



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

RENALLY BARBOSA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, PRÓ-APOPTÓTICO E
ANTICLONOGÊNICO DE LECTINAS ISOLADAS DE ALGAS MARINHAS
VERMELHAS DAS ESPÉCIES *Bryothamnion seafortii* e *Bryothamnion triquetrum***

FORTALEZA

2022

RENALLY BARBOSA DA SILVA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, PRÓ-APOPTÓTICO E
ANTICLONOGÊNICO DE LECTINAS ISOLADAS DE ALGAS MARINHAS
VERMELHAS DAS ESPÉCIES *Bryothamnion seafortii* e *Bryothamnion triquetrum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutorem Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Aplicação biotecnológica de moléculas biologicamente ativas.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Nascimento Neto.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S583a Silva, Renally Barbosa da.
Avaliação do potencial citotóxico, pró-apoptótico e anticlonogênico de lectinas isoladas de algas marinhas vermelhas das espécies *Bryothamnion seafortii* e *Bryothamnion triquetrum* / Renally Barbosa da Silva. – 2022.
105 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.

Coorientação: Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Nascimento Neto.

1. Câncer . 2. Lectinas. 3. Algas vermelhas. 4. Antitumoral. 5. Apoptose. I. Título.

CDD 660.6

RENALLY BARBOSA DA SILVA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, PRÓ-APOPTÓTICO E
ANTICLONOGÊNICO DE LECTINAS ISOLADAS DE ALGAS MARINHAS
VERMELHAS DAS ESPÉCIES *Bryothamnion seafortii* e *Bryothamnion triquetrum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutorem Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Aplicação biotecnológica de moléculas biologicamente ativas.

Aprovada em: 20 / 07 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Fábila Karine Andrade
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira
Universidade Federal do Cariri (UFCA)

Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Nascimento Neto
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

A Deus, por me sustentar todos os dias. Aos meus pais, Severino e Lúcia, pelo incentivo, amor, compreensão e apoio ao longo de minha vida. Aos meus queridos irmãos, Pedro e Ruth.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha por ter me recebido e me apoiado durante realização desse trabalho e por me integrar ao Laboratório de Biocristalografia (LABIC).

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Nascimento Neto pela orientação, por todos os ensinamentos no laboratório de cultivo de células e pela disponibilidade em me ajudar.

Ao Prof. Dr. Edson H. Teixeira por ter me acolhido e por me inserir no Laboratório de Biomoléculas (LIBS). Sou profundamente grata pela oportunidade e confiança! Os ensinamentos adquiridos foram e são extremamente importantes para minha formação profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Mayron Alves por sempre está disponível em me ajudar a buscar soluções práticas.

A Profa. Dra Fábria Karine pela parceria na obtenção das linhagens, troca de experiências e vivências em cultivo celular e por sempre se mostrar solícita.

A toda equipe do Laboratório de Química de proteínas pela parceria. Ao Prof. Dr. Celso Nagano pela confiança em ceder as lectinas e por vezes ir a bancada para garantir que a molécula estivesse purificada.

Ao Prof. Dr. Rômulo Carneiro pelo auxílio na complexação das lectinas e por sempre se demonstrar disponível para esclarecer dúvidas.

A Dra. Renata Chaves pela disponibilidade, compreensão e auxílio durante todo o doutorado. Suas contribuições foram essenciais para realização das análises de biologia molecular.

Ao Prof. Dr. André Coelho e aos alunos do Laboratório de Biotecnologia Molecular por me ajudar e dar suporte no desenho de estratégias para execução do Western Blotting.

Ao Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá pela disponibilidade, acolhida e parceria na realização dos ensaios de PCR em tempo real.

Aos grandes amigos do LIBS pela confiança, amizade e respeito. Ao Alexandre Andrade por desde o início me acolher e me ensinar todos os dias. Ao Leonardo Barbosa por me ensinar, por me fazer refletir pelos mais variados assuntos, por me acompanhar e “ser meus dois braços” durante boa parte do doutorado. A Aryane Pinheiro por ter sido minha companheira de experimentos, pelos conselhos, por sempre me ajudar a buscar soluções quando as coisas não saiam como previsto e por fazer minha jornada mais leve. Aos meus queridos ICs

(Hugo, Evandro, Maria Geovana, Isa, Nicole) que tanto me auxiliaram e me ensinaram. Acompanho vocês mesmo de longe e me orgulho da caminhada de cada um.

Ao Djaci Mello e ao Edson pela parceria e amizade. Vocês foram essenciais no desenvolvimento dos ensaios e análises de efeito clonogênico. Tenho certeza de que esse foi nosso primeiro de muitos trabalhos juntos!

Aos colegas e amigos do LABIC pelo incentivo, apoio e companheirismo. Vocês foram essenciais não só na minha formação profissional, mas, na minha formação como pessoa.

A querida Cássia por me dar suporte e por vezes ir para bancada comigo nos ensaios realizados no LABIC. Agradeço a amizade, a paciência e a paz que você transmite em tudo que faz.

Aos meus queridos amigos e colegas da Fiocruz-CE (UNADIG-CE) pela torcida e pelo incentivo. É muito bom poder dividir meus dias e compartilhar com vocês a conclusão desse ciclo.

A todos os meus colegas de turma e professores do curso de Doutorado de Biotecnologia de Recursos Naturais.

A CAPES pelo apoio financeiro através da concessão e manutenção da bolsa de auxílio.

Fica minha gratidão a todos que de forma direta ou indireta me ajudaram a desenvolver esse trabalho e fizeram parte da minha construção profissional. Muito Obrigada!

RESUMO

O câncer é um problema de saúde pública mundial e apesar dos avanços no desenvolvimento de terapias, os tratamentos continuam sendo inespecíficos, onerosos e ineficientes, principalmente em decorrência da quimiorresistência. Na diferenciação de células tumorais e no processo de metástase os padrões de glicosilação celular estão alterados e as células passam à não responder a estímulos essenciais como os de morte celular regulada. Lectinas isoladas de algas marinhas possuem estruturas moleculares únicas que podem atuar na modulação de vias de morte celular e/ou na inibição vias essenciais na progressão tumoral. Diante do exposto, este estudo buscou investigar o potencial antitumoral in vitro das lectinas de algas vermelhas isoladas de *Bryothamnion triquetrum* (BTL) e *Bryothamnion seaforthii* (BSL), frente a linhagem tumorais e não tumorais. Os resultados obtidos mostraram que BTL e BSL foram capazes de reduzir a atividade mitocondrial a viabilidade celular e aumentar a citotoxicidade. Por sua vez, em células saudáveis, as lectinas não demonstraram citotoxicidade significativa. O efeito a longo prazo, mostrou que às duas lectinas induziram a morte clonogênica com efeito tempo dependente. Foi verificado por citometria de fluxo que as lectinas testadas interferiram no ciclo celular das células A549, promovendo a parada do ciclo em G1 e induzindo dupla marcação para anexina-V e 7-AAD. Os aspectos morfológicos analisados por microscopia ótica e confocal, mostraram alterações ao nível de núcleo, citoplasma, com a presença de corpos apoptóticos. Além disso, as lectinas testadas também mostraram capacidade de interferir no processo de adesão celular e são capazes de ativar caspases 3/7 e 9. Por fim, foi verificado o aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Desta forma, esse estudo traz fortes evidências de que BTL e BSL possuem efeito antitumoral para células de carcinoma de pulmão, por meio da indução da morte celular por apoptose, ativando a via intrínseca.

Palavras-chave: câncer; lectinas; algas vermelhas; antitumoral; apoptose.

ABSTRACT

Cancer is a global public health issue and despite advances in treatment, they remain unspecific, costly and inefficient, mainly due to chemoresistance. The patterns of cellular glycosylation are altered during the differentiation of tumor cells and the process of metastasis, and therefore the cells stop responding to essential stimuli such as those from regulated cell death. Lectins that have been isolated from seaweed have unique molecular structures that can act to modulate cell death pathways and inhibit the pathways that are essential to tumor progression. In view of this, the aim of this study was to investigate the antitumor potential, in vitro, of isolated red algae lectins from *Bryothamnion triquetrum* (BTL) and *Bryothamnion seaforthii* (BSL), to combat tumor and non-tumor strains. The results showed that BTL and BSL were able to reduce mitochondrial activity, compromise membrane integrity, reduce cell viability and increase cytotoxicity. In turn, the lectins did not demonstrate any significant cytotoxicity to healthy cells. The long-term effect was that both lectins induced clonogenic death as a time-dependent effect. We used flow cytometry to confirm that the lectins tested interfered with the cell cycle of A549 cells, helped to stop the cycle in G1 and induced double labeling for annexin-V and 7-AAD. The morphological features, analyzed using optical and confocal microscopy, showed that there were alterations to the nucleus and cytoplasm, and apoptotic bodies were present. In addition, the lectins tested also showed an ability to interfere with the cell adhesion process and it was able to activate caspase 3/7 and 9. Finally, we also confirmed that amount of the pro-apoptotic protein Bax increased. Therefore, this study provides strong evidence that BTL and BSL have an antitumor effect on lung carcinoma cells, by inducing cell death by apoptosis, and activating the intrinsic pathway.

Keywords: câncer; lectins; red algae; antitumor; apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Alterações morfológicas nos diferentes tipos de morte celular: apoptose, autofagia e necrose.....	23
Figura 2	– Vias de sinalização: Apoptose extrínseca e intrínseca.....	27
Figura 3	– Resumo das etapas e metodologias empregadas.....	37
Figura 4	– Efeito da BTL na viabilidade de linhagens tumorais em função do tempo.....	48
Figura 5	– Efeito da BSL na viabilidade de linhagens tumorais em função do tempo.....	49
Figura 6	– Efeito da BTL na viabilidade celular de linhagens tumorais.....	51
Figura 7	– Efeito da BSL na viabilidade celular de linhagens tumorais.....	53
Figura 8	– Morfologia da A549 tratadas com BTL, BSL e conA.....	54
Figura 9	– Adesão de A549 tratadas com BTL e BSL.....	55
Figura 10	– Expressão das proteínas TP53, Bcl-2 e BAX em células A549.....	57
Figura 11	– BTL e BSL não reduzem a viabilidade de células de fibroblastos saudáveis (L929).....	82
Figura 12	– Tratamento com BTL aumenta a viabilidade celular e reduz de citotoxicidade de células A549.....	83
Figura 13	– Tratamento com BSL aumenta a viabilidade celular e reduz de citotoxicidade de células A549.....	84
Figura 14	– BTL, BSL e conA na progressão do ciclo celular em células A549.....	85
Figura 15	– Lectinas induzem apoptose/necrose em células A549.....	86
Figura 16	– Padrão morfológico de células A549 tratadas com IC50 de BTL e BSL determinado por coloração AO e DAPI.....	87
Figura 17	– BTL e BSL promovem apoptose (caspases 3/7 ativa).....	88
Figura 18	– BTL e BSL promovem apoptose (caspase 9 ativa).....	89
Figura 19	– Viabilidade de células A549 (carcinoma de pulmão) submetidas a tratamento com BTL e BSL.....	97
Figura 20	– Morte clonogênica em células A549 induzida por conA, BTL e BSL.....	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	–	Fármacos de origem marinha aprovados com atividade antitumoral.....	29
Quadro 2	–	Atividade biológica de lectinas de algas marinhas vermelhas.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Painel do efeito de BTL sobre a viabilidade de células tumorais.....	50
Tabela 2	– Painel do efeito de BSL sobre a viabilidade de células tumorais.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAF-1	Fator apoptótico de ativação de peptidase 1
BSL	<i>Bryothamnion seaforthii lectina</i>
BTL	<i>Bryothamnion triquetrum lectina</i>
CASP	Caspase
CASPASES	Proteases cisteína-aspartato
COVID-19	Doença do coronavírus 2019
DAMPS	Padrões moleculares associadas a danos
DIABLO	Proteína de ligação-IAP direta com baixo pI
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
ESA	Eucheuma serra aglutinina
FADD	Proteína de domínio de morte associada a FAS
FUTS	Fucosiltransferases
IAP	Inibidor de proteínas de apoptose
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
MRC	Morte celular regulada
MOMP	Permeabilização da membrana externa mitocondrial
NMR	Ressonância magnética nuclear
SUS	Sistema único de saúde
TCTP	Proteína tumoral controlada por tradução
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
VDAC	Canal aniônico dependente de voltagem
WHO	Organização mundial de saúde
XIAP	Inibidor da proteína de apoptose ligado ao X

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
1.1	Câncer.....	16
1.1.1	<i>Epidemiologia e custos com câncer.....</i>	16
1.1.2	<i>Carcinogênese e etiologia.....</i>	17
1.1.2.1	<i>Câncer de pulmão.....</i>	18
1.1.3	<i>Mecanismos de morte celular.....</i>	21
1.1.3.1	<i>Apoptose.....</i>	24
1.1.3.1.1	<i>Apoptose intrínseca.....</i>	24
1.1.3.1.2	<i>Apoptose extrínseca.....</i>	25
1.2	Potencial farmacológico de lectinas marinhas.....	28
1.2.1	<i>Compostos marinhas e câncer.....</i>	28
1.2.2	<i>Potencial biotecnológico de lectinas de algas marinhas vermelhas.....</i>	31
1.2.3	<i>Efeito antimorfológico e mecanismos de morte celular induzidos por lectinas marinhas de algas vermelhas.....</i>	33
1.2.4	<i>Lectinas de algas vermelhas do gênero <i>Bryothamnium</i>.....</i>	35
2	OBJETIVOS.....	36
2.1	Geral.....	36
2.2	Específicos.....	36
3	METODOLOGIA.....	37
3.1	Resumo da metodologia.....	37
3.2	Descrição da metodologia.....	38
3.2.1	<i>Linhagem celular e condições de cultivo.....</i>	38
3.2.2	<i>Avaliação do efeito das lectinas BTL e BSL na viabilidade de células saudáveis e tumorais.....</i>	38
3.2.2.1	<i>Avaliação da atividade mitocondrial (ensaio colorimétrico com MTS).....</i>	38
3.2.2.2	<i>Avaliação da viabilidade e citotoxicidade (fluorescência).....</i>	39
3.2.2.3	<i>Integridade da membrana (azul de tripano).....</i>	40
3.2.2.4	<i>Avaliação da viabilidade reprodutiva (efeito clonogênico).....</i>	40
3.2.3	<i>Efeito das lectinas sobre a morfologia de células tumorais, indução de eventos característicos de MCR e mecanismos de sobrevivência celular....</i>	41
3.2.3.1	<i>Análise dos aspectos morfológicos (microscopia óptica).....</i>	41

3.2.3.2	<i>Análise de eventos morfológicos característicos de morte celular regulada.</i>	41
3.2.3.3	<i>Eventos de sobrevivência: adesão de células tumorais tratadas com lectinas.....</i>	43
3.2.4	<i>Efeito das lectinas sobre o ciclo celular.....</i>	43
3.2.5	<i>Avaliação de apoptose/necrose induzida por BTL e BTS.....</i>	44
3.2.6	<i>Efeito das lectinas na ativação de cascata apoptótica mediada por caspases 3/7 e 9.....</i>	44
3.2.7	<i>Análise da expressão de genes e proteínas relacionados a apoptose e/ou autofagia induzido pelas lectinas em células tumorais.....</i>	45
3.2.8	<i>Expressão gênica por PCR em tempo real.....</i>	45
3.2.9	<i>Expressão de proteínas relacionadas a vias de morte celular programada por Western Blotting.....</i>	46
4	RESULTADOS.....	47
4.1	Lectinas de algas vermelhas reduzem a atividade mitocondrial de células tumorais.....	47
4.2	Lectinas BTL e BSL modificam características morfológicas e eventos de sobrevivência de células A549.....	53
4.2.1	<i>Aspectos gerais.....</i>	53
4.2.2	<i>As lectinas BTL e BSL interferem na adesão de células A549.....</i>	54
4.3	Avaliação de expressão de proteínas envolvidas nas vias de apoptose e/ou autofagia.....	56
5	ARTIGOS.....	58
5.1	Artigo 1 (Português).....	58
5.2	Artigo 2 (Inglês).....	71
6	SHORT COMMUNICATION.....	90
6.1	Short communication 1 (Português).....	90
6.2	Short communication 2 (Inglês).....	93
7	CONCLUSÃO.....	99
7.1	Considerações finais.....	99
7.2	Perspectivas.....	99
	REFERÊNCIAS.....	101