



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Rudimar Martins Junior

**Potencial antiglioma da lectina *Dioclea violacea*:** Internalização mediada por  
glicanos e efeitos na viabilidade celular

Florianópolis  
2025

Rudimar Martins Junior

**Potencial antiglioma da lectina *Dioclea violacea*: Internalização mediada por glicanos e efeitos na viabilidade celular**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Josiane Mann

Florianópolis

2025

Martins Junior, Rudimar

Potencial antiglioma da lectina Dioclea violacea :  
Internalização mediada por glicanos e efeitos na  
viabilidade celular / Rudimar Martins Junior ; orientador,  
Rodrigo Bainy Leal, coorientador, Josiane Mann, 2025.  
70 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Lectinas. 3. Glioma. 4. Autofagia. 5.  
Glicanos. I. Leal, Rodrigo Bainy. II. Mann, Josiane. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica. IV. Título.

Rudimar Martins Junior

**Potencial antiglioma da lectina *Dioclea violacea*: Internalização mediada por glicanos e efeitos na viabilidade celular**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 03 de dezembro de 2025, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

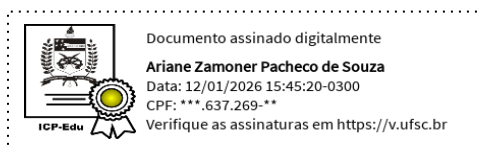
Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lucia Severo Rodrigues  
Universidade Federal de Santa Catarina

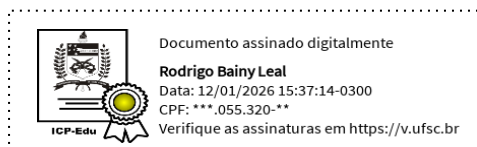
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Inês Tasca  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Tetsadê Camboim Bizerra Piermartiri  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal  
Orientador

Florianópolis, 2025.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio institucional e pelas condições proporcionadas para a realização deste trabalho e para minha formação durante o mestrado.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), expresso minha gratidão pela infraestrutura, pelo ambiente acadêmico e pelas oportunidades de crescimento científico e profissional oferecidas ao longo desta trajetória.

Ao meu orientador, Dr. Rodrigo Bainy Leal, agradeço pela orientação dedicada, pela confiança depositada e pelo incentivo constante ao pensamento crítico e ao rigor científico. À minha coorientadora, Dra. Josiane Mann, agradeço pela disponibilidade, pelas contribuições fundamentais e pelo apoio contínuo durante o desenvolvimento desta dissertação.

À minha mãe, deixo meu agradecimento profundo pelo apoio incondicional, pela compreensão e por todo o suporte emocional que tornaram possível a conclusão desta etapa.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) pela disponibilização das instalações e equipamentos necessários à execução dos experimentos deste estudo.

Estendo meus agradecimentos ao Departamento de Bioquímica da UFSC, incluindo os colegas, técnicos e professores com quem tive contato, cujo suporte, ensinamentos e colaboração contribuíram significativamente para meu desenvolvimento acadêmico, científico e pessoal ao longo deste percurso.

Aos meus amigos próximos, agradeço pela presença, apoio e companheirismo ao longo desses anos. Em especial, deixo meu sincero agradecimento a Filipe, Diego, João, Kevin, Rodrigo e Georgia, cuja amizade teve papel essencial em minha jornada, oferecendo incentivo, compreensão e equilíbrio nos momentos mais desafiadores.

## RESUMO

Os gliomas são tumores cerebrais agressivos com limitadas opções terapêuticas e prognóstico desfavorável, tornando crucial a busca por novos agentes antitumorais. Neste contexto, lectinas de plantas, como a de *Dioclea violacea* (DvL), têm se destacado por sua capacidade de reconhecer glicanos e induzir efeitos citotóxicos seletivos. Este trabalho investigou o potencial antiglioma da DvL, focando em seus mecanismos de citotoxicidade e internalização em células de glioma C6. Estudos prévios já haviam demonstrado que a DvL é capaz de induzir apoptose e autofagia, reduzir a migração celular e modular vias de sinalização em modelos de glioma. Aqui, após 6 horas de tratamento, observou-se que a DvL promoveu redução significativa da viabilidade celular em todas as concentrações avaliadas (5-100 µg/mL), processo que foi acompanhado por alterações morfológicas marcantes, caracterizadas pela transição de um fenótipo fusiforme para uma morfologia arredondada e menos aderente. Essa resposta citotóxica mostrou-se dependente da interação com glicanos, uma vez que a pré-incubação da lectina com alfa-metil-manosídeo (αMM), inibidor competitivo do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), reverteu de forma expressiva a perda de viabilidade induzida por DvL (5-50 µg/mL). Paralelamente, a DvL atuou como um potente indutor de autofagia, evidenciado pelo aumento substancial de organelas vesiculares ácidas (AVOs) no ensaio com Laranja de Acridina e pela elevação da razão LC3-II/LC3-I, especialmente nas concentrações mais altas, sugerindo um fluxo autofágico funcional. Nos tempos e concentrações testados, a citotoxicidade induzida pela DvL não foi afetada pela modulação farmacológica do RE com 4-PBA ou brefeldina A, indicando que seu mecanismo é independente da ativação do estresse do RE. Adicionalmente, a expressão da chaperona BiP/GRP78 não foi modificada pelo tratamento com a lectina. Um achado central deste estudo foi a confirmação, por microscopia confocal, de que a DvL-FITC pode ser internalizada de forma tempo-dependente pelas células C6, acumulando-se preferencialmente na região perinuclear após 6 horas de tratamento. A presença de αMM atenuou essa internalização, sugerindo um processo de endocitose mediado pela interação específica da lectina com glicanos de superfície. Em conjunto, os resultados demonstraram o potencial antiglioma da DvL, promovendo citotoxicidade precoce e indução de autofagia em células de glioma C6, sendo que estes eventos podem estar ligados à sua internalização mediada por glicanos. Portanto, a DvL mostra-se promissora tanto no tratamento direto quanto no direcionamento (delivery) seletivo de nanopartículas a células tumorais. Essa versatilidade e potencial justificam a necessidade de aprofundar as investigações nessa linha.

**Palavras-chave:** Lectinas; Glioma; Glicanos.

## ABSTRACT

Gliomas are aggressive brain tumors with limited therapeutic options and an unfavorable prognosis, making the search for new antitumor agents crucial. In this context, plant lectins, such as those from *Dioclea violacea* (DvL), have been highlighted for their ability to recognize glycans and induce selective cytotoxic effects. This study investigated the antiglioma potential of DvL, focusing on its mechanisms of cytotoxicity and internalization in C6 glioma cells. Previous studies have already demonstrated that DvL can induce apoptosis and autophagy, reducing cell migration, and modulating signaling pathways in glioma models. Here, after 6 hours of treatment, DvL was observed to promote a significant reduction in cell viability at all concentrations evaluated (5-100 µg/mL), a process that was accompanied by marked morphological alterations, characterized by the transition from a fusiform phenotype to a rounded and less adherent morphology. This cytotoxic response proved to be dependent on interaction with glycans, as pre-incubation of the lectin with  $\alpha$ -methyl mannoside ( $\alpha$ MM), a competitive inhibitor of the carbohydrate-recognition domain (CRD), significantly reversed the loss of viability induced by DvL (5-50 µg/mL). Concurrently, DvL acted as a potent inducer of autophagy, evidenced by the substantial increase in acidic vesicular organelles (AVOs) in the Acridine Orange assay and the elevation of the LC3-II/LC3-I ratio, especially at higher concentrations, suggesting a functional autophagic flux. At the tested concentrations and time points, DvL-induced cytotoxicity was not affected by pharmacological modulation of the ER with 4-PBA or brefeldin A, indicating that its mechanism is independent of ER stress activation. Additionally, the expression of the BiP/GRP78 chaperone was not modified by treatment with the lectin. A central finding of this study was the confirmation, by confocal microscopy, that DvL-FITC can be internalized by C6 cells in a time-dependent manner, accumulating preferentially in the perinuclear region after 6 hours of treatment. The blockage of CRD by  $\alpha$ MM attenuated this internalization, suggesting a process of endocytosis mediated by the specific interaction of the lectin with surface glycans. Collectively, the results demonstrated the antiglioma potential of DvL, promoting early cytotoxicity and induction of autophagy in C6 glioma cells, events that may be linked to its glycan-mediated internalization. Therefore, DvL shows promise both in direct treatment and in the selective targeting (delivery) of nanoparticles to tumor cells. This versatility and potential justify the need for further in-depth investigation into this line of research.

**Keywords:** Lectins; Glioma; Glycans.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Componentes do microambiente tumoral .....                                                                                                                      | 21 |
| Figura 2. Alterações comuns em padrões de glicosilação observadas em GBM.....                                                                                             | 24 |
| Figura 3 Aspecto Morfológico das Células C6 em Cultura .....                                                                                                              | 25 |
| Figura 4. Representação da fonte biológica e da estrutura quaternária da lectina DvL .....                                                                                | 27 |
| Figura 5. Representação esquemática das vias de sinalização da apoptose .....                                                                                             | 29 |
| Figura 6. Representação esquemática do processo de autofagia .....                                                                                                        | 31 |
| Figura 7. Representação esquemática da Resposta a Proteínas Mal Dobradas (UPR) induzida pelo estresse do retículo endoplasmático (RE). .....                              | 35 |
| Figura 8. Análise morfológica de células C6 após 6 h de tratamento .....                                                                                                  | 44 |
| Figura 9. Análise da viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT .....                                                                                              | 45 |
| Figura 10. Avaliação da viabilidade celular por ensaio de MTT após tratamento com a lectina DvL nativa e com a forma inibida por $\alpha$ -metil-manosídeo (100 mM) ..... | 46 |
| Figura 11. Avaliação da formação de organelas ácidas pelo ensaio com laranja de acridina .....                                                                            | 47 |
| Figura 12. Análise da razão LC3-II/I por western blot após 6 horas de tratamento, para avaliar a indução de autofagia.....                                                | 48 |
| Figura 13. Avaliação da viabilidade celular por ensaio de MTT após tratamento com a lectina DvL isolada ou em presença de moduladores do estresse do RE .....             | 49 |
| Figura 14. Avaliação da expressão da chaperona BiP (GRP78) por western blot após tratamento com diferentes concentrações de DvL .....                                     | 50 |
| Figura 15. Visualização tridimensional da sublocalização da lectina DvL após 6 horas de tratamento, na concentração de 15 $\mu$ g/mL.....                                 | 51 |
| Figura 16. Internalização da DvL em células C6 ao longo do tempo.....                                                                                                     | 52 |
| Figura 17. Modelo esquemático do possível mecanismo de ação da lectina Dioclea violacea (DvL) .....                                                                       | 58 |

## **LISTA DE TABELAS**

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Classificação dos gliomas de acordo com a OMS em 2021..... | 15 |
| Tabela 2. Anticorpos utilizados no imunoblotting .....               | 43 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |                                                                         |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 4-PBA         | 4-Fenilbutirato                                                         |
| $\alpha$ MM   | $\alpha$ -Metil-manosídeo                                               |
| AO            | Laranja de Acridina                                                     |
| APAF1         | Fator 1 de Ativação da Protease Apoptótica                              |
| ATM           | Proteína cinase mutada na ataxia-telangiectasia                         |
| ATR           | Cinase Relacionada à Mutação de Ataxia-Telangiectasia e ao Gene Rad3    |
| AVO           | Organelas Vesiculares Ácidas                                            |
| BAX           | Bcl-2-associated X protein                                              |
| BER           | Reparo por Excisão de Bases                                             |
| BFA           | Brefeldina A                                                            |
| BiP/GRP78     | Proteína de Ligação à Imunoglobulina / Proteína 78 Regulada por Glicose |
| BSA           | Albumina Sérica Bovina                                                  |
| CHK1          | Cinase de Checkpoint 1                                                  |
| CHK2          | Cinase de Checkpoint 2                                                  |
| CRD           | Domínio de Reconhecimento de Carboidratos                               |
| CT            | Controle                                                                |
| DISC          | Complexo de Sinalização Indutor de Morte                                |
| DNA           | Ácido desoxirribonucleico                                               |
| DMEM          | Meio de Eagle Modificado por Dulbecco                                   |
| DMSO          | Dimetilsulfóxido                                                        |
| DSB           | Quebra de Fita Dupla                                                    |
| DvL           | Lectina de Dioclea violacea                                             |
| EGFR          | Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico                             |
| eIF2 $\alpha$ | Fator de Iniciação da Tradução Eucariótica 2 $\alpha$                   |
| EMT           | Transição Epitélio-Mesenquimal                                          |
| ER            | Retículo Endoplasmático                                                 |
| ERK           | Cinase Regulada por Sinal Extracelular                                  |
| FADD          | Fator Associado ao Domínio de Morte                                     |
| FITC          | Isotiocianato de Fluoresceína                                           |
| FUT8          | Fucosiltransferase 8                                                    |

|                |                                                      |
|----------------|------------------------------------------------------|
| GBM            | Glioblastoma Multiforme                              |
| GFAP           | Proteína Ácida Fibrilar Glial                        |
| GlcNAc         | N-Acetilglicosamina                                  |
| GnTs           | N-Acetilglucosaminiltransferases                     |
| HEPES          | 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfonato         |
| HIF-1 $\alpha$ | Fator Induzível por Hipóxia 1 $\alpha$               |
| IDH            | Isocitrato Desidrogenase                             |
| IGF-1          | Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1         |
| IRE1           | Enzima Dependente de Inositol 1                      |
| JNK            | Cinase N-terminal de c-Jun                           |
| LAMP2          | Proteína 2 Associada à Membrana Lisossomal           |
| LC3            | Proteína 3 da Cadeia Leve 1 Associada a Microtúbulos |
| LIR            | Motivo de Interação com LC3                          |
| MAPK           | Proteína Cinase Ativada por Mitógeno                 |
| MCT-4          | Transportador de Monocarboxilato 4                   |
| MGMT           | O6-Metilguanina-DNA Metiltransferase                 |
| MOMP           | Permeabilização da Membrana Externa Mitocondrial     |
| MPG            | N-Metilpurina-DNA Glicosilase                        |
| MRN            | Complexo MRE11–RAD50–NBS1                            |
| MT1-MMP        | Metaloproteinase de Membranaw Tipo 1                 |
| MTT            | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio     |
| mTOR           | Alvo da Rapamicina em Mamíferos                      |
| mTORC1         | Complexo 1 do mTOR                                   |
| NGS            | Sinapses Neurogliomais                               |
| O6-MeG         | O6-Metilguanina                                      |
| OMS            | Organização Mundial da Saúde                         |
| p53            | Proteína Supressora de Tumor p53                     |
| PARP1          | Poli(ADP-ribose) Polimerase 1                        |
| PBS            | Tampão Fosfato Salino                                |
| PE             | Fosfatidiletanolamina                                |
| PERK           | Proteína cinase do RE semelhante a PRKR              |
| PI3K           | Fosfatidilinositol 3-cinase                          |
| PP1            | Proteína Fosfatase 1                                 |
| RCD            | Morte Celular Regulada                               |

|          |                                                                    |
|----------|--------------------------------------------------------------------|
| RE       | Retículo Endoplasmático                                            |
| RIDD     | Dcaimento Regulado Dependente de IRE1                              |
| ROI      | Região de Interesse                                                |
| RTK      | Receptor Tirosina-cinase                                           |
| S1P      | Protease de Sítio 1                                                |
| S2P      | Protease de Sítio 2                                                |
| SDS-PAGE | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio |
| SFB      | Soro Fetal Bovino                                                  |
| SNC      | Sistema Nervoso Central                                            |
| SQSTM1   | Proteína Sequestossoma 1                                           |
| TBS-T    | Tampão Salino Tris com Tween-20                                    |
| TERT     | Transcriptase Reversa da Telomerase                                |
| TMZ      | Temozolomida                                                       |
| TNF      | Fator de Necrose Tumoral                                           |
| TNFR1    | Receptor do Fator de Necrose Tumoral 1                             |
| TNFR2    | Receptor do Fator de Necrose Tumoral 2                             |
| TRAIL    | Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF                     |
| ULK1     | Cinase 1 Semelhante a Unc-51                                       |
| ULK2     | Cinase 2 Semelhante a Unc-51                                       |
| UPR      | Resposta a Proteínas Mal Dobradas                                  |
| VEGF     | Fator de Crescimento do Endotélio Vascular                         |
| Vps34    | Fosfatidilinositol 3-cinase de Classe III                          |
| Vps35    | Componente do Complexo Retromer                                    |
| XBP1     | Proteína de Ligação ao X-Box 1                                     |

## SUMÁRIO

|              |                                                                                                            |           |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                                          | <b>14</b> |
| 1.1          | GLIOMAS                                                                                                    | 14        |
| 1.2          | GLIOMA DIFUSO TIPO-ADULTO                                                                                  | 14        |
| <b>1.2.1</b> | <b>GLIOBLASTOMA MULTIFORME</b>                                                                             | <b>15</b> |
| 1.2.1.1      | TRATAMENTO                                                                                                 | 16        |
| 1.2.1.2      | DIFICULDADES NO TRATAMENTO DO GBM COM O6AA                                                                 | 19        |
| 1.3          | O MICROAMBIENTE TUMORAL                                                                                    | 19        |
| 1.4          | GLICÔMICA                                                                                                  | 21        |
| <b>1.4.1</b> | <b>O GLICOCÁLICE TUMORAL E SEU PAPEL NA PROGRESSÃO DO CÂNCER E NO RECONHECIMENTO POR LECTINAS</b>          | <b>22</b> |
| 1.5          | A LINHAGEM C6 DE GLIOMA                                                                                    | 24        |
| 1.6          | LECTINAS: ESTRUTURA, CLASSIFICAÇÃO, ESPECIFICIDADE POR GLICANOS E FUNÇÕES BIOLÓGICAS                       | 26        |
| 1.7          | MECANISMOS DE MORTE CELULAR: APOPTOSE, AUTOFAGIA E SUA RELAÇÃO COM O CÂNCER                                | 28        |
| 1.8          | ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO: MECANISMOS MOLECULARES E SEU PAPEL NA SOBREVIVÊNCIA E MORTE CELULAR   | 33        |
| <b>2</b>     | <b>JUSTIFICATIVA</b>                                                                                       | <b>36</b> |
| <b>3</b>     | <b>OBJETIVOS</b>                                                                                           | <b>37</b> |
| 3.1          | OBJETIVOS GERAIS                                                                                           | 37        |
| 3.2          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                                                      | 37        |
| <b>4</b>     | <b>METODOLOGIA</b>                                                                                         | <b>37</b> |
| <b>5</b>     | <b>RESULTADOS</b>                                                                                          | <b>43</b> |
| 5.1          | DVL ALTERA A MORFOLOGIA E REDUZ A VIABILIDADE DE CÉLULAS C6, DE FORMA DEPENDENTE DE INTERAÇÃO COM GLICANOS | 43        |
| 5.2          | TRATAMENTO COM DVL INDUZ AUTOFAGIA EM CÉLULAS DE GLIOMA C6                                                 | 46        |
| 5.3          | O MECANISMO CITOTÓXICO DA DVL É INDEPENDENTE DO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO                        | 48        |
| 5.4          | A LECTINA PASSA POR INTERNALIZAÇÃO, DE FORMA DEPENDENTE DE INTERAÇÃO COM GLICANOS                          | 50        |
| <b>6</b>     | <b>DISCUSSÃO</b>                                                                                           | <b>52</b> |
| <b>7</b>     | <b>CONCLUSÃO</b>                                                                                           | <b>58</b> |
|              | <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                                         | <b>60</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 GLIOMAS

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) são caracterizados por alta morbidade e mortalidade devido à sua localização e capacidade invasiva. De uma forma geral, podem ser divididos em neoplasias cerebrais decorrentes de metástases de cânceres fora do SNC (em adultos, são a forma mais comum) e tumores cerebrais primários, com origem no próprio sistema nervoso, como os gliomas e meningiomas (WELLER *et al.* 2015). Os gliomas representam aproximadamente 30% dos tumores cerebrais primários e 80% dos tumores malignos, sendo responsáveis pela maior parte dos óbitos relacionados aos mesmos (WELLER *et al.* 2015). Acredita-se que sua origem seja de células-tronco ou progenitoras da neuroglia, e podem ser classificados em astrocitomas, oligodendromas ou ependimomas, dependendo da sua origem (WELLER *et al.* 2015; HORBINSKI *et al.*, 2022). Em 2021, a Organização Mundial da Saúde (OMS) revisou esta condição patológica e emitiu a “quinta edição da classificação dos tumores do SNC”. Comparada com a classificação de 2016, esta nova edição incorporou avanços na compreensão dos mecanismos moleculares dos tumores do SNC, reorganizando os gliomas em novas categorias. A **Tabela 1** apresenta um resumo dos principais tipos de gliomas nas categorias de Tipo Adulto (Astrocitoma, Oligodendroglioma, Glioblastoma) e Tipo Pediátrico (Astrocitomas Circunscritos e Ependimoma) (HORBINKSI *et al.*, 2022).

### 1.2 GLIOMA DIFUSO TIPO-ADULTO

O glioma difuso tipo-adulto é o tipo mais comum a emergir do parênquima cerebral de adultos, representando mais de 70% deste tipo de neoplasia (HORBINKSI *et al.*, 2022). Podem ter o gene IDH (isocitrato desidrogenase) mutante ou selvagem, sendo esse correlacionado a diferenças metabólicas, epigenéticas e resposta à terapia (HORBINKSI *et al.*, 2022). Os gliomas com mutação no gene IDH se mostram menos agressivos do que aqueles com IDH selvagem, mesmo quando apresentam necrose e/ou proliferação microvascular — características histológicas típicas do glioblastoma, a forma mais agressiva de glioma. Alterações genéticas adicionais,

como a deleção do locus 9p21.3 que abrange os genes CDKN2A e/ou CDKN2B, estão associadas a um prognóstico piorado nos IDH-mutantes (HORBINKSI *et al.*, 2022).

**Tabela 1:** Classificação dos gliomas de acordo com a OMS em 2021

| <b>Categoria</b>                   | <b>Tipo de Glioma</b>                              | <b>Marcadores Moleculares</b>                                                                | <b>Grau (OMS)</b>  |
|------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Gliomas Difusos do Tipo Adulto     | Astrocitoma, IDH-mutante                           | Mutação IDH; Ausência de codeleção 1p/19q                                                    | 2, 3, ou 4         |
|                                    | Oligodendroglioma, IDH-mutante e 1p/19q-codeletado | Mutação IDH; Codeleção 1p/19q                                                                | 2 ou 3             |
|                                    | Glioblastoma                                       | IDH-selvagem, mutação do promotor TERT, amplificação de EGFR, ganho de cr. 7/perda de cr. 10 | 4                  |
| Gliomas Astrocíticos Circunscritos | Astrocitomas Circunscritos                         | Frequentemente alterações ativadoras da via MAPK (BRAF fusão ou mutação)                     | Variável, de 1 a 3 |
| Tumores Ependimários               | Ependimomas                                        | Fusões ZFTA ou YAP1 (supratentorial); Agrupamentos de metilação PFA/PFB (fossa posterior)    | Variável, de 1 a 3 |

### 1.2.1 GLIOBLASTOMA MULTIFORME

O glioblastoma multiforme (GBM), um astrocitoma de grau IV e a forma mais agressiva de glioma, é definido pela ausência de mutações no gene da IDH. Sua agressividade está associada a alterações genéticas frequentes, como a amplificação do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e mutações no promotor do gene da transcriptase reversa da telomerase (TERT), que promovem a ativação da telomerase e o alongamento dos telômeros, contribuindo para a imortalização celular (HORBINSKI *et al.*, 2022; ECKEL-PASSOW *et al.*, 2015). Além disso, o status de metilação do promotor do gene da enzima de reparo O-6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) constitui um marcador epigenético crítico com implicações prognósticas e preditivas de resposta à quimioterapia (KANDERI *et*

*al.*, 2024). Epidemiologicamente, o GBM é mais comum em homens e sua incidência aumenta com a idade, apresentando uma sobrevida global inferior a 5 anos para 95% dos pacientes (WIRSCHING, 2016). A exposição à radiação ionizante é o principal fator de risco conhecido (WELLER *et al.*, 2015; BONDY *et al.*, 2008), enquanto a utilização de anti-inflamatórios a longo prazo pode conferir um efeito protetor (SCHEURER *et al.*, 2011). Um fator essencial para a alta malignidade do glioblastoma é a presença de uma subpopulação específica de células-tronco de glioma (GSCs), responsável por promover o crescimento e a invasão tumoral (JOHNSON *et al.*, 2022). A notável plasticidade dessas células permite sua autorrenovação, adaptação e diferenciação em múltiplos tipos celulares, além de possibilitar transições entre estados semelhantes a células-tronco e distintos graus de diferenciação. Esses processos são modulados por estímulos indutores -como hipóxia, interação celular, exposição imune e terapias - mediando reprogramações transcricionais e epigenéticas (JOHNSON *et al.*, 2022). A falha terapêutica é multifatorial, decorrente de um microambiente imunossupressor (com liberação de citocinas e falta de células apresentadoras de antígenos), hipóxia, angiogênese exacerbada e ativação de vias de proliferação celular, o que também limita o sucesso das imunoterapias (PACE *et al.*, 2022; KANDERI *et al.*, 2021). Venkataramani e colaboradores em 2019 reportaram a existência de sinapses químicas, denominadas sinapses neurogliomais (NGS), entre neurônios e células de glioma. A sinalização glutamatérgica nessas NGS, mediada por receptores AMPA, é crucial para a progressão do tumor. Especificamente, esses contatos sinápticos estimulam a invasão e o crescimento do glioma ao promover aumento temporário da concentração de cálcio no interior das células, ativando vias de sinalização que favorecem a progressão tumoral.

#### 1.2.1.1 TRATAMENTO

O tratamento atual para GBM inclui ressecção cirúrgica associada a radioterapia e quimioterapia com temozolomida (TMZ). Terapias alternativas sob investigação incluem agentes cloroalquilantes (lomustina), imunoterapia com células CAR T (receptor quimérico de antígeno), vírus oncolíticos, vacinas e inibidores de checkpoint – tendo como alvo as proteínas mTOR, VEGF, EGFR e MEK (KANDERI *et al.*, 2021). Para a compreensão da limitação na efetividade dos tratamentos atuais, é necessário um maior entendimento dos mecanismos moleculares envolvendo os

quimioterápicos. A redução na expressão da enzima de reparo MGMT leva ao acúmulo da lesão no DNA O6-metilguanina, sendo esse déficit amplamente discutido como um possível fator no desenvolvimento de tumores cerebrais (KAINA *et al*, 2023). A variação na expressão de MGMT em diferentes tecidos indica uma forte regulação desta enzima a nível transcricional, além disso, se destaca uma modulação pós transcricional, via poli-(ADP)-ribosilação, fosforilação ou mesmo interação com outras proteínas, como poli (ADP ribose) polimerase 1 (PARP1), fator de transcrição SP1 e p53. Na maior parte dos casos de glioblastoma, há perda de uma cópia do cromossomo 10 (onde se encontra o gene de MGMT) e a metilação do promotor da outra cópia pode silenciar completamente a expressão da enzima (KAINA *et al*, 2023). Uma questão relevante a ser investigada é se a desregulação epigenética negativa do gene MGMT já está presente nas células progenitoras do glioblastoma, contribuindo diretamente para a transformação maligna. Essa hipótese se baseia no fato de que a lesão O6-metilguanina é reconhecida como altamente pré-mutagênica e pré-carcinogênica (FAHRER *et al.*, 2013).

Alguns estudos mostram suscetibilidade à O6-metilação em células onde não há expressão de MGMT (GERSON *et al.*, 2004; BAI *et al.*, 2023). O mecanismo pelo qual a enzima MGMT repara o DNA (ácido desoxirribonucleico) é via transferência direta do grupamento alquila ou cloroetil para um resíduo de cisteína presente no seu sítio ativo. Entretanto, os mecanismos de toxicidade na falta de reparo para O6-metilguanina e O6-cloroetilguanina são diferentes. No primeiro caso, durante a replicação, forma-se um pareamento incorreto entre O6-metilguanina (O6MeG) e timina, que se torna substrato para um ciclo defeituoso de reparo por incompatibilidade de pares. Esse processo acarreta o aparecimento de lacunas no DNA, levando à formação de quebras de fita dupla na replicação e posteriormente ativação de vias de sinalização relacionadas a sobrevivência ou morte. No caso da O6-cloroetilguanina, a lesão é instável, passando por transformação intramolecular e posterior ligação cruzada entre fitas do DNA, bloqueando replicação e transcrição (KAINA *et al*, 2023). Para drogas com potencial de metilação e cloroetilação, é fundamental que o processo de replicação ocorra para que se ativem vias de sinalização relacionadas a morte celular. Como a O6-alquilguanina representa o ponto de partida para o dano ao DNA, a ação da enzima MGMT torna-se crucial para a sobrevivência celular. O tratamento com o agente alquilante temozolomida leva à inibição da replicação do DNA, devido ao pareamento incorreto entre O6-MeG e timina, culminando em quebras de fita dupla.

Esse dano ativa as cinases do tipo ATR (Cinase Relacionada à Mutação de Ataxia-Telangiectasia e ao Gene Rad3) e ATM (Proteína cinase mutada na ataxia-telangiectasia), que por sua vez fosforilam as proteínas CHK1 (Cinase de Checkpoint 1) e CHK2 (Cinase de Checkpoint 2) - sendo a ATR o principal regulador nesse processo (EICH *et al.*, 2013). Um dos principais alvos das cascatas envolvendo as proteínas sinalizadoras mencionadas é a p53, um fator de transcrição central na regulação da apoptose e dotado de múltiplos sítios de fosforilação. A modificação pós-traducional em resíduos específicos influencia sua função: a fosforilação na serina 15 favorece a ativação de genes envolvidos no reparo do DNA, enquanto a fosforilação na serina 46 está associada à indução de genes pró-apoptóticos, como *Fas* e *BAX* (*Bcl-2-associated X protein*). Em suma, a ativação das cinases ATM e ATR em resposta às lesões induzidas por O6-MeG promove a fosforilação da proteína SIAH1 (*Seven in Absentia Homolog 1*), que se encontra associada à enzima HIPK2 (*homeodomain interacting protein kinase 2*), inibindo sua atividade. A fosforilação de SIAH1 resulta na dissociação desse complexo, permitindo que HIPK2 seja ativada. Uma vez livre, HIPK2 fosforila a p53 no resíduo de serina 46, direcionando sua atividade transcricional para a indução de genes pró-apoptóticos (KAINA *et al.*, 2023). Inicialmente, acreditava-se que a morte celular por apoptose era o principal efeito terapêutico da lesão em O6-metilguanina (O6MeG), induzida por agentes alquilantes (O6AA) como a TMZ. No entanto, descobriu-se que a senescência celular também é um evento importante e mais prevalente que a apoptose nas células de glioblastoma tratadas com TMZ, ocorrendo de forma tardia (após alguns dias de tratamento) e sendo mais prevalente que a apoptose (BELTZIG *et al.*, 2022). O processo de senescência induzido por TMZ envolve reconhecimento do dano pelo complexo MRN (Composto pelas proteínas MRE11-RAD50-NBS1), ativação da via ATR-CHK1, degradação de CDC25C (levando à parada do ciclo celular em G2/M), fosforilação de p53 na serina 15 e expressão de p21. Células senescentes também mostram aumento na expressão de NF-κB e citocinas pró inflamatórias, como IL-6 e IL-8, caracterizando o fenótipo secretório associado a senescência (KAINA *et al.*, 2023). Segundo Demaria *et al.* (2017), alguns quimioterápicos podem induzir até mesmo tecidos saudáveis a um estado de senescência, e esse fenótipo pode ser associado a um desbalanço na homeostase, com possível indução de metástase e crescimento tumoral (KAINA *et al.*, 2023).

### 1.2.1.2 DIFICULDADES NO TRATAMENTO DO GBM COM O6AA

Um dos principais desafios no tratamento com agentes alquilantes é que sua eficácia citotóxica depende da replicação do DNA, processo limitado no glioblastoma multiforme (GBM), cuja fração proliferativa representa menos de 25% das células tumorais. Além disso, a presença da enzima MGMT pode comprometer a resposta ao tratamento, uma vez que mesmo em níveis baixos ela é capaz de remover lesões O6-alquilguanina de forma eficiente, protegendo as células tumorais. A via de reparo por excisão de bases (BER) também contribui para a resistência, corrigindo lesões N-alquiladas induzidas pelos fármacos. Nesse contexto, a enzima MPG (N-methylpurine-DNA glycosylase), que inicia a BER, está associada à resistência à TMZ quando superexpressa. Há ainda uma interação funcional entre as vias BER e MGMT, mediada pela enzima PARP1, que regula a atividade de ambas, influenciando a resposta terapêutica (KAINA *et al.*, 2023). A literatura também evidencia o papel fundamental da endonuclease DFF40/CAD no processo apoptótico, sendo responsável pelo início da fragmentação do DNA dependente de ativação por caspases. Em células de GBM, assim como em outros tipos de tumor, ela se encontra subexpressa – fator que pode ser associado diretamente à resistência aos tratamentos convencionais (SÁNCHEZ-OSUNA *et al.*, 2016). Por fim, a capacidade dessas células resistirem aos danos e posterior indução de apoptose culmina em uma via de sinalização alternativa, que leva à senescência – que como mencionado acima, além de dificultar a eliminação dessas células, pode aumentar a capacidade proliferativa e metastática (KAINA *et al.*, 2023).

## 1.3 O MICROAMBIENTE TUMORAL

O microambiente tumoral (Figura 1) é formado por uma variedade de células do sistema imune e nervoso, vasos sanguíneos e elementos da matriz extracelular, desempenhando um papel essencial na sobrevivência das células tumorais e na sua resistência aos tratamentos. A presença de fatores solúveis – como citocinas, quimiocinas, fatores de remodelamento de matriz e fatores de crescimento – possibilita a comunicação entre as células tumorais e células vizinhas, tornando a matriz extracelular um alvo de estudo para possíveis terapias antitumorais (SHARMA *et al.*, 2023). Células tumorais exibem diversas alterações metabólicas,

como o aumento da captação de glicose, que favorecem seu crescimento e proliferação. No entanto, no caso do GBM, a heterogeneidade na angiogênese e vascularização resulta em variações na disponibilidade de oxigênio, o que pode gerar perfis metabólicos distintos entre as células tumorais (DIRKSE *et al.*, 2019). A acidose e a hipóxia também são características marcantes do microambiente tumoral no GBM e desempenham papéis cruciais na progressão da doença e na resistência aos tratamentos. A acidose resulta principalmente do aumento da glicólise aeróbica pelas células tumorais (efeito Warburg), levando à produção excessiva de ácido lático, o que acidifica o microambiente extracelular. Esse ambiente ácido favorece a proliferação, migração e angiogênese, além de induzir resistência à quimioterapia e radioterapia (SHARMA *et al.*, 2023). Para sobreviver a essas condições adversas, as células tumorais ativam mecanismos de adaptação, como o aumento na expressão de transportadores de íons (MCT-4, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>) e proteínas associadas à resistência ao estresse ácido (como LAMP2, ATG5 e BCL-2). Paralelamente, a hipóxia estimula a estabilidade do fator HIF-1 $\alpha$ , que ativa genes relacionados à angiogênese (como VEGF), invasão tumoral e adaptação metabólica. Esses processos não apenas promovem um fenótipo mais agressivo, mas também dificultam a resposta às terapias convencionais (SHARMA *et al.*, 2023). Diante das condições desafiadoras do microambiente tumoral, as alterações na glicosilação de proteínas de superfície têm ganhado destaque por modularem a comunicação celular, resultando em maior adaptação e sobrevivência das células tumorais, o que as torna um potencial alvo terapêutico a ser investigado (LEAL *et al.*, 2025).

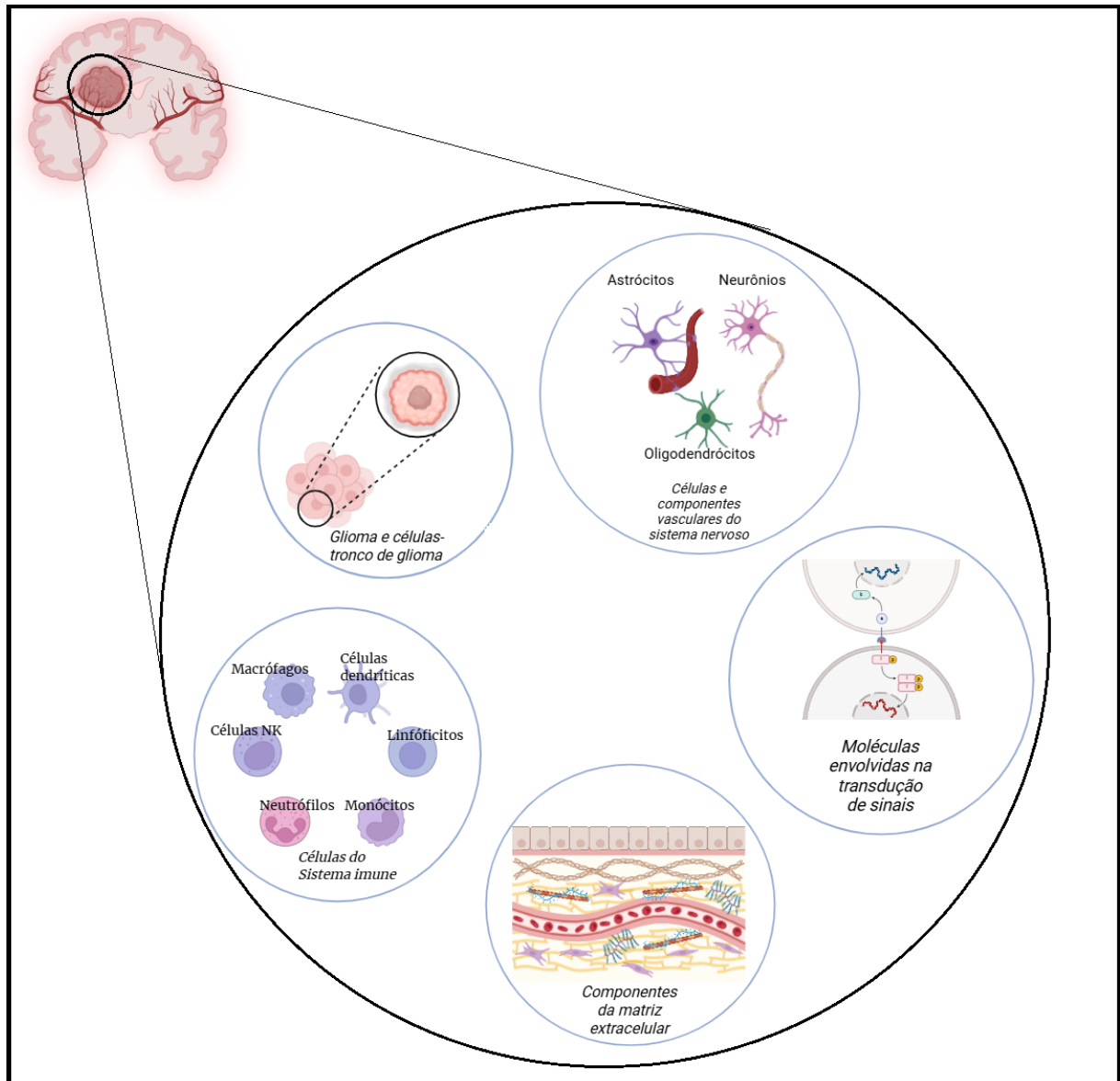


**Figura 1. Componentes do microambiente tumoral.** Adaptado de SHARMA *et al.*, 2023. O microambiente tumoral do glioma constitui um sistema complexo e heterogêneo, integrando diversos elementos celulares — como as próprias células do glioma, células-tronco neoplásicas, populações imunes e componentes vasculares e neurais — em uma matriz extracelular especializada. A fisiopatologia desse microambiente é profundamente influenciada tanto por mecanismos de comunicação celular (direta e indireta) quanto por variáveis físico-químicas do nicho tumoral, notadamente a hipóxia e a acidose, que atuam como moduladores críticos da progressão da doença. Criado com BioRender.com

#### 1.4 GLICÔMICA

A glicômica constitui uma área da biologia molecular dedicada ao estudo dos glicanos. Estes são definidos como cadeias de açúcares ligadas covalentemente a

outras moléculas, como proteínas e lipídeos, formando as glicoproteínas e os glicolipídeos. Esse campo investiga a modulação de função, estrutura e estabilidade de moléculas através dessas interações.

Estima-se que a maioria das proteínas de células eucarióticas sofra modificação pós-traducional por glicosilação, um processamento que ocorre no RE e complexo de golgi (PEARSON, 2019). Este processo pode ser dividido em N-glicosilação e O-glicosilação. O primeiro ocorre no grupamento amida da cadeia lateral do aminoácido asparagina, quando presente em regiões conservadas N-X-T/S, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina. O segundo ocorre em resíduos de serina ou treonina, onde o açúcar é ligado às hidroxilas das cadeias laterais destes aminoácidos (PEARSON, 2019).

Evidências crescentes destacam o papel fundamental do glicoma (conjunto de glicanos constituintes dos organismos) nos mecanismos celulares de reconhecimento. Variações estruturais na glicosilação de membranas podem produzir diversos biomarcadores, sendo correlacionadas a processos como diferenciação, ativação celular e doenças. Estruturas truncadas em O-glicanos como o antígeno T (formado pelo glicosídeo  $\beta$ -galactose- $\alpha$ -N-acetil-galactosamina ligado a Ser/Thr) costumam estar relacionados a um pior prognóstico em diversos tipos de câncer (OHTSUBO *et al*, 2006).

#### 1.4.1 O GLICOCÁLICE TUMORAL E SEU PAPEL NA PROGRESSÃO DO CÂNCER E NO RECONHECIMENTO POR LECTINAS

Em células cancerígenas em geral, bem como gliomas, se observa um padrão alterado de glicosilação (Figura 2), o qual pode promover vias de sinalização relacionadas à migração, proliferação e invasão (FURUKAWA *et al.*, 2015; FAHIE & ZACHARA, 2016; VEILLON *et al* 2018; MEREITER *et al.*, 2019; GAO *et al.*, 2021). A glicosilação constitui um processo rigorosamente controlado e composto por várias etapas, contudo, em neoplasias malignas alterações nas enzimas glicosiltransferases e glicosidases acarretam alterações significativas no perfil de glicanos de proteínas e lipídeos (MEREITER *et al.*, 2019). Alterações nos padrões de glicosilação podem interferir por exemplo na função de receptores tirosina cinase (RTK), bem como em moléculas de adesão celular, como integrinas e caderinas (MEREITER *et al.*, 2019). RTKs e suas cascatas de sinalização estão amplamente envolvidos em diversos

processos relacionados à progressão do câncer. Estudos mostram que a inibição de N-glicosilação em células cancerígenas pode aumentar a sensibilidade à radioterapia, por meio da redução da expressão de RTKs e consequente redução na fosforilação de Akt (CONTESSA *et al.*, 2008). Alteração na glicosilação pode ser também um evento importante no processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT) e sua reversão. Um exemplo disso é a expressão de glicoesfingolípídeos mediada por  $\alpha$ 1,4-galactosiltransferase, associado a adesão célula-célula via E-caderina (Jacob *et al.*, 2018; MEREITER *et al.*, 2019). Em células GBM, observa-se um padrão com estruturas mais truncadas para O-Glicosilação (serina/treonina) e maior ramificação, fucosilação e sialilação em N-glicosilação (Asparagina). A superexpressão de N-acetilgalactosiltransferases (GnTs), enzimas chave para síntese de glicanos, aumenta a estabilidade do transportador GLUT1, o qual é N-glicosilado, levando a uma maior capacidade de proliferação celular. O aumento na ramificação em N-glicanos permite um maior processo de sialilação e fucosilação terminal, os quais contribuem para a propagação do tumor. A superexpressão de fucosiltransferase 8 (FUT8), enzima responsável pela fucosilação da primeira N-acetilglicosamina da estrutura central, está associada ao grau e agressividade do tumor. Esses glicanos também podem modular respostas imunes, interagindo com proteínas da família das lectinas (PACE *et al.*, 2022).

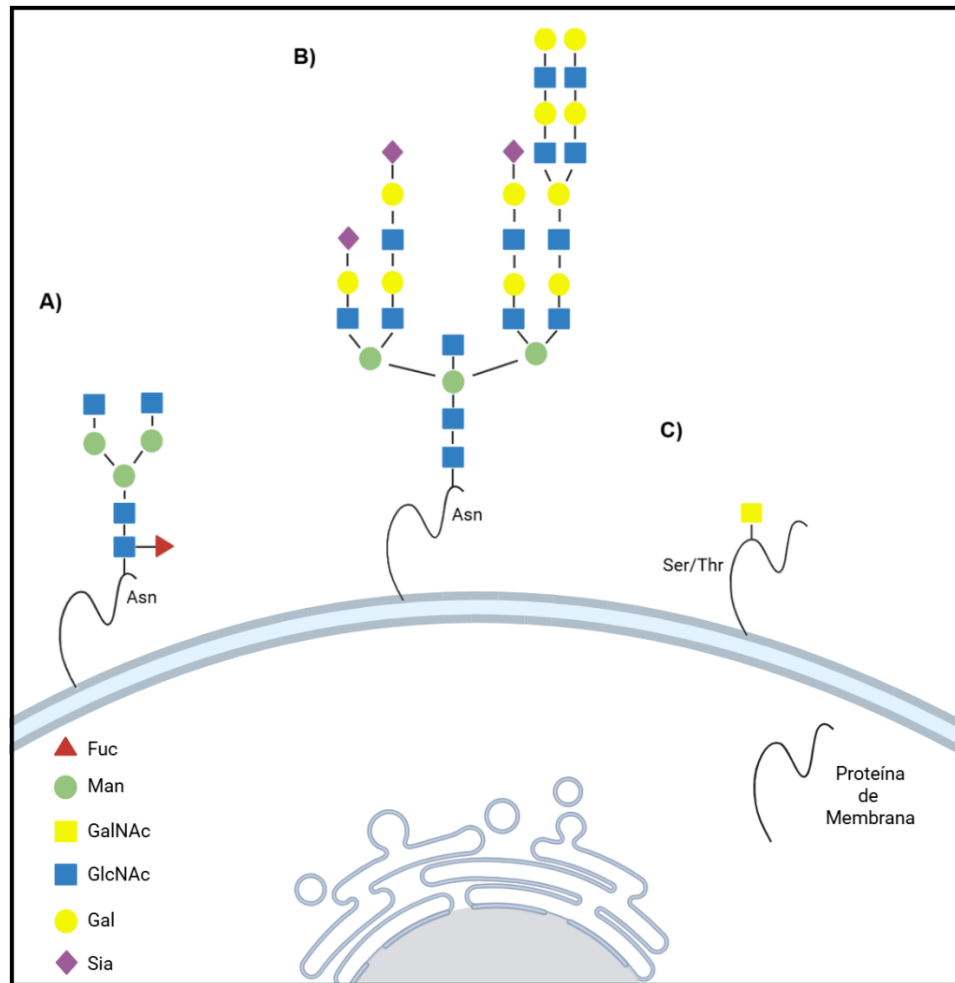


**Figura 2. Alterações comuns em padrões de glicosilação observadas em GBM. A)** Fucosilação no primeiro resíduo de N-acetilglicosamina da estrutura do N-glicano. **B)** Hiper-ramificação em estruturas de N-glicanos. **C)** Presença de O-glicanos truncados (antígeno Tn). **Abreviaturas:** **Fuc:** Fucose; **Man:** Manose; **GalNAc:** N-acetilgalactosamina; **GlcNAc:** N-acetilglicosamina; **Gal:** Galactose; **Sia:** Ácido Siálico. Adaptado de PACE *et al*, 2022. Criado com BioRender.com

### 1.5 A LINHAGEM C6 DE GLIOMA

A linhagem celular C6 de glioma (figura 3) é um modelo experimental consolidado, desenvolvido na década de 1960 a partir da indução de tumor em ratos Wistar-Furth, mediante exposição repetida à N-nitroso-N-metilureia (BENDA *et al.*, 1968). Sua relevância persiste devido um perfil molecular que mimetiza aspectos-chave dos gliomas humanos, notadamente o Glioblastoma (GBM) (GROBBEN *et al.*, 2002).

Do ponto de vista genético, essas células não apresentam mutações em *p53* ou *IDH*, e são caracterizadas pela superexpressão de importantes vias de sinalização oncogênicas, como *IGF-1* (do inglês, *insulin-like growth factor 1*), *EGFR* (*epidermal*

*growth factor receptor*) e a cascata de sinalização *Ras* - alterações também observadas em gliomas humanos. Essas alterações, frequentemente encontradas em GBM humano, conferem às células um fenótipo de proliferação sustentada e crescimento agressivo (GIAKOUMETTIS *et al.*, 2018).

Morfológica e histologicamente, as células C6 exibem um formato fusiforme e recapitulam características marcantes do GBM; como a formação de focos de necrose, alta taxa mitótica e significativo polimorfismo nuclear. No entanto, é crucial reconhecer as diferenças que limitam o modelo: a principal delas é uma expressão limitada de *GFAP* (*Glial fibrillary acidic protein*) um marcador astrocitário clássico, bem como expressão variável de vimentina (GIAKOUMETTIS *et al.*, 2018; BACKHOVENS *et al.*, 1987). Em geral, as células C6 são utilizadas como modelo para estudo de características como crescimento tumoral, invasão, migração, angiogênese, fatores de crescimento e ruptura da barreira hematoencefálica, sendo a inibição do crescimento tumoral o principal foco de estudo com essa linhagem (GIAKOUMETTIS *et al.*, 2018).

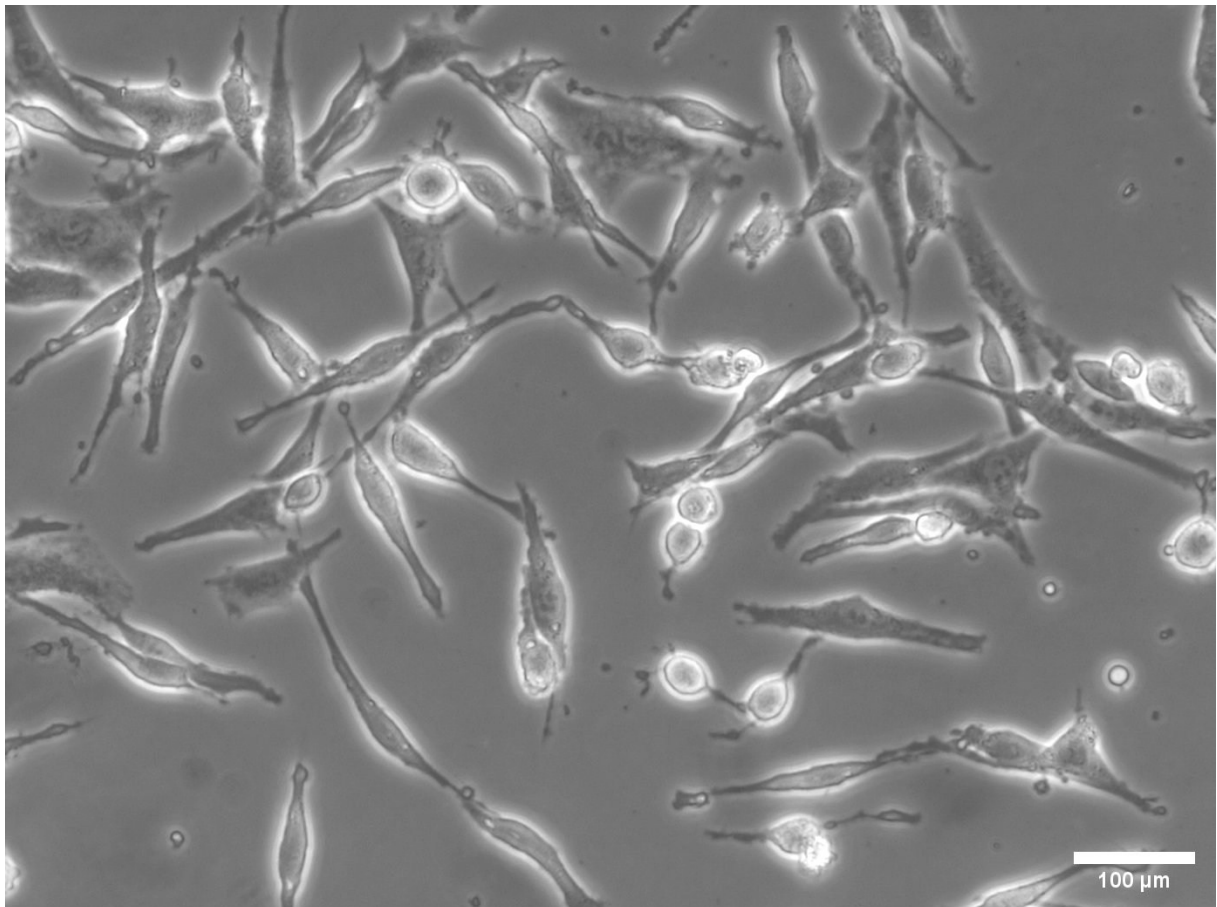


**Figura 3. Aspecto Morfológico das Células C6 em Cultura.** Imagem representativa da linhagem celular de glioma C6, mostrando o crescimento em monocamada e morfologia fusiforme característica.

A imagem foi capturada em microscopia de campo claro antes dos tratamentos experimentais em objetiva de 20x. Fonte: próprio autor.

## 1.6 LECTINAS: ESTRUTURA, CLASSIFICAÇÃO, ESPECIFICIDADE POR GLICANOS E FUNÇÕES BIOLÓGICAS

Lectinas são proteínas que possuem pelo menos um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), o qual se liga especificamente e de forma reversível a glicanos isoladamente ou presentes em glicoconjugados (CAVADA *et al.*, 2019). Dessa forma, a interação das lectinas com glicoproteínas ou glicolípídeos da superfície celular pode desencadear inúmeros efeitos biológicos (BHUTIA *et al.*, 2019). Evidências apontam propriedades pró-apoptóticas e antiproliferativas de lectinas em diversas linhagens de câncer, podendo também ser utilizadas como marcadores de superfície em histoquímica, ligando-se a células neoplásicas *in vivo* (BHUTIA *et al.*, 2019; GAUTAM *et al.*, 2020). A ligação entre lectinas e seus ligantes pode se dar através de ligações de hidrogênio, além de forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Também podem ter íons metálicos associados, os quais mostram reações coordenadas entre carboidratos e água (GAUTAM *et al.*, 2020). Nos últimos anos, observa-se um número crescente de estudos de lectinas obtidas de plantas e suas propriedades para identificação e modulação de tipos celulares específicos, com destaque especial para as propriedades antitumorais (BHUTIA *et al.*, 2019; CAVADA *et al.*, 2019; GAUTAM *et al.*, 2020; MAZALOVSKA & KOUOKAM, 2020; CAVADA *et al.*, 2023; LEAL *et al.*, 2025).

Estudos prévios de nosso Laboratório têm demonstrado a atividade antitumoral de diversas lectinas leguminosas, com graus variados de potência. Notavelmente, essa ação não foi detectada sobre cultura primária de astrócitos (NASCIMENTO *et al.*, 2019; WOLIN *et al.*, 2021), sugerindo uma ação seletiva sobre as células tumorais. Os principais efeitos descritos indicam a capacidade de gerar efeitos citostáticos, ativar caspases e estimular a autofagia em linhagens de glioma C6 e U87. Esses estudos têm demonstrado potencial antiglioma das lectinas leguminosas da subtribo *Diocleinae*, purificadas das sementes de *Canavalia virosa* (ConV) (OSTERNE *et al.*, 2017), *Canavalia bonariensis* (CaBo) (CAVADA *et al.*, 2018), *Canavalia brasiliensis* (ConBr) (WOLIN *et al.*, 2021), *Canavalia grandiflora* (ConGF) (LEAL *et al.*, 2022); *Dioclea lasiocarpa* (DLL) (NASCIMENTO *et al.*, 2017), *Dioclea lasiophylla* (DlyL)

(LEAL *et al.*, 2018) e *Dioclea violacea* (DvL) (NASCIMENTO *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2019).

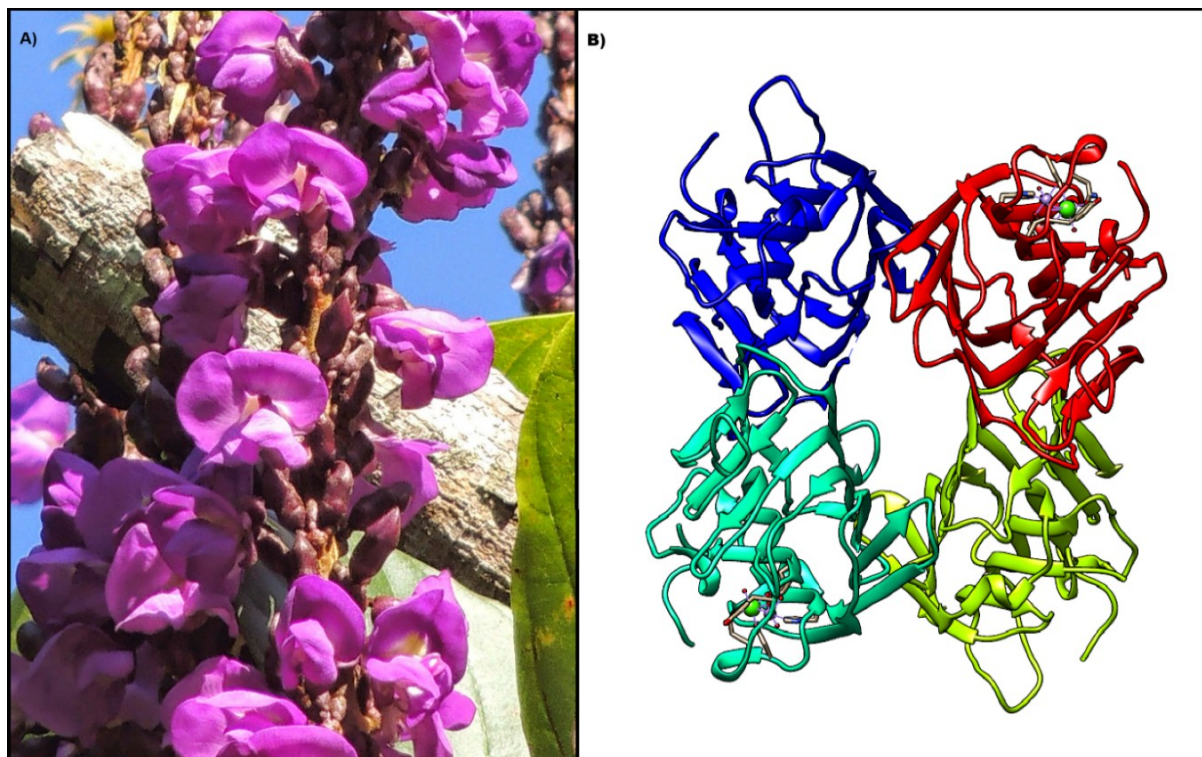


**Figura 4. Representação da fonte biológica e da estrutura quaternária da lectina DvL. (A)** Detalhe das flores de coloração violeta de *Dioclea violacea*, a partir de cujas sementes a lectina é isolada. Fonte: <https://www.plantasonya.com.br/trepadeiras-e-ornamentais/cipo-de-imbiri-dioclea-violacea-m.html> **(B)** Estrutura cristalográfica tridimensional da Lectina DvL (PDB: **2GDF**). A proteína apresenta uma estrutura quaternária tetramérica, com as quatro subunidades diferenciadas por cores. A visualização da estrutura foi realizada utilizando o software Chimera.

Dentre as lectinas investigadas, a *Dioclea violacea* (DvL; Figura 4) tem se destacado por apresentar resultados promissores em estudos *in vitro* com células de glioma C6 e U87. Os achados incluem a redução da viabilidade celular, a indução de apoptose e autofagia, a modulação de vias de sinalização associadas à sobrevivência celular (como Akt, mTOR e ERK), além da diminuição da migração celular e da perda do potencial de membrana mitocondrial (NASCIMENTO *et al.*, 2018; 2019). Contudo, apesar de todos os avanços na compreensão dos mecanismos de ação das lectinas, diversos pontos necessitam de uma investigação mais aprofundada, incluindo a capacidade da lectina induzir estresse de retículo endoplasmático e de ser internalizada.

### 1.7 MECANISMOS DE MORTE CELULAR: APOPTOSE, AUTOFAGIA E SUA RELAÇÃO COM O CÂNCER

A manutenção da saúde e homeostase de organismos multicelulares depende de um equilíbrio rigoroso entre proliferação e morte celular. Neste contexto, a morte celular regulada (RCD - *Reguled cell death*) é executada por processos geneticamente programados e, conseqüentemente, é suscetível a manipulação por meios genéticos ou farmacológicos (VITALE *et al.*, 2023). Múltiplos mecanismos de RCD já foram descritos; dentre eles, a morte celular programada é caracterizada por ser ativada em condições puramente fisiológicas, como no contexto do desenvolvimento embrionário/pós-embrionário ou na homeostase do tecido adulto. Por outro lado, em condições patológicas a RCD pode ocorrer pela ativação de vias de sinalização que levam à eliminação de células excessivamente danificadas e/ou potencialmente prejudiciais, como células infectadas por patógenos (VITALE *et al.*, 2023).

A apoptose (Figura 5) é uma forma de RCD promovida por proteases da família das caspases, podendo ser desencadeada por estímulos extracelulares (via extrínseca) ou intracelulares (via intrínseca) (GALLUZZI *et al.*, 2014). Este processo é executado por uma cascata proteolítica que envolve a ativação sequencial de caspases iniciadoras e caspases efetoras, sendo essas últimas responsáveis pela clivagem final dos substratos celulares (CARNEIRO *et al.*, 2020). O mecanismo de apoptose pela via intrínseca é caracterizado pelo evento crítico da permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP), seguido pela liberação do citocromo c no citoplasma. Uma vez no citosol, o citocromo c associa-se ao fator 1 de ativação da protease apoptótica (APAF1) e à pró-caspase-9, promovendo a formação do complexo apoptossomo e a consequente ativação da caspase-9. Essa, por sua vez, desencadeia a ativação em cascata das caspases efetoras 3 e 7, culminando na execução do processo apoptótico (VITALE *et al.*, 2023). As proteínas BH3-only constituem uma subclasse pró-apoptótica da família BCL-2, caracterizadas por possuírem apenas um domínio homólogo a BCL-2 (domínio BH3). Elas podem ser agrupadas em dois subgrupos funcionais: ativadoras e sensibilizadoras. As proteínas ativadoras (como BIM, BID e PUMA) interagem diretamente com os efetores centrais da apoptose, BAX e/ou BAK1, promovendo sua oligomerização e a formação de poros na membrana mitocondrial externa, evento que culmina no processo de MOMP. Por

outro lado, as proteínas sensibilizadoras (como BAD, NOXA, BIK, BMF e HRK) atuam inibindo as proteínas antiapoptóticas da família BCL-2 e/ou liberando as proteínas ativadoras previamente sequestradas por elas, favorecendo, assim, a progressão da via apoptótica (CARNEIRO *et al.*, 2020). A via extrínseca, por sua vez, é iniciada por proteínas da membrana celular conhecidas como receptores de morte (do inglês *death receptors*). Os receptores de morte pró-apoptóticos incluem o receptor Fas (cujo ligante fisiológico é o FasL), os receptores do fator de necrose tumoral (TNF) TNFR1 e TNFR2, e os receptores DR4 e DR5 do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL). Após interação com ligante, os receptores sofrem trimerização e se agregam na membrana celular (fenômeno conhecido como *capping*), seguido de recrutamento de proteínas adaptadoras, como FADD, e de caspases iniciadoras, como a caspase 8 e caspase 10, para formar o complexo de sinalização indutor de morte (DISC). Uma vez ativadas, as caspases iniciadoras levam à ativação de caspases efetoras, culminando na execução do processo apoptótico (CARNEIRO *et al.*, 2020).

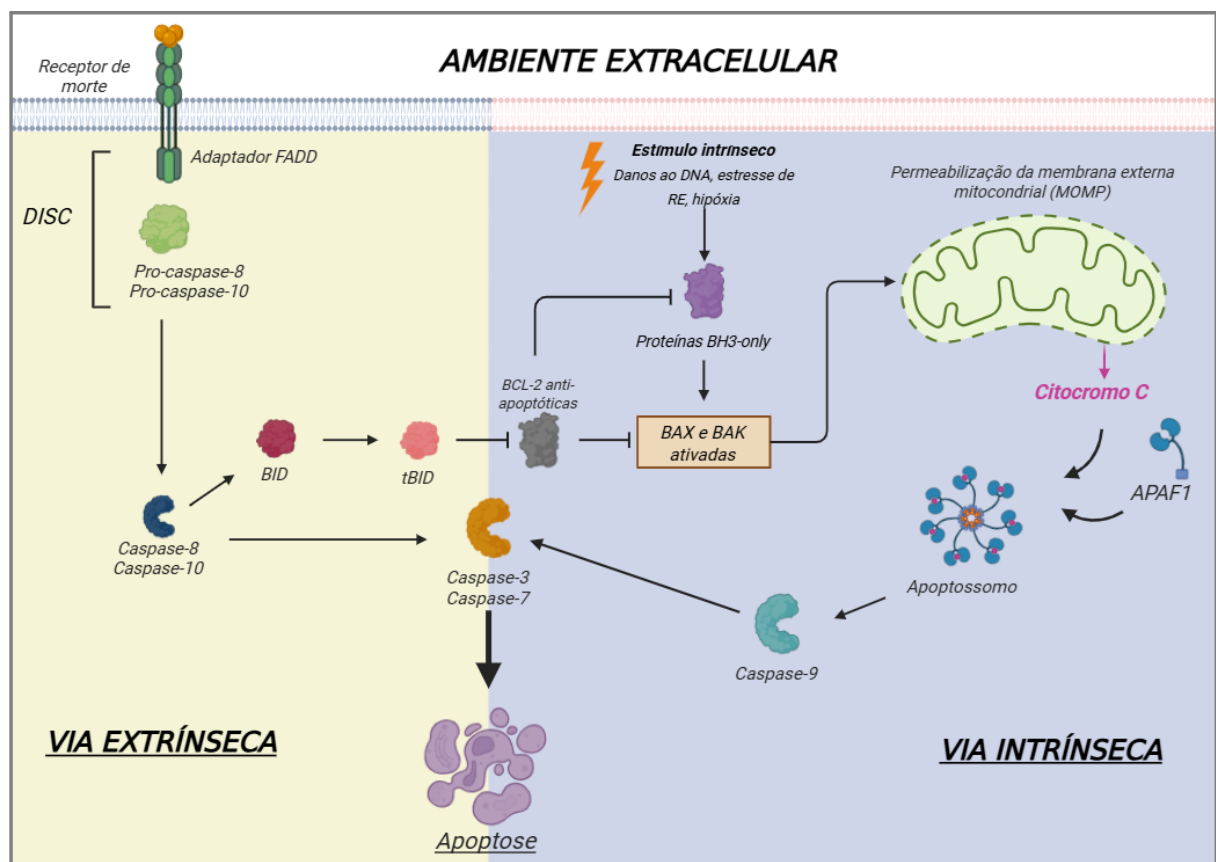


**Figura 5. Representação esquemática das vias de sinalização da apoptose.** A figura ilustra as duas principais rotas de indução apoptótica: a via extrínseca, mediada por receptores de morte, e a via

intrínseca, dependente da mitocôndria. Na via extrínseca, a ligação de ligantes específicos aos receptores de morte na membrana plasmática promove a formação do Complexo de Sinalização Indutor de Morte (DISC), responsável pela ativação das caspases iniciadoras 8 e 10. A caspase-8 ativada pode clivar a proteína BID, gerando tBID, que conecta essa via à via mitocondrial. A via intrínseca, por sua vez, é desencadeada por estímulos internos, como dano ao DNA, estresse do retículo endoplasmático (RE) ou hipóxia, que induzem proteínas BH3-only. Essas proteínas promovem a ativação de BAX e BAK, resultando na permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) e na liberação de citocromo c no citosol. O citocromo c associa-se à APAF1, formando o apoptossomo, que recruta e ativa a caspase-9. Ambas as vias convergem na ativação das caspases efetoras 3 e 7, responsáveis pela clivagem de proteínas estruturais e regulatórias, culminando nas alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose. **Abreviaturas:** **RE:** Retículo Endoplasmático; **DISC:** Complexo de Sinalização Indutor de Morte; **MOMP:** Permeabilização da Membrana Externa Mitocondrial; **tBID:** Proteína BID truncada; **APAF1:** Fator 1 de Ativação da Protease Apoptótica. Criado com BioRender.com

A autofagia (Figura 6) é um processo altamente conservado, essencial para a manutenção da homeostase celular, por meio da degradação e reciclagem de componentes intracelulares, como organelas danificadas e macromoléculas, o que permite o reaproveitamento de nutrientes (XI *et al.*, 2022). Seu mecanismo baseia-se na formação de vesículas de dupla membrana, denominadas autofagossomos, que envolvem os componentes celulares a serem degradados e posteriormente se fundem aos lisossomos, originando o complexo denominado autolisossomo (ou atofagolisossomo) (LEVY; THORBURN, 2019). A formação e maturação dessas estruturas são rigorosamente controladas pela expressão e interação coordenada de proteínas codificadas pelos genes relacionados à autofagia (ATGs), os quais participam de etapas distintas do processo (LEVY; THORBURN, 2019). Os complexos da *mammalian target of rapamycin* (mTOR) atuam como reguladores centrais do crescimento, sobrevivência e proliferação celular. A mTOR forma dois complexos funcionalmente distintos, mTORC1 e mTORC2, sendo o primeiro sensível a fatores como disponibilidade de energia e aminoácidos. Em condições fisiológicas, o mTORC1 exerce efeito inibitório sobre a autofagia. Sob estresse (privação de nutrientes, estresse oxidativo ou estresse do RE) a atividade do mTORC1 é diminuída, reduzindo a fosforilação inibitória de ULK1/2, permitindo sua ativação e desencadeando a via autofágica (XI *et al.*, 2022; GÓMEZ-VIRGILIO *et al.*, 2022). O processo de formação do autofagossomo se inicia pela ativação da proteína PI3K de classe III (Vps34), mediando o passo de “nucleação” junto da proteína Beclin-1

(GÓMEZ-VIRGILIO *et al.*, 2022). A Beclin-1 interage com o complexo UVRAG–Class C Vps, promovendo o recrutamento da proteína LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*), por meio do complexo ATG5–ATG12/ATG16L. Essa interação é essencial para a maturação e alongamento dos autofagossomos (XI *et al.*, 2022). A formação dessas estruturas também depende da conjugação da LC3 à fosfatidiletanolamina (PE), um componente da membrana autofágica, por meio das atividades de ATG7, ATG3 e do complexo ATG5-ATG12, formando LC3-II, que se incorpora à membrana do autofagossomo. A relação LC3-II/LC3-I é amplamente utilizada como marcador da atividade autofágica (XI *et al.*, 2022). Durante a formação dos autofagossomos, a proteína adaptadora p62/SQSTM1 exerce papel central no reconhecimento e direcionamento de proteínas destinadas à degradação, ligando-se simultaneamente a proteínas ubiquitinadas (via domínio C-terminal) e à LC3-II (via motivo *LC3-interacting region*, LIR), e atuando como uma ponte entre os substratos e a membrana autofágica, promovendo sequestro seletivo do material a ser degradado (XI *et al.*, 2022). Após a fusão dos autofagossomos com os lisossomos (autolisossomo), tanto o conteúdo interno quanto a própria p62 são degradados, sendo sua quantificação um indicador do fluxo autofágico (XI *et al.*, 2022).

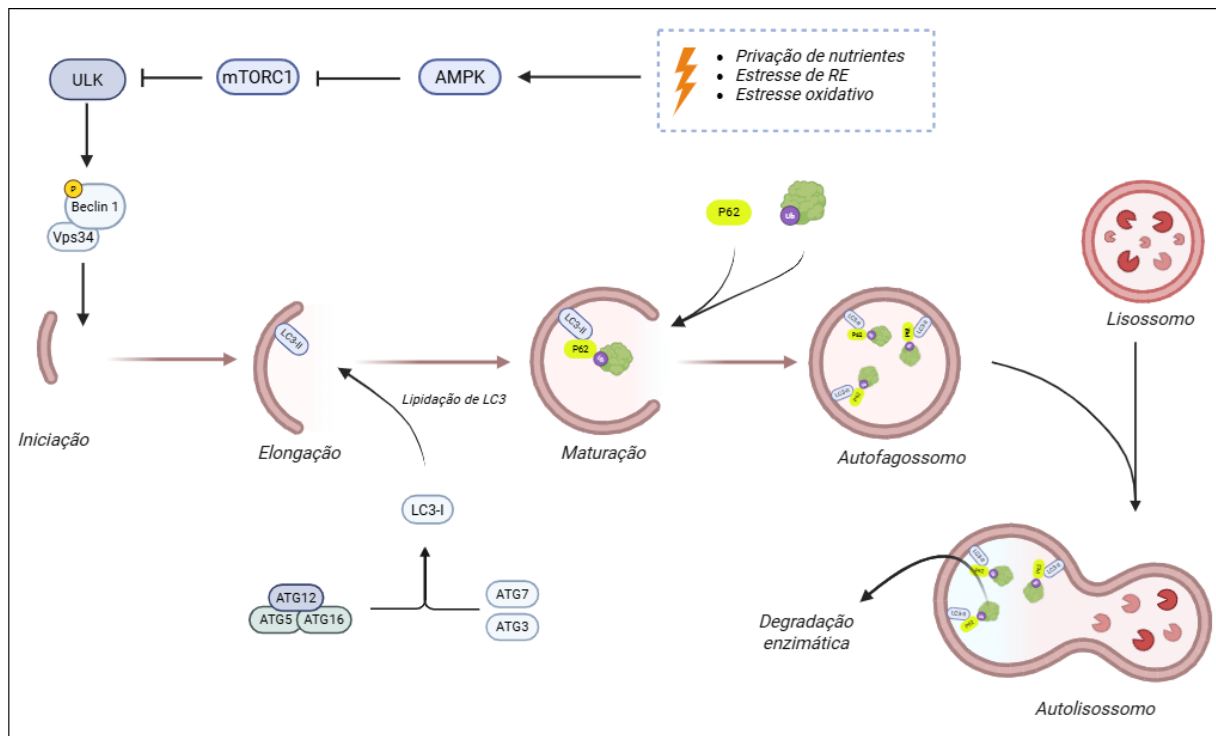


**Figura 6. Representação esquemática do fluxo autofágico.** O processo é desencadeado por condições de estresse, como privação de nutrientes, estresse oxidativo e estresse do retículo

endoplasmático (RE), que sinalizam para a ativação da cinase AMPK. Esta, por sua vez, atua como um inibidor do complexo mTORC1, removendo a repressão sobre o complexo ULK. Na etapa de iniciação, o complexo ULK promove a fosforilação de Beclin-1, que em conjunto com a Vps34, regula a nucleação do fagóforo. Durante a elongação, ocorre a lipidação da proteína citosólica LC3-I em LC3-II, processo mediado pelas proteínas ATG7 e ATG3, juntamente com o complexo ATG12–ATG5–ATG16. Na fase de maturação, a proteína adaptadora p62 reconhece alvos marcados com ubiquitina (Ub) e interage com a LC3-II ancorada à membrana, direcionando a carga para o interior da vesícula. O autofagossomo maduro funde-se ao lisossomo, formando o autolisossomo, onde a degradação enzimática permite a reciclagem de componentes essenciais para a célula. **Siglas:** **AMPK:** proteína cinase ativada por adenosina monofosfato; **mTORC1:** complexo 1 do alvo mecanístico da rapamicina; **ULK:** cinase ativadora de autofagia semelhante a Unc-51; **Vps34:** proteína de triagem vacuolar 34; **LC3:** proteína 1 de cadeia leve 3 associada a microtúbulos; **ATG:** proteínas relacionadas à autofagia; **p62/SQSTM1:** sequestossomo 1; **Ub:** ubiquitina; **RE:** retículo endoplasmático. Criado com BioRender.com.

Estudos apontam diversas interações entre os processos de autofagia e apoptose, nas quais mecanismos de sinalização de uma via podem regular a outra (XI *et al.*, 2022). A deficiência do gene ATG7, por exemplo, resulta em elevação da atividade da caspase-8, reforçando a interdependência e regulação cruzada entre os processos de autofagia e apoptose. ATG5 e ATG12 podem ativar caspases pela via mitocondrial. O processo autofágico também pode promover apoptose por meio da degradação de diversas proteínas anti-apoptóticas (XI *et al.*, 2022). As caspases, proteínas-chave no processo apoptótico, também podem degradar diversas proteínas relacionadas à autofagia, inibindo, portanto, esse processo (XI *et al.*, 2022).

Células cancerígenas apresentam a capacidade de evadir o processo apoptótico, sendo frequentes as mutações em genes pró-apoptóticos (XI *et al.*, 2022). Entretanto, alguns estudos também associam a Caspase 3, classicamente conhecida como executora do processo apoptótico, à indução de um microambiente proangiogênico em tecidos tumorais, favorecendo a recorrência do tumor após irradiação e a tumorigenicidade, sugerindo assim que a Caspase 3 desempenha um papel duplo e contra-intuitivo no suporte à angiogênese pós-tratamento (FENG *et al.*, 2017). A autofagia também está intimamente associada ao desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, de modo que a redução de sua atividade basal pode favorecer a carcinogênese. Além disso, esse processo atua como um importante mecanismo supressor tumoral, não apenas por promover a eliminação de células anormais, mas também pela remoção de moléculas potencialmente oncogênicas,

como espécies reativas de oxigênio, durante a degradação de mitocôndrias danificadas. Por outro lado, em células cancerígenas, a autofagia pode contribuir para a sobrevivência tumoral, ao favorecer a reciclagem de nutrientes e a remoção de organelas danificadas, conferindo resistência a condições de estresse metabólico (XI *et al.*, 2022).

## 1.8 ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO: MECANISMOS MOLECULARES E SEU PAPEL NA SOBREVIVÊNCIA E MORTE CELULAR

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela essencial para a síntese, dobramento e modificação de proteínas, bem como a síntese lipídica e armazenamento de cálcio (HETZ *et al.*, 2020). A disfunção no enovelamento de proteínas no RE, causada tanto por fatores endógenos quanto exógenos, é denominada estresse de RE (Figura 7), a qual pode gerar uma série de respostas, denominada *Resposta de proteína desdobrada* (*Unfolded protein response* - UPR) (CHEN & CUBILLOS-RUIZ, 2021). A UPR é coordenada por 3 principais proteínas (conhecidas como “braços da UPR”): Fator ativador de transcrição 6 (ATF6), enzima dependente de Inositol 1 (IRE1) e proteína cinase do RE semelhante a PRKR (PERK). Em condições normais de homeostase, essas proteínas, que atuam como sensores, se encontram ligadas à chaperona GRP78/BiP, estando em sua forma inativa (READ *et al.*, 2021; CHEN & CUBILLOS-RUIZ, 2021). Em situações de estresse de RE, a afinidade da GRP78 por proteínas mal dobradas aumenta, e a mesma se dissocia dos seus sensores, dando início à cascata de sinalização que, de forma controlada, pode reestabelecer a homeostase e promover a sobrevivência celular (CHEN & CUBILLOS-RUIZ, 2021). PERK é uma proteína transmembrana do tipo I que compartilha um domínio homólogo com a IRE1 (READ *et al.*, 2021). A dissociação de BiP promove a ativação de PERK, resultando na fosforilação do fator de iniciação da tradução eucariótica 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) na serina 51. (READ *et al.*, 2021). Esse processo leva à repressão global da síntese proteica, exceto para genes seletivamente traduzidos, como o do fator de transcrição ATF4, reduzindo o influxo de proteínas recém-sintetizadas ao retículo endoplasmático (HETZ *et al.*, 2020). O ATF4 atua na regulação da expressão de genes envolvidos na homeostase redox, metabolismo de aminoácidos, síntese proteica, autofagia e apoptose. Também tem papel no controle

da fosforilação de eIF2 $\alpha$ , regulando positivamente a subunidade GADD34 da proteína fosfatase 1 (PP1), responsável por remover o grupo fosforila de eIF2 $\alpha$  (HETZ *et al.*, 2020; CHEN & CUBILLOS-RUIZ, 2021). IRE1 $\alpha$  é uma proteína transmembrana do tipo I que possui atividades cinase e endoribonuclease. Durante o estresse do RE, essa proteína sofre oligomerização e autofosforilação, o que ativa sua função RNase (HETZ *et al.*, 2020). Essa atividade leva ao splicing não convencional do mRNA de XBP1, removendo um íntron de 26 nucleotídeos e gerando a forma ativa do fator de transcrição XBP1s. O fator XBP1s, por sua vez, induz a expressão de genes envolvidos no dobramento, transporte e secreção de proteínas, bem como da degradação de proteínas mal dobradas (HETZ *et al.*, 2020). Em um processo chamado RIDD (*Regulated IRE1-dependent decay*), IRE1 $\alpha$  pode clivar pequenos mRNAs, levando à sua degradação, e servindo para aliviar a sobrecarga de mRNA e proteínas no RE. Além da função quantitativa já determinada, o RIDD também pode ter papel na regulação de múltiplos processos celulares, clivando mRNAs específicos e de forma dependente de estímulo (HETZ *et al.*, 2020). IRE1 também pode se associar com proteínas adaptadoras e promover vias relacionadas a estresse, incluindo macroautofagia e MAPKs (HETZ *et al.*, 2020). O fator ATF6, por sua vez, migra do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, onde é clivado sequencialmente pelas proteases de sítio 1 (S1P) e de sítio 2 (S2P), liberando um fragmento de aproximadamente 50 kDa (ATF6p50). Esse fragmento é translocado para o núcleo, onde atua como fator de transcrição, induzindo a expressão de genes associados à resposta ao estresse do RE (HETZ *et al.*, 2020). De forma complementar, ATF6p50 e IRE1 atuam em vias distintas, porém sinérgicas, coordenando a regulação de chaperonas e enzimas envolvidas na translocação, maturação, degradação e secreção de proteínas (HETZ *et al.*, 2020). Quando o estresse de RE é contínuo e a UPR não é suficiente para remover as proteínas alteradas, as vias de sinalização associadas podem levar à morte celular (HETZ *et al.*, 2020; CHEN & CUBILLOS-RUIZ, 2021).

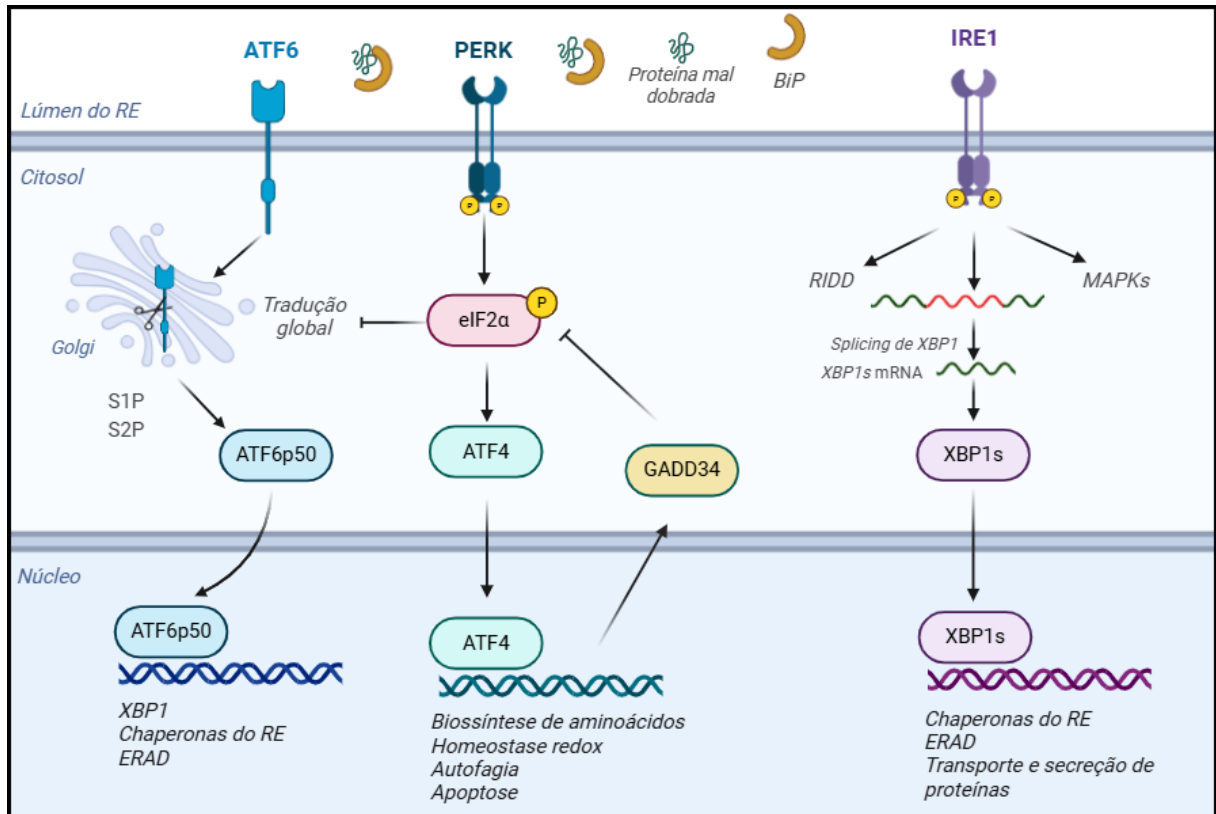


**Figura 7. Representação esquemática da Resposta a Proteínas Mal Dobradas (UPR) induzida pelo estresse do retículo endoplasmático (RE).** A UPR é ativada quando proteínas mal dobradas se acumulam no lúmen do RE e se ligam à chaperona BiP/GRP78, promovendo sua dissociação dos sensores transmembrana PERK, IRE1 e ATF6. A ativação de PERK leva à sua autofosforilação e à fosforilação de eIF2 $\alpha$ , resultando em repressão global da tradução e tradução preferencial de ATF4. O ATF4 transloca-se ao núcleo e regula genes associados à homeostase redox, metabolismo, autofagia e apoptose, além de induzir GADD34, que participa do retorno de eIF2 $\alpha$  ao estado não fosforilado. De forma paralela, IRE1 oligomeriza, autofosforila-se e ativa sua atividade RNase, promovendo o splicing não convencional do mRNA de XBP1 e gerando XBP1s, que induz genes de chaperonas, ERAD e secreção proteica; adicionalmente, sua atividade RNase pode degradar mRNAs via RIDD. Já ATF6 migra para o Complexo de Golgi, onde é clivado por S1P e S2P, liberando ATF6p50, que atua no núcleo regulando chaperonas e componentes de ERAD de forma complementar à via IRE1. **Abreviaturas:** **UPR:** Resposta a Proteínas Mal Dobradas (*Unfolded Protein Response*); **RE:** Retículo Endoplasmático; **BiP/GRP78:** Proteína de Ligação/Proteína Regulada por Glicose de 78 kDa; **PERK:** Proteína cinase do RE semelhante a PRKR; **IRE1:** Enzima 1 que requer Inositol; **ATF6:** Fator de Transcrição Ativador 6; **eIF2 $\alpha$ :** Fator de Iniciação da Tradução Eucariótica 2 subunidade alfa; **ATF4:** Fator de Transcrição Ativador 4; **GADD34:** Proteína de Parada de Crescimento e Dano ao DNA 34; **XBP1s:** Proteína 1 de Ligação ao Box-X (forma processada/*spliced*); **ERAD:** Degradação de Proteínas Associada ao Retículo Endoplasmático; **RIDD:** Degradação de RNA dependente de IRE1 regulada; **S1P/S2P:** Proteases de Local 1 e 2; **MAPKs:** Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos. Criado com BioRender.com

## 2 JUSTIFICATIVA

Estudos apontam que o estresse de RE pode aumentar a sensibilidade das células GBM à temozolomida (TMZ), sugerindo como um potencial alvo terapêutico (SHI *et al.*, 2021). Um estudo de 2011 com a lectina leguminosa ConA, obtida a partir das sementes de *Canavalia ensiformes*, sugere que a mesma é capaz de induzir estresse de retículo endoplasmático em células de glioma humano U87, através da modulação de metaloproteinase de membrana tipo 1 (MT1-MMP), detectado através do aumento na expressão da chaperona GRP78 (PROULX-BUNNEAU, *et al.*, 2011). Dessa forma, considerando que o estresse do retículo endoplasmático (RE) ativa diversos sinais celulares, incluindo a expressão de proteínas associadas à autofagia e apoptose, pode-se postular que a morte celular possa ser desencadeada, inicialmente, pela ativação desse processo. Adicionalmente, hipotetizamos que a lectina *Dioclea violacea* (DvL) possa ser eventualmente internalizada por células de glioma C6 de maneira dependente de glicanos e, uma vez internalizada, possa causar redução da viabilidade celular por meio da ativação de processos de autofagia e estresse do RE. A internalização da lectina leguminosa ConA foi previamente demonstrada em estudos com células de hepatoma (CHANG *et al.*, 2007), sugerindo que a DvL, devido à sua similaridade estrutural, possa adotar um mecanismo de ação também dependente de internalização. A investigação da internalização e da localização subcelular de lectinas é essencial, uma vez que sua distribuição em compartimentos específicos (como o retículo endoplasmático) poderia desencadear respostas celulares específicas. Nesse contexto, torna-se igualmente relevante avaliar se tais processos dependem da interação da lectina com glicanos, pois essa interação pode direcionar tanto sua internalização quanto seu destino intracelular, influenciando diretamente seus efeitos biológicos. Esses dados são fundamentais para avaliar o potencial terapêutico das lectinas, especialmente no combate ao glioblastoma, além de contribuírem para o desenvolvimento de novas estratégias antitumorais em outros tipos de câncer. Considerando o baixo índice de sobrevida e a alta resistência do glioblastoma às terapias convencionais, torna-se imprescindível compreender detalhadamente os mecanismos moleculares envolvidos em sua patogênese e explorar inovações estratégicas baseadas em biomoléculas, como as lectinas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos citotóxicos da lectina DvL em células de glioma, com ênfase em seus possíveis mecanismos de ação e internalização.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os efeitos citotóxicos da DvL na viabilidade e morfologia de células C6 de glioma e investigar a dependência desses efeitos na interação com glicanos.
2. Investigar os mecanismos de ação intracelular da lectina DVL.
3. Confirmar e visualizar a internalização da DvL pelas células de glioma, utilizando técnica de microscopia confocal com a lectina conjugada a um fluoróforo.
4. Correlacionar os efeitos de viabilidade, morfologia, estresse de RE e autofagia, integrando os resultados obtidos para propor um mecanismo de ação da DvL em células de glioma.

### 4 METODOLOGIA

#### 1. CULTURA DE CÉLULAS DE GLIOMA

As células C6 de glioma de rato (linhagem Wistar; *Rattus norvegicus*) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Brasil). Os cultivos foram mantidos em frascos de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica e antimicótica Sigma Aldrich (ref A5955). As células foram incubadas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias, e as células foram repicadas ao atingirem cerca de 80% de confluência.

Para a realização dos experimentos, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS; NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,44 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,24 g/L), dissociadas quimicamente com 2mL de tripsina 0,025% por 5 min e, em seguida, a enzima foi inativada com 1 mL de DMEM +10% SFB. A suspensão resultante foi centrifugada a 1500 rpm por 5 min, e o pellet celular foi ressuspensão em 1 mL de meio DMEM. A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer marcadas com azul de tripan. As células entre a 3ª e a 12ª passagem foram utilizadas para todos os experimentos.

## 2. TRATAMENTOS

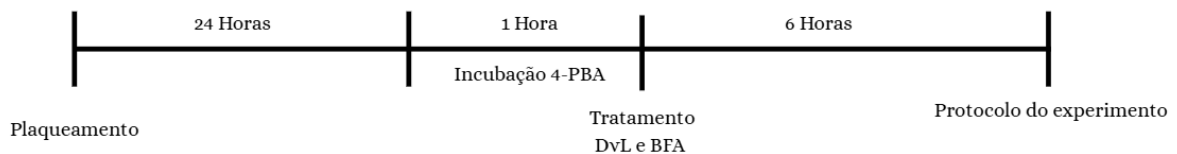
### a. LECTINA DVL

As células C6 de glioma foram semeadas em placas de 6, 12, 24 ou 96 poços e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), em estufa com atmosfera controlada (37°C, 95% de ar atmosférico e 5% de  $\text{CO}_2$ ) até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Para o tratamento, o meio de cultura foi cuidadosamente aspirado e substituído por meio fresco contendo a lectina DvL, solubilizada em solução HEPES salina (NaCl 124 mM, KCl 4 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,2 mM, HEPES 25 mM e  $\text{CaCl}_2$  1 mM, pH 7,4), nas concentrações variando de 1 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , conforme o ensaio específico. O grupo controle foi exposto apenas ao veículo (solução HEPES salina). Após a adição dos tratamentos, as células foram incubadas novamente nas condições padrão de cultura por um período de 6 horas, antes da realização das análises subsequentes.



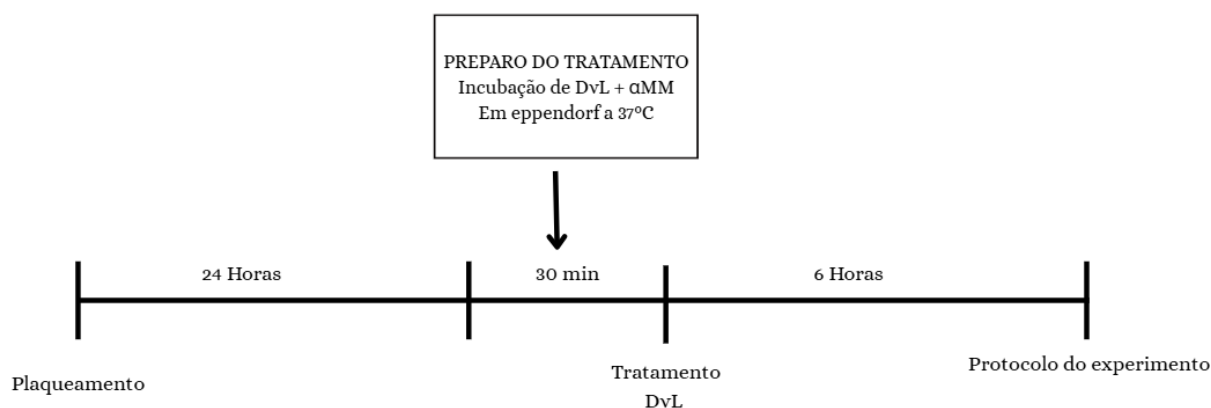
### b. PRÉ-TRATAMENTO E CO-TRATAMENTO COM MODULADORES DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (RE)

Para investigar com maior precisão a contribuição do estresse do retículo endoplasmático (RE) para a redução da viabilidade celular, as linhagens foram submetidas a pré-tratamento e co-tratamento com 4-fenilbutirato (4-PBA), uma chaperona química capaz de atenuar a sobrecarga proteotóxica e, consequentemente, aliviar o estresse de RE (PRASAD *et al.*, 2022). De acordo com o protocolo descrito por Lin *et al.* (2012), a pré-incubação de células U87 com 10 mM de 4-PBA por 1 hora mostrou-se suficiente para mitigar a ativação de vias associadas ao estresse de RE. Também foi avaliada a possibilidade de potencialização do efeito citotóxico da DvL em co-tratamento com o indutor de estresse de RE Brefeldina A, capaz de inibir o transporte de proteínas do RE para o complexo de golgi e induzir o caminho inverso, culminando no acúmulo de proteínas mal dobradas e consequente desencadeamento da UPR (OSLOWSKI *et al.*, 2011). Proulx-Bonneau *et al.* (2010) mostra que a concentração de 100ng/mL é suficiente para levar ao aumento nos marcadores de estresse de RE em células U87.



### c. PRÉ-INCUBAÇÃO DA LECTINA COM $\alpha$ -METIL-MANOSÍDEO

Para verificar o papel do domínio lectínico sobre a atividade de DVL, esta lectina foi dissolvida também de forma estéril em tampão HEPES-salina sem glicose, contendo 0,1 M de seu açúcar ligante específico ( $\alpha$ -metil-D-manosídeo) e mantida durante 30 minutos a 37°C antes do tratamento.



### 3. DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE PELO MÉTODO DE MTT

O método colorimétrico com sal tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio permite avaliar a atividade metabólica das células por meio da redução do MTT em cristais de formazan, via enzimas oxirredutases dependentes de NAD(P)H (MOSMANN, 1983).

Após o tratamento, 20 µl do meio foi removido e substituído por uma solução de MTT para uma concentração final de 0,5 mg/ml em HBSS (CAVADA *et al.*, 2025). As placas então foram incubadas protegidas da luz por 90 minutos a 37°C. Após a incubação, o MTT foi removido e os cristais de formazan dissolvidos em 100ul de dimetilsulfóxido (DMSO), com auxílio da micropipeta para homogeneizar. As absorbâncias foram medidas no comprimento de onda de 540nm, na Multileitora Infinite M200 TECAN, disponibilizada pelo Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia LAMEB/CCB/UFSC.

### 4. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COM LARANJA DE ACRIDINA

O ensaio de laranja de acridina é utilizado para detecção da formação de organelas vesiculares ácidas (OVA), as quais podem surgir como consequência de aumento no processo autofágico. Para isso, utilizou-se o protocolo já descrito anteriormente (Nascimento *et al.*, 2018, 2019; Wolin *et al.*, 2021). As células foram semeadas em placas de 12 poços na densidade de  $10^5$  células por poço, em 1 mL de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), e incubadas por 24 horas. Após esse período, o meio foi substituído por DMEM contendo 0,2% de albumina bovina sérica (BSA), e os tratamentos foram aplicados nas concentrações de 1, 5, 10

e 30 µg/mL. Ao término do tratamento, 250 µL do meio foram removidos de cada poço, e adicionou-se 100 µL do corante Laranja de Acridina (10 µg/mL; Sigma), seguido de incubação em estufa por 15 minutos, protegido da luz. Em seguida, o meio contendo o corante foi descartado, as células foram lavadas com 1 mL de PBS e as imagens capturadas ao microscópio NikonR Eclipse T2000-U, usando filtros de 470 nm excitação e 525 nm de emissão para a análise da cromatina (CR fluorescência verde), e 350 nm de excitação e 615 nm de emissão para a detecção de vesículas ácidas (AVO; fluorescência laranja/vermelha). Para este ensaio, foram utilizados 4 cultivos celulares distintos (N=4).

## 5. DETERMINAÇÃO DE LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA LECTINA DVL

A localização subcelular da lectina DVL conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi padronizada neste estudo e avaliada por microscopia confocal. A lectina de DVL-FITC foi disponibilizada pelo Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol) coordenado pelo Prof. Dr. Benildo Cavada. Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 24 poços previamente tratadas com poly-L-lisina e contendo lamínulas, na densidade de  $5 \times 10^4$  células por poço. Após 24 horas de incubação, o meio DMEM suplementado com soro fetal bovino foi substituído por DMEM contendo 0,2% de BSA, e os tratamentos foram aplicados por diferentes períodos (6 h, 3 h, 1 h e 5 min). Os grupos experimentais incluíram veículo, DvL-FITC (15 µg/mL) e DvL-FITC (15 µg/mL) co-tratadas com o  $\alpha$ -metilmanosídeo (100 mM). Ao término dos tratamentos, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e os núcleos corados com Hoechst (5 µg/mL). As imagens foram obtidas no microscópio confocal LEICA TCS SP5 / DMI 6000 (LAMEB – UFSC). As imagens foram capturadas usando objetiva de 63x/1.4 de imersão em óleo. As amostras foram excitadas usando linhas de laser de 488 nm e 405 nm para FITC e para visualização dos núcleos, respectivamente. Os sinais foram coletados simultaneamente de 500 a 530 nm para FITC e de 400 a 430 nm para Hoechst 33258 (núcleos). Pelo menos três campos por condição, incluindo uma pilha Z por amostra, foram adquiridos para cada experimento. Em seguida, as imagens foram processadas digitalmente: primeiramente, utilizando o ImageJ para o empilhamento de imagens; e subsequentemente, o software Fiji foi empregado para a modelagem tridimensional.

## 6. WESTERN BLOT

A técnica de western blot foi utilizada para análise da expressão de proteínas conforme descrito anteriormente (Leal *et al.*, 2022; Nascimento *et al.*, 2018, 2019). Foram semeadas  $5 \times 10^5$  células por poço em placa de 6 poços, utilizando 2 dos mesmos para cada tratamento. As células foram então incubadas por 24 horas e tratadas com DvL nas concentrações de 10, 30, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Finalizado o tempo de tratamento, com o auxílio de Cell Scraper e SDS 4% Stop Solution (Tris 50 mM, EDTA 2 mM, SDS 4%, pH 6,8), realizou-se a remoção das células dos poços para posterior preparo das amostras. Após retirada de alíquotas do homogeneizado para dosagem de proteínas pelo método de Lowry modificado (Peterson, 1977), foi adicionado 25% de tampão de diluição (40% glicerol, 100 mM de Tris e azul de bromofenol) e 8% de  $\beta$ -mercaptoetanol. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando gel de separação nas concentrações de 16% e 14%, e o gel de entrada na concentração de 4%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 15mA por placa, e tensão máxima de 180V por aproximadamente 2 horas, utilizando tampão superior (glicina 190 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%) e inferior (Tris 50 mM; pH 8,3). Após eletroforese, os géis foram submetidos a eletrotransferência via sistema semi-dry, com corrente calculada de 1,2 mA/cm<sup>2</sup> por 90 minutos. As membranas foram então coradas com solução Ponceau 0,5% em ácido acético 1%. Para imunodeteção, as membranas foram lavadas com água Milli Q, e posteriormente incubadas com “Antigen Pretreatment Solution” (Thermo Scientific, Cat # 46640) por 10 minutos, lavadas com água Milli Q novamente e incubadas por 30 minutos com “Blocking Buffer” (Thermo Scientific; Cat # 37536). Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T (Tween-20 0,1%; Tris 10 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5) e incubadas com o anticorpo específico contra as proteínas de interesse (Tabela 2). Por fim, realizou-se incubação por 30 minutos com anticorpo secundário (Diluído em TBS-T + Albumina 2%), e posterior detecção por quimioluminescência no Fotodocumentador ChemiDoc (Bio RadR), disponível no Laboratório Multiusuário da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMEB), utilizando o reagente “SuperSignal™ West FEMTO Maximum Sensitivity Substrate” (Thermo Scientific; Cat # 34095), conforme orientação do

fabricante. A quantificação dos valores foi realizada utilizando o software Image Lab® (Bio-Rad).

**Tabela 2.** Anticorpos utilizados no imunoblotting

| Anticorpo                        | Massa Molecular da Proteína Alvo                               | Fabricante (código)                 | Diluição |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------|
| Anti-LC3                         | ~18 kDa (LC3-I), ~16 kDa (LC3-II)                              | Cell Signaling (#12741s)            | 1:1000   |
| Anti- $\beta$ -actina            | ~45 kDa                                                        | Santa Cruz biotechnology (sc-47778) | 1:2000   |
| Anti-BiP                         | ~78 kDa                                                        | Cell Signaling (#3813)              | 1:1000   |
| Anticorpo Secundário anti-mouse  | Goat IgG, conjugated secondary antibody anti-mouse peroxidase  | Millipore (ap308p)                  | 1:2500   |
| Anticorpo Secundário anti-rabbit | Goat IgG, conjugated secondary antibody anti-rabbit peroxidase | Millipore (AP132P)                  | 1:2500   |

## 7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados pelo programa Graph Pad Prism versão 8.4.3 (La Jolla, Califórnia, EUA). Os dados com distribuição normal, conforme o teste de Shapiro-Wilk ( $p > 0,05$ ), foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguido por teste pos-hoc de Tukey ou bonferroni. Valores de  $p$  menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DVL ALTERA A MORFOLOGIA E REDUZ A VIABILIDADE DE CÉLULAS C6, DE FORMA DEPENDENTE DE INTERAÇÃO COM GLICANOS

Para avaliar a atividade antitumoral da DvL, células de glioma C6 foram tratadas com a lectina por 6 horas, nas concentrações de 5, 10, 30, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Paralelamente, foi conduzido um protocolo de saturação dos domínios lectínicos (CRD) com  $\alpha$ -metil-manosídeo (100 mM), a fim de bloquear a interação com glicanos alvo. As imagens de microscopia demonstram que a DvL promoveu alterações morfológicas nas células, levando-as de um formato fusiforme e fortemente aderido para uma morfologia mais arredondada e com menor adesão à placa. Quando comparadas aos tratamentos correspondentes com os CRDs inibidos, observa-se que

as células preservaram parcialmente a adesão e a morfologia fusiforme, indicando que o efeito da DvL é dependente da interação com glicanos (Figura 8).

A análise de viabilidade celular através do ensaio de MTT demonstrou uma redução significativa da viabilidade das células C6 em todas as concentrações de DvL testadas, atingindo uma queda de aproximadamente 30% nas doses de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Para comparativo da ação de DvL foi utilizada a lectina ConBr, previamente reconhecida por causar citotoxicidade sobre as células C6 (WOLIN *et al.*, 2021). Entretanto, o tratamento com a lectina ConBr por 6 h não promoveu alterações relevantes na viabilidade, sugerindo que a DvL apresenta uma ação citotóxica mais rápida sobre essas células (Figura 9). Posteriormente, foi realizado o ensaio de MTT com o protocolo de saturação dos CRDs, no qual a análise estatística através de ANOVA de duas vias indicou um bloqueio da citotoxicidade de DvL nas concentrações de 5-50  $\mu\text{g/mL}$ , resultado que reforça a dependência da interação da DvL com glicanos para sua atividade citotóxica (Figura 10).

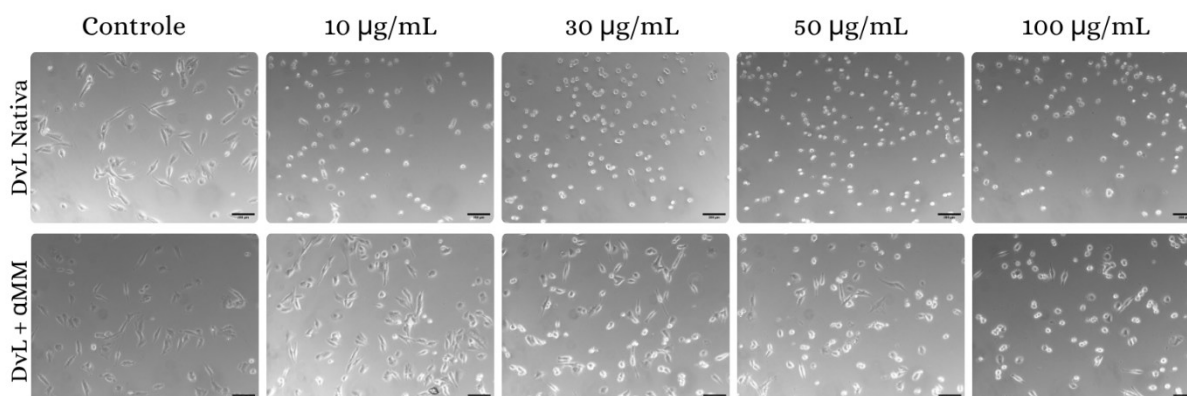


**Figura 8. Análise morfológica de células C6 após 6 h de tratamento com a lectina DvL nativa ou na presença de  $\alpha$ -metil-manosídeo (100 mM), inibidor competitivo dos domínios de reconhecimento de carboidratos (CRDs).** As imagens foram obtidas por microscopia de campo claro, utilizando objetiva de 10x.

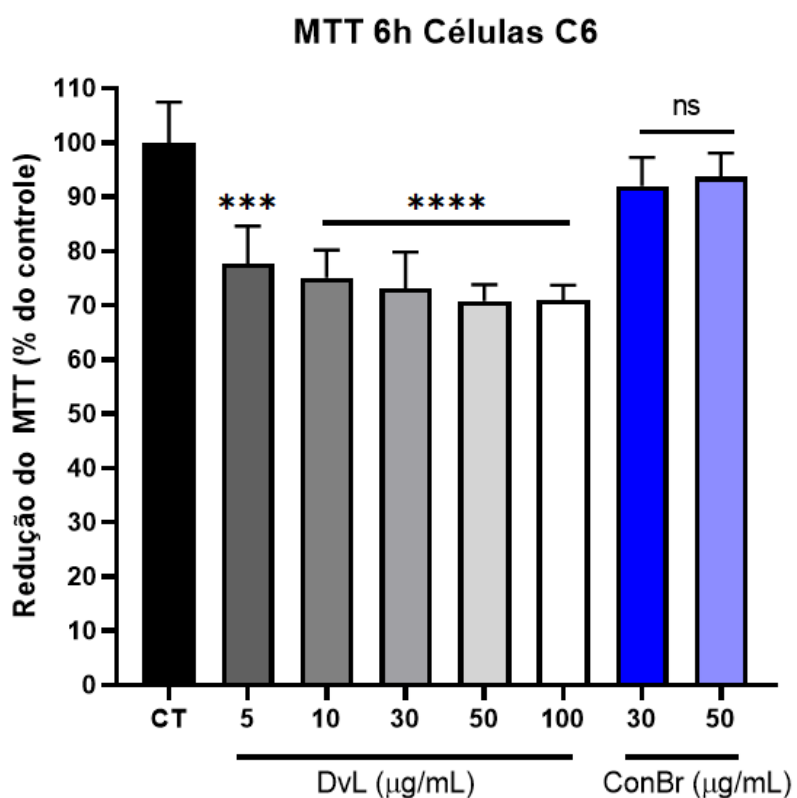


**Figura 9. Análise da viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT.** Células de glioma da linhagem C6 foram tratadas por 6 horas com DvL ou ConBr em diferentes concentrações, ou apenas com o veículo (solução salina de HEPES, controle – CT). Os experimentos (N = 4) foram realizados em quadruplicata, e os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, expressos em relação ao controle. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

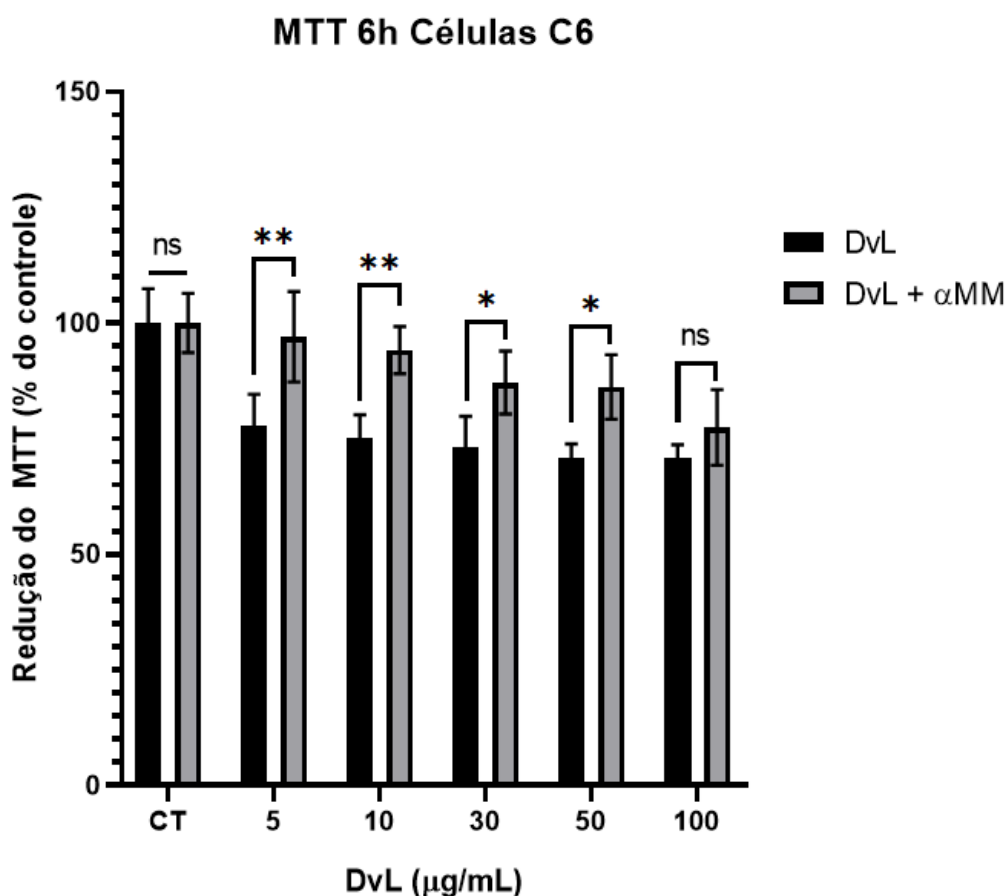


**Figura 10. Avaliação da viabilidade celular por ensaio de MTT após tratamento com a lectina DvL nativa e com a forma inibida por  $\alpha$ -metil-manosídeo (100 mM).** As células foram expostas a diferentes concentrações de DvL (5, 10, 30, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) por 6 h, e a atividade metabólica foi determinada pela redução do MTT. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias, seguida de teste pós-hoc de Bonferroni. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 4$ ); \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ .

## 5.2 TRATAMENTO COM DVL INDUZ AUTOFAGIA EM CÉLULAS DE GLIOMA C6

A fim de investigar a indução de autofagia pelo tratamento com DVL, foram utilizadas duas abordagens complementares: a marcação de vesículas autofágicas, com laranja de acridina, analisadas por microscopia de fluorescência e detecção de LC3I/LC3II por *western blot*.

Para as análises de microscopia, as células foram tratadas com DvL (1 a 30  $\mu\text{g/mL}$ ). A escolha por esta faixa de concentração deveu-se ao fato de que concentrações mais elevadas reduziram a quantidade de células aderidas, dificultando a captura das imagens. Após a aquisição das imagens e análise

qualitativa, a densidade de fluorescência foi normalizada pelo número de células contadas em cada campo, sendo essa razão utilizada para comparação entre os grupos. As análises qualitativas revelam um aumento expressivo na formação de organelas ácidas (em vermelho) em relação ao número de células, e a quantificação confirma esse achado, indicando que o tratamento com DvL 30  $\mu\text{g/mL}$  promove um aumento de aproximadamente sete vezes na marcação em comparação ao controle (Figura 11).

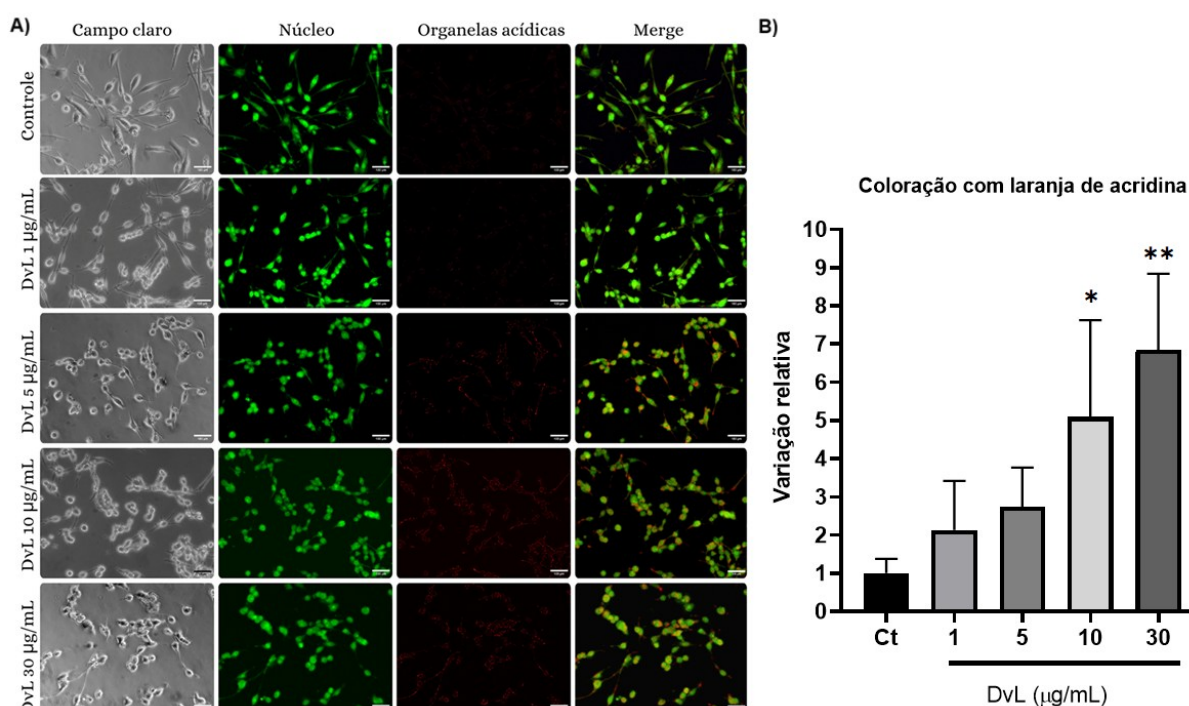


**Figura 11. Avaliação da formação de organelas ácidas pelo ensaio com laranja de acridina.** Células C6 foram tratadas com DvL nas concentrações de 1 - 30  $\mu\text{g/mL}$ , ou apenas com o veículo (solução salina de HEPES, controle – CT). **A)** Representação qualitativa da coloração das células após 6 horas de tratamento. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ . **B)** Análise quantitativa da razão entre a fluorescência de vesículas ácidas e o número de células, expressa em relação ao controle (N=4). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Para confirmar a indução de autofagia, também foi realizado *western blot* utilizando tratamentos com o veículo e DvL nas concentrações de 10 - 100  $\mu\text{g/mL}$ . Observou-se aumento da razão LC3-II/I em resposta ao tratamento com DvL, que foi estatisticamente significativa nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , indicando a formação de autofagossomos e consequente ativação do processo autofágico (Figura 12). Esses achados corroboram com os resultados obtidos no ensaio de laranja de

acridina, reforçando a hipótese de que a DvL induz autofagia de forma dependente da concentração.

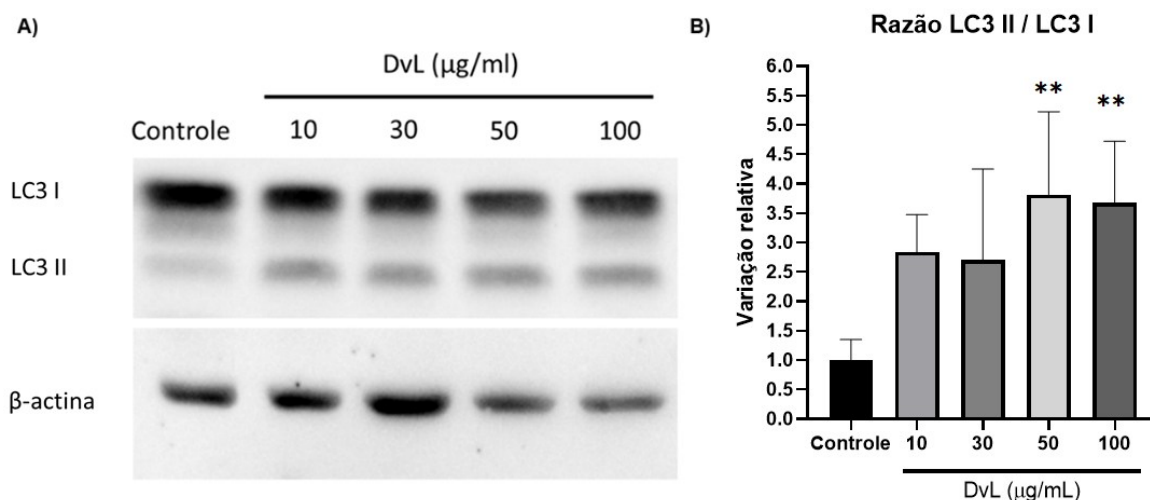


**Figura 12. Análise da razão LC3-II/I por *western blot* após 6 horas de tratamento, para avaliar a indução de autofagia (N=5).** A) A) Imunoblot representativo mostrando as isoformas LC3-I e LC3-II, utilizando β-actina como controle de carga. B) Quantificação da razão LC3-II/LC3-I normalizada à β-actina, expressa como múltiplo do controle (valor do controle = 1). Os dados foram analisados com o software ImageLab e submetidos à ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. \*\* p < 0,01.

### 5.3 O MECANISMO CITOTÓXICO DA DVL É INDEPENDENTE DO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Para investigar a possível contribuição do estresse do retículo endoplasmático (RE) na citotoxicidade induzida pela DvL, as células foram tratadas com DvL (30 µg/mL) na presença ou ausência do 4-PBA (10 mM), um inibidor químico do estresse de RE, aplicando em esquema de pré e co-tratamento. Paralelamente, a DVL, foi administrada em conjunto com o indutor de estresse do RE brefeldina A (100 ng/mL). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT.

Os resultados indicam que a perda de viabilidade celular induzida pela DvL permaneceu inalterada frente à modulação farmacológica do estresse do RE. Coletivamente, esses dados sugerem que a via do estresse do RE não desempenha um papel determinante na citotoxicidade mediada pela lectina DvL nas condições avaliadas (Figura 13).

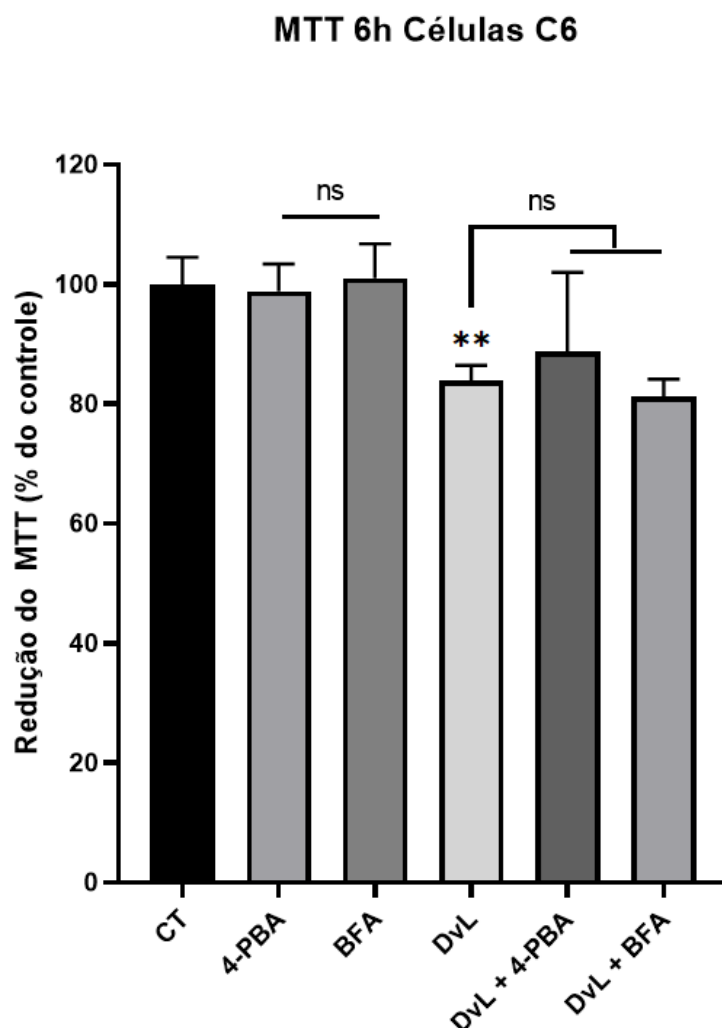


**Figura 13. Avaliação da viabilidade celular por ensaio de MTT após tratamento com a lectina DvL isolada ou em presença de moduladores do estresse do RE.** Para o tratamento com 4-PBA (10 mM), inibidor do estresse de RE, as células foram pré-incubadas por 1 h antes da adição da lectina. A brefeldina A (100 ng/mL), indutora de estresse de RE, foi adicionada concomitantemente ao tratamento com DvL (30 µg/mL). Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA de uma via;  $p < 0,01$ .

Para complementar a análise de uma possível indução de estresse do RE, foi realizada a detecção da chaperona BiP (GRP78) por *western blot*, em diferentes concentrações de DvL (10 - 100 µg/mL). Os resultados não revelaram diferenças estatisticamente significativas, mesmo nas concentrações mais elevadas, corroborando os dados obtidos no ensaio de viabilidade e indicando que a DvL, em um período de incubação de 6h, exerce seu efeito citotóxico por um mecanismo distinto do estresse de RE (Figura 14).

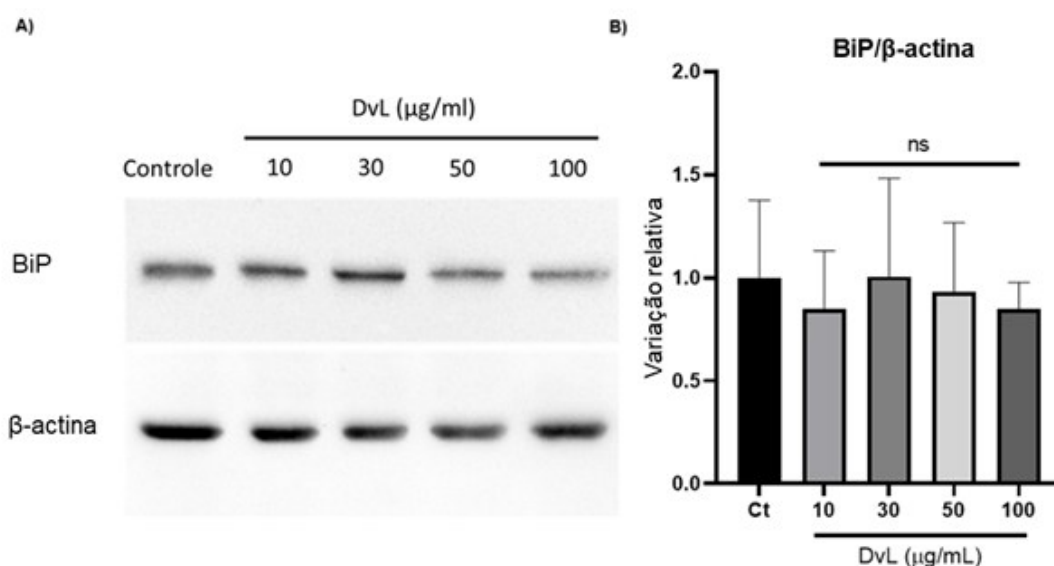


**Figura 14. Avaliação da expressão da chaperona BiP (GRP78) por *western blot* após tratamento com diferentes concentrações de DvL.** As células foram tratadas com 10 - 100 μg/mL de DvL por 6 h, a fim de investigar uma possível indução de estresse do retículo endoplasmático (RE) de forma dose-dependente. A β-actina foi utilizada como controle de carregamento. (A) Membrana representativa do *western blot*. (B) Quantificação da expressão relativa de BiP em relação à β-actina (n = 3). Dados expressos como média ± desvio padrão; ANOVA de uma via.

#### 5.4 A LECTINA PODE SOFRER INTERNALIZAÇÃO, DE FORMA DEPENDENTE DE INTERAÇÃO COM GLICANOS

Para elucidar o mecanismo de ação da DvL foi investigado se sua atividade citotóxica decorre exclusivamente da interação com glicoproteínas da membrana e ativação de cascatas de sinalização, ou se poderia envolver sua internalização via endocitose para atuação no ambiente intracelular.

Para tanto, as células foram incubadas com DvL conjugada com FITC e analisadas por microscopia confocal. Esta técnica permite a visualização em diferentes planos de profundidade (eixo Z), com subsequente empilhamento das imagens e geração de projeções tridimensionais por meio do software ImageJ. A internalização foi avaliada de forma tempo-dependente, em intervalos de 5 minutos, 1, 3 e 6 horas de exposição à lectina.

Adicionalmente, com o intuito de determinar a dependência da interação com glicanos para a internalização, foi realizado um ensaio de bloqueio por saturação, no qual a DvL foi previamente incubada com α-metilmanosídeo (α-MM) 100 mM antes da aplicação sobre as células.

A ocorrência de internalização foi analisada de forma qualitativa, observando nas projeções 3D a posição da lectina no eixo Z, em relação ao núcleo celular. Foi possível observar que, após 6 horas de tratamento, a DvL era internalizada, e sua localização subcelular se dava, em maior parte, próxima ao núcleo (Figura 15).

O empilhamento das imagens no eixo Z também mostrou que a lectina se acumula mais dentro da célula ao longo do tempo, bem como a saturação dos CRDs com  $\alpha$ -MM parece reduzir a entrada da mesma – efeito mais notável em 6 horas de tratamento (Figura 16).

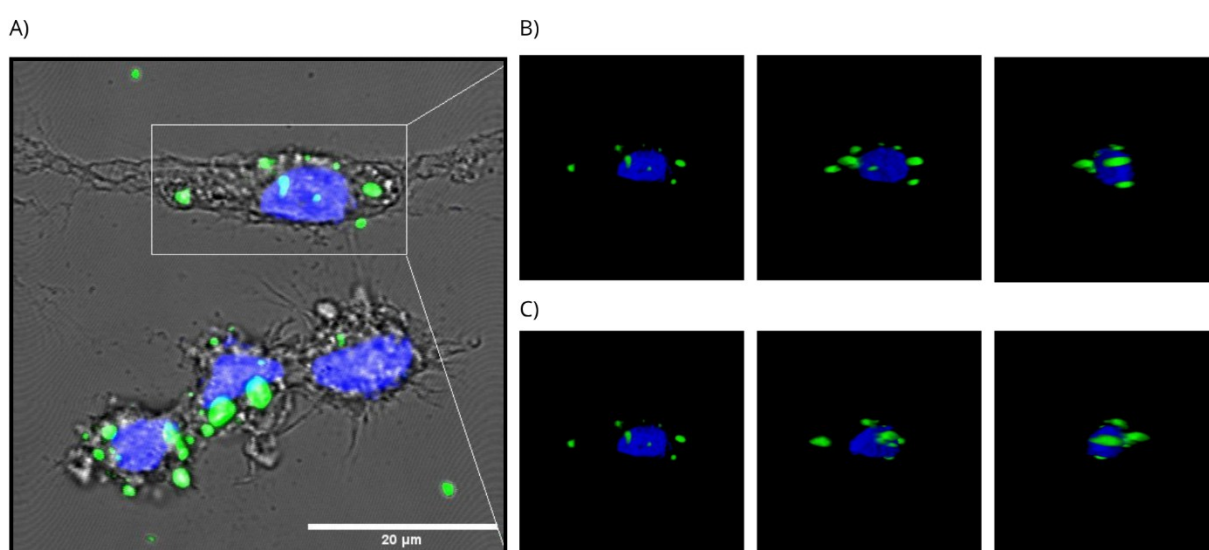


**Figura 15. Visualização tridimensional da sublocalização da lectina DvL após 6 horas de tratamento, na concentração de 15 µg/mL. A)** Imagem sobreposta do campo claro, núcleo (azul) e lectina (verde), destacando a região de interesse utilizada na reconstrução 3D. **B)** Modelagem tridimensional gerada no software Fiji, com rotação do modelo no eixo Z para a direita. **C)** Modelagem tridimensional gerada no software Fiji, com rotação do modelo no eixo Z para a esquerda.

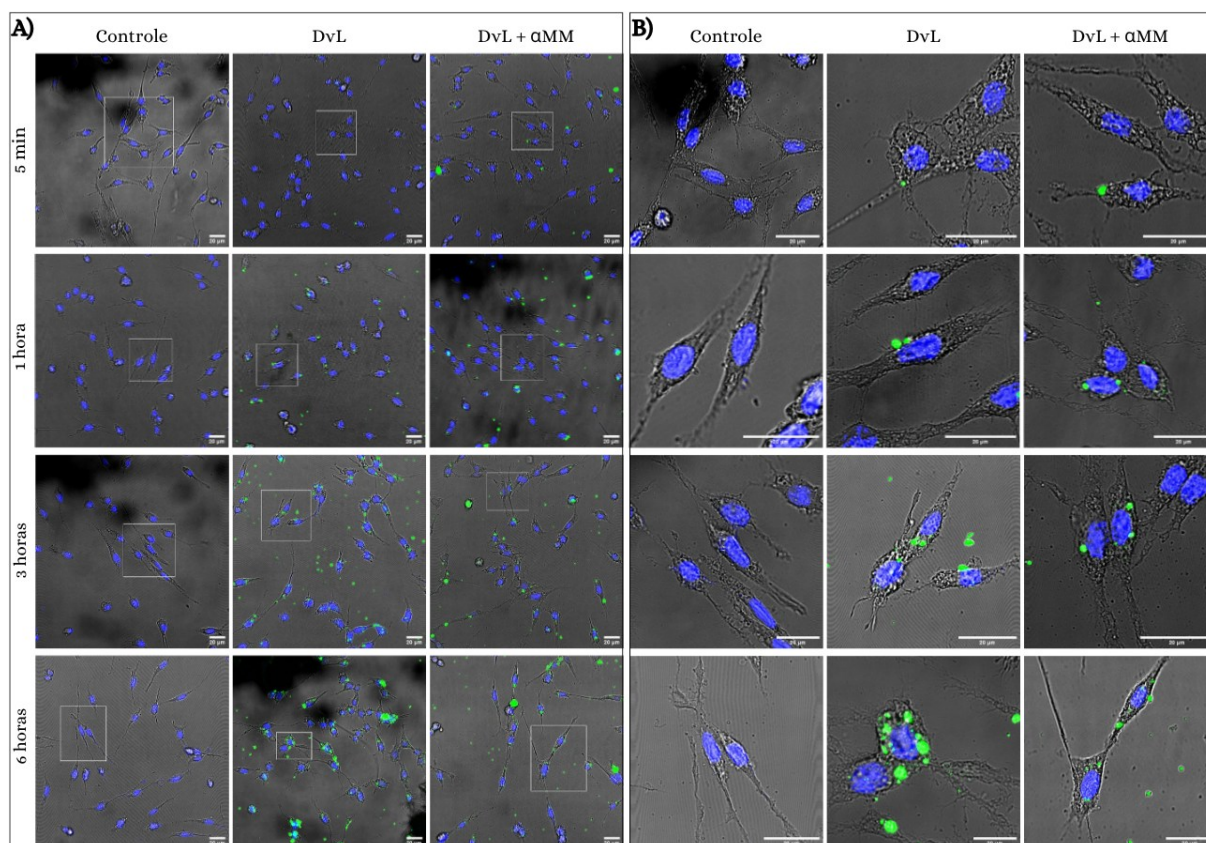


**Figura 16. Internalização da DvL em células C6 ao longo do tempo.** Empilhamento das imagens obtidas por microscopia confocal no eixo Z, de acordo com o tempo de exposição ao tratamento. As imagens apresentam a sobreposição dos canais correspondentes ao campo claro, núcleos (azul) e DvL (verde). A) Imagens capturadas com objetiva de 63x, com as regiões de interesse (ROIs) destacadas por retângulos. B) Captura de imagem com zoom nas ROIs correspondentes do quadro A. A barra de escala representa 20 μm.

## 6 DISCUSSÃO

Estudos anteriores mostraram a atividade anti glioma da DvL, induzindo autofagia e apoptose, reduzindo migração e induzindo disrupção de potencial de membrana mitocondrial em células C6 (NASCIMENTO *et al.*, 2018). Em células U87, foi observado resultados semelhantes, além da modulação de vias de sinalização como Akt, mTOR, ERK, p38 e JNK (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

No presente estudo, buscou-se compreender melhor o mecanismo de ação da lectina em células C6 após períodos curtos de incubação (até 6h), avaliando seus efeitos sobre a viabilidade celular, indução de autofagia, internalização, estresse do retículo endoplasmático (RE) e a possível dependência da interação com glicanos de superfície. A lectina promoveu uma redução significativa da viabilidade celular em

todas as concentrações testadas, causando uma queda de aproximadamente 30% nas doses mais elevadas (50 e 100 µg/mL). Esse efeito precoce sugere que a DvL desencadeia respostas citotóxicas rápidas, possivelmente relacionadas à modulação de vias de sinalização associadas à sobrevivência e ao metabolismo celular, como AKT, ERK e mTORC1, as quais são reguladas pela lectina até mesmo em baixas concentrações. Por outro lado, a ativação das vias de estresse mediadas por p38 e JNK tem sido observada apenas em doses mais elevadas de DvL, indicando que a intensidade da resposta celular pode variar conforme a concentração do tratamento (NASCIMENTO *et al.*, 2019). Em comparação com a lectina ConBr, a DvL apresentou uma cinética de ação mais acelerada, uma vez que, em estudos prévios, a ConBr demonstrou efeito citotóxico significativo apenas após 12 horas de exposição (WOLIN *et al.*, 2021). Esses achados indicam que diferenças estruturais entre as lectinas podem influenciar a rapidez e a intensidade da resposta celular, possivelmente em função de distintas afinidades ou padrões de reconhecimento de glicanos na superfície das células tumorais ou de alvos intracelulares. A fim de determinar se o efeito citotóxico observado após 6 horas de tratamento com a DvL está relacionado à sua capacidade de reconhecer glicanos na superfície das células C6, a atividade da lectina nativa foi comparada à lectina com CRD bloqueado, através da pré-incubação de DvL com o ligante  $\alpha$ -metil-manosídeo ( $\alpha$ MM). A análise do ensaio de MTT revelou que o  $\alpha$ MM foi capaz de reverter significativamente a redução da viabilidade celular promovida pela DvL nas concentrações de 5, 10, 30 e 50 µg/mL, restaurando os valores para níveis próximos aos do controle. Apenas na concentração mais elevada (100 µg/mL) essa reversão não foi significativa, possivelmente em função da alta quantidade de lectina disponível, que pode ter superado a capacidade de inibição competitiva do  $\alpha$ MM. Além disso, a interação entre lectinas e seus ligantes glicanos ocorre por meio de ligações não covalentes, como pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, cuja estabilidade depende da afinidade entre a lectina e o substrato. Assim, em concentrações elevadas, o equilíbrio dessas interações pode tender a favorecer a ligação da lectina aos alvos celulares, reduzindo a eficácia do ligante. Esses resultados indicam que a citotoxicidade induzida pela DvL é possivelmente mediada por interações específicas com glicoconjugados contendo manose na superfície celular, consistentes com a afinidade conhecida dessa lectina por este resíduo. De forma complementar, análises morfológicas mostraram um comportamento semelhante, com a presença do  $\alpha$ MM atenuando as alterações

morfológicas características observadas nas células tratadas apenas com DvL, reforçando o papel central da interação entre lectina e glicano no desencadeamento da resposta citotóxica.

A avaliação dos efeitos da lectina DvL após 6 horas de tratamento confirmou a indução de autofagia em células C6, revelando uma diferença na magnitude dos resultados obtidos pelos diferentes métodos. O ensaio com Laranja de Acridina (AO), que quantifica o acúmulo de organelas vesiculares ácidas (AVOs), incluindo autolisossomos, indicou um aumento significativo nas concentrações de 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$ , refletindo a ativação das etapas tardias de degradação autofágica (THOMÉ *et al.*, 2016). Em contraste, a análise por *Western blot* da razão LC3-II/LC3-I, marcador das fases iniciais de formação de autofagossomos, mostrou um aumento mais discreto, sendo estatisticamente significativo apenas nas concentrações mais elevadas (50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ). Essa divergência é atribuída à natureza dinâmica do processo, uma vez que a proteína LC3-II, incorporada à membrana do autofagossomo, é degradada no autolisossomo durante a conclusão do ciclo autofágico. Assim, o nível de LC3-II detectado por *Western blot* reflete um balanço entre a formação e a degradação de autofagossomos, podendo ser reduzido quando o fluxo autofágico é rápido e eficiente (MIZUSHIMA *et al.*, 2007). Nessa perspectiva, a predominância do sinal observado no ensaio de AO em relação ao aumento de LC3-II indica que a DvL não apenas induziu a formação de autofagossomos, mas também manteve um fluxo autofágico funcional ao longo do período de tratamento. Portanto, a integração dos resultados sugere que a DvL atua como um potente indutor do fluxo autofágico, sendo esse efeito mais claramente evidenciado pela análise das AVOs com Laranja de Acridina (Figura 11).

A análise experimental demonstrou que a lectina DvL exerce um efeito citotóxico significativo em células C6, evidenciado pela redução da viabilidade celular observada no ensaio de MTT. No entanto, essa citotoxicidade não parece estar diretamente associada à indução de estresse no retículo endoplasmático (RE). A ausência de um aumento significativo e dose-dependente nos níveis da proteína BiP/GRP78 - uma chaperona residente do RE e marcador clássico da resposta a proteínas mal dobradas (UPR) - sugere que a DvL não promoveu uma ativação detectável dessa via em um período curto de 6 horas de incubação (Figura 14). Em condições de estresse do RE, a BiP normalmente se dissocia dos três sensores transmembrana (IRE1, PERK e ATF6), desencadeando as cascatas de sinalização

adaptativas da UPR. A falta de indução da BiP, portanto, sugere que a DvL não gera um acúmulo suficiente de proteínas mal conformadas para ativar essa resposta, ou que o período de exposição de 6 horas seja insuficiente para que a ativação ocorra de forma mensurável. De forma consistente, a co-incubação da DvL com moduladores farmacológicos do estresse do RE - o inibidor químico 4-fenilbutirato (4-PBA) e o indutor brefeldina A (BFA) - não alterou significativamente a redução da viabilidade celular induzida pela lectina. Caso o estresse do RE fosse o gatilho primário do efeito citotóxico, a atenuação desse estresse pelo 4-PBA deveria resultar em um resgate parcial da viabilidade, o que não foi observado. Assim, embora a DvL apresente clara atividade citotóxica, os resultados sugerem que essa ação não depende da ativação da UPR. É provável, portanto, que o mecanismo de morte celular envolva vias alternativas, como autofagia, apoptose pela via mitocondrial, ou outros tipos de estresse celular independentes do RE, hipótese coerente com a ausência de marcadores clássicos da resposta adaptativa do estresse de RE.

O estudo dos possíveis mecanismos de ação da lectina DvL sobre células C6 avançou com a observação de sua internalização (Figura 15 e 16). Este achado indica a possibilidade de alvos no meio intracelular que poderiam responder pela citotoxicidade induzida pela lectina DvL. As imagens obtidas por microscopia confocal revelaram que a DvL é incorporada de forma tempo-dependente, com acúmulo progressivo ao longo das 6 h de tratamento, culminando em uma distribuição predominante na região perinuclear. Esse padrão de localização indica que, após a ligação à membrana, a DvL é internalizada e direcionada para o meio intracelular, onde tende a se concentrar próxima ao núcleo. A especificidade do processo de internalização é sugerida pelo ensaio com competidor, no qual o  $\alpha$ -metilmanosídeo ( $\alpha$ MM) reduziu – observado de forma qualitativa - a entrada da lectina. Esse resultado sugere que a captação da DvL ocorre por endocitose possivelmente mediada por receptor, e dependente da interação seletiva com seus domínios de reconhecimento de carboidratos (CRDs). Embora o glicoconjugado de superfície que atua como receptor ainda não tenha sido identificado, a inibição observada pela presença de  $\alpha$ MM sugere sua existência.

Em conjunto, esses resultados sustentam o modelo em que a DvL exerce seu efeito citotóxico de forma rápida, e dependente do CRD, por um mecanismo que pode envolver a internalização da lectina. Este processo, culmina em disfunções intracelulares, incluindo autofagia, e que parece não envolver diretamente o estresse

de RE. Entretanto, baseado em estudos prévios, poderia envolver inibição de Akt, mTORC1 e ERK, bem como ativação de vias de estresse como p38 e JNK, (NASCIMENTO *et al.*, 2018; 2019). Estudos anteriores demonstram que a atividade catalítica da metaloproteinase de matriz MT1-MMP é essencial para os efeitos citotóxicos induzidos pela lectina ConA, e que o silenciamento desse gene reduz significativamente a autofagia mediada pela lectina, sugerindo que a MT1-MMP possa atuar como um possível alvo glicoproteico (PRATT *et al.*, 2012). A similaridade estrutural e de mecanismo de ação entre as duas lectinas nos permite inferir o compartilhamento de um mesmo alvo molecular. Nascimento *et al.* (2018) também sugere que o processo de autofagia desencadeado pela DvL possa não ser a macroautofagia (normalmente referida apenas como autofagia), mas sim mitofagia (autofagia seletiva das mitocôndrias), devido à disrupção no potencial de membrana mitocondrial. Essa hipótese é reforçada por estudos anteriores com a lectina ConA, como o de Pratt *et al.* (2014), que mostra indução da expressão de BNIP3 (também conhecida como NIX), o qual é um conhecido mediador de mitofagia (DIKIC *et al.*, 2018).

Além do mecanismo previamente proposto, as alterações morfológicas observadas – caracterizadas pelo arredondamento celular e pela perda de adesão ao substrato – podem representar a ativação de um mecanismo alternativo de morte celular, compatível com o processo de anoikis, desencadeado pela perda da adesão mediada por integrinas e pela subsequente ativação de caspases (GALLUZZI *et al.*, 2018). As integrinas são glicoproteínas transmembrana que possuem papel fundamental não só na adesão celular, como também na mediação de respostas intracelulares para eventos extracelulares, como por exemplo a indução de autofagia a partir da perda de adesão (VLAHAKIS *et al.*, 2017). Sob condições de desprendimento da matriz extracelular (ECM), a autofagia é recrutada como uma resposta citoprotetora aguda, visando mitigar o estresse metabólico e retardar a cinética da anoikis, o que confere à célula uma janela temporal para a readesão. Esse equilíbrio entre sobrevivência e morte é orquestrado por "interruptores moleculares", como as proteínas Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death) e Bmf (Bcl-2-modifying fator), que ao se dissociarem do citoesqueleto após o descolamento, ativam simultaneamente a via intrínseca da apoptose e liberam a proteína Beclin-1 para iniciar a maquinaria autofágica (VLAHAKIS *et al.*, 2017). Nossos resultados indicaram a perda de adesão celular, com uma marcante ancoragem célula-célula caracterizada

pela formação de agregados multicelulares após o tratamento com DvL (Figura 11). Notavelmente, alguns estudos indicam que essa transição da adesão ao substrato para a agregação intercelular é um fenômeno que pode ser uma estratégia adaptativa para a evasão da anoikis em condições de perda de ancoragem (KANG *et al.*, 2007). Nesse sentido, a sinalização mediada por integrinas e caderinas e a expressão da proteína BNIP3 tem sido sugerida como reguladora de resistência à anoikis em esferoides tumorais (CHEN *et al.*, 2017). Nesse contexto, a superexpressão de BNIP3 em células de GBM U87, observada no estudo de Pratt *et al.* (2014) em resposta à lectina ConA, poderia estar correlacionada com o aumento sustentado do fluxo autofágico e com a consolidação de agregados celulares viáveis. Apesar dessas possibilidades devemos salientar que nosso estudo não caracterizou a indução de anoikis, como mecanismo de morte celular, em resposta a lectina. Além disso, não foi avaliado o papel da autofagia na morte celular ou como um eventual mecanismo de proteção em resposta à DvL. Dessa forma, será importante realizar experimentos futuros para determinar essas possibilidades.

As perspectivas futuras deste trabalho incluem a identificação do receptor glicoproteico específico responsável pela ligação e internalização da DvL, bem como a validação experimental do envolvimento da MT1-MMP e da BNIP3 nas vias de sinalização de sobrevivência observadas. Será igualmente essencial investigar se o fluxo autofágico detectado corresponde à ativação de mitofagia, correlacionando a disrupção do potencial mitocondrial com a expressão de marcadores seletivos, além de quantificar os níveis de ErbB4 e de caderinas nos agregados celulares, a fim de confirmar os mecanismos citotóxicos e de resistência propostos anteriormente. Ademais, a caracterização de potenciais alvos intracelulares da DvL e a elucidação de se sua ação citotóxica ocorre predominantemente de forma extracelular, intracelular ou de maneira concomitante constituem etapas críticas para a compreensão completa de seu mecanismo de ação. Por fim, ensaios de co-tratamento empregando inibidores farmacológicos das principais vias de escape – como bloqueadores da autofagia ou do eixo PI3K/Akt – poderão determinar se a interrupção dessas defesas adaptativas é capaz de romper o patamar residual de viabilidade, sensibilizando as células C6 ao tratamento e consolidando a DvL como uma ferramenta promissora em estratégias terapêuticas combinadas contra gliomas.

## 7 CONCLUSÃO

No presente estudo, avaliou-se o potencial citotóxico da lectina DvL em células C6 após 6 horas de tratamento, bem como os possíveis mecanismos subjacentes à sua ação (Figura 17). Os resultados demonstraram que a DvL reduz a viabilidade celular e induz autofagia, aparentemente de forma independente do estresse do retículo endoplasmático (RE) e dependente de interações com glicanos. Além disso, foi confirmada a internalização da lectina, embora sejam necessários estudos adicionais para identificar seus alvos moleculares e as vias de sinalização envolvidas em seus efeitos celulares.

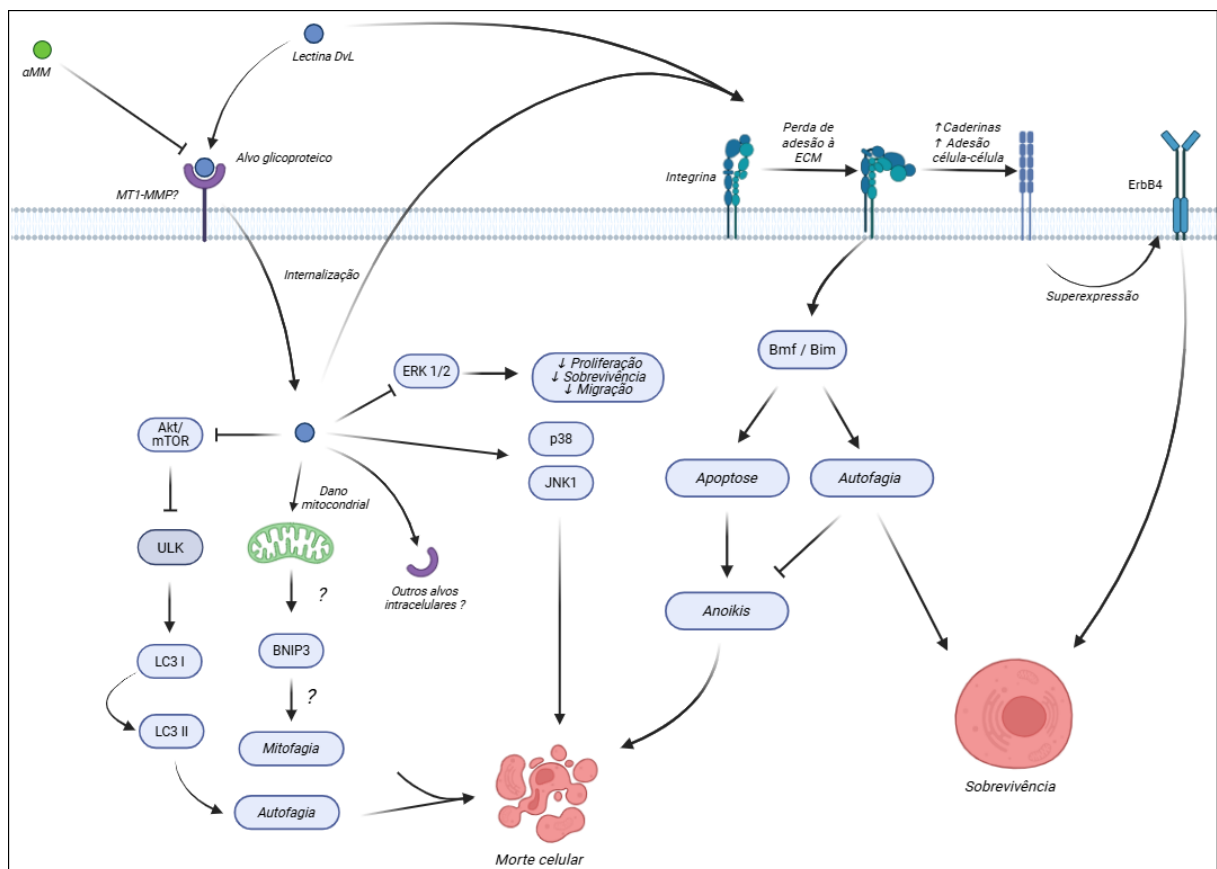


**Figura 17. Modelo esquemático do possível mecanismo de ação da lectina Dioclea violacea (DvL).** A DvL inicia sua atividade por meio da interação específica com um alvo glicoproteico na superfície celular, possivelmente a metaloproteinase de membrana tipo 1 (MT1-MMP), também sugerida para lectina ConA; essa interação pode ser inibida pelo  $\alpha$ -metil-manosídeo ( $\alpha$ MM). Após o reconhecimento de glicanos, a lectina é rapidamente internalizada e passa a modular diversas vias de sinalização intracelulares. A DvL inibe as vias Akt/mTOR e ERK1/2, normalmente associadas à proliferação, sobrevivência e migração celular, enquanto ativa vias de estresse celular mediadas por p38 e JNK1. A lectina também induz disfunção mitocondrial, incluindo perda do potencial de membrana,

o que pode favorecer a ativação de mediadores pró-mitofágicos como BNIP3, conforme sugerido em estudos com outras lectinas, culminando potencialmente em mitofagia. A inibição de Akt/mTOR, por sua vez, favorece a ativação de ULK e a conversão de LC3-I em LC3-II, promovendo o fluxo autofágico. A integração entre sinais de estresse celular, possível mitofagia, inibição de vias de sobrevivência e ativação de autofagia pode contribuir para o desfecho citotóxico, envolvendo apoptose e/ou outras formas de morte celular regulada. O diagrama também ilustra a existência de alvos intracelulares adicionais ainda não identificados. Adicionalmente, sugere-se que DvL pode promover a perda de adesão à matriz extracelular (ECM), provavelmente mediada por integrinas. Neste caso, poderíamos hipotetizar como consequência a dissociação de Bim e Bmf do citoesqueleto, ativando anoikis (morte celular), bem como a maquinaria autofágica (que poderia representar um mecanismo de proteção). Em paralelo, sugere-se outros possíveis mecanismos compensatórios para sobrevivência celular incluindo aumento na expressão de caderinas, adesão célula-célula e aumento da expressão do receptor ErbB4.

Abreviaturas:  **$\alpha$ MM**: alfa-metil-manosídeo; **MT1-MMP**: metaloproteinase de membrana tipo 1; **DvL**: lectina de *Dioclea violacea*; **Akt**: proteína cinase B **mTOR**: alvo mecanístico da rapamicina; **ERK 1/2**: cinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2; **p38**: proteína cinase ativada por mitógenos p38; **JNK1**: cinase c-Jun N-terminal 1; **BNIP3**: proteína 3 de interação com Bcl-2/adenovírus E1B de 19 kDa; **ULK**: cinase ativadora de autofagia semelhante a Unc-51; **LC3**: proteína 1 de cadeia leve 3 associada a microtúbulos; **Bmf**: fator modificador de Bcl-2; **Bim**: mediador da morte celular que interage com Bcl-2; **ECM**: matriz extracelular; **ErbB4**: homólogo 4 do oncogene viral da leucemia eritroblástica; **PI3K**: fosfoinositídeo 3-cinase. Criado com BioRender.com

## REFERÊNCIAS

BAI, Peiying *et al.* The dual role of DNA repair protein MGMT in cancer prevention and treatment. **Dna Repair**, [S.L.], v. 123, p. 103449, mar. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2023.103449>.

BACKHOVENS, H. *et al.* Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein in Rat C6 Glioma Relates to Vimentin and Is Independent of Cell-Cell Contact. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 49, n. 2, p. 348-354, ago. 1987. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1987.tb02872.x>.

BELTZIG, Lea *et al.* Senescence Is the Main Trait Induced by Temozolomide in Glioblastoma Cells. **Cancers**, [S.L.], v. 14, n. 9, p. 2233, 29 abr. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers14092233>.

BENDA, Philippe *et al.* Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science**, v. 161, n. 3839, p. 370-371, 1968.

BHUTIA, Sujit K. *et al.* Plant lectins in cancer therapeutics: targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. *Pharmacological Research*, [S.L.], v. 144, p. 8-18, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2019.04.001>.

BONDY, Melissa L. *et al.* Brain tumor epidemiology: consensus from the brain tumor epidemiology consortium. **Cancer**, [S.L.], v. 113, n. 7, p. 1953-1968, 1 out. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.23741>

CARNEIRO, Benedito A. *et al.* Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S.L.], v. 17, n. 7, p. 395-417, 23 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>.

CAVADA, B.S. *et al.* Canavalia bonariensis lectin: molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 106, p. 369-378, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.023>.

CAVADA, Benildo Sousa *et al.* Crystallographic Structure and Antiglioma Potential of Centrolobium microchaete Seed Lectin. **Acs Omega**, [S.L.], v. 10, n. 5, p.

4686-4698, 27 jan. 2025. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.4c09145>.

CAVADA, B.S. *et al.* One century of ConA and 40 years of ConBr research: a structural review. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 134, p. 901-911, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.100>.

CAVADA, B.S. *et al.* Recent advances in the use of legume lectins for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Biochimie*, [S.L.], v. 208, p. 100-116, maio 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2022.12.015>.

CONTESSA, Joseph N. *et al.* Inhibition of N-Linked Glycosylation Disrupts Receptor Tyrosine Kinase Signaling in Tumor Cells. **Cancer Research**, [S.L.], v. 68, n. 10, p. 3803-3809, 15 maio 2008. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-6389>.

DEMARIA, Marco *et al.* Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. **Cancer Discovery**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 165-176, 1 fev. 2017. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-16-0241>.

DIRKSE, Anne *et al.* Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. **Nature Communications**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-1, 16 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-09853-z>.

CHAGANTI, Lalith K. *et al.* An efficient method for FITC labelling of proteins using tandem affinity purification. *Bioscience Reports*, [S.L.], v. 38, n. 6, p. 1-1, 11 dez. 2018. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bsr20181764>.

CHANG, Chih-Peng *et al.* Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. **Hepatology**, [S.L.], v. 45, n. 2, p. 286-296, fev. 2007. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1002/hep.21509>.

CHEN, James L. *et al.* Autophagy Induction Results in Enhanced Anoikis Resistance in Models of Peritoneal Disease. **Molecular Cancer Research**, [S.L.], v.

15, n. 1, p. 26-34, 1 jan. 2017. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-16-0200-t>.

CHEN, XI; CUBILLOS-RUIZ, Juan R.. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nature Reviews Cancer*, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 71-88, 19 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-020-00312-2>.

DIKIC, Ivan *et al.* Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 349-364, 4 abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>.

ECKEL-PASSOW, Jeanette E. *et al.* Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *New England Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 372, n. 26, p. 2499-2508, 25 jun. 2015. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1407279>.

EICH, Marcus *et al.* Contribution of ATM and ATR to the Resistance of Glioblastoma and Malignant Melanoma Cells to the Methylating Anticancer Drug Temozolomide. *Molecular Cancer Therapeutics*, [S.L.], v. 12, n. 11, p. 2529-2540, 1 nov. 2013. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.mct-13-0136>.

FAHIE, Kamau; ZACHARA, Natasha E.. Molecular Functions of Glycoconjugates in Autophagy. *Journal Of Molecular Biology*, [S.L.], v. 428, n. 16, p. 3305-3324, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.011>.

FAHRER, J. *et al.* O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the defense against N-nitroso compounds and colorectal cancer. *Carcinogenesis*, [S.L.], v. 34, n. 11, p. 2435-2442, 8 ago. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgt275>.

FENG, Xiao *et al.* Dying glioma cells establish a proangiogenic microenvironment through a caspase 3 dependent mechanism. *Cancer Letters*, [S.L.], v. 385, p. 12-20, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.10.042>. FURUKAWA J, *et al.* Comprehensive Glycomics of a Multistep Human Brain Tumor Model Reveals Specific Glycosylation Patterns Related to Malignancy. *PLoS One*. 10(7):e0128300, 2015.

GALLUZZI, L *et al.* Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the nccd 2015. **Cell Death & Differentiation**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 58-73, 19 set. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2014.137>.

GALLUZZI, Lorenzo *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. **Cell Death & Differentiation**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 486-541, 23 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.

GAO, Yin; LUAN, Xue; MELAMED, Jacob; BROCKHAUSEN, Inka. Role of Glycans on Key Cell Surface Receptors That Regulate Cell Proliferation and Cell Death. *Cells*, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 1252, 19 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells10051252>.

GAUTAM, Ajay Kumar; SHARMA, Divakar; SHARMA, Juhi; SAINI, Khem Chand. Legume lectins: potential use as a diagnostics and therapeutics against the cancer. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 142, p. 474-483, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.119>.

GERSON, Stanton L. *et al.* MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 296-307, abr. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1319>.

GIAKOUMETTIS, D.; KRITIS, A.; FOROGLOU, N. C6 cell line: the gold standard in glioma research. **Hippokratia**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 105-112, jul./set. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31641331/>. Acesso em: 23 out. 2025.

Grobben B, De Deyn PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res*. 2002 Dec;310(3):257-70. doi: 10.1007/s00441-002-0651-7. Epub 2002 Nov 6. PMID: 12457224.

GÓMEZ-VIRGILIO, Laura *et al.* Autophagy: a key regulator of homeostasis and disease. **Cells**, [S.L.], v. 11, n. 15, p. 2262, 22 jul. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells11152262>.

GROSCHÉ, Victória Riquena *et al.* Mannose-Binding Lectins as Potent Antivirals against SARS-CoV-2. **Viruses**, [S.L.], v. 15, n. 9, p. 1886, 6 set. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v15091886>.

HETZ, Claudio; ZHANG, Kezhong; KAUFMAN, Randal J.. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [S.L.], v. 21, n. 8, p. 421-438, 26 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>.

HORBINSKI, Craig *et al.* Clinical implications of the 2021 edition of the WHO classification of central nervous system tumours. **Nature Reviews Neurology**, [S.L.], v. 18, n. 9, p. 515-529, 21 jun. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-022-00679-w>.

JACOB, Francis *et al.* Transition of Mesenchymal and Epithelial Cancer Cells Depends on  $\alpha$ 1-4 Galactosyltransferase-Mediated Glycosphingolipids. **Cancer Research**, [S.L.], v. 78, n. 11, p. 2952-2965, 31 maio 2018. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-17-2223>.

JOHNSON, Amanda L. *et al.* Exploring glioblastoma stem cell heterogeneity: immune microenvironment modulation and therapeutic opportunities. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-1, 21 set. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2022.995498>.

KAINA, Bernd *et al.* Temozolomide, Procarbazine and Nitrosoureas in the Therapy of Malignant Gliomas: update of mechanisms, drug resistance and therapeutic implications. **Journal Of Clinical Medicine**, [S.L.], v. 12, n. 23, p. 7442, 30 nov. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jcm12237442>.

KANDERI, T.; MUNAKOMI, S.; GUPTA, V. *Glioblastoma Multiforme*. [S. l.]: StatPearls Publishing, 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558954/>. Acesso em: 24 jul. 2025

KANG, Hyung-Gyoo *et al.* E-Cadherin Cell-Cell Adhesion in Ewing Tumor Cells Mediates Suppression of Anoikis through Activation of the ErbB4 Tyrosine Kinase. **Cancer Research**, [S.L.], v. 67, n. 7, p. 3094-3105, 1 abr. 2007. American

Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-3259>.

Leal RB *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*, [S.L.], v. 114, p. 64-76, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.080>.

Leal RB *et al.* Structural Prediction and Characterization of *Canavalia grandiflora* (ConGF) Lectin Complexed with MMP1: unveiling the antiglioma potential of legume lectins. *Molecules*, [S.L.], v. 27, n. 20, p. 7089, 20 out. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27207089>.

LEAL, Rodrigo Bainy *et al.* The Antiglioma Potential of Plant Lectins: molecular targets, mechanisms, and future directions. *Neuroglia*, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 5, 2 fev. 2025. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/neuroglia6010005>.

LEVY, Jean M. Mulcahy; THORBURN, Andrew. Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients. *Cell Death & Differentiation*, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 843-857, 13 dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-019-0474-7>.

LIN, Chien-Ju *et al.* Inhibition of Mitochondria- and Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagy Augments Temozolomide-Induced Apoptosis in Glioma Cells. *Plos One*, [S.L.], v. 7, n. 6, p. 1-1, 22 jun. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0038706>.

MAZALOVSKA, Milena; KOUOKAM, J. Calvin. Plant-Derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools. *Biomed Research International*, [S.L.], v. 2020, p. 1-13, 15 maio 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/1631394>.

MEREITER S *et al.* Glycosylation in the Era of Cancer-Targeted Therapy: where are we heading?. *Cancer Cell*, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 6-16, jul. 2019. Elsevier BV.

MIZUSHIMA, Noboru *et al.* How to Interpret LC3 Immunoblotting. **Autophagy**, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 542-545, 26 nov. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.4600>.

MOSMANN, Tim *et al.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, [S.L.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez. 1983. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

MUSTAFA, Mohd *et al.* Apoptosis: a comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications. **Cells**, [S.L.], v. 13, n. 22, p. 1838-1838, 6 nov. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells13221838>.

NASCIMENTO APM *et al.* Anti-glioma properties of DVL, a lectin purified from *Dioclea violacea*. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 120, p. 566-577, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.106>.

NASCIMENTO APM *et al.* Lectin from *Dioclea violacea* induces autophagy in U87 glioma cells. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 134, p. 660-672, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.203>.

NASCIMENTO KS *et al.* Structural analysis of *Dioclea lasiocarpa* lectin: a c6 cells apoptosis-inducing protein. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, [S.L.], v. 92, p. 79-89, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2017.09.014>.

OHTSUBO, Kazuaki *et al.* Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. **Cell**, [S.L.], v. 126, n. 5, p. 855-867, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.019>.

OSLOWSKI, Christine M.; URANO, Fumihiko. Measuring ER Stress and the Unfolded Protein Response Using Mammalian Tissue Culture System. *The Unfolded Protein Response And Cellular Stress, Part B*, [S.L.], p. 71-92, 2011. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-385114-7.00004-0>.

OSTERNE VJS *et al.* Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. *International Journal Of*

Biological Macromolecules, [S.L.], v. 94, p. 271-282, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.020>.

PACE, Angelica *et al.* "Glycan-Lectin Interactions as Novel Immunosuppression Drivers in Glioblastoma." International journal of molecular sciences vol. 23,11 6312. 5 Jun. 2022, doi:10.3390/ijms23116312

PEARSON, Amanda J.; GALLAGHER, Elyssia S.. Overview of Characterizing Cancer Glycans with Lectin-Based Analytical Methods. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 389-408, 2019. Springer New York. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-9027-6\\_20](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-9027-6_20).

PETERSON, Gary L. *et al.* A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 83, n. 2, p. 346-356, dez. 1977. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4).

PRASAD M K, MOHANDAS S, RAMKUMAR KM. Role of ER stress inhibitors in the management of diabetes. European Journal Of Pharmacology, [S.L.], v. 922, p. 174893, maio 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174893>.

PRATT, J. *et al.* Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. **Glycobiology**, [S.L.], v. 22, n. 9, p. 1245-1255, 12 jun. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cws093>.

PRATT, Jonathan *et al.* Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAK2/STAT3 and MT1-MMP signaling interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells. **Cellular Signalling**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 917-924, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.01.012>.

PROULX-BONNEAU, Sébastien; PRATT, Jonathan; ANNABI, Borhane. A role for MT1-MMP as a cell death sensor/effector through the regulation of endoplasmic reticulum stress in U87 glioblastoma cells. Journal Of Neuro-Oncology, [S.L.], v. 104, n. 1, p. 33-43, 19 nov. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11060-010-0468-2>.

READ, Adam *et al.* The Unfolded Protein Response: an overview. **Biology**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 384, 29 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biology10050384>.

REIFENBERGER, Guido; WIRSCHING, Hans-Georg; KNOBBE-THOMSEN, Christiane B.; WELLER, Michael. Advances in the molecular genetics of gliomas — implications for classification and therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, [S.L.], v. 14, n. 7, p. 434-452, 29 dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.204>.

SCHEURER, Michael E. *et al.* Effects of antihistamine and anti-inflammatory medication use on risk of specific glioma histologies. **International Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 129, n. 9, p. 2290-2296, 4 abr. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.25883>.

SHARMA, Pratibha *et al.* Tumor microenvironment in glioblastoma: current and emerging concepts. **Neuro-Oncology Advances**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-1, 1 jan. 2023. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/noajnl/vdad009>.

SÁNCHEZ-OSUNA, María *et al.* An intrinsic DFF40/CAD endonuclease deficiency impairs oligonucleosomal DNA hydrolysis during caspase-dependent cell death: a common trait in human glioblastoma cells. **Neuro-Oncology**, [S.L.], v. 18, n. 7, p. 950-961, 10 jan. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/nov315>.

SHI, Pengfei *et al.* Endoplasmic reticulum stress-induced cell death as a potential mechanism for targeted therapy in glioblastoma (Review). *International Journal Of Oncology*, [S.L.], v. 59, n. 2, p. 59-60, 6 jul. 2021. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2021.5240>.

THOMÉ, Marcos P. *et al.* Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal Of Cell Science**, [S.L.], v. 129, n. 24, p. 4622-4632, 15 dez. 2016. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.195057>.

VEILLON, Lucas *et al.* Glycosylation Changes in Brain Cancer. *Acs Chemical Neuroscience*, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 51-72, 7 nov. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acchemneuro.7b00271>.

VENKATARAMANI, Varun *et al.* Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression. **Nature**, [S.L.], v. 573, n. 7775, p. 532-538, 18 set. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1564-x>.

VITALE, Ilio *et al.* Apoptotic cell death in disease—Current understanding of the NCCD 2023. **Cell Death & Differentiation**, [S.L.], v. 30, n. 5, p. 1097-1154, 26 abr. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-023-01153-w>.

WELLER, Michael *et al.* Glioma. *Nature Reviews Disease Primers*, [S.L.], v. 1, n. 1, 16 jul. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2015.17>.

WIRSCHING, Hans-Georg *et al.* Glioblastoma. *Handbook Of Clinical Neurology*, [S.L.], p. 381-397, 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-802997-8.00023-2>.

WOLIN, Ingrid A.V. *et al.* ConBr lectin modulates MAPKs and Akt pathways and triggers autophagic glioma cell death by a mechanism dependent upon caspase-8 activation. *Biochimie*, [S.L.], v. 180, p. 186-204, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2020.11.003>.

XI, Hongyan *et al.* The role of interaction between autophagy and apoptosis in tumorigenesis (Review). **Oncology Reports**, [S.L.], v. 48, n. 6, p. 1-1, 11 out. 2022. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2022.8423>.

YALAMARTY, Satya Siva Kishan *et al.* Mechanisms of Resistance and Current Treatment Options for Glioblastoma Multiforme (GBM). **Cancers**, [S.L.], v. 15, n. 7, p. 2116, 1 abr. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers15072116>.

YOOL, Andrea J. *et al.* Molecular Targets for Combined Therapeutic Strategies to Limit Glioblastoma Cell Migration and Invasion. *Frontiers In*

Pharmacology, [S.L.], v. 11, 27 mar. 2020. Frontiers Media SA.  
<http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2020.0035>