

A AÇÃO BIOLÓGICA DE LECTINAS NA INDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

ALICE CALDERIPE DE LIMA¹; KETHLIN DE QUADROS¹; GUILHERME FEIJÓ DE SOUSA²; LUCIANO DA SILVA PINTO³

¹Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Graduação em Biotecnologia, CDTec, UFPel – calderipe.a@gmail.com; kethlin04@hotmail.com

²Laboratório de Bioinformática e Proteômica, PPGBiotec, CDTec, UFPel – guima.sousa07@gmail.com

³Laboratório de Bioinformática e Proteômica, PPGBiotec, CDTec, UFPel – dmpluc@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Lectinas são uma classe de proteínas de origem não imune com domínios capazes de se ligar a diferentes carboidratos de forma reversível, específica e não covalente. A maioria das lectinas estudadas são de origem vegetal, como, por exemplo, as do gênero *Bauhinia*, utilizadas há muitos anos na medicina popular graças às suas propriedades anti-inflamatórias e antidiabéticas. Além dessas características, as lectinas também auxiliam o processo de cicatrização e regeneração tecidual e podem inibir o crescimento de fungos, bactérias, vírus e células tumorais (CAGLIARI *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2019).

A reconstituição tecidual ocorre através de dois processos, chamados de regeneração e cicatrização (SCHREML *et al.*, 2010). Durante a regeneração, células mortas devido a agressões são substituídas pelo parênquima do mesmo órgão, enquanto na cicatrização as células lesadas são substituídas por tecido fibroso. Para isso acontecer, é necessário que uma cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos ocorra simultaneamente (ANDRADE *et al.*, 2013).

No Brasil, o Ministério da Saúde reporta uma prevalência de *diabetes mellitus* em cerca de 6,6 a 9,4% da população adulta (GOLLO *et al.*, 2022). Portadores dessa doença metabólica apresentam dificuldade na cicatrização de feridas, principalmente devido ao comprometimento da perfusão sanguínea, que diminui o fornecimento de oxigênio e nutrientes às feridas. As lesões crônicas, além de causarem desconforto ao paciente, constituem um problema de saúde pública, ainda sem estudos aprofundados sobre seu impacto econômico (ANDRADE *et al.*, 2013).

Nesse sentido, o papel das lectinas na indução da proliferação de células epiteliais pode auxiliar no tratamento de feridas crônicas devido ao seu potencial terapêutico. As proteínas deste estudo foram obtidas de farinha de sementes de *Bauhinia variegata*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar sua atividade proliferativa em uma linhagem de fibroblastos humanos e em outra de camundongos, visando sua utilização futura como biofármaco.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção da lectina BvL

A lectina extraída das sementes de *B. variegata* (BvL) foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de lactose-agarose (Sigma, St. Louis, MO, EUA), seguindo o método descrito por Pinto *et al.* (2008). A concentração de proteína foi determinada pelo método BCA (*kit PIERCETM BCA Protein Assay, Thermo Scientific*), usando albumina de soro bovino como padrão. A pureza da proteína foi confirmada por SDS-PAGE na concentração de 12%.

2.2 Ensaio de proliferação celular

A lectina purificada foi testada em células de fibroblasto de camundongo (NIH/3T3) e células de fibroblasto humano (HFF-1). As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) a 37°C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As linhagens foram tratadas por 24, 48 e 72 horas com a lectina BvL nas concentrações de 6, 12,5, 25, 50 e 100 µg.mL⁻¹. Após o tratamento, a viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de MTT.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as etapas de purificação, a BvL nativa foi obtida de forma homogênea na massa molecular esperada (Figura 1). Após liofilização, sua atividade biológica foi verificada no teste de aglutinação de sangue de coelho. A determinação do rendimento de purificação foi realizada com ensaio de quantificação de proteínas pelo método BCA. Cerca de 40 gramas de pó de sementes de *B. variegata* descascadas produziram aproximadamente 25 mg de lectina liofilizada.

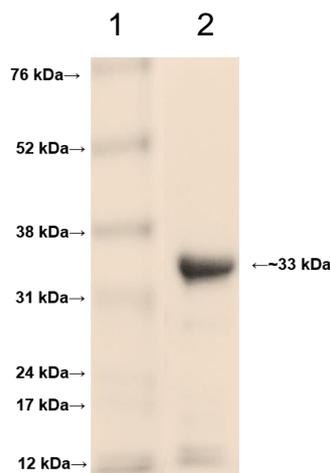


Figura 1: Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (12%). 1 - Marcador de proteína de massa molecular Full Range Rainbow (G&E). 2 - BvL purificada a partir de sementes de *B. variegata* por cromatografia de afinidade em coluna de agarose-lactose.

Durante o tratamento, a lectina induziu proliferação celular nas linhagens NIH/3T3 após 24 horas, com significativo resultado ($p < 0,001$) na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Além disso, após 24 e 72 horas de tratamento, as concentrações de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram resultados significativos ($p < 0,01$) em relação ao controle (meio DMEM alto teor de glicose). A variável tempo tem o mesmo efeito para todos os tratamentos ($p < 0,05$) e afeta os resultados obtidos ($p < 0,001$).

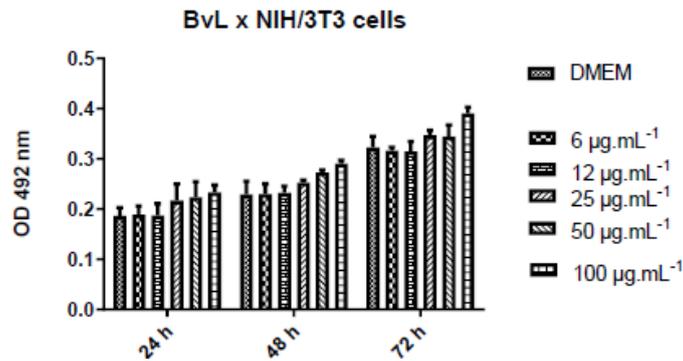


Figura 2: Ensaio de proliferação celular. Viabilidade celular e indução de proliferação de fibroblastos NIH/3T3 após tratamento com diferentes concentrações de BvL foram monitoradas usando MTT. Os resultados são expressos como intensidade de absorbância a 492 nm, usando células cultivadas em meio DMEM de alta glicose 10% FBS (ANOVA de duas vias, *** $p < 0,001$).

Já nas linhagens HFF-1, a proliferação celular foi observada após 24 horas de cultivo com os tratamentos com 25, 50 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, não diferindo do controle na concentração de $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Nas concentrações de 50 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foi possível observar uma proliferação celular significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle e ao tratamento após 48 horas. Após 72 horas, é possível observar diferença significativa nos tratamentos com 25, 50 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em relação ao controle, mas não entre as concentrações (Figura 3).

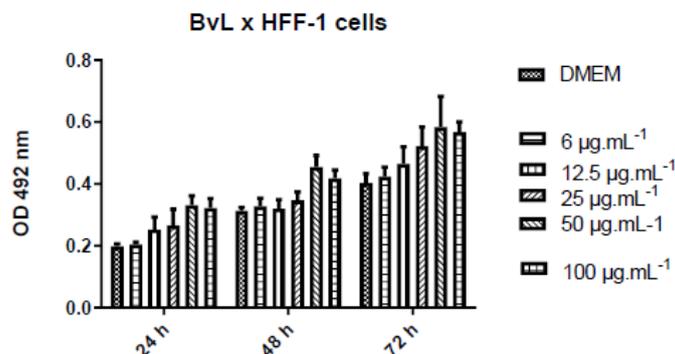


Figura 3: Ensaio de MTT em fibroblastos HFF-1 após o tratamento com BvL. Os resultados são expressos em intensidade de absorbância a 492 nm e percentual de proliferação celular, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 10% SFB como controles (*two way ANOVA*, ** $p < 0,01$).

4. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no estudo demonstram que na linhagem celular NIH/3T3, o tratamento induziu proliferação celular, mas com diferença efetiva na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p < 0,001$). A proliferação celular induzida em concentrações mais elevadas está de acordo com testes anteriores realizados *in vivo* pelo nosso grupo (Reis *et al.*, 2015). Sendo assim, a lectina de *B. variegata* (BvL) é uma biomolécula terapêutica que apresenta um potencial voltado para a proliferação de células envolvidas na cicatrização de feridas cutâneas, e sua produção em sistemas heterólogos será realizada no futuro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M. G. L.; CAMELO, C. N.; CARNEIRO, J. A.; TERÊNCIO, K. P. Evidências de alterações do processo de cicatrização de queimaduras em indivíduos diabéticos: revisão bibliográfica. **Rev Bras Queimaduras**, v. 12, n. 1, p. 42-48, 2013.
- CAGLIARI, R.; KREMER, F. S.; PINTO, L. da S. Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 811–820, 2018.
- GOLLO, J.; GULIANI, P.; MARIA, A. *et al.* Itinerários terapêuticos de pessoas com diabetes mellitus no Brasil: revisão integrativa. **Rev. bras. promoç. saúde (Impr.)**, p. 1–11, 2022.
- NETO, L. G.; PINTO, L. S.; BASTOS, R. M. *et al.* Effect of the Lectin of *Bauhinia variegata* and Its Recombinant Isoform on Surgically Induced Skin Wounds in a Murine Model. **Molecules. Switzerland**, v. 16, p. 9298-9315, 2011.
- PINTO, L.S; *et al.* Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **Indian Academy of Sciences**, v. 33, n. 3, p. 355–363, 2008.
- PINTO, L.S. *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, 2019.
- REIS, L. B. *et al.* Efeito da lectina de *Bauhinia variegata* incorporada ao gel de hidroxietilcelulose na cicatrização *in vivo*. In: UFPel. (Org.). **Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**. 1ed. Pelotas: Editora UFPel, v. 1, p. 234-248, 2015.
- SCHREML, S. *et al.* Wound healing in the 21st century. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 5, p. 866–81, 2010.
- SINGER, A. J. & CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.