160, 8 jan. 2021.

GILLSON, J. et al. Autophagy: A Key Player in Pancreatic Cancer Progression and a Potential Drug Target. **Cancers**, v. 14, n. 14, p. 3528, 20 jul. 2022.

GONDIM, A. C. S. et al. The potent anti-cancer activity of *Dioclea lasiocarpa* lectin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 175, p. 179–189, out. 2017.

GONDIM, A. C. S. et al. Potent antiviral activity of carbohydrate-specific algal and leguminous lectins from the Brazilian biodiversity. **MedChemComm**, v. 10, n. 3, p. 390, 3 mar. 2019.

GUEDES, I. A. et al. New machine learning and physics-based scoring functions for drug discovery. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3198, 4 fev. 2021.

HALBROOK, C. J. et al. Pancreatic cancer: Advances and challenges. **Cell**, v. 186, n. 8, p. 1729–1754, 13 abr. 2023.

- HEBDITCH, M. et al. Protein-Sol: A web tool for predicting protein solubility from sequence. **Bioinformatics**, v. 33, n. 19, p. 3098–3100, 1 out. 2017.
- HENDRICKSON, O. D.; ZHERDEV, A. V. Analytical Application of Lectins. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 279–292, 4 jul. 2018.
- HESSEL, S. S. et al. A computational simulation appraisal of banana lectin as a potential anti-SARS-CoV-2 candidate by targeting the receptor-binding domain. **Journal of Genetic Engineering & Biotechnology**, v. 21, p. 148, 28 nov. 2023.
- HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular dynamics simulations for all. **Neuron**, v. 99, n. 6, p. 1129–1143, 2018.
- HOU, W. et al. Autophagic degradation of active caspase-8: A crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. **Autophagy**, v. 6, n. 7, p. 891–900, 1 out. 2010.
- INAMDAR, S. R. et al. The TF-antigen binding lectin from *Sclerotium rolfsii* inhibits growth of human colon cancer cells by inducing apoptosis in vitro and suppresses tumor growth in vivo. **Glycobiology**, v. 22, n. 9, p. 1227–1235, 1 set. 2012.
- JO, S. et al. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1859–1865, ago. 2008.
- JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 15 jul. 1983.
- JUMPER, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature** **2021 596:7873**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 15 jul. 2021.
- KIRSCHNER, K. N. et al. GLYCAM06: A generalizable biomolecular force field. Carbohydrates. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 622–655, 2008.
- KONTOYIANNI, M. Docking and virtual screening in drug discovery. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2017. v. 1647p. 255–266.
- KOZAKOV, D. et al. The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature Protocols**, v. 12, n. 2, p. 255–278, fev. 2017.
- LACERDA, R. R. et al. Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L. var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 1072–1081, 1 fev. 2017.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1 abr. 1993.

LEAL, R. B. et al. Crystal structure of DlyL, a mannose-specific lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds that display cytotoxic effects against C6 glioma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 64–76, 15 jul. 2018.

LEIST, M.; WENDEL, A. A novel mechanism of murine hepatocyte death inducible by concanavalin A. **Journal of Hepatology**, v. 25, n. 6, p. 948–959, dez. 1996.

LEMKUL, J. A. From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [Article v1.0]. **Living Journal of Computational Molecular Science**, v. 1, n. 1, p. 5068–5068, 2019.

LI, J.; FU, A.; ZHANG, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, v. 11, n. 2, p. 320–328, 1 jun. 2019.

LIGORIO, M. et al. Stromal Microenvironment Shapes the Intratumoral Architecture of Pancreatic Cancer. **Cell**, v. 178, n. 1, p. 160–175.e27, 27 jun. 2019.

LIMA, A. DE M. et al. In silico improvement of the cyanobacterial lectin microvirin and mannose interaction. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v. 40, n. 3, p. 1064–1073, fev. 2022.

LIN, Y.; LUBMAN, D. M. The role of N-glycosylation in cancer. **Acta Pharmaceutica Sinica. B**, v. 14, n. 3, p. 1098–1110, mar. 2024.

LIU, B. et al. Molecular mechanisms of *Polygonatum cyrtoneuma* lectin-induced apoptosis and autophagy in cancer cells. **Autophagy**, v. 5, n. 2, p. 253–255, fev. 2009.

LIU, B. et al. *Polygonatum cyrtoneuma* lectin induces murine fibrosarcoma L929 cell apoptosis and autophagy via blocking Ras–Raf and PI3K–Akt signaling pathways. **Biochimie**, Special section “DNA and Chromosomes: Physical and Biological Approaches”. v. 92, n. 12, p. 1934–1938, 1 dez. 2010.

LIU, J.; WANG, X.; XU, D. QM/MM study on the catalytic mechanism of cellulose hydrolysis catalyzed by cellulase Cel5A from *acidothermus cellulolyticus*. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 3, p. 1462–1470, 2010.

LIU, T. et al. Role of reactive oxygen species-mediated MAPK and NF- κ B activation in *Polygonatum cyrtoneuma* lectin-induced apoptosis and autophagy in human lung adenocarcinoma A549 cells. **The Journal of Biochemistry**, v. 160, n. 6, p. 315–324, 1 dez. 2016.

LIU, X. et al. Cell surface-specific N-glycan profiling in breast cancer. **PloS One**, v. 8, n. 8, p. e72704, 2013.

LIU, X.; LV, B.; GUO, W. The size distribution of protein families within different types of folds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 406, n. 2, p. 218–222, 11 mar. 2011.

LUAN, W. et al. Polygonatum odoratum lectin promotes BECN1 expression and induces autophagy in malignant melanoma by regulation of miR1290. **OncoTargets and therapy**, v. 10, p. 4569–4577, 14 set. 2017.

LUDWIG, A. K. et al. Lectinology 4.0: Altering modular (ga)lectin display for functional analysis and biomedical applications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1863, n. 5, p. 935–940, 1 maio 2019.

LYU, S. Y.; CHOI, S. H.; PARK, W. B. Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. **Archives of Pharmacal Research**, v. 25, n. 1, p. 93–101, 1 fev. 2002.

MAITRA, A.; HRUBAN, R. H. Pancreatic Cancer. **Annual review of pathology**, v. 3, p. 157–188, 2008.

MAIURI, M. C. et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 741–752, set. 2007.

MARTINEZ, D. et al. The Use of Lectins as Tools to Combat SARS-CoV-2. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, 1 set. 2021.

MARTY-DETRAVES, C. et al. Inhibitory action of a new lectin from *Xerochomus chrysenteron* on cell-substrate adhesion. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 258, n. 1, p. 49–55, 1 mar. 2004.

MAZALOVSKA, M.; KOUOKAM, J. C. Plant-Derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1631394, 15 maio 2020.

MCDOWELL, C. T. et al. Imaging Mass Spectrometry and Lectin Analysis of N-Linked Glycans in Carbohydrate Antigen-Defined Pancreatic Cancer Tissues. **Molecular & Cellular Proteomics : MCP**, v. 20, p. 100012, 8 dez. 2020.

MCGUFFIN, L. J.; ALHARBI, S. M. A. ModFOLD9: A Web Server for Independent Estimates of 3D Protein Model Quality. **Journal of Molecular Biology**, p. 168531, 11 mar. 2024.

- MCKENNA, M. K. et al. Novel banana lectin CAR-T cells to target pancreatic tumors and tumor-associated stroma. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 11, n. 1, p. e005891, jan. 2023.
- MEAGHER, J. L. et al. Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site. **Glycobiology**, v. 15, n. 10, p. 1033–1042, out. 2005.
- MENG, X.-Y. et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146–57, jun. 2011.
- MIRDITA, M. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature Methods**, v. 19, n. 6, p. 679–682, jun. 2022.
- MITCHELL, C. A.; RAMESSAR, K.; O'KEEFE, B. R. Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry. **Antiviral Research**, v. 142, p. 37–54, 1 jun. 2017.
- MIYAGI, T. et al. Concanavalin a injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an antitumor effect in murine liver. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 40, n. 5, p. 1190–1196, nov. 2004.
- MO, H. et al. Carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin: I. Novel recognition of internal α 1,3-linked glucosyl residues. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 9, p. 2609–2615, maio 2001.
- MONTE, L. G. et al. Lectin of *Abelmoschus esculentus* (okra) promotes selective antitumor effects in human breast cancer cells. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 3, p. 461–469, mar. 2014.
- MONTICELLI, L.; TIELEMAN, D. P. Force fields for classical molecular dynamics. **Methods in Molecular Biology**, v. 924, p. 197–213, 2013.
- MORANA, O.; WOOD, W.; GREGORY, C. D. The Apoptosis Paradox in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1328, jan. 2022.
- MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular docking. **Methods in Molecular Biology**, v. 443, p. 365–382, 2008.
- MUNKLEY, J. The glycosylation landscape of pancreatic cancer. **Oncology Letters**, v. 17, n. 3, p. 2569–2575, mar. 2019.
- MURTAJA, A. et al. The ribosome inhibiting protein riproximin shows antineoplastic activity in experimental pancreatic cancer liver metastasis. **Oncology Letters**, v. 15, n. 2, p. 1441–1448, fev. 2018.

NASCIMENTO, K. S. et al. Structural analysis of Dioclea lasiocarpa lectin: A C6 cells apoptosis-inducing protein. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 92, p. 79–89, nov. 2017.

NIVEDHA, A. K. et al. Vina-Carb: Improving Glycosidic Angles during Carbohydrate Docking. **J Chem Theory Comput.**, v. 12, n. 2, p. 892–901, 2016.

OH, Y. J. et al. Antitumor activity of a lectibody targeting cancer-associated high-mannose glycans. **Molecular Therapy**, v. 30, n. 4, p. 1523–1535, 6 abr. 2022.

OLECHNOVIC, K. et al. Comparative analysis of methods for evaluation of protein models against native structures. **Bioinformatics**, v. 35, n. 6, p. 937–944, 2019.

OUYANG, L. et al. Polygonatum odoratum lectin induces apoptosis and autophagy via targeting EGFR-mediated Ras-Raf-MEK-ERK pathway in human MCF-7 breast cancer cells. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 21, n. 12, p. 1658–1665, 15 out. 2014.

PAGGI, J. M.; PANDIT, A.; DROR, R. O. The Art and Science of Molecular Docking. v. 93, p. 389–410, 2024.

PAGLIARINI, V. et al. Proteolysis of Ambra1 during apoptosis has a role in the inhibition of the autophagic pro-survival response. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 9, p. 1495–1504, set. 2012.

PAIVA, P.; GOMES, F.; NAPOLEÃO, T. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, n. January 2010, p. 396–406, 2010.

PAIVA, V. DE A. et al. Protein structural bioinformatics: An overview. **Computers in Biology and Medicine**, v. 147, p. 105695, 1 ago. 2022.

PAN, S. et al. Quantitative Glycoproteomics Analysis Reveals Changes in N-Glycosylation Level Associated with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 3, p. 1293–1306, 7 mar. 2014.

PARZYCH, K. R.; KLIONSKY, D. J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 3, p. 460–473, 20 jan. 2014.

PELOSI, E.; CASTELLI, G.; TESTA, U. Pancreatic Cancer: Molecular Characterization, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. **Biomedicines**, v. 5, n. 4, p. 65, 18 nov. 2017.

- PINHO, S. S.; REIS, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 9, p. 540–555, set. 2015.
- PLATEAU-HOLLEVILLE, C. et al. UDock2: interactive real-time multi-body protein–protein docking software. **Bioinformatics**, v. 39, n. 10, p. btad609, 1 out. 2023.
- POIROUX, G. et al. 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, 9 jun. 2017.
- POPULATION COUNCIL. **A Phase 1 Trial to Evaluate the Safety, Pharmacokinetics (PK) and Pharmacodynamics (PD) of PC-6500 (Griffithsin [GRFT] in a Carrageenan Gel) in Healthy Women**. [s.l.] clinicaltrials.gov, 26 nov. 2018. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02875119>>. Acesso em: 17 jul. 2022.
- PRATT, J.; ROY, R.; ANNABI, B. Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. **Glycobiology**, v. 22, n. 9, p. 1245–1255, 1 set. 2012.
- PYO, J.-O. et al. Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 21, p. 20722–20729, 27 maio 2005.
- RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 95–99, 1 jul. 1963.
- RAWLA, P.; SUNKARA, T.; GADUPUTI, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. **World Journal of Oncology**, v. 10, n. 1, p. 10–27, 26 fev. 2019.
- REILY, C. et al. Glycosylation in health and disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 15, n. 6, p. 346–366, jun. 2019.
- REIS, L. et al. Investigation of cellular proliferative potential of lectin extracted from *Bauhinia variegata* according to different cell lines. **BMC Proceedings**, v. 8, n. 4, p. P265, 1 out. 2014.
- ROSATO, F. et al. A bispecific, crosslinking lectibody activates cytotoxic T cells and induces cancer cell death. **Journal of Translational Medicine**, v. 20, n. 1, p. 578, 9 dez. 2022.
- ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature protocols**, v. 5, n. 4, abr. 2010.

SATO, Y. et al. High mannose-binding *Pseudomonas fluorescens* lectin (PFL) downregulates cell surface integrin/EGFR and induces autophagy in gastric cancer cells. **BMC Cancer**, v. 16, p. 63, 6 fev. 2016.

SAVANUR, M. A. et al. Sclerotium rolfsii Lectin Induces Stronger Inhibition of Proliferation in Human Breast Cancer Cells than Normal Human Mammary Epithelial Cells by Induction of Cell Apoptosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e110107, 3 nov. 2014.

SCHAEFFER, R. D.; DAGGETT, V. Protein folds and protein folding. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 24, n. 1–2, p. 11–19, 1 jan. 2011.

ŠČUPÁKOVÁ, K. et al. Clinical importance of high-mannose, fucosylated, and complex N-glycans in breast cancer metastasis. **JCI insight**, v. 6, n. 24, p. e146945, 22 dez. 2021.

SHI, Z. et al. Antitumor effects of concanavalin A and *Sophora flavescens* lectin in vitro and in vivo. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 2, p. 248–256, fev. 2014.

SILVA, H. C. et al. BUL: A novel lectin from *Bauhinia unguolata* L. seeds with fungistatic and antiproliferative activities. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 203–209, fev. 2014.

SINGH, D. D. et al. Unusual sugar specificity of banana lectin from *Musa paradisiaca* and its probable evolutionary origin. Crystallographic and modelling studies. **Glycobiology**, v. 15, n. 10, p. 1025–1032, out. 2005.

SINGH, R. et al. Two Chitotriose-Specific Lectins Show Anti-Angiogenesis, Induces Caspase-9-Mediated Apoptosis and Early Arrest of Pancreatic Tumor Cell Cycle. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146110, 21 jan. 2016.

SINGH, S. S.; DEVI, S. K.; NG, T. B. Banana Lectin: A Brief Review. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 18817–18827, 17 nov. 2014.

SIQUEIRA, A. S. et al. In silico analysis of the cyanobacterial lectin scytovirin: new insights into binding properties. **Molecular Biology Reports**, v. 44, n. 4, p. 353–358, 2017.

SIUKSTAITE, L. et al. The Two Sweet Sides of Janus Lectin Drive Crosslinking of Liposomes to Cancer Cells and Material Uptake. **Toxins**, v. 13, n. 11, p. 792, 9 nov. 2021.

SRINIVAS, B. K.; SHIVAMADHU, M. C.; JAYARAMA, S. *Musa acuminata* lectin exerts anti-cancer effects on HeLa and EAC cells *via* activation of caspase and inhibitions of Akt, Erk, and Jnk pathway expression and suppresses the neoangiogenesis in *in-vivo*

models. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 1173–1187, 1 jan. 2021.

STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. **Progress in medicinal chemistry**, v. 60, p. 273–343, 1 jan. 2021.

SWANSON, M. D. et al. Engineering a Therapeutic Lectin by Uncoupling Mitogenicity from Antiviral Activity. **Cell**, v. 163, n. 3, p. 746–758, 22 out. 2015.

THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Cancer cell**, v. 32, n. 2, p. 185–203.e13, 14 ago. 2017.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–61, 30 jan. 2010.

TSAI, C.-C. et al. Cyanovirin-N Inhibits AIDS Virus Infections in Vaginal Transmission Models. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 20, n. 1, p. 11–18, jan. 2004.

TSAI, M.-H. et al. Artocarpin, an isoprenyl flavonoid, induces p53-dependent or independent apoptosis via ROS-mediated MAPKs and Akt activation in non-small cell lung cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 17, p. 28342, 4 abr. 2017.

TSANEVA, M.; VAN DAMME, E. J. M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate Journal**, v. 37, n. 5, p. 533, 1 out. 2020.

URIBE, M. L.; MARROCCO, I.; YARDEN, Y. EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. **Cancers**, v. 13, n. 11, p. 2748, 1 jun. 2021.

VAN DAMME, E. J. M. 35 years in plant lectin research: a journey from basic science to applications in agriculture and medicine. **Glycoconjugate Journal**, v. 39, n. 1, p. 83–97, 1 fev. 2022.

VAN HUYEN, J.-P. D. et al. Induction of Apoptosis of Endothelial Cells by *Viscum album*: A Role for Anti-Tumoral Properties of Mistletoe Lectins. **Molecular Medicine**, v. 8, n. 10, p. 600–606, out. 2002.

VIEIRA NETO, A. E. et al. New structural insights into anomeric carbohydrate recognition by frutalin: an α -D-galactose-binding lectin from breadfruit seeds. **Biochemical Journal**, v. 476, n. 1, p. 101–113, 11 jan. 2019.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W407–W410, jul. 2007.

WILD, C.; WEIDERPASS, E.; STEWART, E. **World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer., 2020.

WILKINS, M. R. et al. Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server. Em: LINK, A. J. (Ed.). **2-D Proteome Analysis Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 1999. p. 531–552.

WIRAWAN, E. et al. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. **Cell Death & Disease**, v. 1, n. 1, p. e18, jan. 2010.

WORMALD, M. R.; DWEK, R. A. Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. **Structure (London, England)**, v. 7, n. 7, p. R155-60, 1 jul. 1999.

WU, L. et al. Polygonatum odoratum lectin induces apoptosis and autophagy by regulation of microRNA-1290 and microRNA-15a-3p in human lung adenocarcinoma A549 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 217–226, abr. 2016.

WU, Q. et al. Small-molecule inhibitors, immune checkpoint inhibitors, and more: FDA-approved novel therapeutic drugs for solid tumors from 1991 to 2021. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, p. 143, 8 out. 2022.

XI, H. et al. The role of interaction between autophagy and apoptosis in tumorigenesis (Review). **Oncology Reports**, v. 48, n. 6, p. 1–16, 1 dez. 2022.

YAMAMOTO, K. et al. Alteration of the carbohydrate-binding specificity of the Bauhinia purpurea lectin through the preparation of a chimeric lectin. **Journal of Biochemistry**, v. 111, n. 1, p. 87–90, jan. 1992.

YAMAMOTO, K.; KONAMI, Y.; OSAWA, T. A chimeric lectin formed from Bauhinia purpurea lectin and Lens culinaris lectin recognizes a unique carbohydrate structure. **Journal of Biochemistry**, v. 127, n. 1, p. 129–135, jan. 2000.

YANG, J.; ROY, A.; ZHANG, Y. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. **Structural bioinformatics**, v. 29, n. 20, p. 2588–2595, 2013a.

YANG, J.; ROY, A.; ZHANG, Y. BioLiP: a semi-manually curated database for biologically relevant ligand-protein interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Database issue, p. D1096-1103, jan. 2013b.

YAU, T. et al. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 3791, 1 mar. 2015.

YOUSEFI, S. et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 1124–1132, out. 2006.

ZHANG, Y. et al. Purification and characterization of a novel protein with activity against non-small-cell lung cancer *in vitro* and *in vivo* from the edible mushroom *Boletus edulis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 174, p. 77–88, 31 mar. 2021.

ZHU, Y. et al. Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. **Protein & Cell**, v. 1, n. 5, p. 468–477, maio 2010.

Apêndices

Apêndice A – resultados complementares

Tabela I - Possíveis sítios de ligação preditos pelo *software* COACH para a porção XCL da quimera.

PDB ID	C-score	Ligante	Resíduos consensos
3QDV-A	0.04	N-acetil- α -D-Galactosamina (A2G)	182,202,203,225,226,227,251,260
3QDV-B	0.10	N-acetil- α -D-Glicosamina (α -GlcNAc)	232,233,234,235,256,258,259,267,269

Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Tabela II – Parâmetros usados na construção da *gridbox* com o programa Autodock Tools.

Proteína	Center X	Center Y	Center Z	Tamanho da caixa
Quimera (porção XCL)	-1.594	-0.891	7.746	40x40x40
Quimera (porção H84T)	26.149	-7.123	-24.174	40x40x40
H84T	15.377	15.534	46.577	30x30x30
XCL	30.561	59.47	-11.306	40x40x40
<i>Redocking</i> H84T + dimanose	13.941	16.302	47.172	30x30x30

Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Tabela III - Resultados do *docking* utilizando DockThor.

Complexo proteína-ligante	Afinidade (kcal/mol)	Energia total (kcal/mol)	Energia vdW	Energia eletrostática
XCL + Tn-Ag	-6.267	-5.850	-0.388	-26.673
XCL + T-Ag	-7.1	13.737	-7.639	-29.357
Quimera + Tn-Ag	-6.835	-10.127	-8.091	-23.65
Quimera + T-Ag	-7.821	81.363	50.952	-45.401
<i>Redocking</i> H84T+diMAN	-6.564	23,761	-6.079	-30.240
H84T + Man5	-8.262	156.127	-16.096	-33.347
H84T + Man6	4,81	1670.144	1343.006	-61.141

Quimera + Man5	-7.807	213.022	14.013	-39.958
Quimera + Man6	-4.966	877.607	384.631	-0.962

Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Tabela IV - Clusters e score de energia dos possíveis arranjos quaternários obtidos no *software* ClusPro

Cluster	Membros	Score de Energia
1	216	-786.1
2	109	-730.8
3	89	-645.8
4	87	-618.5
5	75	-787.9

Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Apêndice B – Patente

Processo sigiloso SEI nº 23110.020049/2024-12

RESUMO

Aplicação da lectina quimérica biespecífica de *Musa acuminata* e *Xerocomus chrysenteron* como agente antitumoral para câncer de pâncreas

O presente pedido de patente de invenção refere-se à utilização da lectina quimérica de *Musa acuminata* e *Xerocomus chrysenteron* como agente antitumoral. A presente invenção se refere na classificação internacional de patentes as áreas de química e necessidade humanas elencadas nas seções A61K; A61K 8/64; A61K 8/72; A61K 31/74; A61P 35/04; A61K 36/07; A61P 43/00; A61K 49/14; A61K 131/00; A61P 17/02; C12N 15/09; C12N 15/29. A principal inovação nesse trabalho é a produção e caracterização do caráter antiproliferativo de uma quimera de duas lectinas, capaz de impedir o crescimento de células de câncer de pâncreas. A associação das duas lectinas com especificidades diferentes (manose e galactose) permite o reconhecimento de glicanos aberrantes expostos na superfície de células tumorais, mas não de células saudáveis. Visto que os medicamentos mais aplicados atualmente na clínica dependem de mutações em proteínas chave do ciclo celular que não são estão presentes no câncer de pâncreas, a lectina quimérica se torna uma alternativa promissora. Além disso, a lectina quimérica é possivelmente uma droga de amplo espectro, visto que a ocorrência de glicanos aberrantes é comum às células cancerosas com metabolismo alterado das enzimas responsáveis por modificações pós-traducionais. Assim, a presente invenção contribui para aumentar o leque de alternativas terapêuticas disponíveis para o tratamento do câncer de pâncreas.

RELATÓRIO DESCRITIVO

Aplicação da lectina quimérica biespecífica de *Musa acuminata* e *Xerocomus chrysenteron* como agente antitumoral para câncer de pâncreas

Campo da invenção

[001] A presente invenção se refere na classificação internacional de patentes as áreas de química e necessidade humanas elencadas nas seções A61K; A61K 8/64; A61K 8/72; A61K 31/74; A61P 35/04; A61K 36/07; A61P 43/00; A61K 49/14; A61K 131/00; A61P 17/02; C12N 15/09; C12N 15/29. Refere-se a utilização de uma lectina quimérica biespecífica, formada por duas lectinas com especificidades diferentes, das espécies *Musa acuminata* (aqui referida como lectina de banana, Banlec) e *Xerocomus chrysenteron* (aqui referida como XCL). A lectina quimérica foi produzida através da tecnologia do DNA recombinante e possui atividade antiproliferativa contra células de câncer de pâncreas. A inovação refere-se à produção recombinante a partir de um vetor de expressão e uso da lectina quimérica em linhagem celular de câncer de pâncreas como agente antitumoral.

Fundamentos da invenção

[002] O câncer de pâncreas tem a maior relação mortalidade/incidência entre todas as doenças malignas. Em geral, as drogas antitumorais baseiam-se majoritariamente em mutações chave que alteram o funcionamento de proteínas que auxiliam na tumorigenicidade das células malignas. As drogas mais utilizadas são os inibidores de tirosina quinases (ITQ), que se ligam especificamente àquelas proteínas mutadas para impedir sua atividade, como o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) e gene de transição mesenquimal-epitelial (MET). Um resultado indesejado da utilização dos ITQs é a resistência adquirida, e novas alternativas vêm sendo descobertas ainda em um ritmo lento (WU, Q. et al. **Small-molecule inhibitors, immune checkpoint inhibitors, and more: FDA-approved novel therapeutic drugs for solid tumors from 1991 to 2021. Journal of Hematology & Oncology, v. 15, p. 143, 8 out. 2022**). Especificamente no caso do câncer de pâncreas, apenas quatro mutações

características de cânceres foram detectadas (nomeadamente KRAS, CDKN2A, TP53 e SMAD4), porém, nenhum destes é alvo de terapias comumente empregadas, já que dependem de mutações que acometem os receptores de membrana relacionados à manutenção do ciclo celular. Os genes alvo destas drogas estão fracamente expressos, o que impacta o potencial terapêutico, conseqüentemente, no sucesso do tratamento antitumoral **(THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Cancer cell, v. 32, n. 2, p. 185- 203.e13, 14 ago. 2017).**

[003] Células tumorais apresentam glicanos modificados em sua superfície, um alvo que é presente amplamente em diversos tipos de câncer. Os glicanos aberrantes que ocorrem em células tumorais geralmente estão associados a proteínas glicosiladas e receptores de membrana, como o Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR). Mais interessante, estes glicanos modificados não são encontrados em células saudáveis, uma vez que são processados pelas enzimas específicas de modificações pós-traducionais que não têm sua atividade alterada pelas mutações promovidas pelo câncer **(PINHO, S. S.; REIS, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. Nature Reviews Cancer, v. 15, n. 9, p. 540–555, set. 2015).** No caso do câncer de pâncreas, há uma grande quantidade de açúcares aberrantes expostos na superfície, principalmente N-glicanos (açúcares ligados à asparagina) e O-glicanos (açúcares ligados à hidroxila de uma serina ou treonina). Estes glicanos não sofreram o processamento adequado e estão amplamente presentes em diversos tipos de câncer de pâncreas, tornando-se alvos extremamente pertinentes. **(MUNKLEY, J. The glycosylation landscape of pancreatic cancer. Oncology Letters, v. 17, n. 3, p. 2569–2575, mar. 2019.)**

[004] As lectinas são proteínas capazes de se ligar a carboidratos de forma específica e seletiva. O potencial terapêutico das lectinas é determinado principalmente pela capacidade de reconhecimento de carboidratos e pela especificidade de ligação. As lectinas são muito diversas, especialmente em termos de especificidade fina: o sítio de ligação aos carboidratos pode acomodar açúcares simples e complexos. A eficiência de lectinas como agente antitumoral é demonstrada pela inibição da proliferação em diversos tipos de câncer, sendo que essas proteínas são capazes de reconhecer de

forma seletiva glicanos modificados pela célula tumoral, mas não interagem com glicanos de células saudáveis expostos na superfície celular. Associado ao reconhecimento específico, as lectinas são capazes de induzir a morte celular das células tumorais por mecanismos de apoptose e autofagia **(BARRE, A. et al. Mannose-specific lectins from marine algae: Diverse structural scaffolds associated to common virucidal and anti-cancer properties. Marine Drugs, v. 17, n. 8, 26 jul. 2019. POIROUX, G. et al. 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. 1232, 9 jun. 2017).**

[005] Uma estratégia inovadora no campo da lectinologia é a combinação de lectinas com diferentes especificidades, formando quimeras ou lectinas ciborgues. Esse tipo de estudo foi realizado anteriormente com a inserção de um nonapeptídeo da lectina de *Lens culinaris* na sequência de lectina de *Bauhinia purpurea*, tornando a proteína quimérica duplo-específica (ou biespecífica) por manose e galactose, ao contrário da proteína selvagem, que exibia afinidade apenas por galactose. Isso tem sido feito a fim de explorar o potencial de moléculas já identificadas de maneira mais eficaz, visando uma atividade antiproliferativa aprimorada em diversos tipos de câncer, além de utilizar concentrações reduzidas e sem o risco da resposta imune exacerbada. **(YAMAMOTO, K.; KONAMI, Y.; OSAWA, T. A chimeric lectin formed from Bauhinia purpurea lectin and Lens culinaris lectin recognizes a unique carbohydrate structure. Journal of Biochemistry, v. 127, n. 1, p. 129–135, jan. 2000).**

[006] Recentes estratégias de engenharia de lectinas têm se mostrado bastante promissoras em relação ao seu potencial terapêutico. A união de lectinas a importantes efetores do sistema imune tem sido bastante estudada. Primeiro, uma construção que tem como alvos os glicanos de *high mannose* são os *lectibodies*, que consistem em parte anticorpo e parte lectina. Especificamente, as lectinas se encontram na porção Fab, enquanto a porção Fc humana é mantida. Resultados promissores foram observados ao se utilizar o *lectibody* da lectina Avaren (AvFc) em câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), em que se observou a ligação de AvFc à diversas glicoproteínas da matriz extracelular, como por exemplo EGFR e ao receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina (IGF1R) **(OH, Y. J. et al. Antitumor activity of a lectibody**

targeting cancer-associated high-mannose glycans. *Molecular Therapy*, v. 30, n. 4, p. 1523–1535, 6 abr. 2022). Em segundo lugar, destaca-se o desenvolvimento de células T CAR modificadas contendo uma lectina de banana. Nesta construção, a lectina fica ancorada a um receptor de antígeno quimérico (CAR) e é expressa em células T. As células T CAR Banlec mutante foram capazes de reconhecer seletivamente e se ligar especificamente à *high mannose* de diversas linhagens de câncer de pâncreas, assim como romper a arquitetura das células do estroma em cultivo 3D, outro empecilho apresentado pelos tumores sólidos. Além disso, foram efetivas também nos estudos in vivo, penetrando especificamente no tumor e por fim, não foram tóxicas para células saudáveis **(MCKENNA, M. K. et al. Novel banana lectin CAR-T cells to target pancreatic tumors and tumor-associated stroma. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, v. 11, n. 1, p. e005891, 18 jan. 2023).**

[007] O potencial das lectinas como moléculas de amplo reconhecimento que reconhecem diferentes glicanos aberrantes expostos na superfície celular ficam claro a partir destes estudos. Ter como alvo estes glicanos permite uma abordagem terapêutica de amplo espectro e surge como uma alternativa terapêutica de grande relevância, já que os quimioterápicos mais utilizados contra o câncer de pâncreas são dependentes destas mutações nos receptores de membrana relacionados a manutenção do ciclo celular.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 representa o desenho esquemático da construção da quimera Banlec mutante-XCL. As sequências de DNA relevantes para Banlec mutante (azul) e XCL (verde), recuperadas do banco de dados Uniprot, serão conectadas através de um linker (vermelho) e inseridas no vetor pET-24a (+) e o marcador de histidina (His6x) localizado em C-terminal.

A Figura 2 apresenta o teste de expressão da quimera recombinante. O teste de colônia foi realizado com as cepas RIL (A) e Origami (B) e o tamanho de banda esperado é de 32 KDa. Em A, é possível observar uma banda proeminente no poço 7. Poço 1: Colônia 1 não induzida; 2: colônia 1 induzida; 3: colônia 2 não induzida; 4: colônia 2 induzida; 5: colônia 3 não induzida; 6: colônia 3 induzida. Em B, a mesma banda também é visível

na altura esperada em colônias que foram induzidas com o análogo a lactose. Poço 1: Extrato celular da bactéria não transformada; 2: Colônia 1 induzida com 1 mM de IPTG; 3: Colônia 1 não induzida; 4: Colônia 2 não induzida; 5: Colônia 2 induzida; 6: Colônia 3 não induzida; 7: Colônia 3 induzida; 8: Colônia 4 não induzida; 9: Colônia 4 induzida; 10: Colônia 5 não induzida; 11: Colônia 5 induzida; 12: Marcador de peso molecular BioRad All Blue 1KB.

A Figura 3 apresenta o teste de expressão da proteína XCL isolada. O teste de colônia foi realizado colônia com as cepas RIL e Origami, sendo detectado o tamanho de banda esperado (15 KDa) em ambas. Em A, Gel SDS-PAGE e WB da expressão na cepa RIL. Poço 1: RIL não transformada; 2: colônia 1 induzida; 3: colônia 2 induzida; 4: colônia 3 induzida; 5: colônia 4 induzida; 6: colônia 5 induzida 7: Marcador de peso molecular BioRad 1Kb plus. Em B, Gel SDS-PAGE e WB da expressão na cepa Origami. Poço 1: Marcador de peso molecular; 2: Origami não transformada; 3: Colônia 1 não induzida; 4: Colônia 1 induzida; 5: Colônia 2 induzida; 6: Colônia 3 induzida; 7: Colônia 4 induzida; 8: Colônia 5 não induzida.

A Figura 4 apresenta a análise do arranjo estrutural da quimera, XCL e Banlec mutante em tampão D-PBS. Em A, é mostrado o gel SDS-PAGE da quimera e seus componentes isolados (Banlec mutante e XCL) em comparação com BSA (1 mg/ml) e em B é apresentado o Western Blot do mesmo gel. Essa análise comprova que após todos os passos de produção e processamento a molécula continua formando suas estruturas ativas. Poço 1: Marcador de peso molecular BioRad Dual Color Plus; 2 e 3: Banlec mutante em condições não desnaturantes e desnaturantes (presença de beta-mercaptoetanol no tampão de amostra); 4 e 5: quimera em condições não desnaturantes e desnaturantes, respectivamente; 6 e 7 XCL em condições não desnaturantes e desnaturantes. O anticorpo primário utilizado foi anti-histidina (1:10000) e secundário anti-camundongo (1:10000), sendo a membrana revelada com o composto quimioluminescente Pierce ECL Western Blotting Substrate™.

A Figura 5 apresenta os ensaios de proliferação celular em células de câncer de pâncreas CFPAC-1. As proteínas foram incubadas com as células por até 6 dias, quando foram capturadas as imagens em magnificação 4x (EVOS Microscope, Invitrogen). É possível observar marcada redução no crescimento das células tumorais, o que também

é comprovado através do ensaio de MTT. Em A, o controle de tratamento apenas com D-PBS. Em B, Banlec mutante, em C a quimera, em D, a proteína XCL.

A Figura 6 demonstra a porcentagem da viabilidade celular normalizada em relação ao dia 0. Média de 3 experimentos independentes utilizando triplicatas dos tratamentos. Os dados foram gerados no programa GraphPad aplicando 2-way ANOVA e teste *post hoc* de Tuckey. Os asteriscos indicam diferença estatística significativa entre os grupos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$); as barras de erro foram geradas a partir do erro padrão da média (SEM).

A Figura 7 apresenta o Western Blot de proteínas associadas a vias de sinalização de morte celular por autofagia ou apoptose. As células de câncer de pâncreas CFPAC-1 tratadas apenas com meio de cultivo, com 10 μ M da quimera ou com suas respectivas porções isoladas (Banlec mutante e XCL). Os extratos foram coletados em 24, 72 e 120h após o tratamento com as lectinas e 30 μ g de proteína total foram transferidas para membrana. É possível que as lectinas estejam apresentem atividade antiproliferativa tanto apoptose quanto autofagia.

Descrição da invenção

[008] A presente invenção visa demonstrar a capacidade de produção e atividade antitumoral de duas lectinas com diferentes especificidades compondo uma quimera. Para isso, foram utilizadas a Banlec mutante com afinidade para o N-glicano modificado *high mannose*, e a lectina de cogumelo XCL, com afinidade para os antígenos T e Tn, O-glicanos truncados. Espera-se, portanto, aumentar a atividade antiproliferativa e especificidade das lectinas quando em contato com células tumorais, e, preferencialmente, diminuir a concentração necessária para a efetividade.

[009] É interessante notar que apesar do grande potencial das lectinas como agentes terapêuticos nenhuma lectina efetivamente chegou à fase clínica. Isso pode ocorrer devido algumas características que dificultam sua utilização, como a citotoxicidade e mitogenicidade de algumas lectinas, ativação exacerbada do sistema imunológico - resultando em respostas deletérias - e dificuldade de produção em larga escala (**NABI-**

AFJADI, M. et al. Lectins and lectibodies: potential promising antiviral agents. Cellular & Molecular Biology Letters, v. 27, p. 37, 13 maio 2022).

[0010] A lectina de banana (Banlec), é uma lectina semelhante à jacalina (JRL) de 15 kDa que reconhece glicanos complexos como *high mannose* e sua atividade antitumoral já foi demonstrada para diversos tipos de câncer. Infelizmente, a potente resposta mitogênica dificulta a sua utilização terapêutica **(SINGH, S. S.; DEVI, S. K.; NG, T. B. Banana Lectin: A Brief Review. Molecules, v. 19, n. 11, p. 18817–18827, 17 nov. 2014.)**. Uma Banlec engenheirada a partir de análises *in silico* das sequências de nove outras lectinas relacionadas à família JRL manteve sua atividade antiproliferativa contra linhagem de melanoma, demonstrando que o sítio de ligação a carboidrato foi preservado e é possível utilizá-la como um novo agente antitumoral **(DE CAMARGO, L. J. et al. Characterization of a Molecularly Engineered Banlec-Type Lectin (rBTL). Molecular Biotechnology, v. 66, n. 2, p. 288–299, 1 fev. 2024).**

[0011] A lectina de *Xerocomus chrysenteron* (XCL) é de grande potencial biotecnológico e atividade antitumoral. A XCL possui 14 kDa e reconhece especificamente a N-acetil galactosamina (GalNAc). Sua interação com células tumorais se dá principalmente pela afinidade aos antígenos T e Tn, estimulando a perda da adesão celular. A principal característica da XCL reside no fato de não desencadear eventos mitogênicos ou toxicidade para células normais. O pequeno tamanho, a falta de atividade mitogênica e a ligação ao O-glicano modificado são características desejadas e estudadas e implementadas em conjunto com novas tecnologias terapêuticas, incluindo aquelas que visam a atividade antiproliferativa **(DAMIAN, L. et al. Determination of thermodynamic parameters of Xerocomus chrysenteron lectin interactions with N-acetylgalactosamine and Thomsen-Friedenreich antigen by isothermal titration calorimetry. BMC Biochemistry, v. 6, n. 1, p. 11, 1 jun. 2005; MARTY-DETRAVES, C. et al. Inhibitory action of a new lectin from Xerocomus chrysenteron on cell-substrate adhesion. Molecular and Cellular Biochemistry, v. 258, n. 1/2, p. 49–55, mar. 2004).**

[0012] Devido ao potencial antiproliferativo apresentado pela Banlec e XCL, hipotetizou-se que seria possível aumentar a afinidade pelos glicanos aberrantes e a inibição do crescimento tumoral ao unir duas lectinas com especificidades diferentes.

[0013] As experiências conduzidas durante o curso do desenvolvimento de modalidades da presente invenção demonstraram a atividade da lectina quimérica como um antitumoral capaz de inibir a proliferação de células cancerosas, notadamente de câncer de pâncreas.

[0014] A lectina quimérica possui uma variedade de propriedades que a tornam atraente para o desenvolvimento como um componente terapêutico antitumoral, incluindo seu pequeno tamanho, estabilidade, inibição da proliferação celular, capacidade de ligação a diferentes glicanos aberrantes, e pode ser produzida em bactérias, plantas e leveduras.

[0015] Por conseguinte, em algumas modalidades, a presente invenção fornece a possibilidade do uso do produto originado a partir da sequência de nucleotídeo da quimera Banlec mutante-XCL otimizada para expressão heteróloga, definida em SEQ ID N°1; ou seus fragmentos ativos.

[0016] A presente invenção prevê o uso de quaisquer sistemas de expressão de DNA recombinante, tais como bactérias, leveduras, células de insetos, células animais ou plantas, caracterizado por ter sido transfectada com a sequência de DNA das reivindicações 1 e 2, bem como método de expressão da lectina caracterizada pelo fato de ser efetuada dentro do organismo a partir de cDNA ou de DNA genômico ou sequência sintética sob a forma nativa.

[0017] Em algumas modalidades, a presente invenção prevê a construção de DNA, caracterizada por compreender uma sequência de nucleotídeo que expresse toda ou parcialmente a quimera Banlec mutante-XCL, operacionalmente ligada a uma sequência de nucleotídeos heteróloga de interesse.

[0018] Em alguma modalidade, a presente invenção fornece a possibilidade de uso do produto da expressão recombinante de uma sequência de nucleotídeo compreendendo um fragmento de no mínimo 50% da sequência otimizada, definida em SEQ ID N°1. Além disso, a presente invenção prevê o uso de uma sequência de nucleotídeo compreendendo um fragmento da sequência definida em SEQ ID N°1, na qual a referida

sequência inicia a transcrição em um sistema de expressão de DNA recombinante e em células eucarióticas ou procarióticas.

[0019] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece polipeptídios variantes onde uma sequência de nucleotídeo compreendendo uma sequência apresentando pelo menos 90% de identidade com a sequência definida em SEQ ID N°1, na qual a referida sequência inicia a transcrição em um sistema de expressão de DNA recombinante.

[0020] Em algumas modalidades, a presente invenção prevê a utilização de qualquer célula caracterizada por ter sido transfectada com a sequência de DNA das reivindicações 1 e 2; e o uso de qualquer organismo transgênico, caracterizado por ter estavelmente incorporada em seu genoma a sequência de DNA das reivindicações 1 e 2;

[0021] Por conseguinte, a presente invenção prevê o desenvolvimento de método de expressão da quimera Banlec mutante-XCL caracterizada pelo fato de ser efetuada dentro do organismo a partir de cDNA ou de DNA genômico ou sequência sintética fusionada com outra proteína ou peptídeo.

[0022] Além disso, a presente invenção prevê o uso de método de expressão da lectina caracterizada pelo fato de ser efetuada dentro do organismo a partir de cDNA ou de DNA genômico ou sequência sintética fusionada com parte da proteína original.

[0023] Em alguma modalidade, a presente invenção prevê o uso da proteína heteróloga de interesse caracterizada por ter sido produzida através da sequência de DNA das reivindicações 1 e 2, não limitando-se a este. Além disso, está contemplada nesta reivindicação a utilização da sequência compreendendo um polipeptídeo variante da quimera Banlec mutante-XCL em que a referida variante demonstre atividade antitumoral.

[0024] Em algumas modalidades, o produto da expressão do gene da lectina quimérica Banlec mutante-XCL (SEQ ID N°1) é usada como um componente das composições quimioterápicas, por exemplo, para controlar o crescimento e disseminação de células cancerosas e malignas, impedindo então sua proliferação.

[0025] Em algumas modalidades, o produto da expressão do gene da lectina quimera Banlec mutante-XCL (por exemplo, SEQ ID NOs: 1) é usada como um componente das composições quimioterápicas (por exemplo, para diminuir ou destruir células cancerosas, de modo a contribuir com o tratamento contra o câncer). Por exemplo, em algumas modalidades, a lectina quimérica e mutantes obtidos a partir da engenharia genética desta, estão incluídos em formulações para uso como composto antitumoral (por exemplo, isoladamente ou em conjunto com diferentes tratamentos antitumorais). Em algumas modalidades, formulações compreendendo a proteína quimérica recombinante são usadas no tratamento quimioterápico de diversos tipos de cânceres sólidos que apresentem os glicanos aberrantes específicos, como câncer de fígado, mama, ovário, próstata, colorretal e pulmão, não limitando-se a estes.

[0026] Em algumas modalidades, as composições e formulações contendo a lectina quimérica Banlec mutante-XCL, para aplicação superficiais, podem incluir soluções aquosas estéreis que também podem conter tampões, diluentes e outros aditivos adequados, tais como, mas não limitados a melhoradores de penetração, compostos veículos e outros veículos ou excipientes aceitáveis.

[0027] As composições possíveis da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a soluções, emulsões e formulações contendo lipossomas. Estas composições podem ser geradas a partir de uma variedade de componentes que incluem, mas não estão limitados a estes, líquidos pré-formados, sólidos auto emulsionantes e semissólidos auto emulsionantes.

[0028] As composições possíveis da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a soluções, emulsões e formulações que contenham nanopartículas ou que integrem a presente invenção às nanopartículas. Estas composições podem ser geradas ou conter uma variedade de componentes que incluem exossomas, nanopartículas coloidais, nanopartículas poliméricas, dendrímeros, micelas, nanopartículas de proteínas e de membrana celular, nanopartículas de sílica mesoporosa, nanopartículas de ouro, nanopartículas de óxido de ferro, *quantum dots*, nanotubos de carbono, mas não estão limitados a estes,

[0029] As formulações da presente invenção, que podem ser convenientemente apresentadas na forma de dosagem unitária, podem ser preparadas de acordo com técnicas convencionais bem conhecidas na indústria biotecnológica. Tais técnicas incluem a etapa de associar os ingredientes ativos ao (s) veículo (s) farmacêutico (s) ou excipiente (s). Em geral, as formulações são preparadas associando uniformemente e intimamente os ingredientes ativos com veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos ou ambos, e então, se necessário, moldando o produto.

[0030] As composições da presente invenção podem adicionalmente conter outros componentes adjuntos encontrados convencionalmente em composições químicas e biotecnológicas. Assim, por exemplo, podem conter materiais adicionais úteis na formulação física de várias formas de dosagem das composições da presente invenção, tais como corantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espessantes e estabilizadores. Por outro lado, esses materiais, quando adicionados, não devem interferir com as atividades biológicas dos componentes das composições da presente invenção. As formulações podem ser esterilizadas por métodos que mantenham suas propriedades, incluindo a lectina quimérica.

Exemplos de concretizações da invenção

EXEMPLO 1 – CONSTRUÇÃO E PRODUÇÃO DA LECTINA QUIMÉRICA E XCL

Análises bioinformáticas

[0031] Anteriormente à construção do gene sintético, a configuração e estabilidade da quimera Banlec mutante-XCL foi avaliada através de ferramentas bioinformáticas. Utilizando as sequências de Banlec mutante (Uniprot ID: O22321) e da lectina de *Xerocomus chrysenteron* (XCL) (Uniprot ID: Q8WZC9), foram testados diferentes arranjos através de modelagem 3D no *software* Colabfold. O posicionamento da cauda de histidina em C ou N-terminal e diferentes linkers e sua quantidade foram avaliadas, sendo estes rígidos ou flexíveis.

[0032] Avaliou-se a estabilidade da proteína quimérica em uma simulação por 100 ns na temperatura de indução da expressão (16 °C) através de dinâmica molecular no programa GROMACS. O programa ProtParam foi utilizado para obter informações

relacionadas à natureza bioquímica, como ponto isoelétrico, índice GRAVY, coeficiente de extinção molar e absorvância a 280 nm de 1 mg/ml. A solubilidade da quimera foi verificada no *software* Protein-sol.

[0033] Estudos de docking molecular utilizando o programa Vina-Carb e os carboidratos aos quais a quimera poderia interagir foram realizados com o antígeno T, Tn e glicanos complexos de high mannose. Para a avaliação da interação entre os protômeros da quimera, foram utilizados os *softwares* ClusPro, UDock e AlphaFold3.

[0034] As análises bioinformáticas comprovaram através dos modelos 3D que o melhor *linker* para garantir flexibilidade estrutural é flexível. A cauda de histidina posicionada em C-terminal está adequada ao plasmídeo e esta configuração se mostrou estável em simulação de dinâmica molecular, apresentando baixa variação na distância entre os átomos medidos pelo RMSD, RMSF e raio de giro. Este foi o melhor arranjo para o presente objetivo, apresentando a seguinte configuração: sítio de restrição HindIII - lectina Banlec mutante - *linker* GGGS (2x) - sítio de restrição HindIII - lectina XCL - cauda de histina. As análises dos parâmetros bioquímicos indicaram peso molecular de 32 KDa, ponto isoelétrico 7.84, índice alifático 74.01, índice GRAVY -0.197, coeficiente de extinção molar 47330 e absorvância a 280 nm (1 mg/ml) 1.467. A solubilidade predita foi de 0.47, apenas marginalmente superior ao ponto de corte para proteínas solúveis (0.45). O docking molecular com carboidratos demonstrou alta afinidade de ligação da lectina quimérica com o antígeno T (-6.4 kcal/mol) e a high mannose (-5.6 kcal/mol), enquanto a análise de interação entre os protômeros demonstrou que as porções isoladas, tanto da Banlec mutante quanto XCL, interagem e formam dímeros, o que já foi detectado experimentalmente.

Construção, expressão e purificação das proteínas quimera e XCL em *E. coli*

[0035] A construção do gene sintético englobou o melhor arranjo derivado das análises de bioinformática, que consistia nas lectinas conectadas por dois linkers flexíveis GGGS, cauda de histidina (His6x-tag) na porção C-terminal e sítios de restrição para a enzima HindIII. Este sítio de restrição foi adicionado na porção N-terminal e logo após o *linker*, visando separar a porção Banlec mutante da proteína quimérica e produzir a XCL isoladamente. As sequências da quimera e XCL e foram expressas através de uma

construção sintética obtida junto a empresa Epoch Life Sciences®, inserida no vetor pET-24(+) e transformada em *Escherichia coli*.

[0036] A cepa de clonagem DH5a foi utilizada para a propagação do plasmídeo sintético contendo o gene da quimera em sua totalidade quanto apenas o gene da XCL após a separação com a enzima de restrição HindIII HF (NEB). O plasmídeo foi incubado por 30 min com a enzima de restrição a 37 °C, seguido de inativação por 20 min a 80 °C. Para a ligação das extremidades foi utilizada a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen™, Catalog #15224017) por 10 min a temperatura ambiente seguida de inativação a 65 °C. As amostras foram analisadas através de gel de agarose 1% em tampão TAE. Já para a expressão recombinante, as seguintes cepas de *E. coli* BL21 (DE3) modificadas foram testadas: STAR, DE(3), PlyS, SOLU, Rosetta (dados não publicados), RIL (Agilent Technologies®) e Origami™ 2 (Sigma Aldrich®). As bactérias foram cultivadas a 37 °C até atingirem a densidade óptica (DO) de 0,6 a 0,8, quando foram induzidas na concentração final de 1 mM IPTG (Isopropil β-d-1-tiogalactopiranosídeo). A indução ocorreu overnight a 16 °C, seguida de centrifugação dos cultivos a 20.000 x g por 20 min.

[0037] Para a purificação, utilizou-se os buffers padrão de cromatografia de afinidade (IMAC) (46 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, 290 mM NaCl, 3,07 mM Sodium Azide (NaN₃), pH 8). O processamento do pellet foi feito com IMAC sem imidazol adicionado de 0,04g de lisozima (Sigma Aldrich) e 80 μL de DNase I (Thermo Fisher Scientific), com agitação por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se o buffer IMAC-50 (mesma composição, adicionado de 50 mM imidazol) e as amostras foram incubadas em gelo por 10 min. A sonicação foi realizada com as amostras em gelo por 4 vezes, sendo 30 segundos a 50% de potência e 60 segundos de intervalo. As amostras sonicadas foram centrifugadas a 38 000 x g por 40 min a 4 °C. O pellet resultante foi ressuspendido em IMAC-25 adicionado de 8M de ureia a fim de obter as proteínas dos corpos de inclusão. 12 a 14 trocas de tampão foram feitas por meio de diálise em tampão D-PBS (Gibco, Catalog #21600069, 2,66 mM Cloreto de Potássio (KCl), 1,47 mM fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), 137,93 mM Cloreto de Sódio (NaCl), 8 mM Fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄)). A confirmação da expressão recombinante e arranjo quaternário das formas ativas foi determinado através de eletroforese SDS-

PAGE em condições desnaturantes e não desnaturantes (MiniProtean Gel 4-20%, BioRad) e *Western Blotting* com anticorpo anti-histidina (Qiagen, 34460).

[0038] As cepas de *Escherichia coli* RIL e Origami foram testadas tanto para a quimera quanto para a XCL. Em relação a quimera, a cepa Origami provou expressar em maiores quantidades, o que é visto pela banda mais proeminente na altura esperada (32 KDa) (Figura 2). Já no caso da XCL, a cepa RIL foi mais adequada, visto pela banda de 15 KDa mais proeminente (Figura 3). Após a diálise em D-PBS, percebeu-se que a estrutura e arranjos quaternários foram mantidos (Figura 4), o que foi avaliado através da presença ou ausência do agente desnaturante β -mercaptoetanol. Assim, fica claro que pós a purificação e remoção do tampão de purificação os arranjos formados por ambas as proteínas são majoritariamente dímeros, estando também presentes tetrâmeros.

[0039] Após a caracterização da melhor forma de produção da quimera Banlec mutante-XCL, concluiu-se que a quimera é expressa em maiores quantidades na cepa Origami, com indução overnight a 16 °C e forma dímeros que são detectados no *Western Blot* na altura de 64 KDa. Já no caso da XCL, uma proteína de 16 KDa, neste estudo está sofrendo dimerização, representada por uma banda de 30 KDa reconhecida também no *Western Blot*. Ambas as proteínas se encontram em corpos de inclusão, portanto, na fração insolúvel, em concordância com a análise in silico.

EXEMPLO 2 – EFEITO DA LECTINA QUIMÉRICA NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE CÂNCER DE PÂNCREAS

[0040] Os procedimentos descritos a seguir são utilizados para a avaliação o potencial antiproliferativo da lectina quimérica.

Teste de atividade antiproliferativa em cultivo celular

[0041] Para o teste de atividade antiproliferativa utilizamos as células de câncer de pâncreas CFPAC-1. A linhagem foi mantida em garrafas de 175 cm² (T-125) com meio de cultivo IMDM (25 mM HEPES + L-glutamina) suplementado com 10% de soro fetal bovino até atingirem a confluência, em atmosfera controlada de 5% CO₂ e temperatura de 37 °C. Foram semeadas 3x10⁴ células por poço, em placas de 48 poços e para a obtenção de dados em triplicata. Como controle, utilizou-se as células adicionadas de D-

PBS estéril a fim de igualar a quantidade deste tampão que presente nos tratamentos com as proteínas. As proteínas foram adicionadas no meio de cultivo na concentração final de 10 μ M e incubadas com as células durante 6 dias. A atividade antiproliferativa das proteínas foi medida indiretamente através de atividade metabólica celular pelo ensaio de MTT (Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). No dia, dia 0 e a partir do terceiro dia adicionou-se o reagente MTT (12 mM) por 3h. Após remoção cuidadosa, as células foram incubadas por 10 min com 100 μ L de DMSO a fim de solubilizar os cristais de formazan para a leitura da absorbância a 540 nm. Para o cálculo de viabilidade celular, foi subtraído do valor de background do DMSO e calculada a porcentagem de células viáveis normalizadas de cada triplicata em relação à média das triplicatas do dia 0. Os valores de cada triplicata foram incluídos no *software* GraphPad Prism 10 (Versão 10.1.2) e a análise de variância ANOVA 2-way foi realizada para identificar diferenças entre grupos com teste post-hoc de Tuckey para identificação de quais grupos diferem entre si.

[0042] Os testes foram realizados para avaliar a ação antiproliferativa em uma linhagem câncer de pâncreas, CFPAC-1. Avaliamos a atividade antiproliferativa da quimera e seus constituintes isolados (Banlec mutante ou XCL) *in vitro*. Foi possível observar um efeito pronunciado de morte celular a partir do terceiro dia de ensaio, como já observado para Banlec mutante, mas o efeito máximo de morte celular foi obtido no quinto e sextos dias após o tratamento (Figura 5). A porcentagem de viabilidade celular foi obtida através do teste de MTT e cálculo das absorbâncias das triplicatas de cada ensaio, em 3 ensaios diferentes (Figura 6). O efeito de 10 μ M da quimera demonstrou maior atividade antiproliferativa no dia 6 em relação às proteínas testadas isoladamente, porém, é estatisticamente igual ao efeito da Banlec mutante sozinha. Nestes ensaios, a XCL isolada apresentou moderada atividade antiproliferativa em relação às outras duas proteínas.

Determinação da via de ação da quimera e XCL nas células de câncer de pâncreas

[0043] A fim de determinar por qual via as lectinas expressas estavam atuando para a morte celular, foi realizada uma série de *Western Blots* utilizando o extrato celular de CFPAC-1. As células foram mantidas como mencionado anteriormente até atingirem confluência, sendo então semeadas 2×10^6 , 5×10^5 e $1,25 \times 10^5$ células por placa,

respectivamente, em placas de cultura de 100 mM de diâmetro (Thermo Fisher Scientific) e tratadas após 24h com as proteínas. Os extratos foram recuperados por *scraping* com PBS 1x estéril nos *timepoints* 24h, 72h e 120h após o início do tratamento. O extrato total foi centrifugado a 1500 rpm a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e prosseguiu com a extração de proteínas totais. As células foram lisadas com tampão CHAPS (150 mM KCl, 50 mM HEPES, 0.1% CHAPS) suplementado com coquetel inibidor de fosfatase 1% e coquetel inibidor de protease com EDTA 1X por 30 min a 4 °C sob agitação leve e então centrifugadas a 13.3 rpm por 10 min a 4 °C. O extrato celular foi quantificado pelo método de Bradford. Anticorpos específicos para diversas proteínas relacionadas tanto a apoptose quanto à autofagia foram utilizados na caracterização das vias de ação: T-EGFR (4267), CASP3 (9662), T-BECLIN-2 (3738S), LC3B (3868), PARP-1 (9542), T-AKT (9272), e GAPDH (camundongo - 2118). Estes anticorpos foram comprados junto à Cell Signaling® e foram produzidos em coelho. Os anticorpos secundários utilizados foram anti-coelho (cabra - 31462) e anti-camundongo (cavalo – 7076; cabra – A2554). Para a detecção, foi utilizado uma concentração de 30 ug de proteína total por poço, calculada a partir do ensaio de Bradford (**BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, n. 72, p. 248–254, 1976**).

[0044] As proteínas analisadas que revelaram resultados distintos entre os tratamentos foram EGFR total (T-EGFR), Beclin total (T-Beclin), LC3B e Caspase-3 não clivada, mas não entre para T-AKT e PARP-1. Estas proteínas estão envolvidas em vias já conhecidas de morte celular causadas por lectinas. O tratamento com cada uma das lectinas mostra diferentes níveis destas proteínas nos extratos celulares (Figura 7). No caso da Banlec mutante, há uma drástica redução nos níveis de T-EGFR e T-Beclin em relação ao controle nos em 24, 72, 120h; já LC3B e caspase-3 estão apenas sutilmente diminuídos. O tratamento com a quimera revelou diminuição nos níveis de T-Beclin a partir de 72h e LC3B é praticamente indetectável até 120h. Os níveis de T-EGFR decaem até 72h, mas aumentam no último *timepoint*. Já Casp-3 parece levemente aumentada em 120h. XCL apresenta um perfil distinto das outras duas lectinas, sem interferência relevante em T-EGFR e Casp-3, enquanto T-Beclin aumenta em 120h e LC3B permanece praticamente indetectável até o mesmo *timepoint*. Essa análise é de extrema importância pois há

indicação de que a quimera age de forma diferente das proteínas isoladas, podendo ser tanto apoptose quanto autofagia. Entretanto, o mecanismo de morte celular envolvido na atividade antiproliferativa da quimera ainda não pode ser afirmado.

[0045] Em suma, a quimera afetou o crescimento celular de forma igual ou melhor que a Banlec mutante isolada, enquanto a XCL isolada não apresentou atividade antiproliferativa equivalente. Caracterizou-se que a atividade antiproliferativa da quimera pode estar ocorrendo tanto por apoptose quanto autofagia devido aos tratamentos apresentarem distintos perfis proteicos. Um potencial agente terapêutico que age em ambas as vias de morte celular caracteriza uma nova possibilidade de destruir células cancerosas.

DESENHOS

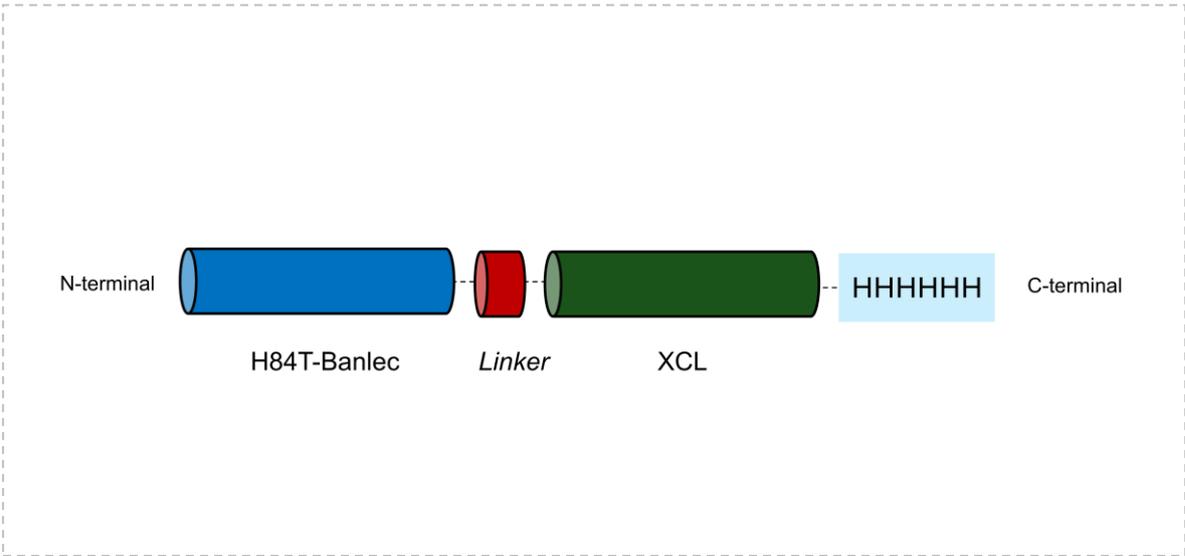


Figura 1

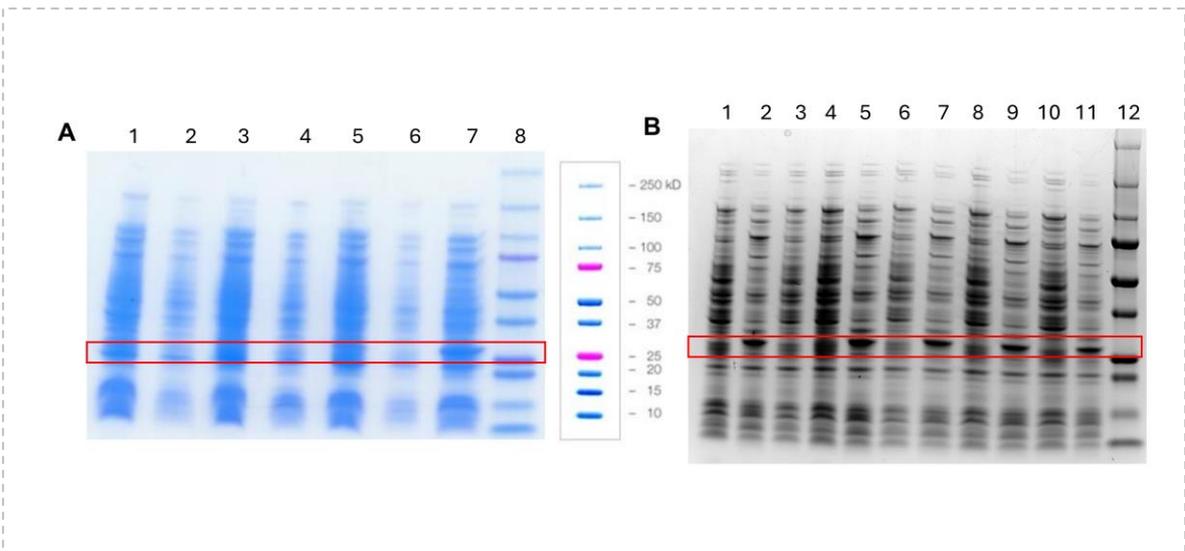


Figura 2

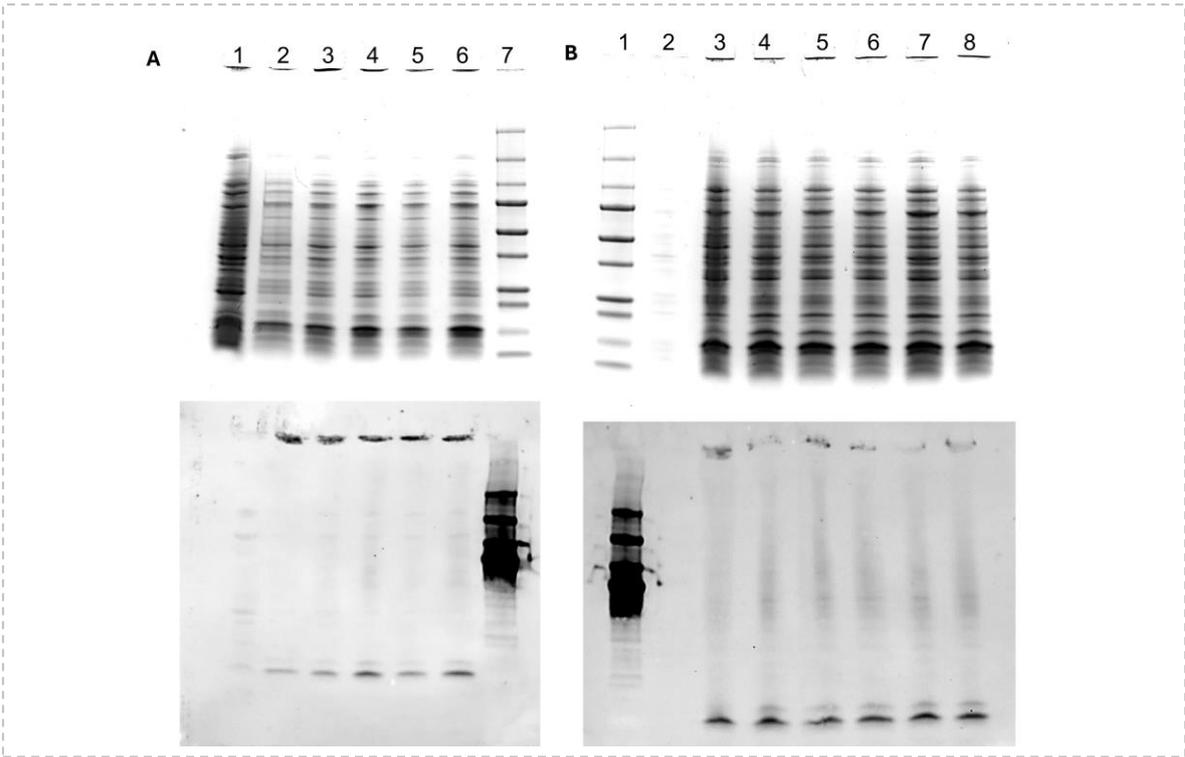


Figura 3

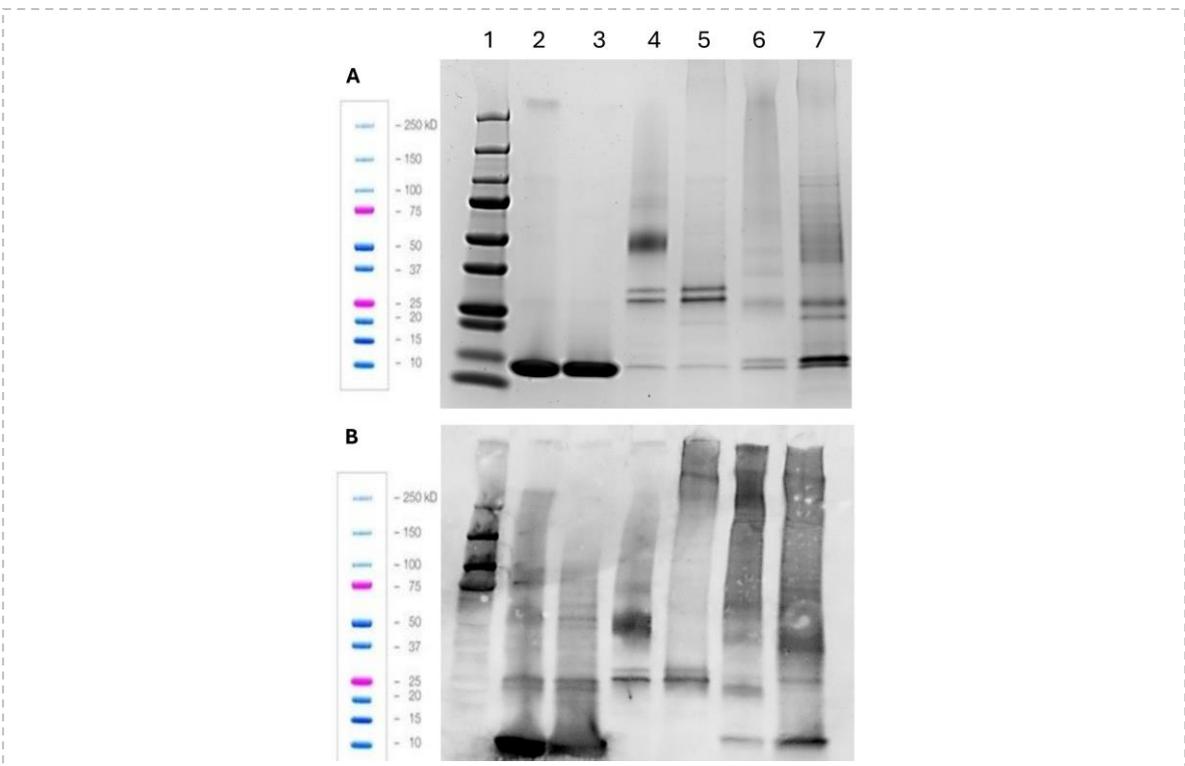


Figura 4

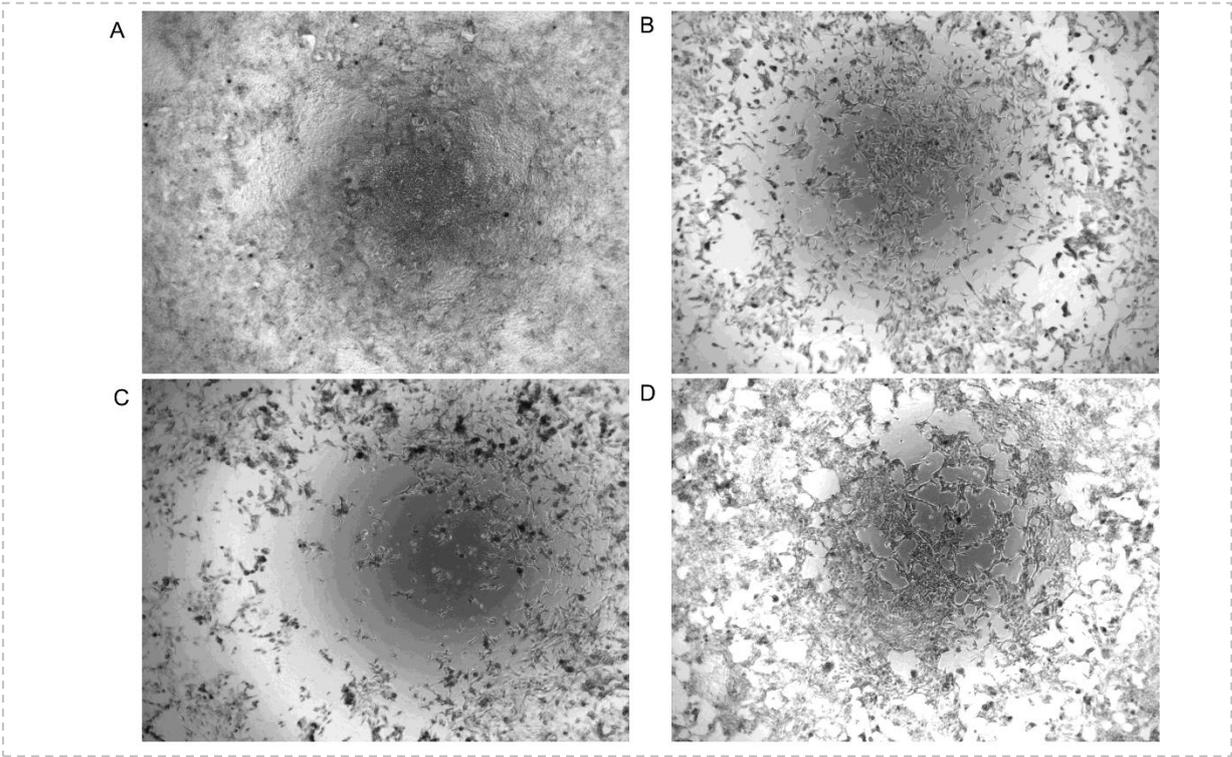


Figura 5

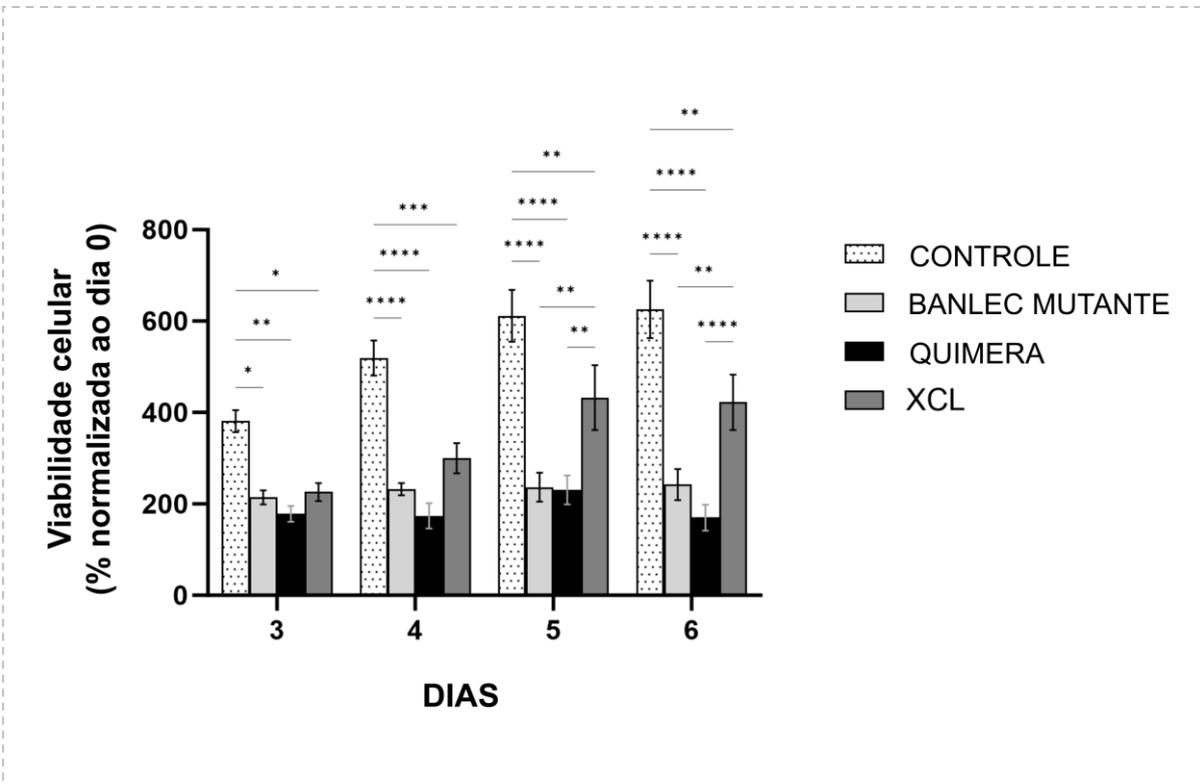


Figura 6

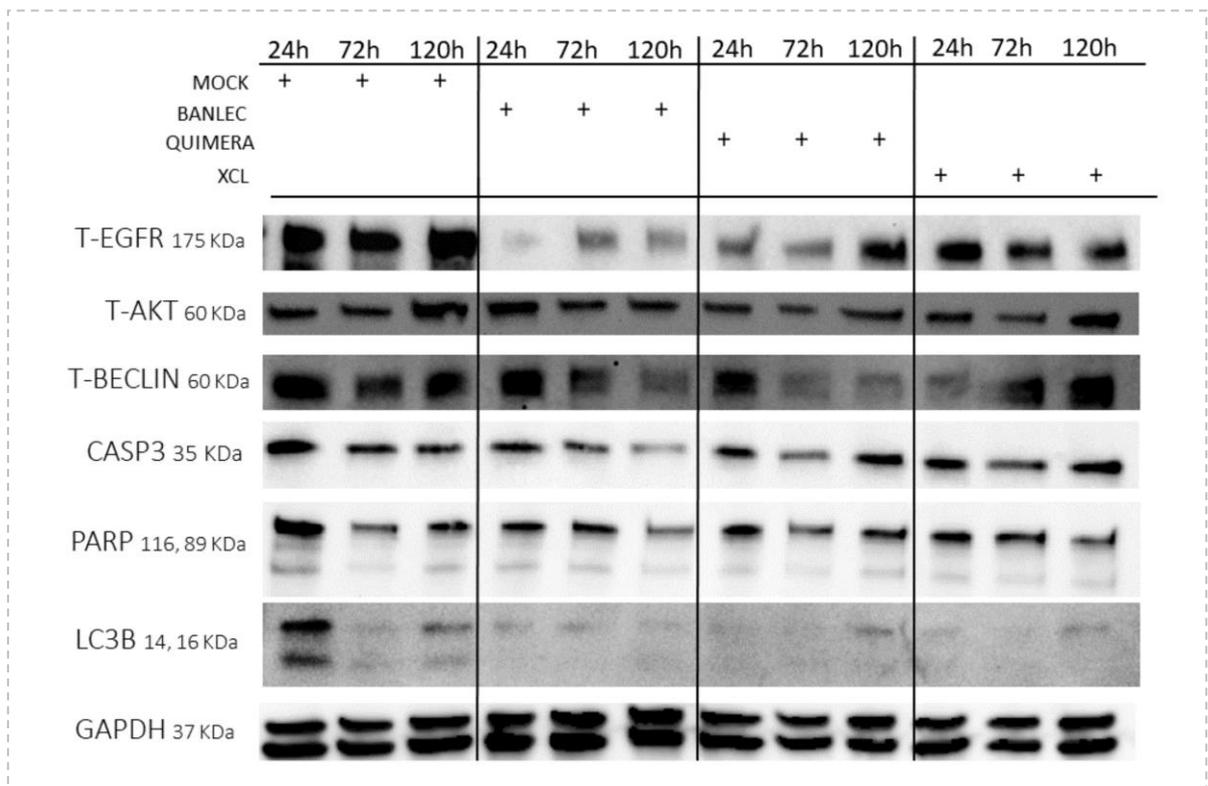


Figura 7

REINVINDICAÇÕES

1. SEQUÊNCIA DE DNA PARA PRODUÇÃO DA LECTINA QUIMÉRICA RECOMBINANTE “BANLEC MUTANTE-XCL” E UTILIZAÇÃO COMO AGENTE ANTITUMORAL **caracterizada por** sequência de nucleotídeos sintéticos (SEQ ID N°1) que codificam a proteína recombinante “Banlec mutante-XCL”;

2. SEQUÊNCIA DE DNA PARA PRODUÇÃO DE LECTINA RECOMBINANTE “BANLEC MUTANTE-XCL” E UTILIZAÇÃO COMO AGENTE ANTITUMORAL, conforme reivindicação 1, **caracterizada por** uma sequência de nucleotídeo que pode compreender de 50% a 100% da sequência definida como SEQ ID N°1;

3. SEQUÊNCIA DE DNA PARA PRODUÇÃO DE LECTINA RECOMBINANTE “BANLEC MUTANTE-XCL” E UTILIZAÇÃO COMO AGENTE ANTITUMORAL, conforme reivindicações 1 e 2, **caracterizada por** utilizar um vetor para expressão da proteína “Banlec mutante-XCL” em células bacterianas, mas não por estas limitada, incluindo leveduras, insetos, mamíferos ou vegetais;

4. SEQUÊNCIA DE DNA PARA PRODUÇÃO DE LECTINA RECOMBINANTE “BANLEC MUTANTE-XCL” E UTILIZAÇÃO COMO AGENTE ANTITUMORAL, conforme reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizada por** compreender um polipeptídeo variante da proteína “Banlec mutante-XCL”, com 50% a 100% de identidade, que demonstre atividade biológica;

5. SEQUÊNCIA DE DNA PARA PRODUÇÃO DE LECTINA RECOMBINANTE “BANLEC MUTANTE-XCL” E UTILIZAÇÃO COMO AGENTE ANTITUMORAL, conforme reivindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizada por** apresentar atividade antitumoral em células de câncer de pâncreas CFPAC-1 na concentração de 10 µM;

6. SEQUÊNCIA DE DNA PARA PRODUÇÃO DE LECTINA RECOMBINANTE “BANLEC MUTANTE-XCL” E UTILIZAÇÃO COMO AGENTE ANTITUMORAL, conforme reivindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizada por** apresentar atividade antitumoral em linhagens tumorais na concentração de 1 a 10 μM ;

7. SEQUÊNCIA DE DNA PARA PRODUÇÃO DE LECTINA RECOMBINANTE “BANLEC MUTANTE-XCL” E UTILIZAÇÃO COMO AGENTE ANTITUMORAL, conforme reivindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizada por** compor uma formulação antitumoral na forma de solução ou emulsão, mas não limitada a estas, contendo a lectina “Banlec mutante-XCL”, recombinante ou ainda parte destas. Estas composições podem ser geradas a partir de uma variedade de componentes que incluem, mas não estão limitados a estes, líquidos pré-formados, sólidos auto-emulsionantes e semi-sólidos auto-emulsionantes.

8. SEQUÊNCIA DE DNA PARA PRODUÇÃO DE LECTINA RECOMBINANTE “BANLEC MUTANTE-XCL” E UTILIZAÇÃO COMO AGENTE ANTITUMORAL, conforme reivindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizada por** compor uma formulação de nanopartículas para tratamento do câncer contendo a proteína recombinante “Banlec mutante-XCL” ou ainda parte destas. Estas formulações podem ser geradas a partir de uma variedade de componentes que incluem, mas não estão limitados a estes, exossomas, lipossomas, *quantum dots*, dendrímeros, micelas e nanotubos de carbonos.

SEQ ID N°1

>quimera

```
catatgaagcttatgaatggtgctatcaaagttggtgcttgggggtggcaatggtggttctgcgt
tcgacatgggtccagcataccgtatcatctctgtgaagatcttcagcggtgacgttggtgatgg
tgtggacgttactttcacctactacggtaagaccgaaactcgtcactacggtagcgggtggc
actccgcacgaaatcgttctgcaagaggggtgaatacctggtgggcatggctggtgaagtagcaa
actacaccggtgccggtgtactgggcaaactgggcttctccactaacaagaaggcgtatggtcc
gttcggtaacactggtggcactccattctctctgccgatcgcagcaggcaagatttctggcttc
tttggtcgtggtggtaagttcctggatgctatcgggtgttacctggaaccagggtggtggtgga
gCGGTGGTGGTGGCTCTAAGCTTATGTCCTATTCTATCACTCTGCGTGTTTACCAGACTAACC
TGACCGTGGCTACTTCAGCATCGTGGAGAAGACCGTGTGGCACTTTGCAAACGGTGGCACCTGG
AGCGAAGCCAACGGTGCGCATACCCTGACCCAGGGTGGCTCTGGTACTTCTGGCGTTCTGCGTT
TCTGTCCACCAAAGGCGAACGTATCACTGTGGCTGTTGGTGTACACAAC TACAAGCGCTGGT
TGACGTAAGTAACTGGTCTGAAGCCAGATGAAACTGCCTGGTTATCAATCCGCAGTACTACAAC
AACGGTGGTCTGTGACTACGTTCTGTGAGAAACAGCTGGCAGAATACAGCGTGACCTCCGCTATCG
GTACTAAAGTTGAGGTTGTGTACACC GTTG CAGAAGGCAACAACCTGGAGGCCAACGTTATCTT
CAGCCTCGAG
```

RELATÓRIO DE BUSCA DE ANTERIORIDADE

(Pesquisa em documentos de patentes e outras publicações técnicas)

<p>NOME DO PESQUISADOR (Gestor do Projeto): Luciano da Silva Pinto</p> <p>Nº DO PROJETO: 5848 (CÓDIGO COCEPE)</p> <p>UNIDADE / ÁREA: UNIDADE / ÁREA: Centro de Desenvolvimento Tecnológico – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (UFPel) DATA: 23/07/2024</p>
<p>OBJETO DA PESQUISA: Utilização de uma quimera de lectinas com atividade antiproliferativa contra diversos cânceres.</p>
<p>PROJETO: Construção de uma nova lectina ciborgue para aplicação biotecnológica</p>
<p>CLASSIFICAÇÕES: A61K; A61K 8/64; A61K 8/72; A61K 31/74; A61P 35/04; A61K 36/07; A61P 43/00; A61K 49/14; A61K 131/00; A61P 17/02; C12N 15/09; C12N 15/29</p>
<p>BANCO E BASE DE DADOS: INPI (http://www.inpi.gov.br/)</p> <p>PALAVRAS-CHAVE 01: “Quimera” AND “H84T” AND “XCL” / 0 resultados</p> <p>PALAVRAS-CHAVE 02: "Quimera" AND "Musa acuminata" AND "Xerocomellus chrysenteron" / 0 resultados</p> <p>PALAVRAS-CHAVE 03: "Quimera" AND "Musa acuminata" AND "Xerocomus chrysenteron" / 0 resultados</p> <p>PALAVRAS-CHAVE 04: “Quimera” AND “H84T” AND “XCL” AND “cancer” / 0 resultados</p> <p>PALAVRAS-CHAVE 05: "Quimera" AND "Musa acuminata" AND "Xerocomus chrysenteron" AND “câncer” / 0 resultados</p>
<p>BANCO E BASE DE DADOS: Google Patents (www.google.com/patents)</p> <p>PALAVRAS-CHAVE 01: “Chimera” AND “H84T” AND “XCL” / 0 resultados</p> <p>PALAVRAS-CHAVE 02: “Chimera” AND “Musa acuminata” AND “Xerocomus chrysenteron” / 0 resultados</p> <p>PALAVRAS-CHAVE 03: “Chimera” AND “Musa acuminata” AND “Xerocomellus chrysenteron” / 0 resultados</p> <p>PALAVRAS-CHAVE 04: “Chimera” AND “H84T” AND “XCL” AND “cancer” / 0 resultados</p> <p>PALAVRAS-CHAVE 05: "chimera" AND "Musa acuminata" AND "Xerocomus chrysenteron" AND “cancer” / 0 resultados</p>

BANCO E BASE DE DADOS: PORTAL CAPES (<http://www.periodicos.capes.gov.br>)

PALAVRAS-CHAVE 01: "Quimera" AND "H84T" AND "XCL" / 0 resultados

PALAVRAS-CHAVE 02: "Quimera" AND "Musa acuminata" AND "Xerocomellus chrysenteron" / 0 resultados

PALAVRAS-CHAVE 03: "Quimera" AND "Musa acuminata" AND "Xerocomus chrysenteron" / 0 resultados

PALAVRAS-CHAVE 04: "Quimera" AND "H84T" AND "XCL" AND "cancer" / 0 resultados

PALAVRAS-CHAVE 05: "Quimera" AND "Musa acuminata" AND "Xerocomus

BANCO E BASE DE DADOS: USPTO (EUA)

(<https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/static/pages/landing.html>)

PALAVRAS-CHAVE 01: "Chimera" AND "H84T" AND "XCL" / 0 resultados

PALAVRAS-CHAVE 02: "*Chimera*" AND "*Musa acuminata*" AND "*Xerocomus chrysenteron*" / 0 resultados

PALAVRAS-CHAVE 03: "Chimera" AND "Musa acuminata" AND "Xerocomellus chrysenteron" / 0 resultados

PALAVRAS-CHAVE 04: "Chimera" AND "H84T" AND "XCL" AND "cancer" / 0 resultados

PALAVRAS-CHAVE 05: "chimera" AND "Musa acuminata" AND "Xerocomus chrysenteron" AND "cancer" / 0 resultados

BANCO E BASE DE DADOS: ESPACENET (EUROPA)

(<http://worldwide.espacenet.com/>)

PALAVRAS-CHAVE 01: "Chimera" AND "H84T" AND "XCL" / 0 resultados

PALAVRAS-CHAVE 02: "*Chimera*" AND "*Musa acuminata*" AND "*Xerocomus chrysenteron*" / 0 resultados

PALAVRAS-CHAVE 03: "Chimera" AND "Musa acuminata" AND "Xerocomellus chrysenteron" / 0 resultados

PALAVRAS-CHAVE 04: "Chimera" AND "H84T" AND "XCL" AND "cancer" / 0 resultados

PALAVRAS-CHAVE 05: "chimera" AND "Musa acuminata" AND "Xerocomus chrysenteron" AND "cancer" / 0 resultados

AVISO IMPORTANTE

A busca prévia de anterioridade é uma amostragem e não verifica os documentos de patentes que estão em período de sigilo a partir da data de pedido de depósito, nos escritórios oficiais, que é de 18 meses. Portanto se algum documento similar ou igual estiver no período de sigilo, vale o recurso para o primeiro depositante. Além do que foi exposto anteriormente, a busca prévia não garante a abrangência do campo de pesquisa bibliográfica na totalidade da literatura técnica publicada no mundo.

RESULTADO DAS PESQUISAS

Segundo sua pesquisa, foram encontradas anterioridades? Não Sim

Caso tenham sido encontradas anterioridades, preencha a tabela a seguir com as informações solicitadas.

Nº da Patente	Descrição	Base	Classificação Internacional

Você teve orientação para realizar a pesquisa de anterioridade? Sim Não
Especificar: Responsável pelo projeto

A escola ou inventor tem interesse em patentear o invento? Sim Não

Existe alguma empresa interessada no projeto? Sim Não

PARECER TÉCNICO DO RESULTADO DA PESQUISA: Como resultado da busca de anterioridade realizada e aqui relatada, podemos concluir que o objeto citado para patenteamento é uma invenção inovadora, uma vez que não foram encontradas produções científicas e/ou tecnológicas patenteadas, a seu respeito, uso ou aplicação. O estado da arte disponível até o presente momento para os termos aqui pesquisados, que abrangem a invenção, não demonstra a existência de patentes de inovação relacionadas, sejam estas produtos ou processos.

Alessandra Neis <hr/>	Luciano da Silva Pinto <hr/>
Responsável pela Busca	Responsável pelo Projeto