

**FRUTALINA, lectina α -D galactose ligante de *Artocarpus incisa* L.
Um estudo com câncer de mama**

Márcia Valéria Pitombeira Ferreira

Fortaleza - Ceará
2001

Frutalina, lectina α -D-galactose ligante de *Artocarpus incisa* L. Um estudo com c ancer de mama

Márcia Valéria Pitombeira Ferreira

Universidade Federal do Ceará
Fortaleza, 2001

Frutalina, lectina α -D-galactose ligante de *Artocarpus incisa* L. Um estudo com c ancer de mama

Márcia Valéria Pitombeira Ferreira

Tese submetida   Coordena o do Curso de p s-gradua o em Bioquímica, como requisito parcial, para obten o do grau de Doutor em Bioquímica

Universidade Federal do Ceará
Fortaleza – 2001

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- F442f Ferreira, Márcia Valéria Pitombeira.
Frutalina, lectina α - D – galactose ligante de *Artocarpus incisa* L.: um estudo com câncer de mama / Márcia Valéria Pitombeira Ferreira. – 2001.
99 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2001.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira.
1. Neoplasias mamarias. 2. Lectina. 3. Frutalina. 4. Glicoconjugados. 5. Fruta pão. I. Título.

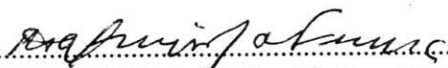
Esta tese foi apresentada, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Universidade e na Biblioteca da Faculdade de Medicina


Márcia Valéria Pitombeira Ferreira

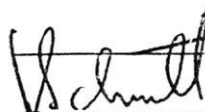
Tese aprovada em: 20/12/ 2001



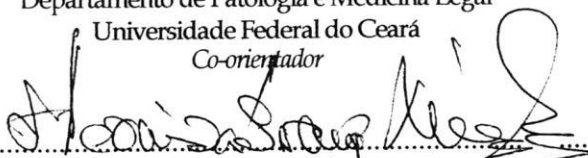
Dr. Renato Azevedo Moreira
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientador



Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira
Departamento de Patologia e Medicina Legal
Universidade Federal do Ceará
Co-orientador



Dr. Fernando Carlos Schmitt
IPATMUP
Universidade do Porto - Portugal
Co-orientador



Dr. Talapala Govindaswamy Naidu
Departamento de Patologia e Medicina Legal
Universidade Federal do Ceará



Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

A Alberto Flávio, Ester e Levi,
com amor.

Agradecimentos

- A DEUS, pela sua infinita bondade.
- Ao PROFESSOR DR. RENATO DE AZEVEDO MOREIRA, pela orientação, incentivo e por acreditar na minha capacidade de trabalho.
- Ao PROFESSOR DR. FRANCISCO VALDECI DE ALMEIDA FERREIRA, pela co-orientação deste trabalho, e por facilitar a utilização do laboratório de patologia do Instituto do Câncer do Ceará.
- Ao PROFESSOR DR. FERNANDO CARLOS SCHIMITT, pela co-orientação desta tese e confiança na minha capacidade de trabalho.
- Ao PROFESSOR DR. TALAPALA GOVINDASWAMY NAIDU pela valiosa contribuição na discussão sobre o anticorpo anti-frutalina.
- À PROFESSORA ANA LÚCIA PONTE FREITAS pelas sugestões e por aceitar participar da banca examinadora.
- À ANA CRISTINA DE OLIVEIRA MOREIRA, por ceder a lectina de *Artocarpus incisa* (frutalina) por ela caracterizada.
- A todos os professores do Departamento de Bioquímica pela dedicação e esforço às disciplinas ministradas.
- À PROFESSORA DRA. SILVIA HELENA BAREM RABENHORST do Departamento de Patologia e Medicina Legal, quem primeiro me apresentou ao estudo das lectinas como marcadores celulares.
- A todos os professores e colegas do Departamento de Patologia e Medicina Legal pelo incentivo e pela substituição em muitas das minhas tarefas.
- Aos residentes do Departamento de Patologia pela compreensão das minhas ausências em um momento tão importante para sua formação profissional.

- À SUSANA e CRISTINA do laboratório de Imunohistoquímica do Instituto do Câncer do Ceará pela grande competência técnica.
- À RENATA e LISIANA, secretárias do laboratório de Patologia do Instituto do Câncer do Ceará, pela grande ajuda na obtenção de dados clínicos utilizados neste trabalho.
- Ao JÚNIOR e a ROSE, que prontamente, procuravam nos arquivos, os blocos e lâminas para seleção dos casos avaliados neste trabalho.
- À MARGARETE, histotécnica do laboratório de patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina por fazer os cortes histológicos.
- A todos os colegas da pós-graduação: ANDRÉ, CRISTINA, DANIELE, FÁBIA, LUIZIETE, MÁRCIA RÚBIA, RAQUEL, RENATA, RICARDO, ROGILDO e SÔNIA que muito me ajudaram nas dúvidas e dificuldades em bioquímica.
- A todos os estudantes bolsistas, particularmente à JACIRA, sempre prestativa.
- Em especial, ao MARCUS MILHOME, atualmente médico, pelo trabalho criterioso, assíduo, valioso e fundamental para o desenvolvimento prático deste trabalho.
- À minha família pela compreensão das horas ausentes, principalmente ao ALBERTO FLÁVIO, ESTER, LEVI, minha mãe, pai e irmãos.
- A todos aqueles que direta e indiretamente, colaboraram na realização desta tese.
- A autora expressa ainda, reconhecimento às seguintes Instituições:
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que concedeu bolsa de iniciação ao estudante Marcus Míhlome.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES), através de convênios firmados com o curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências e Departamento de patologia da Universidade Federal do Ceará.
- À Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa do Estado do Ceará (FUNCAP), através de convênios com o Laboratório de Lectinas (LABLEC) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará.

- À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), através de convênios firmados com o Laboratório de Lectinas (LABLEC) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.
- Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará onde grande parte deste trabalho foi desenvolvido.
- Ao Laboratório de patologia do Instituto do Câncer do Ceará onde as reações de imunohistoquímicas foram realizadas.
- Ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará que forneceu reagentes para as reações de imunohistoquímica obtidos através de projeto integrado de oncologia financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- Ao Instituto de Patologia e Biologia Molecular da Universidade do Porto-Portugal, na pessoa do PROF. DR. FERNANDO CARLOS SCHMITT.

“Se o Senhor não edificar a casa, em vão trabalham os que a edificam.” (*Salmo 127:1a*)

Ist einer Welt Besitz für dich zerronnen,
Sei nicht in Leid darüber, es ist nichts;
Und has du einer Welt Besitz gewonnen,
Sei nicht erfreut darüber, es ist nichts.
Vorüber geh'n die Schmerzen and die Wonnen,
Geh'an der Welt vorüber, es ist nichts.

Anwari Soheili

(Se se desffez para ti a posse de um mundo,
não te lamentes, que nada é;
se conquistastes a posse de um mundo,
não te regozijes, que nada é.
Passam as dores e passam as alegrias,
Passa tu ao largo do mundo, que nada é).

Sumário

Abreviaturas e definições	xiii
Lista de figuras	xvi
Lista de tabelas	xvii
Resumo.....	xiiiiv
Abstract	xix
1. Introdução.....	1
1.1 Histórico	3
1.2 Detecção e caracterização da especificidade de lectinas vegetais	5
1.3 Fontes das Lectinas.....	7
1.4 Biossíntese das lectinas vegetais.....	8
1.5 Propriedades químicas e físico-químicas das lectinas vegetais	8
1.6 Aplicações das lectinas vegetais	9
1.7 Sítios de combinação de lectinas com carboídratos	11
1.8 Carboidratos das superfícies celulares humanas	12
1.8.1 Integrinas.....	13
1.8.2 Caderinas.....	15
1.8.3 Selectinas	17
1.8.4 CD44	18
1.8.5 Receptor da superfamília das imunoglobulinas.....	19
1.8.6 Mucinas	21
1.8.7 Galectinas	21
1.9 Lectinas no câncer de mama.....	22
1.10 Caracterização da Frutalina	27
2. Hipótese de Trabalho.....	31
2.1 Estratégia de trabalho.....	31
2.2 Observações correlacionadas.....	31
3. Material e Métodos	32
3.1 Pacientes e tumores	32
3.2 Linfonodos	32
3.3 Isolamento e purificação da frutalina	32
3.3.1 A semente.....	33
3.3.2 A farinha.....	33
3.3.3 O extrato total.....	33
3.3.4 Cromatografia de afinidade	33
3.3.5 Cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana extraída de <i>Adenantha pavonina</i>	34
3.3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol.....	35
3.3.7 Cromatografia de filtração em gel Superdex	36
3.4 Soro policlonal anti- extato total e anti-frutalina.....	36
3.5 Imunodifusão radial dupla	37

3.6	Imunohistoquímica.....	38
3.7.1	Técnica de imunohistoquímica utilizando frutalina (Técnica I) e anti-corpo anti-frutalina (Técnica II), como sondas.....	38
3.7.2	Controles da técnica de imunohistoquímica.....	40
3.7.3	Variação do pH.....	40
3.7.4	Padronização da coloração.....	40
4.	Resultados.....	41
4.1	Cromatografia de afinidade do extrato total em coluna de galactomanana de <i>Adenantha pavonina</i>	41
4.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol.....	42
4.3	Cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex.....	43
4.4	Imunodifusão radial.....	44
4.5	Imunomarcações com frutalina como sonda (Técnica I) e com o anticorpo anti-frutalinina como sonda (Técnica II).....	45
4.5.1	Epitélio mamário normal.....	47
4.5.2	Metaplasia apócrina.....	48
4.5.3	Hiperplasia ductal (com e sem atipia).....	49
4.5.4	Carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS).....	52
4.5.5	Carcinomas invasivos.....	53
4.5.6	Metástase ganglionar.....	56
4.5.7	Estroma.....	58
4.6	Correlação com os fatores prognósticos para câncer de mama.....	58
4.7	Variação do pH.....	60
5.	Discussão.....	61
5.1	Frutalina como sonda.....	61
5.2	Anticorpo anti-frutalina como sonda.....	65
5.3	Variação do pH.....	72
5.4	Comparação de resultados obtidos com a frutalina com os da jacalina citados na literatura.....	73
5.5	Comparação dos resultados obtidos com a frutalina com lectinas de outras famílias citadas na literatura.....	74
5.6	Resumo de todos os achados deste trabalho.....	75
6.	Conclusão.....	76
7.	Referências bibliográficas.....	77

Abreviaturas

A :	Alanina
C:	Cisteína
D:	Ácido aspártico
E:	Ácido glutâmico
F:	Fenilalanina
G:	Glicina
H:	Histidina
I:	Isoleucina
K:	Lisina
L:	Leucina
M:	Metionina
N:	Asparagina
P:	Prolina
Q:	Glutamina
R:	Arginina
S:	Serina
T:	Treonina
V:	Valina
W:	Triptofano
Y:	Tirosina
Z:	Glutâmico/Glutamina
B:	Aspártico/Asparagina
A280:	Absorbância a 280nm

Antígenos T, Tn, Siali-Tn: Representam produtos imaturos iniciais de glicosilação dos resíduos serina-treonina de proteína celular

CD: Clusters Differentiation (Grupos de Diferenciação)

CDIS: Carcinoma Ductal in situ

CEA:	Antígeno Carcinoembrionário
C-erb:	Gene que codifica receptor de membrana que responde a fatores de crescimento
Con A:	Concanavalina A
C-myc:	Gene envolvido com ativação do ciclo celular
DCC:	Molécula alterada no câncer colo-retal
ELAM:	Molécula de Adesão Celular Endotélio-Leucócito
E-Selectina:	Selectina Endotelial
Fase S:	Fase de Síntese de DNA no ciclo celular
FPLC:	Cromatografia líquida de alta performance
Gly-CAMS:	Molécula de Adesão celular Dependente de Glicosilação
HDA:	Hiperplasia Ductal Atípica
HDT:	Hiperplasia Ductal Típica
HPA:	Helix Pomatia Agglutinin
kDa:	Quilodalton
LAM:	Molécula de Adesão Leucocitária
LCA:	Lens Culinaris Agglutinin
LTA:	Lotus Tetragonolobus Agglutinin
L-Selectina:	Selectina de Linfócito
Mr:	Massa molecular relativa
NCAM:	Molécula de Adesão Neural
p53:	Gene que codifica uma fosfoproteína nuclear (proteína do p53), capaz de parar o ciclo celular em G1 para que ocorra reparo do DNA
PADGEM:	Proteína de Membrana Granular Externa Dependente de Ativação Plaquetária
PNA:	Peanut Agglutinin
PBS:	Solução salina tamponada com fosfato
Progressão tumoral:	processo ordenado de lesões pré-neoplásicas para, finalmente, cânceres invasivos. Na mama, a evolução é a seguinte: hiperplasia ductal típica → hiperplasia ductal atípica → carcinoma <i>in situ</i> → carcinoma invasivo → metástases (Figura 4 A, B, C, D e E)

P-Selectina:	Selectina plaquetária
RCA:	Ricinus Communis Agglutinin
SBA:	Soyabean Agglutinin
Sonda	Uma molécula que pode ser utilizada para identificar uma outra por afinidade ou complementaridade
TCD4+:	Linfócito T com receptor CD4
Tris:	Tris (Hidróximetil) aminometano
UEA I:	<i>Ulex Europeus Agglutinin</i>
UH:	Unidade Hemaglutinante. Definida como o inverso da maior diluição de uma dada solução protéica que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de hemácias a 2%
VCAM:	Molécula de Adesão Celular Venular
WGA:	Wheat Germ Agglutinin

Lista de figuras

Figura 1 - Esquema de aglutinação celular	6
Figura 2 - Esquema de inibição da ação da lectina por açúcar específico	7
Figura 3 - Esquema de Esquema de interações prováveis por lectinas na célula normal (A) e na célula tumoral (B).....	10
Figura 4 - Progressão tumoral no câncer de mama	24
Figura 5 - Fruta-pão (<i>Artocarpus incisa</i>).	27
Figura 6 - Cromatografia de filtração em gel da frutalina em diferentes valores de pH....	29
Figura 7 - Esquema do isolamento da frutalina.....	33
Figura 8 - Esquema de produção de soro policlonal anti-extrato total e anti-frutalina	37
Figura 9 - Cromatografia de afinidade do extrato total de <i>Artocarpus incisa</i>	42
Figura 10 - Eletroforese em gel de poli(acrilamida) (15%) em presença de SDS	43
Figura 11 - Cromatografia da frutalina em Superdex 75 HR.....	44
Figura 12 - Imunodifusão radial de soro policlonal anti-frutalina.....	44
Figura 13 - Comparação da intensidade de coloração da membrana e citoplasma do epitélio normal e alterado pela Técnica I	46
Figura 14 - Comparação da intensidade de coloração da membrana e citoplasma do epitélio normal e alterado pela Técnica II.....	46
Figura 15 - Ductos mamários normais: coloração com frutalina.....	47
Figura 16 - Metaplasia apócrina: marcação pela frutalina.....	48
Figura 17 - Metaplasia apócrina: marcação pela frutalina.....	48
Figura 18 - Metaplasia apócrina: marcação pelo anticorpo anti-frutalina.....	49
Figura 19 - Hiperplasia ductal típica: marcação pela frutalina	50
Figura 20 - Hiperplasia ductal típica: marcação pelo anticorpo anti-frutalina	50
Figura 21 - Hiperplasia ductal atípica: marcação pela frutalina	51
Figura 22 - Hiperplasia ductal atípica: marcação pelo anticorpo anti-frutalina	51
Figura 23 - Carcinoma ductal <i>in situ</i> : marcação pela frutalina	52
Figura 24 - Carcinoma ductal <i>in situ</i> : marcação pelo anticorpo anti-frutalina	52
Figura 25 - Carcinoma ductal invasivo Grau I marcação pela frutalina.....	53
Figura 26 - Carcinoma ductal invasivo Grau I marcação pelo anticorpo anti-frutalina.....	54
Figura 27 - Carcinoma ductal invasivo Grau III marcação pela frutalina	54
Figura 28 - Carcinoma ductal invasivo Grau III marcação pelo anticorpo anti-frutalina	55
Figura 29 - Comparação entre as intensidades de coloração de membrana e citoplasma pelas Técnicas I e II dos carcinomas invasivos de graus I-III....	55
Figura 30 - Metástase de carcinoma ductal marcado com frutalina.....	56
Figura 31 - Comparação entre as intensidades de coloração de membrana e citoplasma das metástases ganglionares de diferentes graus histológicos	57
Figura 32 - Metástase de carcinoma ductal marcado pelo anticorpo anti-frutalina.....	57
Figura 33 - Marcação negativa para frutalina em pH 2,6	60
Figura 34 - Marcação positiva para frutalina em pH 10,0.....	60
Figura 35 - Alinhamento da seqüência N-terminal das lectinas frutalina e jacalina	74
Figura 36 - Sequenciamento da frutalina	73

Lista de tabelas

Tabela 1 - Trabalhos publicados entre 1983 e 2001 sobre interação entre lectinas e câncer de mama, relacionados com parâmetros clínicos, patológicos e moleculares	25
Tabela 2 - Lectinas utilizadas em publicações relacionadas com câncer de mama entre 1983 e 2001	26
Tabela 3 - Relação quantitativa entre o epitélio mamário normal e as diferentes lesões pelas Técnicas I e II.....	45
Tabela 4 - Percentuais e valores absolutos de marcação da membrana e citoplasma pela Técnica I nos carcinomas invasivos da mama e fatores prognósticos	58
Tabela 5 - Percentuais e valores absolutos de marcação da membrana e citoplasma pela Técnica II nos carcinomas invasivos da mama e fatores prognósticos	59

Resumo

Lectinas são proteínas que apresentam afinidade por carboidratos específicos. Existe um considerável interesse pelos carboidratos de superfície celular posto que estão relacionados com fenômenos de diferenciação e maturação. Durante a transformação neoplásica ocorrem alterações da membrana celular, principalmente na composição de carboidratos, que determinam características especiais às células. Lectinas têm sido utilizadas como ferramentas em muitas áreas de investigação diagnóstica, especialmente no estudo dos glicoconjugados celulares. No presente estudo investigou-se a expressão de glicoconjugados específicos para *Artocarpus incisa* (frutalina) em vários estágios histológicos de progressão tumoral na mama. Foram incluídas amostras de epitélio normal, metaplasia apócrina, hiperplasia ductal típica e atípica, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo e metástase ganglionar. As amostras foram marcadas utilizando o método da Estrepto-Avidina-Biotina-Peroxidase com duas técnicas diferentes: a frutalina, como sonda primária e o anticorpo anti-frutalina como ponte (Técnica I); anticorpo anti-frutalina como sonda primária (Técnica II). Em ambas as técnicas ocorreu coloração mais forte no epitélio alterado do que no normal, sendo o predomínio da coloração membranar. Muitos dos carcinomas ductais *in situ* também coraram tanto a membrana quanto a citoplasma, pela Técnica I; com a técnica II, o predomínio foi de citoplasma. Todos os carcinomas ductais invasivos coraram fortemente, com ligeira predominância do citoplasma, quando foi utilizada a Técnica I. Um número menor de casos corou com a Técnica II. Com esta técnica nenhuma das hiperplasias atípicas corou a membrana, aliás, a partir das hiperplasias atípicas houve um decréscimo na marcação das membranas e um ganho na marcação do citoplasma. Este trabalho mostrou que a frutalina é um marcador de células epiteliais. Revela que durante a progressão tumoral houve modificação de glicoconjugados da superfície celular expondo resíduos de galactose. O anticorpo anti-frutalina marcou células epiteliais, aparentemente de forma específica, porém sempre em menor número de casos.

Abstract

Lectins are proteins which bind specifically to carbohydrates. Recently considerable interest has been devoted to cell surface carbohydrates, since they are related to differentiation and maturation phenomena. Neoplastic transformation in cells is associated to altered cell surface membranes, particularly with an abnormal composition. This may determine of neoplastics cell characteristics. Lectins have been used as tools in many areas of diagnostic investigation especially related to changes in the expressions of membrane and cytoplasmatic carbohydrates. In this study it has been examined the expression of glycoconjugates especific to *Artocarpus incisa* lectin (frutalina) in various histological stages of tumor progression in the breast tissues. These included normal epithelium, apocrine metaplasia, ductal hyperplasia, without and with atypia, ductal carcinoma *in situ*, invasive ductal carcinoma and nodal metastasis. This tissue was stained to bind to the lectin using two different histochemical techniques: frutalina reacting directly (Technique I) and antibody anti-frulalina as a bridge; antibody anti-frutalina reacting directly (Technique II). In both techniques the staining was more frequent in malignant than in benign breast epithelium. Most of the ductal carcinomas *in situ* stained the membrane as well as the citoplasm. All invasive ductal carcinomas were stained by frutalina. During the tumor progression there occurred modifications on the glycoconjugate cellular surfaces showing galactose residues. The most interesting aspect of this study was that the antibody anti-frutalina did not stained any of the cases of atypical hyperplasia.

1 Introdução

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas ligantes reversíveis de mono e oligossacarídeos com alta especificidade, em geral desprovidas de atividade catalítica e em contraste aos anticorpos, não são produtos de uma resposta imune (LIS e SHARON, 1998). Representam um grupo de proteínas oligoméricas que variam amplamente em peso, estrutura, organização molecular, e os constituintes do sítio de combinação (LIS e SHARON, 1998).

Durante muito tempo as lectinas foram conhecidas como proteínas fitohemaglutinante, dada a esta sua importante propriedade (ELFSTRAND et al., 1898).

O nome lectina é de origem latina e significa “escolher” (*legere*) (BOYD e SHAPHEIGH, 1954).

As lectinas são, geralmente, classificadas de acordo com o que foi estabelecido por MAKELA (1957) que dividiu os monossacarídeos de lectinas em quatro grupos conforme a configuração do C3 e C4 do anel piranosídico. Lectinas que ligam manose e glicose (*Pisum sativa*, *Lens culinaris*, *Vicia faba*, *Canavalia ensiformis* e *Dioclea grandiflora*) pertencem ao grupo III; lectinas que ligam galactose e N-acetil-galactosamina (*Glycine Max* e *Phaseolus lunatus*), pertencem ao grupo II e lectinas específicas por L-fucose (*Lotus tetragonolobus* e *Ulex europaeus*), pertencem ao grupo I. Até o momento ainda não foram descobertas lectinas que interagem com açúcares do grupo IV (idiose, gulose, L-xylose, L-glicose). Três novos grupos foram acrescentados àqueles de Makela: as lectinas específicas por N-acetilglicosamina, aquelas específicas por ácido siálico e aquelas específicas por estruturas complexas (GOLDSTEIN e PORETZ, 1986). É importante notar que esses monossacarídeos são todos constituintes de polissacarídeos e glicoconjugados, presente em células e fluídos.

As lectinas foram classificadas em três tipos, conforme a sua estrutura global (PEUMANS e Van DAMME, 1994):

As **merolectinas**, proteínas constituídas exclusivamente por um único domínio ligante a carboidrato. Elas são proteínas pequenas, de uma única cadeia polipeptídica, e que por causa de sua natureza monovalente, são incapazes de precipitar glicoconjugados.

dos ou aglutinar células. Como exemplo deste grupo, podemos citar a haveína e as proteínas monoméricas de orquídea.

As **hololectinas**, também constituídas exclusivamente por domínios ligantes de carboidratos, contêm dois ou mais desses domínios, os quais podem ser iguais ou homólogos. Este grupo compreende todas as lectinas clássicas que têm múltiplos sítios ligantes e que, portanto, são capazes de precipitar glicoconjugados e aglutinar células.

As **quimerolectinas**, proteínas que além do grupo ligante de açúcar possuem um outro domínio, não relacionado com este, possuindo uma atividade catalítica (ou uma outra atividade biológica) bem definida, que age independentemente dos domínios ligantes de carboidratos. Dependendo do número de sítios ligantes de açúcar, as quimerolectinas podem se comportar como hololectinas ou merolectinas. Um exemplo de quimerolectinas são as RIPs tipo 2, com um sítio possuindo atividade RNA-N-glicosidásica (na sua cadeia A) além de dois sítios ligantes de açúcar (na sua cadeia B), como a ricina, que é capaz, inclusive de aglutinar células. Um outro exemplo das quimerolectinas são as quitanases classe I, com apenas um sítio ligante de açúcar e que não aglutinam.

Mais recentemente, foi sugerido um outro grupo de lectina, as **superlectinas**, um tipo especial das quimerolectinas. Elas seriam proteínas de fusão, com dois domínios de ligação a carboidratos. Estes domínios são estruturalmente distintos e reconhecem carboidratos estruturalmente diferentes. Apenas um exemplo de superlectinas foi, até hoje, descrito, a lectina de bulbos de tulipa, com dois domínios, um específico por manose e o outro específico por N-acetil-galactosamina (VAN DAMME et al, 1997).

A habilidade das lectinas de plantas de servirem como marcadores de alterações celulares para distinguir células normais e alteradas foi relatado inicialmente por Aub et al., em 1963. Desde então muitos estudos têm usado as lectinas como provas histoquímicas para demonstrar alterações na seqüência terminal de carboidratos dos glicoconjugados da membrana celular em uma variedade de lesões neoplásicas (SUJATHAN et al., 1996).

Por outro lado, como a estrutura dos carboidratos é altamente resistente nos processos de preparação histológica, as lectinas são ferramentas valiosas no estudo da estrutura dos carboidratos na rotina da patologia cirúrgica (URDIALES-VIEDMA, et al., 1995).

1.1 Histórico

O marco inicial na história das lectinas foi o trabalho de Stillmark (1888) que observou a coagulação quando uma preparação proteica de *Ricinus communis* era adicionada a uma suspensão de hemácias. Além disso, foi observado que a ricina reagia de forma diferente com os diversos tipos de hemácias.

No início dos estudos com lectinas, acreditava-se que suas propriedades de hemaglutinação e hemólise eram devidas a princípios tóxicos. Somente 100 anos depois as lectinas responsáveis pelos efeitos tóxicos foram separadas daqueles responsáveis pela aglutinação (OLNES e PIHL, 1982).

As pesquisas em sorologia e imunologia foram estimuladas pela descoberta da propriedade eritroaglutinante da ricina, que aconteceu pouco mais de uma década após o conhecimento da eritroaglutinação por proteínas de origem animal (LANDOIS, 1875).

A notável toxicidade da ricina e da abrina foi de grande valia para a elucidação das bases de resistência imunológica. Quando comparadas com as toxinas bacterianas, até então empregadas, elas eram mais fáceis de preparar e muito mais estáveis, além de produzirem, quando injetadas em animais, anticorpos capazes de inibir tanto a atividade tóxica como a atividade hemaglutinante (EHRlich, 1891).

As primeiras lectinas de origem animal foram detectadas em 1899 por CAMMUE et al. em glândula de albúmen do caramujo, *Helix pomatia* (FLEXNER e NOGHCHI, 1902), no caranguejo, *Limulus polyphemus*, [NOGUCHI, 1903], embora a atividade eritroaglutinante de venenos de serpentes já tivesse sido descrita anteriormente (LANDSTEINER, 1902; MARCUSSON-BEGUN, 1925).

Um outro pioneiro no estudo das lectinas foi Karl Landsteiner. Ele começou seus estudos com aglutininas vegetais logo depois de ter descoberto os grupos sanguíneos do sistema ABO (LANDSTEINER e RAUBITSCHek, 1907).

Somente cerca de 20 anos após os trabalhos de Stillmark (1888) é que surgiram os primeiros estudos, embora sem sucesso, sobre a aplicabilidade das lectinas na identificação de grupos sanguíneos (LENZE, 1909; SUGAN, 1910), porém até meados deste século as lectinas ainda eram tidas como inespecíficas.

O período entre o fim do século passado e a Primeira Guerra Mundial foi de efervescência nos trabalhos com lectinas. Estes estudos puderam comprovar o efeito hemaglutinante das lectinas em leucócitos, hemácias e células hepáticas e renais devido à sua propriedade específica e não a possíveis efeitos tóxicos (WIENHAUS, 1909; ASSMAN, 1911; SCHNEIDER, 1912; DOSET e HENLEY, 1917; SEMNER e HOWELL, 1936a ; BOYD e REGUERA, 1949).

Nesta mesma época, surgiu a primeira utilização prática das lectinas, quando foi estabelecido um protocolo para a remoção de hemácias na preparação de anti-soro contra cólera suína (RENKONEM, 1948).

Logo após a Primeira Guerra Mundial houve um esfriamento nas pesquisas com lectinas; entretanto, foi nesta época que foram desenvolvidos os estudos com a concanavalina, quando foram identificadas duas das suas principais frações proteicas: a Concanavalina A, com atividade hemaglutinante, e a Concanavalina B (KRUPPE, 1956).

Um passo muito importante foi a descoberta de que no soro da enguia *Anguilla japonica* havia duas lectinas, uma das quais apresentava especificidade por hemácias humanas do grupo O. A partir de então muitos outros estudos também evidenciaram especificidade de outras lectinas para outros grupos sanguíneos (KOULUMIES, 1950; WATKINS e MORGAN, 1952).

A propriedade de certas lectinas aglutinarem hemácias apresentando uma especificidade por grupos, bem como a de serem inibidas por açúcares simples, desempenhou um papel crucial na descoberta das bases químicas da especificidade do sistema ABO. Pela primeira vez, foi demonstrado, que substâncias solúveis do soro de grupos sanguíneos inibiam a eritroaglutinação por lectinas anti-O da *Laburnum alpinus*, *Lotus tetragonolobus* e *Cytissus sessilifolius* (WATKINS e MORGAN, 1952). Nesta mesma época, foram encontradas evidências de que N-acetil D-galactosamina e alfa-D-galactose eram os açúcares responsáveis pela especificidade dos grupos A e B, respectivamente.

Uma outra descoberta que desempenhou um papel revolucionário foi a das propriedades mitogênicas da lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) a qual fazia proliferar linfócitos maduros *in vitro*, que até então eram consideradas células quiescentes (NOWEL, 1960).

AUB e colaboradores (1963), acreditavam que a diferença entre as células normais e as malignas estava nas suas superfícies, ou seja, que alterações nas propriedades da superfície celular habilitariam as células cancerosas a continuar proliferando e se desprender do seu local inicial, espalhando-se pelo corpo, estabelecendo novos focos tumorais. Para testar estas idéias, examinaram a resposta de células modificadas ao tratamento com diversas enzimas. Apenas no caso de uma enzima, a lipase de germe de trigo, houve resposta positiva, isto é, células normais pareciam não ser afetadas pela enzima enquanto as células malignas eram aglutinadas. Entretanto, quando a lipase pancreática substituiu a lipase do germe de trigo, não havia aglutinação. Descobriram que a preparação da lipase de germe de trigo continha um contaminante protéico, que era responsável pela aglutinação. Posteriormente, foi demonstrado que a substância responsável por aquela ação era a “aglutinina de germe de trigo” (AUB et 1965; BURGER e GOLDBERG, 1967). Depois destes estudos, propriedades semelhantes foram encontradas em outras lectinas como a concanavalina A (INBAR e SACHS, 1969) e a lectina de soja (SELA et 1970). BURGER e NOONAM (1970) obtiveram, ainda, em presença de Con A, a restauração da inibição por contato em cultura de células malignas.

O isolamento da Concanavalina A por cromatografia de afinidade trouxe um novo período para a história das lectinas (AGRAWALL e GOLDSTEIN, 1965).

Somente com o desenvolvimento tecnológico que resultou na purificação das lectinas foi possível um melhor entendimento da estrutura, ação e emprego destas moléculas. Os anos 80 deram início assim a uma nova fase no emprego das lectinas nas mais diversas áreas, inaugurando o que se poderia chamar de período biotecnológico. Só para citar alguns casos, já em 1981 a lectina de soja foi empregada em transplante de medula óssea (SHARON e REISNER, 1986).

1.2 Detecção e caracterização da especificidade de lectinas vegetais

A aglutinação é uma das mais importantes propriedades das lectinas (Figura 1). Esta atividade, no entanto, está restrita às hololectinas, que apresentam dois domínios ligantes de açúcar. Diferenças na aglutinabilidade das células podem também ocorrer graças a mudanças nas estruturas de carboidratos da superfície celular, quer por trans-

formação maligna (AUB et al, 1963), ou por maturação de células embrionárias em adultas ou, ainda, por estimulação mitótica (RAPIN e BURGER, 1974).

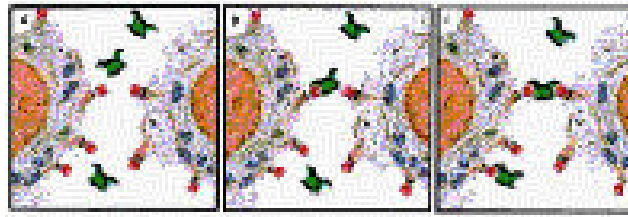


Figura 1 – Esquema de aglutinação celular, onde o vermelho representa açúcares da superfície celular e o verde, lectinas com seus domínios de ligação.

A aglutinação de células tem como pré-requisito, a ligação da lectina à superfície celular, a qual é função de um amplo conjunto de variáveis, tais como: valência, tamanho da lectina, capacidade de interagir com glicopeptídeos e/ou glicolipídeos, tipo celular, estado metabólico e propriedades da superfície celular; esta última se relacionando com a natureza, o número, a distribuição, a exposição e mobilidade de receptores, além das cargas, deformidades e fluidez da membrana celular. A técnica mais comumente empregada é baseada na reação entre a lectina e eritrócitos, quando a uma diluição salina seriada (1:2) da lectina é adicionada uma suspensão (geralmente a 2%) de hemácias (MOREIRA & PERRONE, 1978).

Existem técnicas de rastreamento para a detecção de hololectinas, baseadas na habilidade de algumas dessas proteínas precipitar glicoconjugados e polissacarídeos. A precipitação entre ligantes multivalentes e lectinas, no entanto, deve ser interpretada com cautela, pois interações inespecíficas podem ocorrer (NICHOLSON, 1974). A eletroforese de afinidade e a difusão radial são técnicas muito utilizadas (GOLDENSTEIN e PORETZ, 1986).

Antes do emprego de qualquer uma destas técnicas acima citadas, faz-se necessário o conhecimento da especificidade da lectina a açúcares específicos. Este conhecimento também é fundamental para a sua purificação, bem como para o seu emprego em pesquisas bioquímicas e técnicas de imunohistoquímica. A especificidade por açúcar é, normalmente, determinada pela técnica de inibição por hapteno de Landsteiner (GOLDSTEIN e HAYES, 1978; GOLDSTEIN e PORETZ, 1986). A capacidade inibitória de um determinado carboidrato é estabelecida com base na concentração mínima do açúcar

requerida para inibir a reação de hemaglutinação ou a reação de precipitação entre a lectina e uma molécula reativa

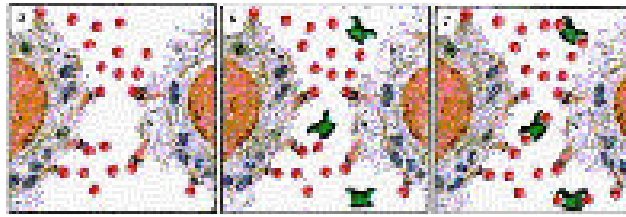


Figura 2 – Esquema de inibição da ação da lectina por açúcar específico.

A metodologia mais usada é aquela em que o açúcar a ser testado é submetido a diluições seriadas (normalmente 1:2) e a estas soluções é adicionada uma solução da lectina, com concentração conhecida (normalmente 4 UH). A mistura é então deixada em contato por 30 min a 37 °C, após o que é adicionada uma suspensão de hemácias a 2%. A mistura é deixada, novamente, a reagir por 30 min a 37 °C e 30, min à temperatura ambiente. Entretanto, a técnica pode apresentar erros de até 25% (MOREIRA, 1998). Para contornar este problema, vem sendo utilizada uma outra metodologia, diluindo-se seriadamente tanto a solução de açúcar como a de lectina. Inicialmente, são feitas diluições seriadas da lectina, na direção A-H, em placas de microtitulação; a seguir, a solução do açúcar a ser testada é diluída na direção 1-12. Ao ser feita a segunda diluição a concentração da solução diluída inicialmente é alterada, mas a relação lectina/açúcar pode ser determinada, nas diversas fileiras. As relações lectina/açúcar podem atingir valores desde $3,9 \times 10^{-3}$ até 16×10^3 vezes.

1.3 Fontes das Lectinas

Hoje, após século de pesquisas, tem-se nas plantas as principais fontes de lectinas, podendo ainda ser encontradas em bactérias, protozoários, vírus e animais (SHARON e LIS, 1989a). Estas últimas são conhecidas como lectinas endógenas, para diferenciá-las das exógenas. Apesar dos esforços já desenvolvidos, as possíveis funções desempenhadas pelas lectinas ainda constituem um desafio.

1.4 Biossíntese das lectinas vegetais

Investigações extensas têm detalhado o mecanismo de processo de tradução na biossíntese das lectinas produzindo uma quantidade considerável de conhecimento sobre a biossíntese e genética molecular destes compostos. A exemplo das demais proteínas vegetais, a informação para a síntese das lectinas está codificada no DNA. A síntese das lectinas vegetais tem sido estudada com detalhe, havendo muitas semelhanças entre todas elas. As diferenças, quando ocorrem, provavelmente estão nas várias etapas de modificações pós-tradução. Assim, as lectinas são sintetizadas nos ribossomos aderidos ao retículo endoplasmático, onde inclusive podem sofrer uma glicosilação pós-tradução, envolvendo um peptídeo sinhidrofóbico, que facilitaria seu transporte da superfície para o lúmen do retículo endoplasmático rugoso, através de um mecanismo semelhante ao das proteínas secretoras de mamíferos (HIGGINS et al, 1983a; CHRISPEELS, 1984).

Durante o transporte da recém-sintetizada pré-pró-lectina, uma peptidase específica, ligada à membrana, remove o peptídeo sinal da porção N-terminal originando a pró-lectina, (também denominada de precursora). No processo pode ocorrer uma série de modificações pós-traducionais, como glicosilação e clivagens proteolíticas, resultando na lectina madura, plenamente funcional (SHARON e LIS, 1990).

1.5 Propriedades químicas e físico-químicas das lectinas vegetais

As lectinas de vegetais superiores são ricas em aminoácidos ácidos e hidroxilados, os quais podem perfazer até mais de 30 % do seu conteúdo, mas pobres ou destituídas de aminoácidos sulfurados. Algumas famílias de lectinas possuem uma composição de aminoácidos singular. As lectinas de gramíneas possuem um alto conteúdo de glicina (23 %) e cisteína (21 %), sendo que todos os resíduos de cisteína estão envolvidos em pontes dissulfeto (STINISSEN e PNEUMANS, 1985), enquanto que as lectinas de solanáceas são ricas em hidroxiprolina, serina, glicina e cisteína (SHOWALTER, 1993).

Os principais carboidratos encontrados nas lectinas são N-acetil-glicosamina, manose, L-fucose e xilose. Estes açúcares são característicos das lectinas de leguminosas (SHARON e LIS, 1989a). Por outro lado, as lectinas de solanáceas possuem arabinose e

galactose como únicos constituintes da porção glicídica. Nas lectinas de *Solanum tuberosum* (ALLEN et 1978) e de *Datura stramonium* (DESAI et 1981), todos os resíduos de arabinose (90 % da porção glicídica) estão ligados covalentemente aos resíduos de hidroxiprolina, enquanto que os resíduos de galactose estão ligados aos resíduos de serina.

As lectinas apresentam, ainda, sítios funcionais, conservados durante a evolução, caracterizados por conterem metais, carboidratos e aminoácidos predominantemente hidrofóbicos.

1.6 Aplicações das lectinas vegetais

As lectinas têm se mostrado ferramentas poderosas tanto para propósitos analíticos como para pesquisas em bioquímica, biologia celular, imunologia e áreas relacionadas. Uma de suas maiores contribuições tem sido no esclarecimento do papel de membranas celulares e subcelulares. Nestes estudos usam-se lectinas marcadas, quer radioativamente, quer com fluoresceína, quer imunomarcadores (NICHOLSON, 1974; RAPIN e BURGER, 1974; LIS e SHARON, 1986).

A afinidade de lectinas por glicoproteínas de superfície celular tem sido empregada para a identificação de microorganismos. Assim é que, *Neisseria gonorrhoea* pode ser diferenciada de outras espécies de *Neisseria* por sua aglutinação com a aglutinina de germe de trigo (SHAEFER, et 1979). Existem relatos que algumas cepas não encapsuladas de *Neisseria meningitides*, assim como alguns meningococos são também aglutinados. Ficou demonstrado que a reação lectina--*Neisseria* era específica por açúcar e que as diferenças residiam nos carboidratos da superfície celular de diferentes cepas de *Neisseria gonorrhoeae* (CURTIS, e SLACK, 1981).

Na imunologia, algumas lectinas são consideradas mitógenos-padrão induzindo uma potente estimulação linfocitária (CAMPBELL et al. 1982).

Em parasitologia, a capacidade aglutinante das lectinas foi utilizada na análise de cepas de *Trypanosoma cruzii* e *Leishmania* (SCHOTTELIUS, 1982).

O uso das lectinas como ferramenta para o diagnóstico e terapêutica do câncer pode ser assim resumido (Figura 3):

1. Lectinas como sondas diagnósticas ligantes de carboidratos nas superfícies celulares;
2. Lectinas como marcadores tumor-específicos com a produção de neoglicoproteínas, neoglicoenzimas, pseudopolissacarídeos, anticorpos anti lectinas que podem ser associadas a radioisótopos, biotina, enzimas, fluorocromos, drogas tumorícidas, citotoxinas e oligonucleotídeo;
3. Lectinas como citotoxinas antitumorais, quer por ação direta (como a ricina - RCA-I) quer por ativação de linfócitos;
4. Lectinas como imunotoxinas (lectinas citotóxicas de plantas acopladas a anticorpos monoclonais);
5. Lectinas como indutoras de resposta biológica, como ativação de linfócito e indução de liberação de linfocinas (MODY et al., 1995).

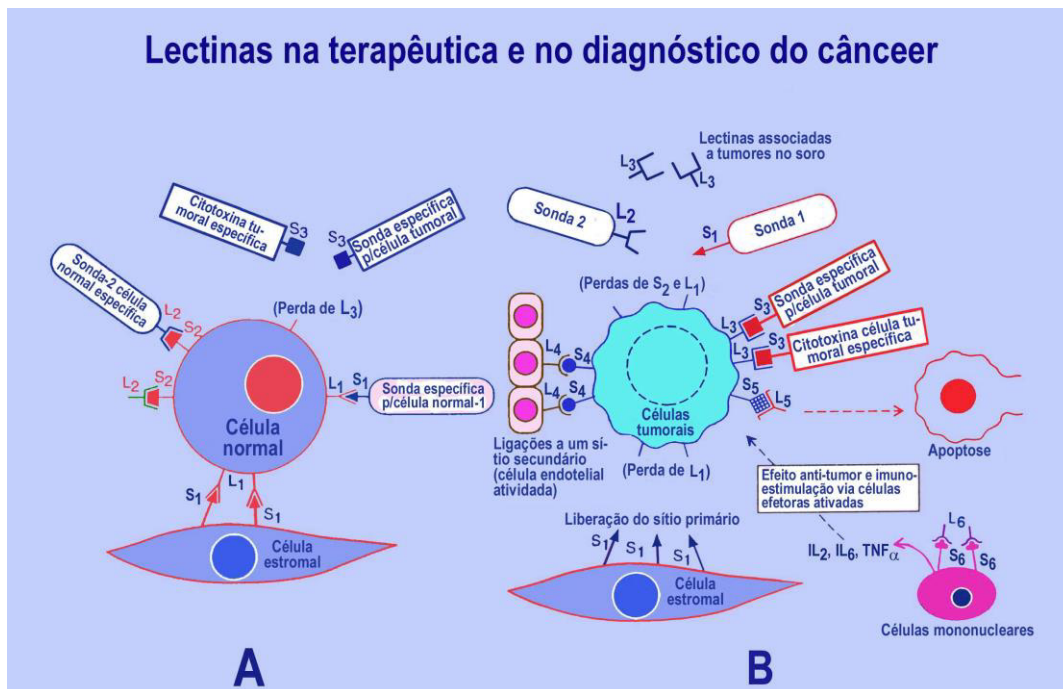


Figura 3 - Esquema das interações prováveis mediadas por lectinas na célula normal (A) e na célula tumoral (B). (L1 e L2 lectinas específicas de células; L3 lectinas associadas às células tumorais; L4 lectinas em células ativadas; L5 e L6 lectinas de plantas com atividades mitogênicas ou antitumoral direta ou indireta; S1 - S6 moléculas contendo açúcares específicos ligantes de lectinas (Moody et al, 1995).

1.7 Sítios de combinação de lectinas com carboidratos

Os sítios de ligações da lectina com o carboidrato são em forma de depressão rasa na superfície da proteína, através de um ou dois pontos ou faces do carboidrato ligante. Este sítio parece está previamente formado, visto que ocorrem poucas alterações conformacionais após a ligação do açúcar. Em geral estes sítios são similares dentro de uma mesma família de lectina, mas muito diferentes em lectinas de famílias diferentes, mesmo quando a especificidade é a mesma (LIS e SHARON, 1998).

Lectinas se combinam com carboidratos por uma rede de pontes de hidrogênio e por interações hidrofóbicas, e às vezes, íons metálicos podem desempenhar algum papel. As pontes de hidrogênio ocorrem entre os grupamentos hidroxílicos dos carbonos C3 e C4 do carboidrato e os grupamentos aminos, hidroxílicos e átomos de oxigênio das proteínas. Assim, quando as duas hidroxilas adjacentes de um monossacarídeo interagem com dois diferentes átomos de um mesmo aminoácido eles formam pontes de hidrogênio bidentada. Um tipo diferente de ponte de hidrogênio e característico para complexos glicoprotéicos é a ponte cooperativa em que um grupo hidroxila age simultaneamente como doador a receptor. As forças de van der Waals, apesar de fracas, são freqüentemente numerosas e juntas contribuem significativamente para a ligação (LIS e SHARON, 1998).

Mesmo sendo os carboidratos moléculas altamente polares, a disposição espacial dos grupos hidroxilas criam pontos hidrofóbicos na superfície do açúcar que possibilitam contatos com regiões hidrofóbicas da molécula protéica. Um tipo comum de interação é o empilhamento de monossacarídeos na cadeia lateral de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina, e triptofano. Em adição, o grupo metil de açúcares N-acetilamina montados frequentemente reage resíduos aromáticos das lectinas (LIS e SHARON, 1998).

Contatos entre proteínas e seus ligantes são algumas vezes mediadas por pontes de água. As moléculas de água têm a capacidade de agir como doadora e receptoras de hidrogênios. Comparação de uma série de açúcares ligados a uma certa lectina, ou uma série de lectinas ligadas a certo açúcar, muitas vezes revelam comumente moléculas de água, sugerindo que são importantes elementos na ligação de reconhecimento (LIS e SHARON, 1998).

Como os sítios de ligação dentro de uma mesma família são similares, é provável que a frutalina apresente os mesmos que a jacalina.

1.8 Carboidratos das superfícies celulares humanas

As membranas celulares são um mosaico fluído de glicoconjugados. A importância dos carboidratos da membrana, no reconhecimento celular e no seu micro-ambiente, é imensa. Pode-se dizer que existe uma espécie de “linguagem glicosídica” para essas interações, envolvendo moléculas específicas conhecidas como receptores de adesão (SHARON e LIS, 1993).

As superfícies celulares dos vertebrados são recobertas pelo glicocálix, constituído por moléculas glicoproteicas, glicolipídicas e glicosaminoglicanos, conhecidos como glicoconjugados (MUSTAC et al, 1996; SHUMACHER et al, 1996).

A proporção de carboidratos covalentemente ligados à membrana plasmática de células eucarióticas varia de 2 a 10% do seu peso. Muitos destes carboidratos estão em ligações O-glicosídicas ou N-glicosídicas com proteínas (glicoproteínas) e em ligações O-glicosídicas com as ceramidas (glicolipídios), sendo que os glicoconjugados predominantes são realmente as glicoproteínas contendo 80% de todos os carboidratos da superfície celular. Por outro lado, somente 10% dos lipídios da membrana são glicosilados (SMETS e BEEK, 1984). Estas unidades de carboidratos têm uma distribuição assimétrica na superfície externa da célula. Apesar da sua relativa baixa proporção por peso de membrana, os carboidratos estão distribuídos por toda a superfície celular e formam, além da matriz extracelular, a primeira camada de interação com outras células (SMETS e BEEK, 1984).

Os resíduos de carboidratos dos glicoconjugados desempenham muitas funções celulares importantes, tais como o reconhecimento, comportamento, inibição por contato, crescimento e diferenciação celular (MUSTAC et al, 1996; SCHUMACHER et al, 1996). Estas funções são dependentes do número e tipo de resíduos dos açúcares, de conformações anoméricas, presença ou ausência de ramificações moleculares, tipo e quantidade de ácido siálico. Essas propriedades particulares dos glicoconjugados contribuem para a microheterogeneidade estrutural e servem para o reconhecimento de sinais celulares (MUSTAC et al, 1996; SCHUMACHER et al, 1996).

Os carboidratos da superfície celular podem mostrar níveis alterados de expressão em tumores primários e metastático. Também, muitas mucinas associadas a tumores são identificadas em cânceres como os de mama, pâncreas, bexiga, cólon e próstata (ALAN et al, 1990; KROGERUS et al, 1990). Ressalta-se que a lectina HPA (*Helix pomatia*) é um preditor da progressão no câncer do cólon (NOGUECHI et al, 1993). Acumulam-se evidências que carboidratos de superfície celular que medeiam a adesividade celular são importantes na metástase (SCHMITT, 1998, 2000; NOGUCHI et al, 1993).

Dentre muitos monossacarídeos encontrados na natureza, apenas manose, glucose, galactose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, ácido siálico e fucose são encontrados como componentes dos glicoconjugados animais (SCHUMACHER et al, 1996).

A organização dos receptores de adesão celular compreende uma variedade de moléculas, que foram primeiramente entendidas através do estudo das interações dos linfócitos com o endotélio no processo de inflamação. Dentre estas, estão incluídas: as Selectinas, Integrinas, Caderinas, Membros da classe das superfamílias, Proteínas ricas em carboidratos referidas como Gly-CAMS (moléculas de adesão celular-dependentes de glicosilação) e CD44 (BUCK, 1995).

Em geral os receptores de adesão celular são moléculas heterodímeras com unidades alfa e beta em ligações não covalentes. Apresentam um domínio extracelular, geralmente a porção amino-terminal que interage com o ligado, com a matriz celular ou molécula na superfície de células adjacentes. O domínio citoplasmático interage com elementos do citoesqueleto. Há também um domínio intracitoplasmático hidrofóbico (BUCK, 1995). Estas moléculas funcionam como âncoras, dando estabilidade aos tecidos e permitindo a polaridade das células. Servem de transmissores de informação entre o ambiente extracelular e a célula para determinar a sua posição dentro dos órgãos bem como o estado de diferenciação celular. Funcionam também como uma via condutora de informações induzindo a célula a organizar uma série complexa de moléculas e ativar processos genéticos específicos agindo, portanto, como sinalizador de transdução (BUCK, 1995).

1.8.1 Integrinas

São moléculas heterodímeras constituídas de uma subunidade α ligada não covalentemente a subunidade β . São conhecidas 8 subunidades β e 14 subunidades α que nos

mamíferos, se organizam para formar 20 diferentes integrinas (WILCOX, 1990). As integrinas com subunidades $\beta 1$ estão relacionadas com adesão célula-matriz e servem de receptores para a laminina, o colágeno e a fibronectina (WILCOX, 1990). As que possuem subunidade $\beta 2$ são exclusivas para os leucócitos (WILCOX, 1990). As $\beta 3$ são achadas principalmente nas plaquetas (WILCOX, 1990). Existe uma espécie de seletividade de combinação em que as subunidades β se combinam com específicas subunidades α . Por exemplo, $\beta 1$ combina-se com $\alpha 5$ e forma o receptor para fibronectina; quando se combina com $\alpha 6$ forma o receptor para laminina (BUCK, 1995). Apesar da especificidade para ligantes específicos, as integrinas podem servir como receptores para múltiplos ligantes. Porque a célula precisa de mais de um receptor para a mesma molécula, como, por exemplo, para o colágeno, não está bem entendido, mas sabe-se que as integrinas transmitem sinais através da membrana para dentro da célula e, diferentes integrinas podem transmitir diferentes mensagens, assegurando desta forma que atividades importantes para a célula sem realizadas (BUCK, 1995).

Existe um domínio comum de ligação dentro das complexas moléculas ligantes. Consistem de pequenas seqüências de 3 a 6 aminoácidos. Assim, uma interação entre integrinas e fibronectina envolve os aminoácidos arginina, glicina e ácido aspártico. Também foi observado, que a estrutura tridimensional é importante para fortalecer a ligação e o reconhecimento do ligante a uma integrina particular o que pode ser influenciada pelo tipo de célula em que o receptor está expresso (HEMLER et al. 1990), pela proteína em que a integrina esta associada (BROWN et al. 1990), a composição da camada bilipídica e a concentração de cátions divalentes no meio extracelular (SMYTH et 1992). Isto sugere que o microambiente influencia a função da integrina.

As modificações da integrina por alterações de glicosilação (KAWANO et 1993), fosforilação (VALMU et 1991) ou composição de aminoácidos resultantes de alterações de RNA mensageiros, afetam a sua função (VALMU et al, 1991).

As subunidades β têm de 90 a 120KDa. Possuem um domínio aminoterminal extracelular grande com 75Kda, um domínio transmembranar hidrofóbico e um citoplasmático, pequeno, com 50 aminoácidos que é a porção terminal carboxil (HOGERVORST et 1990). A subunidade β é rica em ligações dissulfeto e possui 56 resíduos de cisteína colocados em posição homóloga em todas as subunidades (YEE e HYNES, 1993) e são dobra-

das na região homóloga dentro da estrutura terciária e esta precisão é essencial para a função das integrinas (CALVETE et 1991). A subunidade $\beta 4$ é muito diferente, pois apresenta um domínio citoplasmático maior e mais pesado com 1000 aminoácidos e pesando 180 kDa (HOGERVORST et 1990).

As subunidades α são geralmente maiores que as β , pesando entre 120 a 140KDa, com exceção da $\alpha 1$ que é cerca de 180 kDa (HELMER, 1990). São também moléculas transmembranares com o domínio extracelular na extremidade amino. O domínio citoplasmático é significativamente diferente nas diversas subunidades α e pode funcionar como um regulador natural controlando a distribuição do receptor e sua atividade (YLLANE et 1993).

Estudos feitos em carcinomas de pulmão, intestino, próstata e mama, linfomas, leucemias, melanomas, e neuroblastomas mostram diferentes aspectos de expressão das integrinas, quando comparados aos tecidos normais (ALBELDA, 1993). Carcinomas pobremente diferenciados mostram perda de expressão das integrinas (STAMP e PIGNATELLI, 1991). Os caminhos de investigação de integrinas alteradas nas células tumorais têm ocorrido em diferentes linhas de pesquisa: através do bloqueio de lesões metastáticas com agentes específicos, anticorpos ou peptídeos, que perturbam a interação integrina-ligante; através do estudo de linhas celulares mutantes que falham em expressar um receptor particular e a sua correlação com a expressão de integrinas e o potencial metastático; através da transfecção de diferentes c-DNA que codificam várias subunidades de integrinas e estudar o efeito da expressão de novas integrinas e suas propriedades metastáticas (BUCK, 1995). Evidências experimentais sugerem que as integrinas podem controlar o crescimento tumoral, promover a migração celular e a invasão pela membrana celular, e facilitar o processo de metástase. Isto deve refletir uma combinação de integrinas alteradas para permitir um comportamento aberrante (BUCK, 1995).

1.8.2 Caderinas

São uma superfamília de moléculas requeridas para o reconhecimento célula-célula, a morfogênese tecidual e a manutenção da integridade dos tecidos em vertebrados e invertebrados (BUXTON e MAGEE, 1992). Os membros desta família recebem nomes de acordo com o tecido em que primeiramente foram isolados. Por exemplo, as caderi-

nas das células epiteliais são denominadas como E-caderinas enquanto a N-caderina é expressa pelas células neurais (BUCK, 1995).

Uma típica caderina de maníferos é uma glicoproteína transmembranar com 723 a 748 aminoácidos, e tem uma massa molecular de cerca de 120KDa. A porção extracelular possui quatro subunidades repetidas com aproximadamente 110 aminoácidos que é o domínio, dependente de cálcio, da atividade da caderina (HATTA et 1988). O domínio citoplasmático tem massa molecular de 14KDa e mostra alto grau de homologia dentro das caderinas (HATTA et 1988), possuindo como função comum, a ligação ao citoesqueleto celular. Muitas caderinas contêm, ainda, uma seqüência hidrofóbica dentro da membrana; uma exceção é a T-Caderina (HATTA et al. 1988).

Algumas das subfamílias das caderinas são vistas como fazendo parte de complexas estruturas de adesão celular, conhecidas como desmossomos (BUXTON e MAGEE, 1992). Outras aparecem envolvidas na adesão celular durante a histogênese e fazem parte de estruturas menos complexas como as junções aderentes. Estas estruturas complexas de adesão possuem um mecanismo homofílico dependente de cálcio (BUCK, 1995).

Existem duas regiões na molécula que controlam a especificidade de ligação. Uma delas é dentro dos 113 aminoácidos na extremidade aminoterminal e envolvem resíduos não conservados e também uma seqüência comum His-Ala-Val (HATTA et al, 1988). A segunda região está localizada perto da região contendo cisteína adjacente ao domínio transmembrana. Estas duas regiões estão separadas por um peptídeo linear (BUCK, 1995).

O domínio citoplasmático das caderinas é altamente conservado e regula a interação entre os elementos do citoesqueleto e o seu próprio receptor. A interação com o citoesqueleto ocorre com os últimos 72 aminoácidos da porção carboxilterminal. A deleção desta região inativa a atividade de adesão (BUCK, 1995). As caderinas interagem com microfilamentos de actina via moléculas intermediárias associadas ao citoesqueleto. Envolve 3 diferentes proteínas chamadas cateninas que são designadas α , β e γ , com pesos entre 83 a 120 kDa (NAGAFUCHI et al, 1991). Existem evidências de algumas diferenças entre as cateninas dos diversos tecidos. Por exemplo, a α -catenina existe nas células epiteliais que interagem com a E-caderina e possui uma forma diferente porém relacionada

a α -catenina do tecido neural. Estas diferenças são importantes na organização e regulação dos vários tecidos (HIRANO *et al.* 1992). É fundamental no processo morfogênético (EDELMAN, 1992). A movimentação celular de uma camada para outra, bem como a reintegração em outro tecido durante a embriogênese é acompanhada pela perda da expressão de uma caderina e subsequente expressão de uma outra (HIRANO *et al.* 1992).

A perda da expressão das E-caderinas ou a falência de sua função poderia facilitar a invasão das células tumorais (VAN ROY e MARELL, 1992). Muitos tumores experimentais mostram esta correlação. Em geral as células tumorais que permanecem epitelióides continuam expressando caderinas e não são invasivas. As células dos carcinomas com fenótipo fibroblástico não expressam E-caderinas, produzindo tumores indiferenciados e com grande potencial de invasividade (FRIXEN *et al.*, 1991).

A função alterada das caderinas pode ocorrer por uma expressão anormal por alteração nos seus receptores, bem como das proteínas a elas associadas, como as cateninas (VALLÉS *et al.*, 1992). Os fatores de motilidade celular também podem influenciar de maneira negativa, uma vez que estes fatores induzem a fosforilação de proteínas transmembrana que podem afetar de alguma forma as caderinas ou suas proteínas associadas (MATSUYOSHI *et al.*, 1992).

1.8.3 Selectinas

As selectinas são lectinas endógenas São moléculas reconhecedoras de oligossacáridos que intermedeiam a interação celular com o endotélio (BUCK, 1995).

A L-selectina (linfocitária) está expressa nos linfócitos, neutrófilos, macrófagos e monócitos e foi identificada por anticorpo monoclonal que bloqueia a adesão dos linfócitos em um receptor específico designado por LAM-1 (TELDDER *et al.*, 1989).

A E-selectina (endotelial) também foi identificada por anticorpo monoclonal e inicialmente foi reconhecida como molécula de adesão celular endotélio-leucócito1 (ELAM-1). A sua expressão no endotélio é transitória quando induzida por citocinas como Interleucina-1, fator de necrose tumoral e interferon (POBER *et al.*, 1987).

A P-selectina (plaquetária) foi originalmente identificada nas plaquetas. É também conhecida como proteína granular de membrana-140 (GMP-140) (STENBERG *et al.*,

1985) e ainda como proteína de membrana granular externa dependente de ativação plaquetária - PADGEM (BERMAN et al, 1986). A histamina, a interleucina 8 e agentes oxidantes promovem a rápida expressão de selectina na superfície de plaquetas e endotélio (GENG *et al*, 1990).

A porção extracelular das três selectinas consiste de 3 domínios. O domínio aminoterminal é uma seqüência de 120 aminoácidos homólogos com um domínio de reconhecimento de carboidratos do tipo C ou lectina animal dependente de cálcio. O domínio de lectina é composto por 35 a 40 aminoácidos como a seqüência EFG. Este é seguido de cerca de 60 aminoácidos que são homólogos para ligação complementar ao domínio proteico. Existe um pequeno domínio hidrofóbico transmembrana e um citoplasmático de 17 a 35 aminoácidos (BUCK, 1995).

Os ligantes para cada selectina incluem carboidratos. A L-selectina pode ser inibida por polissacarídeos ricos em manose-6 fosfato e fucoidina, que é um polímero sulfatado de fucose (BUCK, 1995). A remoção de ácido siálico da superfície dos linfócitos e do endotélio suprime a ligação de um ao outro (BUCK, 1995), sugerindo que o ácido siálico é um importante constituinte ligante de carboidrato. A remoção da fucose ou ácido siálico por bloqueio com o anticorpo Sialil-Lewis impede a adesão mediada por E-selectina. (MOORE *et al*, 1991).

Curiosamente a L-selectina pode servir como ligante para E-selectina (PICKER et al, 1991), uma vez que as selectinas podem apresentar oligossacarídeos os quais servem de ligação para a selectina da célula vizinha.

Como as selectinas reconhecem receptores oligossacarídeos sialisados e fucosilados podem está envolvidas no processo metastático já que muitas células tumorais mostram elevados níveis de glicoproteínas sialisadas e fucosiladas (WARREN *et al*, 1972).

1.8.4 CD44

Membro da família das proteínas ligantes de colágeno, inicialmente foi reconhecido como molécula ligante dos linfócitos ao endotélio venular para a movimentação dos linfócitos do sangue aos tecidos (HEIDER et al, 1993). O CD44 também pode se ligar ao ácido hialurônico e facilitar o extravasamento das células tumorais por se ligar a micro-

vasculatura ou ao linfócito e também por funcionar cooperativamente com outros receptores em estabilizar interações célula-célula (BUCK *et al*, 1995).

A massa molecular do CD44 é variável de 80 a 200 kDa e depende da glicosilação de cada forma (TOLG *et al*, 1993). A forma mais comum é encontrada nos linfócitos com peso de 90 kDa e nas células epiteliais (TOLG *et al*, 1993).

O CD44 está expresso em muitas isoformas diferentes que estão relacionadas com o potencial metastático de vários tumores. As isoformas têm diferentes potenciais de adesividade (CAMP *et al*, 1991). Também pode funcionar como facilitador de sinal de transdução (KOOPMAN *et al*, 1990).

1.8.5 Receptor da superfamília das imunoglobulinas

Constitui uma das mais diversas famílias de receptores. Incluem, imunoglobulinas, receptor do complexo maior de histocompatibilidade, receptor de células T e moléculas associadas com várias neoplasias como o antígeno carcinoembrionário (CEA), molécula alterada no câncer colon-retal (DCC) e molécula de adesão neural (NCAM) (BENCHIMOL *et al*. 1989; FEARON *et al*, 1990; CUNNINGHAM *et al*, 1987).

Os membros mais importantes da família das imunoglobulinas incluem: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1 (BUCK, 1995).

Uma característica particular dos membros da superfamília das imunoglobulinas é a presença de unidades homólogas de imunoglobulinas no domínio extracelular (BUCK, 1995). Muitos membros deste grupo são moléculas transmembranas e interagem com o citoesqueleto, com proteíno-quinases e regulam a atividade de receptores ou iniciam reações de ativação, funcionando como segundo mensageiro que resulta na ativação de outros receptores ou induzindo funções celulares como a divisão (SHIMIZU *et al*, 1991).

O ICAM-1 fica expresso por ativação com interferon gama, fator de necrose tumoral, interleucina-1 e lipopolissacarídeos. A expressão do ICAM-2 é constitutiva e não é afetada por mediadores inflamatórios (BUCK, 1995). Todas as três moléculas de ICAM funcionam como receptores para as integrinas $\alpha 1$ e $\beta 2$ (BUCK, 1995). O VCAM-1 é encontrado nas células endoteliais ativadas por citoquinas (LEPPA *et al*, 1992).

A frequência de expressão de ICAM-1 é baixa em muitos tumores, exceto para os melanomas e certos carcinomas (ALBELDA, 1993; JONSON *et al.* 1989). A progressão do melanoma e o risco de metástase têm sido correlacionados com a expressão de ICAM-1 (JONIC *et al.* 1992). A expressão de VCAM-1 no endotélio em cultura promove adesão de células de melanoma através da integrina $\alpha 4\beta 1$ nas células do melanoma (THOMAS *et al.* 1991).

O CEA é uma proteína oncofetal que está associada a certos tumores como os de intestino e pulmão (ACHESON *et al.* 1991). Existem 6 tipos de CEA. A diferença maior é a forma como estão ligados à superfície celular. O CEA está ancorado em uma ligação com o fosfatidilinositol e não tem domínio citoplasmático, enquanto que outras moléculas relacionadas se ancoram à membrana via seqüências típicas de aminoácidos em domínio hidrofóbico transmembrana e possuem domínio citoplasmático. A função do CEA não está totalmente clara. Sabe-se que promove a agregação entre células homófilas, dependente de cálcio (BENCHIMOL *et al.* 1989).

Existem evidências experimentais de que as células com expressão do CEA mostram mais metástase hepática especificamente para os sinusóides (BUCK, 1995).

Outra molécula relacionada à superfamília é o NCAM. Inicialmente descrita como molécula de adesão das células neurais, é, agora, sabida estar presente em muitos tipos celulares (BUCK, 1995). É importante para o desenvolvimento embrionário e tem papel central na inervação muscular (CUNNINGHAM *et al.* 1987). Existem a forma embrionária e a adulta com diferenças nos homopolímeros α -2,8 ácido siálico, com a quantidade maior na forma embrionária (KIBBELLAR *et al.* 1991). A expressão de NCAM foi encontrada em tumores neural e neuroendócrinos, sendo a forma embrionária, menos adesiva, a que tem sido identificada em tumores (KIBBELLAR *et al.* 1991).

Todos estes diferentes grupos de moléculas envolvidas na adesão celular são fundamentais para o complexo e harmônico processo de crescimento e diferenciação das células. As alterações que ocorrem nas moléculas de adesão levarão ao crescimento anômalo dos tecidos.

1.8.6 Mucinas

Mucinas são grandes moléculas glicoproteicas em forma de bastão devido à presença de aglomerados de serinas e treoninas enfileiradas em sítios repetidos. Muitos glicoconjugados epiteliais pertencem à família MUC. No epitélio normal polarizado as mucinas são expressas exclusivamente na sua região apical em direção ao lúmen do órgão. As mucinas solúveis são secretadas, exclusivamente, na cavidade dos órgãos. Nas células malignas esta organização é perdida, onde as mucinas podem estar expressas tanto no citoplasma como em qualquer parte da superfície celular e podem ainda ser lançadas no sangue (VARKI, A., *et al*, 1999). Alguns estudos avaliaram a expressão de diferentes tipos de mucinas em carcinomas; por exemplo, MUC1, MUC2, MUC3, MUC5AC, MUC6 apresentam alterada expressão em carcinomas de mama (SCHMITT, FC., ROSE, V., 2001).

As mucinas parecem ser os principais alvos de glicosilação alterada nos carcinomas, conferindo um potencial de metástase às células malignas. Devido a glicosilação incompleta as células passam a expressar formas imaturas dos resíduos serina e treoninas, os conhecidos antígenos T e Tn (VARKI, A., *et al*, 1999). Existe uma correlação entre a expressão destes antígenos e pior prognóstico em pacientes com câncer, notadamente, da mama (SCHMITT, FC, 2000).

1.8.7 Galectinas

Constituem uma família de lectinas endógenas ligantes de glicoconjugados contendo β -galactose com sítios de ligação conservados (ANDRE, A., *et al*, 1999). As galectinas estão amplamente distribuídas no reino animal podendo ocupar diversas localizações sub-celulares, podem ser multivalentes ou oligoméricas. São capazes de promover adesão celular, enquanto que outras apresentam potente atividade biológica, como por exemplo, capacidade para induzir apoptose, alterações metabólicas, ativação celular e mitose (VARKI, A. *et al*, 1999).

Em 1976, foi isolada por Kornfeld, a primeira galectina de mamífero (Galectina-1) de extratos de coração e pulmão bovinos. Outros elementos desta família foram sendo descobertos em diversos tecidos, recebendo uma sistematização em 1994 (VARKI, A. *et al*, 1999).

O domínio de ligação das galectinas tem, aproximadamente, 130 aminoácidos; porém, apenas poucos resíduos estabelecem contato direto com o carboidrato ligante (VARKI, A. *et al*, 1999).

A expressão destas moléculas é altamente regulada. Quando existem mutações ocorrem defeitos no desenvolvimento animal, com alterações da fisiologia e diferenciação celular (VARKI, A. *et al*, 1999).

Foi demonstrado que a presença de RNAm para galectinas humanas 1, 2, 3, 4, 7, 8 e 9 em tumores de mama, de cólon, de pele, de rim, sistema hematopoético e sistema urogenital mostram expressão aumentada de uma forma específica dependente do tipo celular; por exemplo, a positividade para galectinas 2 e 4 ficou confinada a uma fração significativa de tumores cólon-retal e neural (LAHM, H., *et al*, 2001). Outro estudo demonstrou uma correlação com um aumento da galectina-1 e redução da galectina-3, ou uma redução de ambas as galectinas com a ocorrência de metástase ganglionar em tumores de mama e cólon (ANDRE, A., *et al*, 1999).

1.9 Lectinas no câncer de mama

Os estudos epidemiológicos e experimentais apontam que o câncer de mama se desenvolve a partir do epitélio normal através de múltiplos estágios intermediários de progressão tumoral, que compreendem a hiperplasia ductal típica, hiperplasia ductal atípica, carcinoma *in situ* e por último, carcinoma invasivo (DUPONT *et al*, 1993; SLOANE, 1993) (Figura 4).

O maior problema no tratamento dos cânceres é que podem se disseminar para sítios distantes do organismo e uma vez desenvolvidos múltiplos focos tumorais não existe um tratamento efetivo e em geral as metástases determinam a morte do paciente. O processo de metástase é insidioso, progressivo e complexo (NOGUCHI *et al*, 1993). A possibilidade de conhecer e prever a disseminação tumoral depende do entendimento da microanatomia local e de seu microambiente e das propriedades das células tumorais envolvidas (SCHMITT *et al*, 1994).

Na verdade, estudar as interações da membrana celular tumoral com o ambiente extracelular pode possibilitar uma compreensão das etapas importantes da cascata metastática e o desenvolvimento de meios efetivos de intervenção terapêutica.

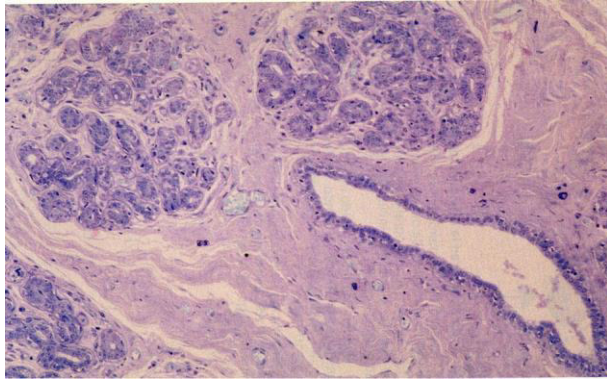
Em câncer de mama não existe um modelo metastático animal de relevância clínica. Schumacher e colaboradores têm estudado o processo metastático usando lectinas em ratas imunodeficientes. A lectina HPA funciona como um marcador metastático promissor (SCHUMACHER *et al*, 1995).

Um outro grande problema no câncer de mama é que cerca de 50% das pacientes têm metástase axilar no momento de seu diagnóstico e necessitam de terapia adjuvante. Da outra metade das pacientes com axila negativa, 70% tem cura com a cirurgia e 30% terá recidiva e/ou metástase (MICHELL *et al*, 1995). A procura de fatores prognósticos que possam prever qual dos pacientes com axila negativa terão progressão de sua doença é de fundamental importância, já que implica em uma conduta terapêutica adjuvante. Com este desafio, muitos fatores prognósticos têm sido pesquisados, como o tamanho do tumor, o envolvimento dos linfonodos axilares, tipo e grau histológico, receptores hormonais e índice proliferativo, mas de longe o melhor deles é o estado dos linfonodos axilares (BROOKS *et al*, 1993; SCHMITT *et al*, 2000). Dentre os diversos fatores prognósticos moleculares investigados, existem aqueles que rotineiramente devem ser avaliados pelo patologista e informados ao clínico para ajudar nas condutas terapêuticas: os receptores de estrógeno e de progesterona, a taxa de proliferação celular tumoral pelo anticorpo MIB-1, os oncogenes c-erb-B2 e p53; o antígeno Sialil-Tn, e o índice angiogênico são dois outros fatores bastante promissores (SCHMITT *et al*, 2000). Dentro de perspectiva do estudo das lectinas como um marcador prognóstico, a HPA está fortemente correlacionada com o acometimento dos gânglios axilares (SCHUMACHER *et al*, 1995; BROOKS, 2000).

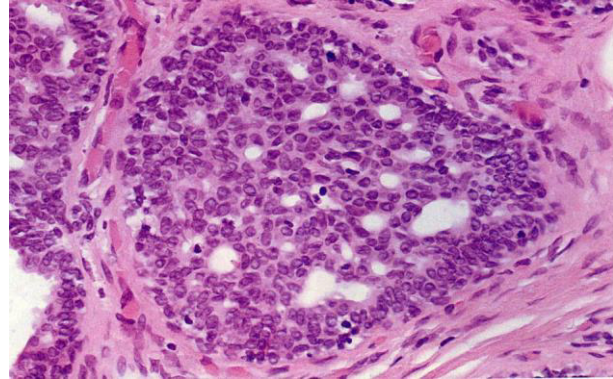
Os estudos do câncer de mama utilizando lectinas demonstram a heterogeneidade para expressão de várias lectinas dentro da população tumoral (TOMAS *et al*, 1993), outros relacionam a expressão de sítios de ligação com receptores hormonais, também com o aumento de ácido siálico nas células tumorais (TOMAS *et al*, 1993), e ainda expressão das lectinas com o potencial metastático (SCHUMACHER *et al*, 1995; RAK *et al*, 1992; FUKUTOMI *et al*, 1991; BROOKS *et al*, 1991; 2000), e com muitos outros fatores prognóstico para câncer de mama, como a ploidia, oncogenes e fração de fase S, dentre outros.

Alguns também correlacionam a sobrevida e tempo livre de doença. Estes achados de literatura podem ser vistos nas Tabelas 1 e 2, que mostram uma revisão bibliográfica de 18 anos (1983 a 2001).

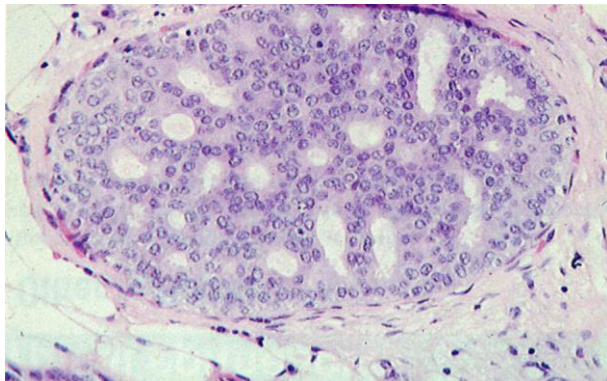
FIGURA 4 - Progressão tumoral no câncer de mama.



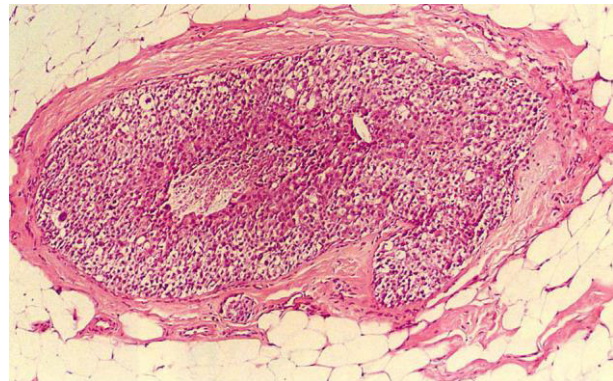
A: mama normal em repouso



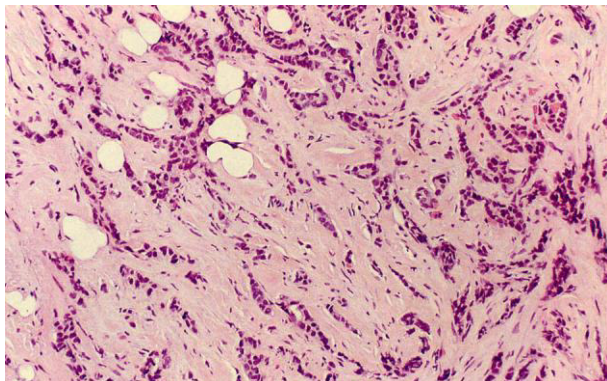
B: hiperplasia ductal típica (HDT)



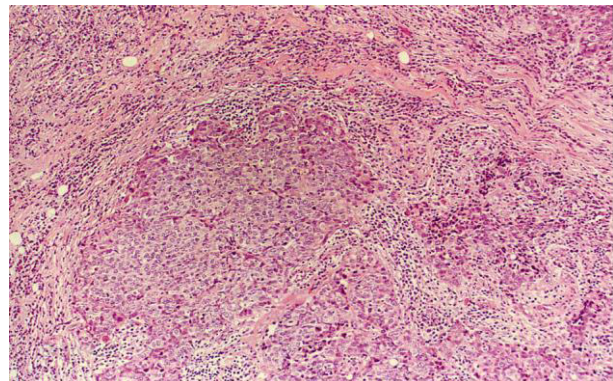
C: hiperplasia ductal atípica (HDA)



D: carcinoma in situ (CDIS)



E: carcinoma ductal invasivo (CDIV)



F: metástase ganglionar

Tabela 1 – Trabalhos publicados entre 1983 e 2001 sobre interação entre lectinas e câncer de mama, relacionadas com parâmetros clínicos, patológicos e moleculares.

Parâmetros	Correlação Positiva	Referências
Taxa de Proliferação	4*/4	Brooks, AS & Leathem, AJ (1993)*;, Rak, JW, et al (1992)*; Klein, PJ, et al (1983)* e Vierbuchen, M, et al (1983)*.
Terapêutica Endócrina	2*/2	Klein, PJ, et al (1983)* e Vierbuchen, M, et al (1983)*.
Heterogeneidade	8*/8	Mustac, E, et al (1996)*; Schumacher, U, et al (1996)*; Krogerus, L, et al (1990)*; Schumarcher, U, et al (1995)*; Michell, BS, et al (1995)*; Rak, JW et al (1992)*; Dansey, R, et al (1989)* e Leathen, A, et al (1983)*.
Receptor da proteína do leite	2*/2	Klein, PJ, et al (1983)*, Schmuacher, u et al (1995)*
Receptor de Estrógeno	7*/8	Mustac, E, et al (1996)*; Usa et al (1992)*, Fukutomi, t, et al, (1989)*, Leathen, A, et al (1983)*, Dansey R et al (1988)**, Helle, M & Krohn, K (1986)*, Remmele, W et al (1986)* Helpap, B et al (1989)*.
Recorrência e Sobrevida	11*/16	Barry, J D et al (1984)**,Brooks AS, et al (1996)*, Krogerus, L, et al (1990)*, Tomas, M, et (1993)*, Fukutomi, T, et al (1991)*, Brooks SA, et al (1991)*, Walker, RA, et al (1990)**, Alam, SM, et al (1990)**, Fukutomi, t, et al, (1989)*, Marth, R, et al (1988)**, Fenlon, S, et al (1987)*, Leathem, AJ, et al (1987)*, Barry, JD, et al (1994)**, Gusterson, BA et al(1993)*, Dansey, R et al 1988)*, Dwek, MV (2001)*.
Metástase axilar	13*/16	Mustac, E, et al (1996)*, Schumacher, U, et al (1996)*, Noguchi, M, et al (1993)*, Noguchi, M, et al (1993)*, Tomas, M, et (1993)*, Brooks, AS & Leathem, AJ (1993)**, Brooks SA, et al (1991)*, Walker, RA, et al (1990)**, Leathen, A, et al (1983)*., Fenlon, S, et al (1987)*, Mitchell, BS, et al (1998)*, Gusterson, BA et al (1993)*, Melato, M et al (1998)**, Ludwig group (1993)*, Alam, SM et al (1990)*, Brooks, SA (2000)*.
Inibição da proliferação celular	1*/1	Marth, R, et al (1988)*
Progresso tumoral	7*/8	Barry, J D et al (1984)**, Marth, R, et al (1988)*, Henou, C, et al (1998)*, Karuma, V, et al (1992)*, Skutelsky, E et al, (1988)*, Streets, AJ et al (1996)*, Dandey, R et al (1988)*, Remani, V et al (1989)* .
Nucleólos	1*/1	Helpap, B. (1989)*
Grau nuclear	2*/2	Fukutomi, t, et al, (1989)*, Alam, SM et al (1990)*
Oncogene	1*/1	Leathen, A, et al (1983)*.
Tamanho do tumor	2*/3	Brooks SA, et al (1991)**, Alam, SM, et al (1990)*, Leathen, A, et al (1983)*.
Grau histológico	4*/5	Mustac, E, et al (1996)*, Brooks SA, et al (1991)**, Alam, SM, et al (1990)*, Leathen, A, et al (1983)*., Karuma, V, et al, (1992)*
Tipo histológico	1*/1	Leathen, A, et al (1983)*.
Fase S	1**/1	Brooks SA, et al (1991)**
Idade	1**/1	Brooks SA, et al (1991)**
Amplificação do C – Myc	1*/1	Fukutomi, T, et al (1991)*
Amplificação do C – Erb	1*/2	Tomas, M, et (1993)*, Fukutomi, T, et al (1991)*
Metástase cerebral	1*/1	Schumacher, U, et al (1992)*
Aneuploidia	3*/3	Mustac, E, et al (1996)*, Noguchi, M, et al (1993)*, Brooks, AS & Leathem, AJ (1993)*
Metástase para mamária interna	1*/1	Noguchi, M, et al (1993)*

* Correlação estatística; ** Não correlação estatística.

Tabela 2 –Lectinas utilizadas em publicações relacionadas com câncer de mama entre 1983 – 2001

Lectinas	Referências
PNA (Peanut Agglutinin)	Barry, J D et al (1984), Mustac, E, et al (1996), Usa et al (1992), Walker, RA, et al (1990), Marth, R, et al (1988), Marth, R, et al (1988), Kelli, M, et al, (1996), Reusmele, W, et al (1096), Klein, PJ, et al (1983), Vierbuchen, M, et al (1983), Mitchell, BS et al (1998), Karuma, V et al (1992), Skutelsky, E et al (1988), Dansey, R et al (1988), Melato, M et al 1998), Remmele, W et al (1986) .
Erva dos cancos (Pokeweed)	Vierbuchen, M, et al (1983)
LTa (<i>Lotus Tetragonolobus</i> Agglutinin)	Walker, RA, et al (1990), Vierbuchen, M, et al (1983), Karuna, V et al (1992).
WGA (Wheat Germ Agglutinin)	Walker, RA, et al (1990), Marth, R, et al (1988), Vierbuchen, M, et al (1983), Karuma, V et al (1992), Dansey, R et al (1988), Skutelsky, E et al (1988).
<i>Bandeiraea 1</i>	Leathen, A, et al (1983)
SBA (Soyabean Agglutinin)	Leathen, A, et al (1983), Karuma, V el al (1992).
Con A (Concavalin A)	Walker, RA, et al (1990), Alam, SM, et al (1990), Marth, R, et al (1988), Leathen, A, et al (1983), Karuma, V et al (1992), Skutelsky, E et al (1988), Dansey, R et al (1988), Alam, SM et al (1990) .
<i>(RCA-Ricinuscommunis Agglutinin)</i>	Reusmele, W, et al (1096), Karuma, V et al (1992), Skutelsky, E et al (1988).
HPA (<i>Helix Pomatia Agglutinin</i>)	Tumner, GA, et all (1997), Brooks AS, et al (1996), Schumacher, U, et al (1996), Noguchi, M, et al (1993), Noguchi, M, et al (1993), Tomas, M, et (1993), Tomas, M, et (1993), Schumacher, U, et al (1995), Michell, BS, et al (1995), Brooks, AS & Leathem, AJ (1993), Schumacher, U, et al (1996), Usa et al (1992), Fukutomi, T, et al (1991), Brooks SA, et al (1991), Alam, SM, et al (1990), Fukutomi, T et al, (1989), Mitchell, BS et al (1998), Fenlon, S et al (1987), Streets, AJ (1996), Gusterson, BA et al (1993), Alam, SM et al (1990), Brooks, SA (2000), Dwek, MV (2001).
UEA I (<i>Ulex Europeus Aggutinin</i>)	Walker, RA, et al (1990), Fenlon, S et al (1987), Skutelsky, E et al (1988).
<i>Artocarpus integrifolia (Jacalina)</i>	Remani, U et al (1989).

1.10 Caracterização da frutalina

Artocarpus incisa (fruta-pão) pertencente à família *Moraceae*, classe Magnoliadae e subclasse Hemaneliadae é amplamente encontrada por todo Brasil. (Figura 5). Esta família é formada por aproximadamente 75 gêneros e 1550 espécies tropicais, sendo que apenas poucas ocorrem nas regiões temperadas. No Brasil podem ser encontrados 28 gêneros com cerca de 340 espécies (BARROSO, 1978). Somente dos gêneros *Artocarpus* e *Maclura*, foram isoladas e caracterizadas lectinas.

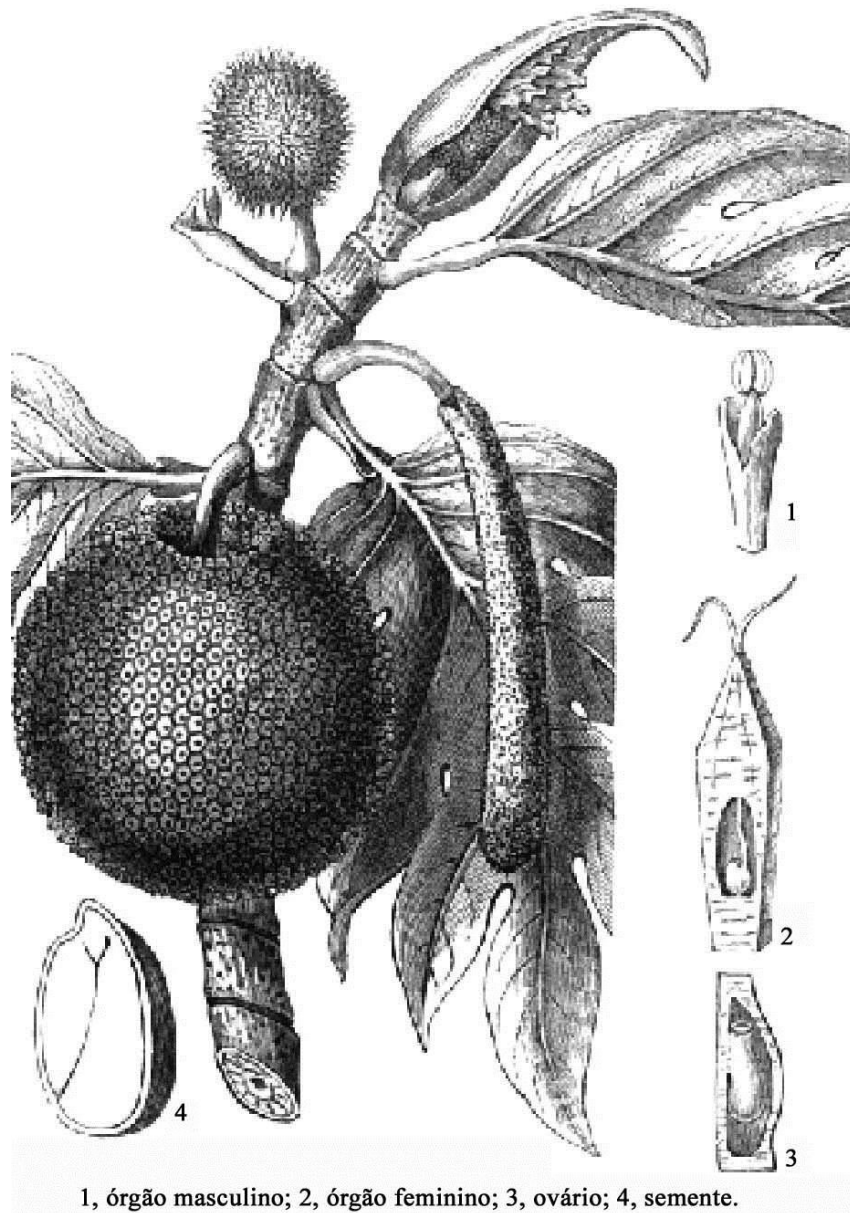


Figura 5 – Fruta-pão (*Artocarpus incisa*).

O gênero *Artocarpus* é composto por cerca de 50 espécies; dentre estas há várias espécies que contêm lectinas em suas sementes. A primeira lectina isolada na família *Moraceae* pertencente ao gênero *Maclura*, foi isolada de sementes da espécie *M. pomífera*. Esta lectina aglutina fortemente eritrócitos humanos e é mitogênica para linfócitos.

O gênero *Artocarpus* possui várias lectinas isoladas e caracterizadas. A primeira delas foi *A. integrifolia* (MOREIRA & AINOUS, 1977), conhecida como jacalina, sendo a lectina mais estudada deste gênero e de toda a família. A jacalina é uma glicoproteína ligante de α -D-galactopiranoídeos (BASU *et al*, 1988), embora ligue fortemente oligossacarídeos α -ligados ao antígeno Thomsen-Friedenreich mais fortemente que outros dissacarídeos (SASTRI, 1986). A jacalina é uma glicoproteína tetramérica de aproximadamente 56 kDa formada por quatro subunidades α , ligadas não covalentemente (AUCOUTURIER, 1987) e um pequeno peptídeo de 20 resíduos, a subunidade β . A estrutura tridimensional da jacalina complexada com metil α -D-galactose foi recentemente caracterizada por cristalografia em que cada subunidade é formada por um β prisma simétrico, composto por três grupos de quatro folhas β . A lectina exibe um novo sítio ligante envolvendo o N-terminal da cadeia α e que é gerado por modificações pós-tradução envolvendo proteólise, se constituindo no primeiro exemplo conhecido no qual tal modificação foi feita para conferir a especificidade por carboidratos. Este novo tipo de enovelamento deve ser característico da família *Moraceae*. A estrutura fornece uma explicação à especificidade relativa da lectina por derivados de galactose e fornece detalhes da base estrutural de sua especificidade pelo antígeno T (SANKARANARYANAN, 1996).

Uma outra lectina, manose específica com forte efeito estimulador da migração de neutrófilos foi detectada também em sementes de *Artocarpus integrifolia* (MIRANDA, 1991) e isolada posteriormente (SANTOS, 1994) sendo denominada de KM+.

A espécie *Artocarpus incisa* popularmente conhecida como fruta-pão, é uma árvore de médio porte, podendo atingir 15 metros de altura, de raízes profundas e caule de casca cinzenta e lisa com 80 a 90 cm de diâmetro, folhas grandes de 30 a 90 cm de comprimento por 30 a 45 cm de largura, alternadas em simples, coriáceas, curvadas na base, recortadas em 5 a 7 lobos, raramente inteiras, de cor verde escura. Suas flores são sem pétalas e muito pequenas. Há duas variedades de fruta-pão que diferem exclusivamente no fruto. A variedade *apyrena* não

possui sementes ou se as possui são atrofiadas (variedade não seminífera). A variedade com sementes, conhecidas como fruta-pão de caroço, possui fruto que pesa cerca de 1 Kg, com epiderme formando protuberâncias hexagonais, massa ou polpa em pequena quantidade, envolvendo em média 80 sementes (Figura 4). Os primeiros estudos com a variedade seminífera de *Artocarpus incisa*, culminaram no isolamento de uma lectina (MOREIRA & OLIVEIRA, 1983) e posteriormente nomeada frutalina (MONTEIRO *et al*, 1998). A frutalina aglutina hemácias de vários animais, aglutinando fortemente as hemácias humanas, não apresentando especificidade por qualquer antígeno do sistema ABO.

A frutalina é uma glicoproteína alfa-D galactose ligante, contendo 2,1% de carboidratos em sua estrutura. Apresenta elevados teores de aminoácidos ácidos, hidroxilados e hidrofóbicos e baixo teor de aminoácidos sulfurados (MONTEIRO, 1998).

A frutalina é uma proteína tetramérica, que apresenta uma massa molecular aparente, dependente do meio, de 48kDa, com formação de tetrâmero apenas em pH alcalino de 10 (Figura 6). A presença do açúcar ligante parece estabilizar a estrutura quaternária, mantendo a estrutura tetramérica mesmo em valores de pH ácidos. A frutalina é composta por duas subunidades de 15,5 kDa e duas de 12 kDa. A estrutura secundária desta lectina é formada predominantemente por folhas β antipareladas (MONTEIRO, 1998).

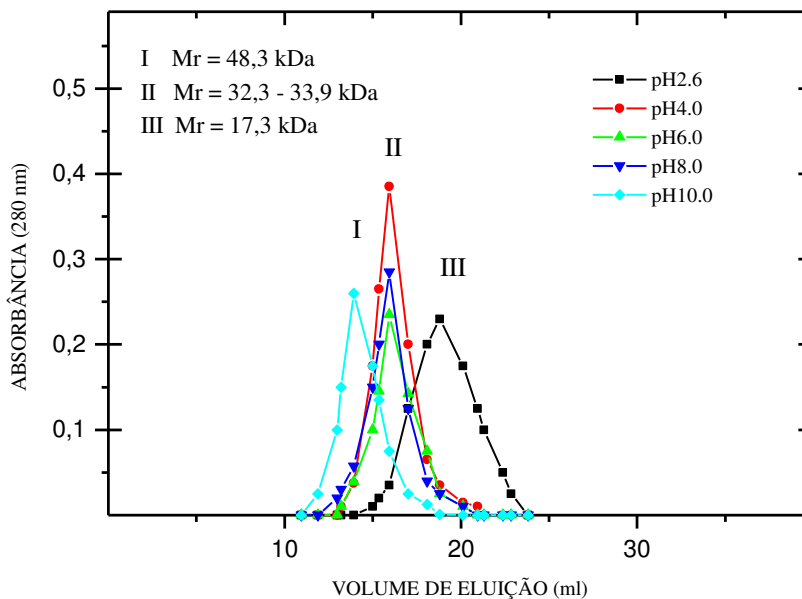


Figura 6 – Cromatografia de filtração em gel da frutalina em diferentes valores de pH. (Cedido por MONTEIRO, 1998)

A frutalina é uma proteína de estabilidade moderada. A desnaturação térmica desencadeia quase que simultaneamente um afrouxamento da estrutura terciária, a perda de atividade hemaglutinante e da estrutura secundária organizada. Quando tratada em diferentes valores de pH, só apresenta modificações significantes ao nível de estrutura secundária e terciária, apenas em pH12. Agentes caotrópicos são capazes desnaturar a frutalina (MONTEIRO, 1998).

Também de sementes de *Artocarpus incisa* foi isolada uma lectina manose específica, conhecida como frutapina e que apresenta muitas semelhanças com a KM+ (MONTEIRO, 1997).

As lectinas da família Moraceae têm-se tornado ferramentas em imun química e imunologia celular (AUCOUTURIER *et al*, 1987). A jacalina é comumente usada em imun química porque é capaz de precipitar IgA e IgD humanos (ROQUE-BARREIRA, 1985) e é seletivamente mitogênica para linfócitos TCD4⁺ humano (BLASCO *et al*, 1996). A frutalina quando comparada com a jacalina (*Artocarpus integrifolia*) apresenta uma grande semelhança em torno de 97% (MONTEIRO, 1998)

2 Hipótese de Trabalho

Existe uma necessidade de se desenvolver métodos que possam detectar alterações significativas em células transformadas com acurácia diagnóstica para se obter informação concernente ao potencial de malignidade. Muitos estudos usando lectinas mostraram alterada expressão de glicoconjugados nas células tumorais. A frutalina, uma lectina α -D-galactose ligante seria capaz de identificar modificações de açúcares na superfície celular do epitélio mamário alterado? O anticorpo anti-frutalina funcionaria também como um possível marcador epitelial?

2.1 Estratégia de trabalho

Utilizar a frutalina como sonda e observar o padrão de marcação avaliando desde o epitélio mamário normal, metaplasia apócrina, lesões hiperplásticas, carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo e metástase ganglionar.

Avaliar se o anticorpo anti-frutalina proporciona a ocorrência ou não de marcações apenas inespecíficas ou que possam ser utilizadas como marcadoras de células epiteliais, estudando desde o epitélio mamário normal, metaplasia apócrina, lesões hiperplásticas, carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo e metástase ganglionar.

2.2 Observações correlacionadas

Verificar o efeito de alterações do pH sobre a frutalina nos resultados dos ensaios imunohistoquímicos.

Correlacionar a marcação da frutalina e do anticorpo anti-frutalina com fatores prognósticos: idade, tamanho do tumor, grau histológico, receptores de estrógenos e metástase axilar.

Comparar os resultados de marcação da frutalina com a jacalina e outras lectinas citadas na literatura relacionadas com o câncer de mama.

3 Material e Métodos

3.1 Pacientes e tumores

As pacientes foram aquelas atendidas no Hospital do Câncer do Instituto do Câncer do Ceará e cujos exames anatomopatológicos das peças cirúrgicas foram analisadas no laboratório de patologia do referido hospital. Foram estudadas 23 amostras de epitélio mamário normal, 18 amostras de metaplasia apócrina, 9 amostras de hiperplasia ductal típica, 7 amostras de hiperplasia ductal atípica, 18 amostras de carcinoma ductal *in situ*, 26 amostras de carcinoma ductal invasivo e 13 amostras de metástases ganglionares.

Nos casos de carcinomas a idade das pacientes variou de 32 a 81 anos com a média de 55,7 anos; o tamanho do tumor variou de 1,5 a 14 cm, com a média de 4,9 cm. No grupo das hiperplasias, a idade variou de 27 a 69 anos, com a média de 52,3 anos e o tamanho do tumor variou de 1,5 a 5 cm, com a média de 3,2 cm.

Os tumores foram medidos em três dimensões, fixados em formalina, incluídos em parafina, cortados em 5 μ m e corados por Hematoxilina e Eosina (HE). Utilizou-se a graduação histológica de ELSTON e ELLIS, 1991).

3.2 Linfonodos

Os casos selecionados tinham no mínimo 10 linfonodos isolados para as pacientes do grupo axila negativa.

3.3 Isolamento e purificação da frutalina

O isolamento da frutalina seguiu as etapas abaixo:

3.3.1 A semente

As sementes de *Artocarpus incisa*, (Fruta-pão de caroço) provenientes do município de Maranguape, Estado do Ceará, foram destegumentadas, desidratadas com acetona e secas ao ar livre.

3.3.2 A farinha

A farinha foi obtida pela trituração das sementes livres de tegumento e desidratadas, reduzidas a uma farinha fina (60 mesh), peneirada e acondicionada em frascos fechados à temperatura ambiente.

3.3.3 O extrato total

A extração das proteínas foi feita suspendendo-se a farinha em solução de NaCl 0,15 M, na proporção 1:10 (m/v) e deixada em agitação contínua por 30 minutos à temperatura ambiente. A suspensão obtida foi centrifugada a 8.000 xg por 30 minutos a 4°C, obtendo-se um resíduo que foi re-extraído e posteriormente descartado, e os sobrenadantes reunidos, constituindo o extrato total.

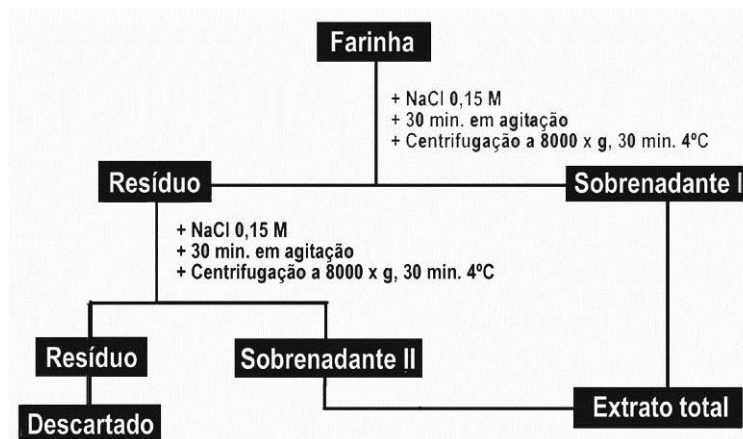


Figura 7 – Esquema do isolamento da frutalina

3.3.4 Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade é uma técnica de isolamento de macromoléculas biológicas, que utiliza o princípio da ligação reversível destas macromoléculas a ligantes específicos. Envolve a preparação de uma matriz de ancoragem que é um polímero de

carboidratos que pode ser de diversas naturezas como Agarose, Celulose, Dextrano, Poli(acrilamida), Galactomanana, dentre outras. À matriz é preso, covalentemente, o ligante específico para a substância que se está estudando. Esta é conhecida como fase estacionária seletiva da cromatografia de afinidade. Quando a amostra contendo a molécula de interesse (analito) é aplicada sobre a matriz, a mesma será retida através de interações fracas reversíveis. As demais substâncias contidas na solução aplicada, não interagindo com o ligante, são eluídas com a solução de equilíbrio.

A eluição das moléculas ligadas é feita empregando-se substâncias com maior afinidade pela molécula que se deseja purificar, do que o ligante estacionário. A eluição do analito também é possível por alteração do pH e/ou força iônica do meio, que torna o complexo molécula-ligante menos estável, levando à dissociação do mesmo.

A cromatografia de afinidade pode ser empregada para isolamento de várias macromoléculas, como lectinas, enzimas, antibióticos, antígenos, ácidos nucleicos, proteínas transportadoras, drogas, receptores hormonais, entre outros.

3.3.5 Cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana extraída de *Adenantha pavonina*

Para isolar a lectina de *A. incisa*, foram feitas cromatografias de afinidade utilizando colunas preparadas a partir da goma endospermica de semente da leguminosa *Adenantha pavonina* (carolina). A galactomanana extraída do endosperma da *Adenantha pavonina* foi reticulada pela formação de ligações cruzadas com epicolidrina seguindo de perto a metodologia utilizada por TAVARES, 1998. Após a extração, purificação e pulverização a galactomanana de *A. pavonina* foi adicionada NaOH 3N e a mistura foi acrescentada epicolidrina de tal forma a se obter uma concentração final de 3M. A mistura foi mantida em estufa a 40 °C por 24 horas, e em seguida, a temperatura foi aumentada para 70 °C por mais 12 horas. Após estes procedimentos o gel foi passado em peneira de 30 mesh, lavado exaustivamente com água deionizada e HCl 0,1 N para neutralizar o excesso de NaOH, novamente lavado com água e as partículas mais finas desprezadas.

Para a cromatografia de afinidade do Extrato Total obtido das sementes de *Artocarpus incisa* um coluna de galactomanana reticulada de Carolina (20 mL) foi preparada. Para acumular lectina suficiente para o desenvolvimento do trabalho, várias cromatografias foram feitas,

observando a padronização seguinte: volume da coluna de 20mL; volume aplicado de 8mL; fluxo de eluente 30mL/h; solução de equilíbrio e aplicação, NaCl 0,15M; tampão de eluição da lectina β -alanina 0,1M, pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M. A concentração protéica foi monitorada pela absorbância a 280nm. Após a eluição as frações contendo a lectina foram reunidas, dializadas contra a água, liofilizadas e estocadas em *freezer*.

Para controlar a pureza da lectina isolada, a mesma foi submetida à cromatografias, eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo SDS e β -mercaptoetanol e imunoeletroforese em gel de agarose.

3.3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol

Para avaliar a pureza das preparações de frutalina foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol. A eletroforese foi feita segundo o método LAEMMLI (1970), utilizando o sistema vertical da Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, EE.UU. A placa foi montada com um gel de aplicações a 3,5 % de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 1,0 % e o gel de separação a 15 % em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8 e SDS com pH 8,3. As amostras liofilizadas do extrato total e frutalina, obtida em galactomanona e agarose-D-galactose, foram analisadas por eletroforese. A amostra (1 mg) foi dissolvida em 1 ml do tampão Tris-HCl 0,0625 M, com pH 6,8, glicerol e SDS a 1 %, na ausência ou presença de β -mercaptoetanol e submetida à fervura por 5 a 10 minutos. Azul de bromofenol (0,05 %) foi adicionado às amostras para controle das corridas eletroforéticas que foram realizadas a 200 V, 150 a 200 mA durante 1 hora. Os géis foram corados com solução contendo Coomassie Brilliant Blue 250 R a 0,05 % em metanol, ácido acético e água (1: 3: 8). O descoramento foi feito com uma solução de ácido acético, metanol e água (1: 3: 8). Os marcadores de massa molecular utilizados foram: albumina sérica bovina (66 kDa). Ovalbumina (45 kDa), anidrato carbônico (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa), citocromo C (12,4 kDa) e inibidor de calicreína (6,6 kDa).

3.3.7 Cromatografia de filtração em gel Superdex

Uma amostra de frutalina (0,2 mg/ml) em um tampão misto (glicina, acetato, fosfato, tris e borato) 0,01 M foi ajustado para pH 7,4 e submetida à cromatografia de filtração em gel em coluna de Superdex 75 HR (Pharmacia LKD Biotechnology, Uppsala, Suecia) usando HPLC (Bio-Rad, 2800). A cromatografia foi monitorada pela absorbância a 280 nm, coletando-se 0,5 ml por minuto. Para a calibração da coluna utilizaram-se as seguintes proteínas: albumina sérica bovina (BSA), quimiotripsina e citocromo C. O “void” foi determinado com azul de dextrana.

3.4 Soro policlonal anti-extrato total e anti-frutalina

Soros imunes contra o Extrato-total e a lectina de *Artocarpus incisa* foram obtidos por imunização de coelhos da raça Nova Zelândia branca. Os animais foram inoculados via intramuscular com emulsão tendo o antígeno de interesse (10mg de Extrato Total, 2mg de frutalina, em 0,5ml de NaCl 0,15M e 0,5mL de adjuvante completo de Freund). Foram feitas doses de reforço com os mesmos antígenos dissolvidos em 1,0ml de NaCl 0,15M via subcutânea, com 21, 28 e 35 dias. Sete dias após o terceiro reforço procedeu-se à primeira sangria. A seguir, a cada sete dias retirava-se cerca de 10ml de sangue e era inoculado novo reforço até o término do experimento (HARBOE e INGILD, 1973). (Figura 8).

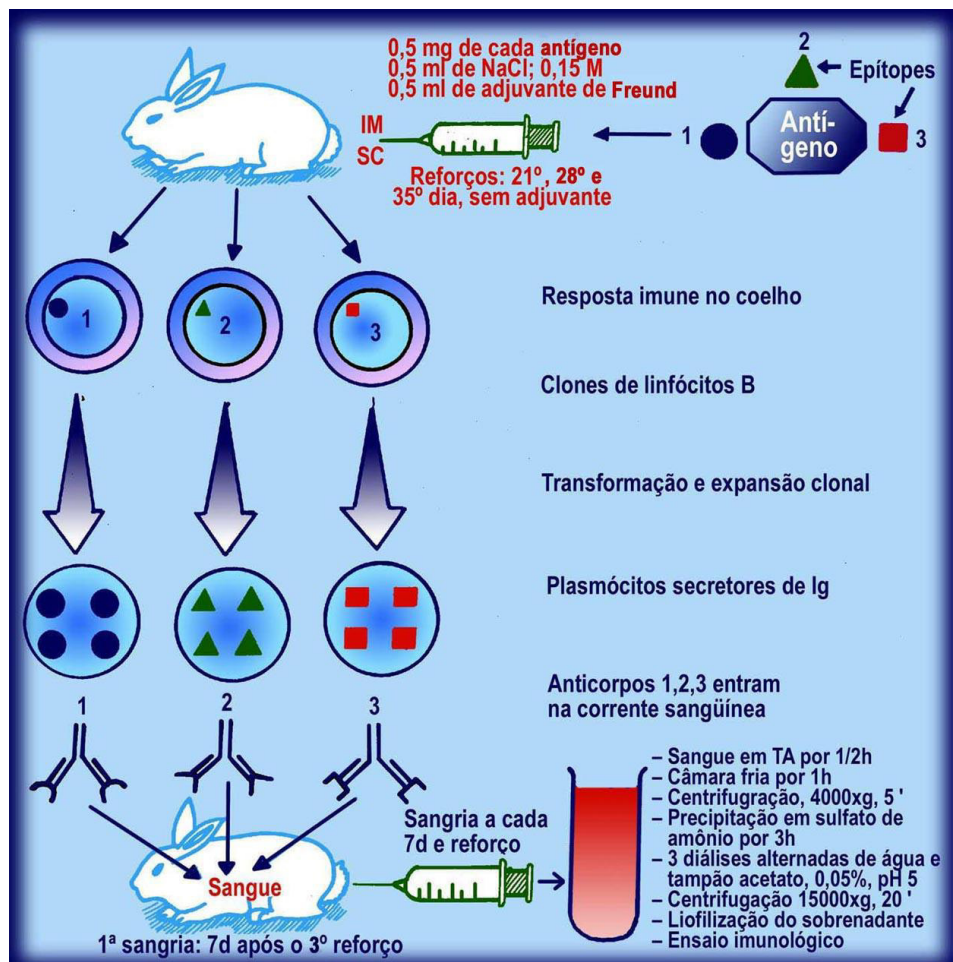


Figura 8 – Esquema de produção de soro policlonal anti-extrato total e anti-frutalina

As imunoglobulinas policlonais foram obtidas por precipitação do soro imune com sulfato de amônio e diálises alternadas com água deionizada e tampão acetato 0,05M, pH 5,0, conforme técnica padronizada (HARBOE e INGILD, 1973).

3.5 Imunodifusão radial dupla

Para avaliar a pureza da lectina, imunodifusões radiais de Ouchterlony (HARBOE e INGILD, 1973) foram desenvolvidas tendo como anticorpo IgG anti-frutalina e como antígenos a própria frutalina ou o extrato total de *Artocarpus incisa*. A técnica foi empregada para demonstrar o reconhecimento específico da frutalina pela IgG anti-frutalina preparada.

3.6 Imunohistoquímica

A histoquímica é o estudo dos constituintes químicos dos tecidos biológicos visualizados *in situ* com ajuda de um microscópio. A imunohistoquímica é uma subárea em que a detecção de um substrato antigênico é feita através de anticorpos específicos que atuam como sondas marcadoras. É uma técnica muito abrangente, sendo utilizada para determinar histogênese de neoplasias histologicamente indiferenciadas; subtipagem (imunofenotipagem) de neoplasias já classificadas quanto à morfologia; identificação de produtos sintetizados por células neoplásicas; identificação de fatores prognósticos nas neoplasias malignas; e, determinação de antígenos de agentes infecciosos (ALVES *et al* 1999; MASON e SAMMONS, 1978).

Um grande avanço na técnica da imunohistoquímica ocorreu devido ao desenvolvimento de procedimentos de recuperação dos antígenos, uma vez que estes ficam mascarados durante as etapas de fixação dos tecidos e sua inclusão em parafina. A utilização de enzimas proteolíticas, a desnaturação pelo calor úmido e a irradiação por microondas, expõem os antígenos alvo da pesquisa. Concomitante, àquele desenvolvimento, surgiram os anticorpos capazes de reagir nos tecidos anteriormente fixados e incluídos em parafina (ALVES *et al.* 1999).

Neste trabalho o estudo iminohistoquímico foi realizado pela técnica da estrep-to-avidina-biotina-peroxidase de cortes histológicos de tecido mamário fixados em formalina e incluídos em parafina e cortados a 5µm de espessura.

3.6.1 Técnica de imunohistoquímica utilizando frutalina (Técnica I) e anticorpo anti-frutalina (Técnica II), como sondas:

1. preparar as lâminas de vidro com substância colante para tecidos;
2. preparar os cortes histológicos na espessura de 5 µm, incubados em estufa a 60 °C, durante 60 minutos;
3. desparafinizar e hidratar em tampão Tris (pH 7.2):
 - xilol, à temperatura de 60 °C, por 15 minutos;
 - xilol, à temperatura ambiente, por 15 minutos;
 - etanol 100%, 3 vezes, por 30 segundos;
 - etanol 95%, por 30 segundos;

- etanol 80%, por 30 segundos;
- etanol 70%, por 30 segundos;
- 4. lavar as lâminas com água destilada;
- 5. colocar as lâminas em um recipiente de plástico, em tampão citrato (pH 6). Colocar as lâminas em microondas, programado em potência máxima. Ligar e esperar a ebulição do tampão, após a qual marcar 7:30 minutos;
- 6. deixar as lâminas no tampão citrato à temperatura ambiente, durante 20 minutos;
- 7. lavar em TBS durante 5 minutos;
- 8. bloquear a peroxidase endógena com H₂O₂, a 3% com metanol, por 10 minutos (repetir, caso necessário);
- 9. lavar com TBS, por 5 minutos;
- 10. incubar em câmara úmida com os primários: (a) *frutalina*, na diluição 1:20 durante 18 horas a 8 °C; (b) *anticorpo anti-frutalina* na diluição de 1:20 durante 18 horas, a 8 °C; (c) preparar os controles (tópico 3.7.2)
- 11. lavar com TBS, por 5 minutos;
- 12. incubar em câmara úmida, com anticorpo secundário (anti-coelho e *anti-mouse*, biotilado), diluído em 1:200, durante 30 minutos;
- 13. lavar em TBS, durante 5 minutos;
- 14. incubar em câmara úmida, com StreptABC-HRP, durante 30 minutos;
- 15. lavar em TBS, durante 5 minutos;
- 16. revelar com diaminabenzidina (DAB), durante 7 minutos. Adicionar 10 ml de H₂O₂ no momento de uso;
- 17. lavar em água corrente;
- 18. contrastar com hematoxilina - 30 segundos (controlar);
- 19. desidratar:
 - etanol, 50%, por 1 minuto;
 - etanol, 80%, por 1 minuto;
 - etanol, 95%, por 1 minuto;
 - etanol, 100%, 3 vezes, por 1 minuto;
 - xilol, 3 vezes, por 1 minuto;
- 23. montar a lâmina em bálsamo;
- 24. observar em microscópio óptico comum;

3.7.2 Controles da técnica de imunohistoquímica

Controles negativos: cortes histológicos de um mesmo caso em que se omite a coloração da frutalina, do anticorpo anti-frutalina, foram submetidos às seguintes situações:

- a. incubação em câmara úmida com galactose a 2 % durante 30 minutos, em temperatura ambiente; em seguida, tirar o excesso e retornar a seqüência da técnica (tópico 3.7.1);
- b. incubação em câmara úmida com a mistura de galactose a 2 % com frutalina na diluição de 1:20 em tampão Tris com pH 7,6 durante 1 hora, em temperatura ambiente; em seguida, tirar o excesso e retornar a seqüência da técnica (tópico 3.7.1);
- c. incubação em câmara úmida com IgG anti-IgG policlonal de rato contra coelho, na diluição de 1:50 (Sigma) durante 18 horas no refrigerador a 8 °C; em seguida, tirar o excesso e retornar a seqüência da técnica (tópico 3.7.1);
- d. incubação em câmara úmida com IgG na diluição de 1:50 durante 1 hora, retirar o excesso, incubar com IgG anti-frutalina na diluição de 1:20 durante 18 horas a 8 °C; em seguida, tirar o excesso e retornar a seqüência da técnica (tópico 3.7.1);

Controle positivo: cortes histológicos de um caso de câncer de mama que foi positivo para frutalina em experimento anterior (projeto piloto).

3.7.3 Variação do pH

Todos os testes de variação de pH foram realizados apenas com a frutalina como sonda. As variações consideradas foram: pH 2,6; pH 4,0; pH 8,6 e pH 10, sendo processadas durante banhos e diluições a partir da etapa (7), da técnica da imunohistoquímica.

3.7.4 Padronização da coloração

Os casos foram considerados positivos para a lectina quando mais de 5% das células eram obviamente positivas ou mais de 50% das células eram fracamente positivas. (BROOKS e LEATHEM, 1995; MUSTAC *et al*, 1996). As colorações foram consideradas fracas (+), fortes (++ e +++).

4 Resultados

4.1 Cromatografia de afinidade do extrato total em coluna de galactomanana de *Adenantha pavonina*.

Foi utilizado neste trabalho, um tipo de cromatografia de afinidade, tendo como matriz a galactomanana obtida de endospermas de sementes de *Adenantha pavonina*, estabilizada com epicloridrina. Esta coluna foi recentemente desenvolvida (TAVARES, 1998) e consiste de ligações éter entre terminais de carboidrato da galactomanana. A galactomanana é formada por uma cadeia linear (α 1-4) de D-Manose, com ramificações (α 1-6) de D-galactose, na proporção de 1,8:1,0 e com alguns poucos resíduos de arabinose e xilose. Demonstrou-se, há bem pouco tempo que a cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana extraída de *Adenantha pavonina* é um método eficiente para purificar a frutalina (MONTEIRO, 1998).

A frutalina foi então purificada por uma metodologia simples, desenvolvida por (MONTEIRO, 1998). O extrato total dissolvido em NaCl 0,15M, foi aplicado à coluna de galactomanana, duas frações foram obtidas. A primeira, foi eluída com solução salina 0.15 M, solução de equilíbrio, que não contém material ligante para a galactose, que corresponde ao primeiro pico na Figura 9; e a segunda fração, corresponde ao segundo pico na mesma figura, foi eluído da coluna com tampão β -alanina 0,1 M, pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M. Este pico (frutalina) podia também ser obtido por eluição da coluna com uma solução de D-galactose 0,2 M, dissolvida na solução de equilíbrio.

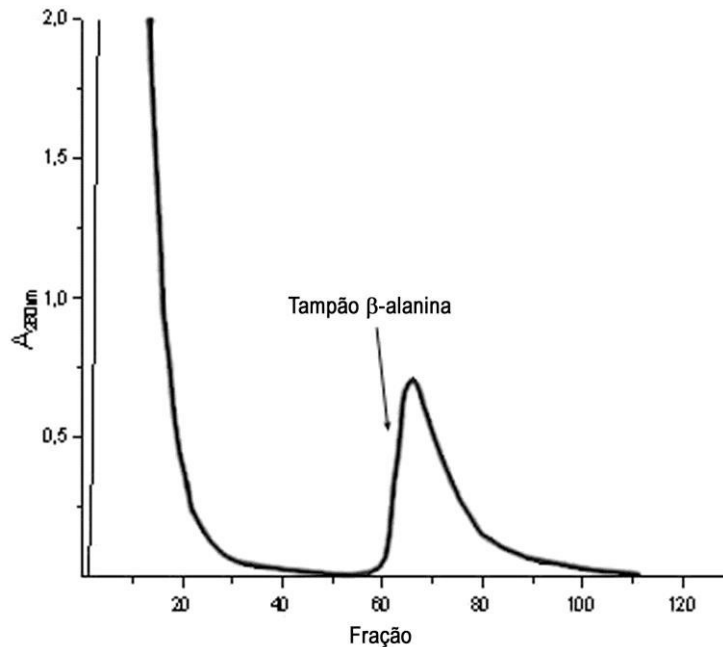


Figura 9 – Cromatografia de afinidade do extrato total de *Artocarpus incisa* em coluna de galactomanana de *Adenanthera pavonina*. A amostra dissolvida em NaCl 0,15M, foi aplicada à coluna equilibrada previamente com a mesma solução. O pico retido foi eluído com β-alanina 0,1M pH 2,6 contendo NaCl 0,15M. Foram coletadas frações de 3,0 mL com fluxo de 30 mL/h.

4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β-mercaptoetanol

O extrato total e a frutalina isolada foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15 % em condições dissociantes e não redutoras (Figura 10). Em condições redutoras, na presença de β-mercaptoetanol, foi encontrado o mesmo perfil. A eletroforese da frutalina obtida em agarose-D-galactose foi também realizada, obtendo-se o mesmo resultado. A frutalina apresentou duas bandas protéicas com massas moleculares aparentes de 12 e 15,5 kDa, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por OLIVEIRA (1980), MOREIRA & OLIVEIRA (1983) e PINTO (1987) que trabalharam com a lectina de fruta-pão purificada por metodologias diferentes. Lectinas isoladas do mesmo gênero (*Artocarpus*) apresentam comportamento similar.

Moreira & Ainouz (1981) isolaram duas isolectinas de *A. integrifolia* (provavelmente, duas formas estruturais da jacalina) que apresentaram duas bandas protéicas de Mr de 11 a 15 kDa, respectivamente.

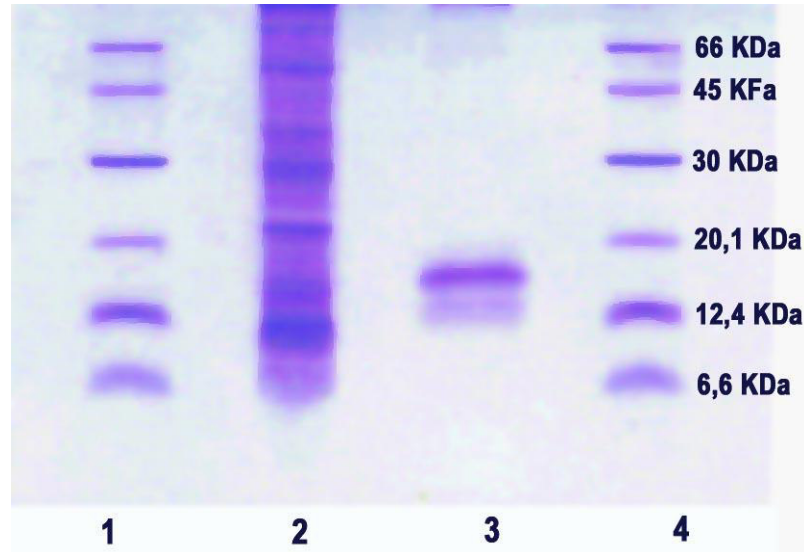


Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) em presença de SDS. Pista (2) extrato total; (3) frutalina; (1 e 4) marcadores de massa molecular. BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), citocromo C (12,4 kDa) e inibidor de caliceína (6,6 kDa).

4.3 Cromatografia de filtração de gel em coluna Superdex

A frutalina foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna de superdex acoplada a uma sistema de HPLC, equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,1 M, com pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M e D-galactose 0,2 M. D-galactose foi usada para prevenir uma possível interação entre a frutalina e o Superdex que tem como constituinte a galactose. O resultado deste experimento pode ser verificado na Figura 11, onde se pode observar a presença de um único pico proteico correspondendo a Mr de 48 kDa.

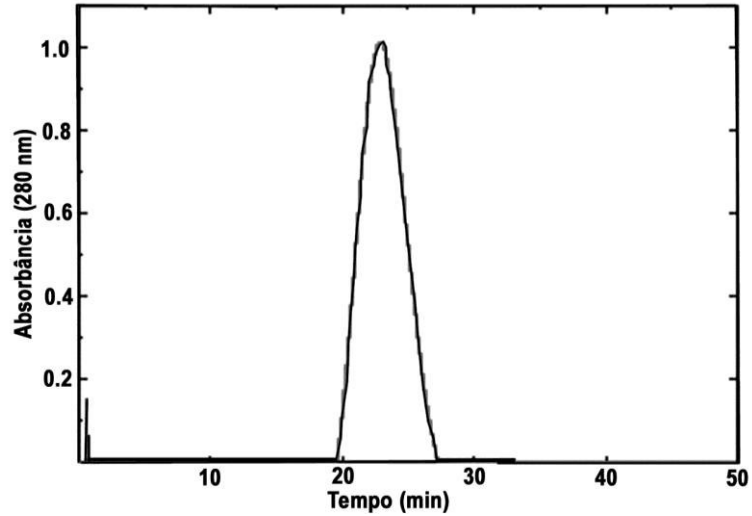
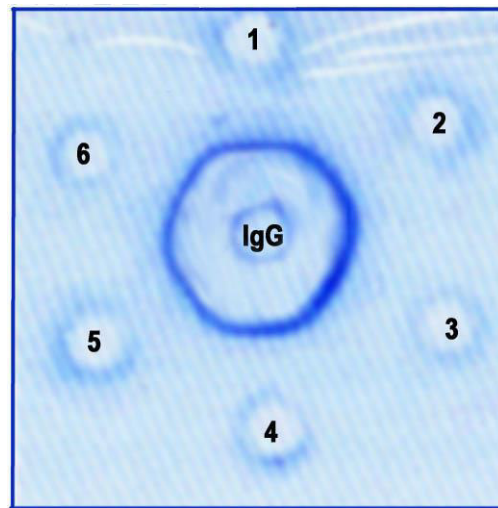


Figura 11 - Cromatografia da frutalina em Superdex 75 HR, acoplada a sistema HPLC. A coluna foi equilibrada e eluída em um tampão misto (glicina, acetato, fosfato, tris e borato) 0,01 M, pH 7,4. A frutalina foi aplicada na concentração de 0,2 mg/ml, no tampão de equilíbrio, à temperatura ambiente. A cromatografia foi monitorada a 280 nm, coletando-se 0,5 ml/minuto.

4.4 Imunodifusão radial

Observou-se formação de um halo completo em torno do poço central (IgG anti-frutalina), refletindo uma identidade total entre o anticorpo e a frutalina, além de evidenciar a semelhança entre esta lectina e a jacalina.



LEGENDA:

1, 2, 3: frutalina, nas diluições 1:4, 1:2 e 1:1, respectivamente.

4, 5, 6: jacalina, nas diluições 1:4, 1:2 e 1:1, respectivamente.

IgG: anticorpo anti-frutalina.

Figura 12 - Imunodifusão radial de soro policlonal anti-frutalina.

4.5 Imunomarcações com frutalina como sonda (Técnica I) e com o anticorpo anti-frutalinina como sonda (Técnica II)

Os resultados quantitativos estão resumidos na Tabela 3 e os de intensidade de coloração nas Figuras 13 e 14.

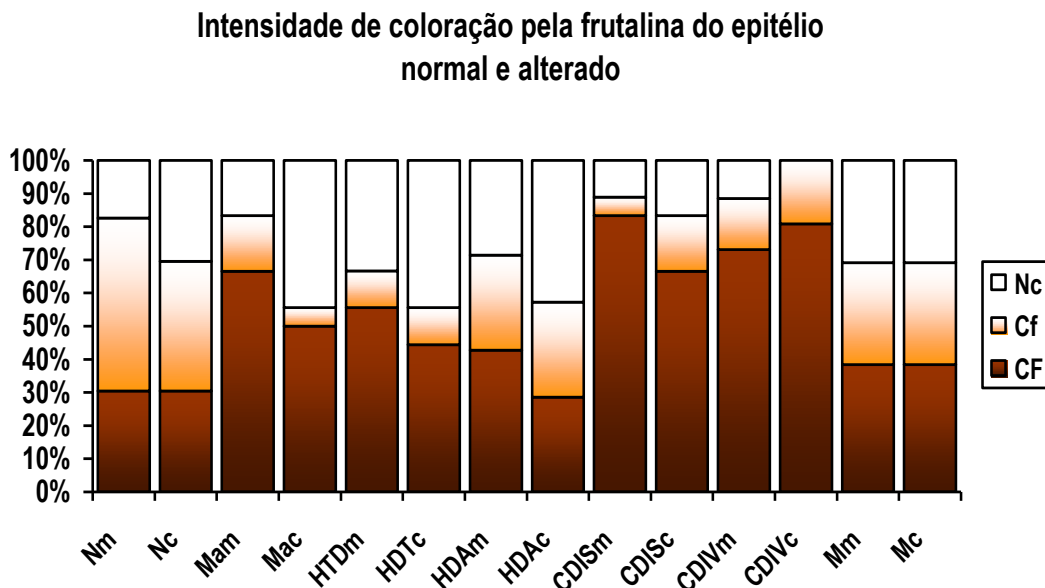
Tabela 3 - Relação quantitativa entre o epitélio mamário normal e as diferentes lesões pelas Técnicas I e II.

Técnica I			Técnica II		
N	m	82,6% (19/23)	N	m	30,4% (7/23)
	c	69,6% (16/23)		c	26,1% (6/23)
Ma	m	83,3% (15/18)	Ma	m	50,0% (9/18)
	c	55,6% (10/18)		c	33,3% (6/18)
HDT	m	66,7% (6/9)	HDT	m	33,3% (3/9)
	c	55,6% (5/9)		c	22,1% (2/9)
HDA	m	71,4% (5/7)	HDA	m	0,0% (0/7)
	c	57,2% (4/7)		c	14,3% (1/7)
CDIS	m	88,9% (16/18)	CDIS	m	27,8% (5/18)
	c	83,3% (15/18)		c	61,1% (11/18)
CDIV	m	88,5% (23/26)	CDIV	m	34,6% (9/26)
	c	100,0% (26/26)		c	69,2% (18/26)
M	m	69,2% (9/13)	M	m	23,1% (3/13)
	c	69,2% (9/13)		c	53,8% (7/13)

LEGENDA:

m = membrana celular; c = citoplasma; N = epitélio normal; Ma = metaplasia apócrina; HDT = hiperplasia ductal típica; HDA = hiperplasia ductal atípica; CDIS = carcinoma ductal *in situ*; CDIV = carcinoma ductal invasivo e M = metástase axilar.

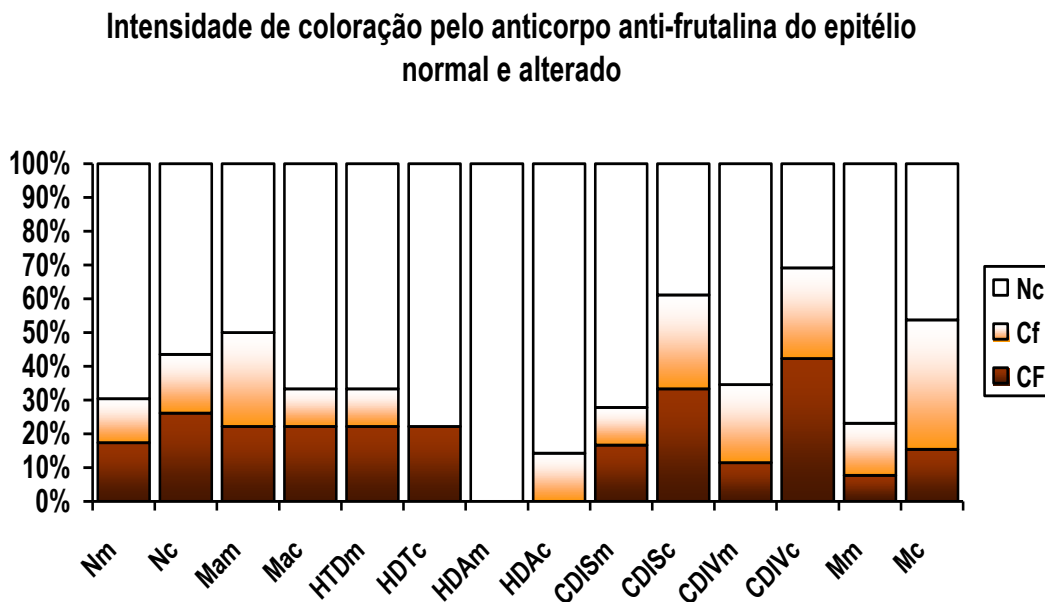
Figura 13 - Comparação da intensidade de coloração da membrana e citoplasma do epitélio normal e alterado pela Técnica I



LEGENDA:

m = membrana celular; c = citoplasma; N = epitélio normal; Ma = metaplasia apócrina; HDT = hiperplasia ductal típica; HDA = hiperplasia ductal atípica; CDIS = carcinoma ductal *in situ*; CDIV = carcinoma ductal invasivo; M = metástase axilar; Nc = não corou; Cf = corou fraco e CF = corou forte.

Figura 14 - Comparação da intensidade de coloração da membrana e citoplasma do epitélio normal e alterado pela Técnica II



LEGENDA:

m = membrana celular; c = citoplasma; N = epitélio normal; Ma = metaplasia apócrina; HDT = hiperplasia ductal típica; HDA = hiperplasia ductal atípica; CDIS = carcinoma ductal *in situ*; CDIV = carcinoma ductal invasivo; M = metástase axilar; Nc = não corou; Cf = corou fraco e CF = corou forte.

Os dados da Tabela 3 e das Figuras 13 e 14 serão explicados a seguir.

4.5.1 Epitélio mamário normal

A frutalina foi expressa no epitélio normal, em geral, fracamente, e predominando, na membrana plasmática, pela Técnica I. Com a Técnica II, a coloração foi menos freqüente e com um predomínio um pouco maior do citoplasma. Há diferença significativa entre as Técnicas I e II ($p = 0,001$) com tendência do anticorpo anti-frutalina de não corar ou corar fracamente as membranas; não é significativa a diferença entre as duas técnicas no que diz respeito ao citoplasma.

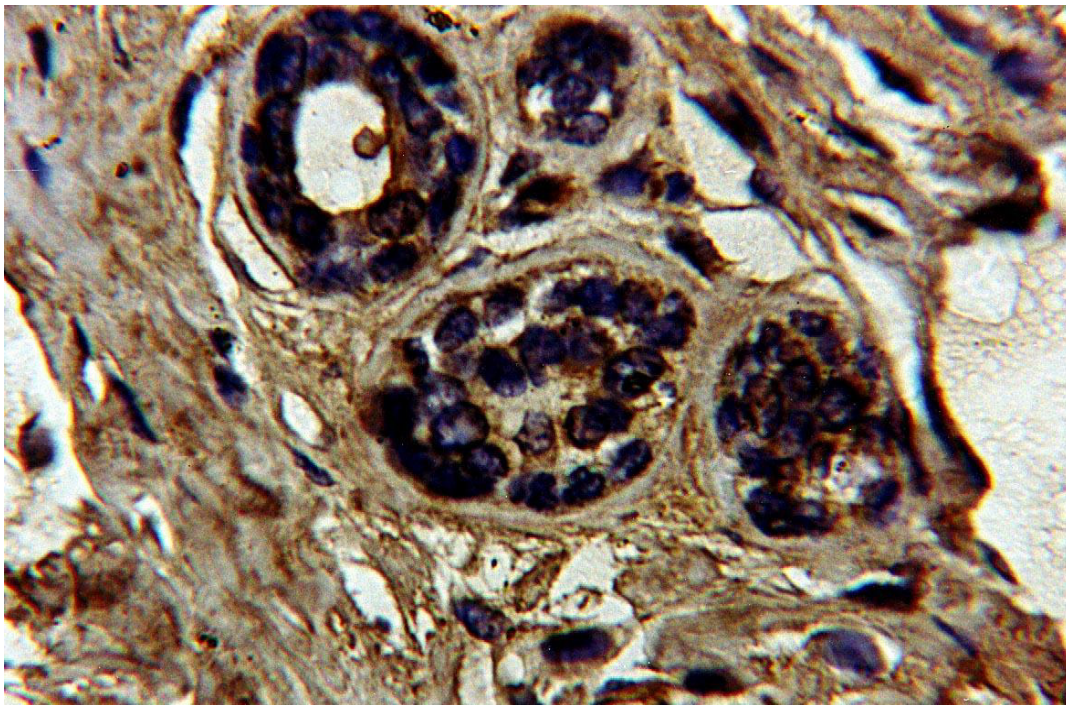


Figura 15 - Ductos mamários normais. A coloração com frutalina estava presente em 82,6% dos casos na membrana e 69,6% no citoplasma, predominando uma intensidade de coloração fraca; 160X.

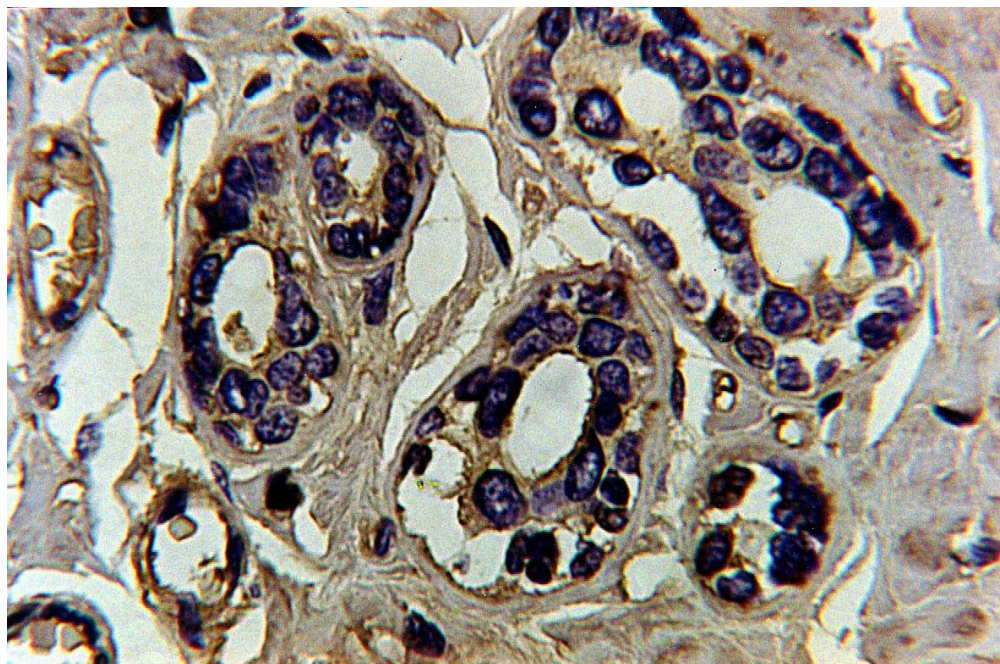


Figura 16 - Ductos mamários normais. A coloração com anticorpo anti-frutalina estava presente em 30,4% dos casos na membrana e 26,1% no citoplasma; 160X

4.5.2 Metaplasia apócrina

Muitos casos de metaplasia apócrina exibiram imunorreatividade pelas Técnicas I e II. A intensidade de coloração foi forte predominantemente nas membranas (Tab. 3 e Fig. 17 e 18).

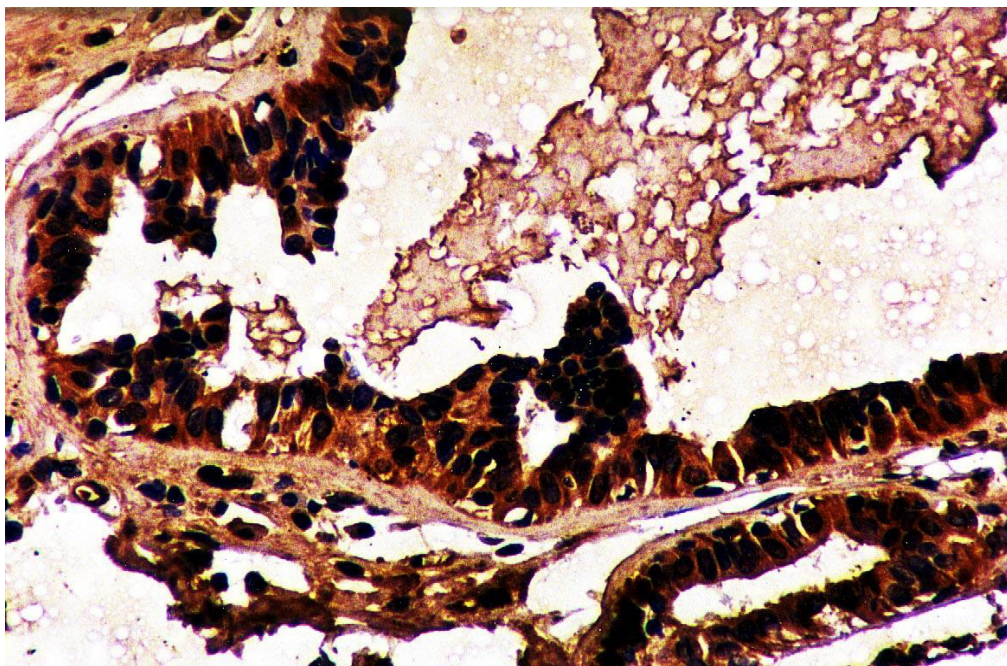


Figura 17 - Metaplasia apócrina. A marcação pela frutalina foi intensa; 160X.

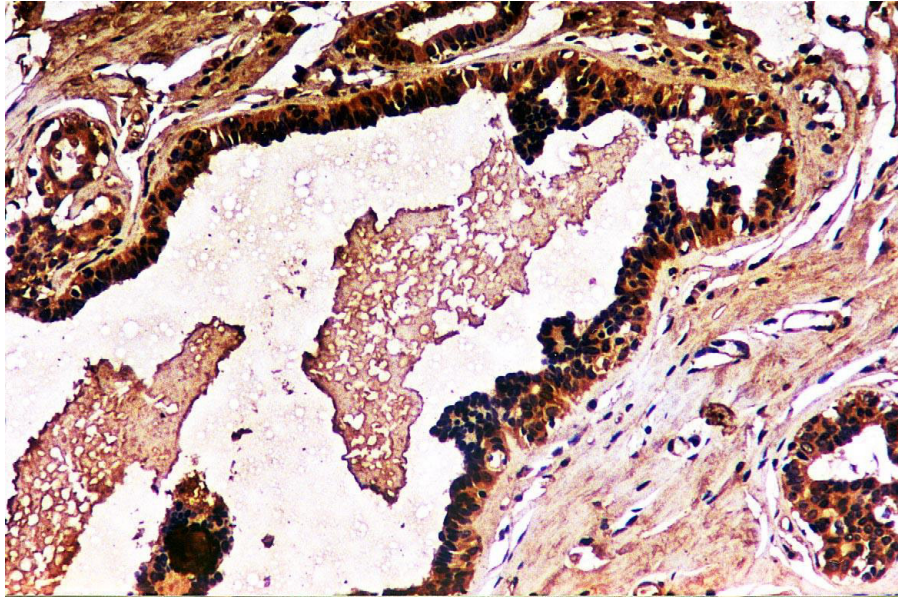


Figura 18 - Metaplasia apócrina. A marcação pelo anticorpo anti-frutalina foi intensa; 80X

A intensidade de marcação da metaplasia apócrina pela frutalina foi mais forte que no epitélio normal e muito semelhante às encontradas nas hiperplasias, carcinomas *in situ* e invasivo.

4.5.3 Hiperplasia ductal (com e sem atipia)

Quando foi utilizada a frutalina como sonda, a intensidade de coloração foi mais intensa na hiperplasia ductal do que no epitélio normal (Técnica I), sendo que neste o predomínio foi de membrana e naquela, tanto membrana quanto citoplasma marcaram bem. Não houve diferença de intensidade e de localização de coloração quando a hiperplasia ductal foi dividida em típica e atípica pela Técnica I. Houve, no entanto, uma grande diferença de resultados entre esses dois grupos em relação à Técnica II, em que as hiperplasias atípicas não marcaram. (Tabela 3, Figuras 13, 14, 19, 20, 21 e 22). Foi significativa a diferença entre as duas técnicas em relação às membranas, tanto na hiperplasia típica ($p < 0,000003$) e atípica ($p < 0,02$).

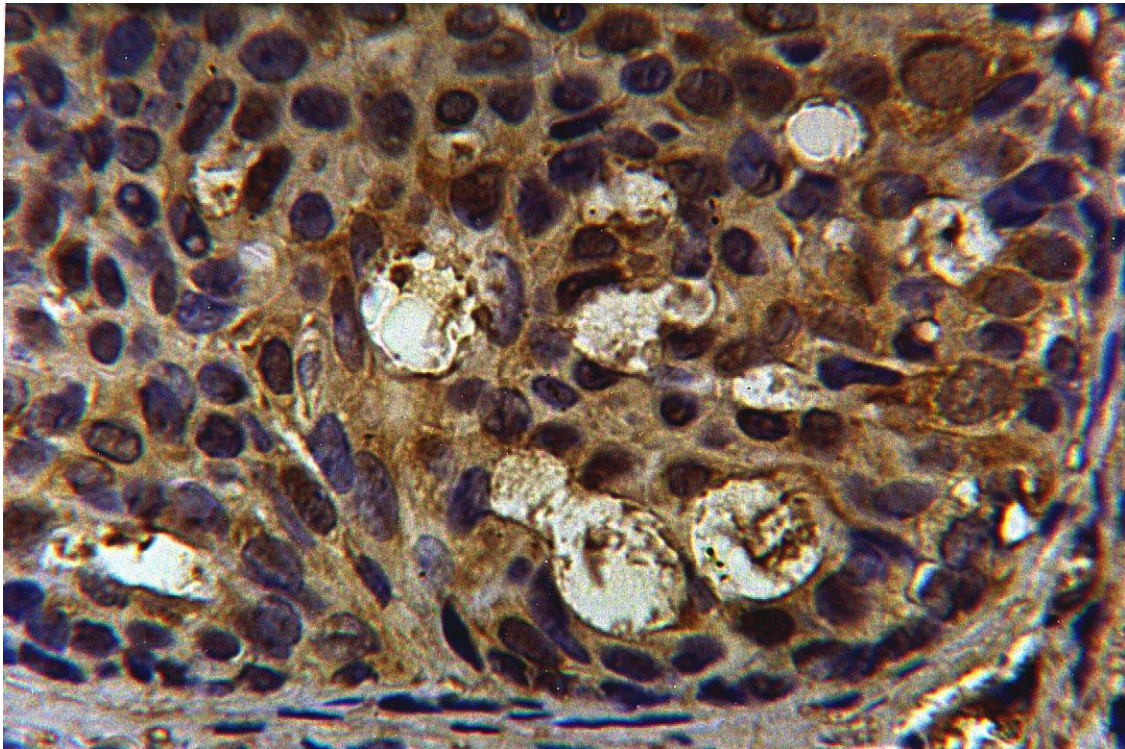


Figura 19 - Hiperplasia ductal típica. A marcação pela frutalina foi intensa e em 66,7% dos casos na membrana e 55,6% no citoplasma; 320X

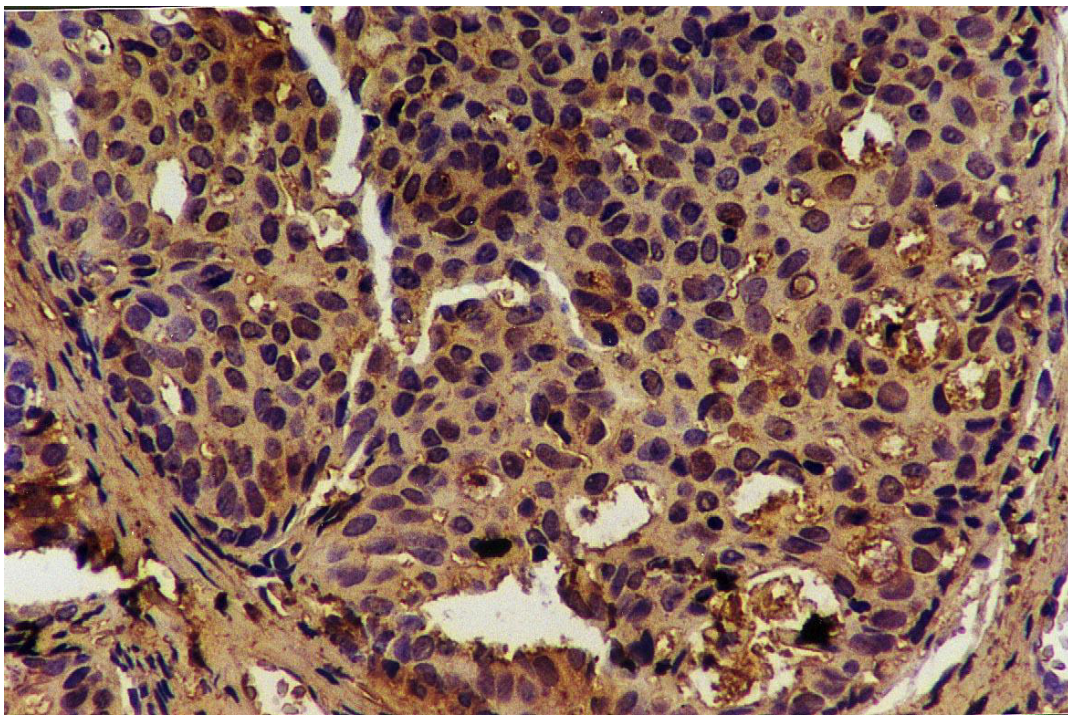


Figura 20 - Hiperplasia ductal típica. A marcação pelo anticorpo anti-frutalina foi expressa em 33,3% dos casos na membrana e 22,1% no citoplasma; 320X

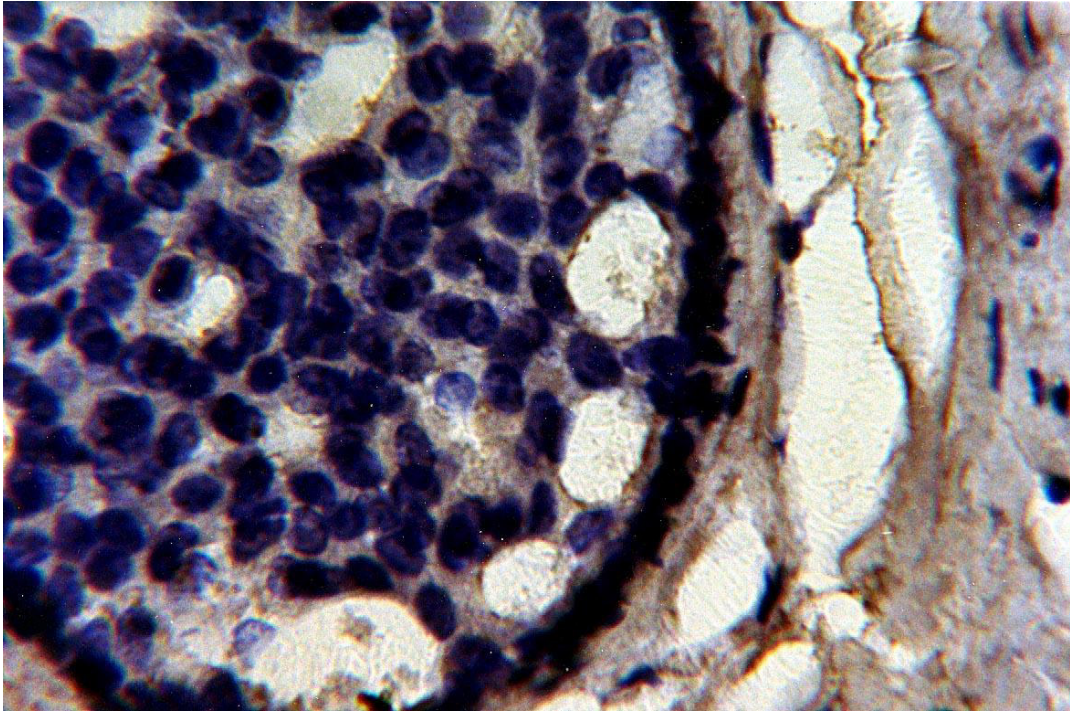


Figura 21 - Hiperplasia ductal atípica. A marcação pela frutalina ocorreu em 71,4% dos casos na membrana e 57,2% no citoplasma; 320X

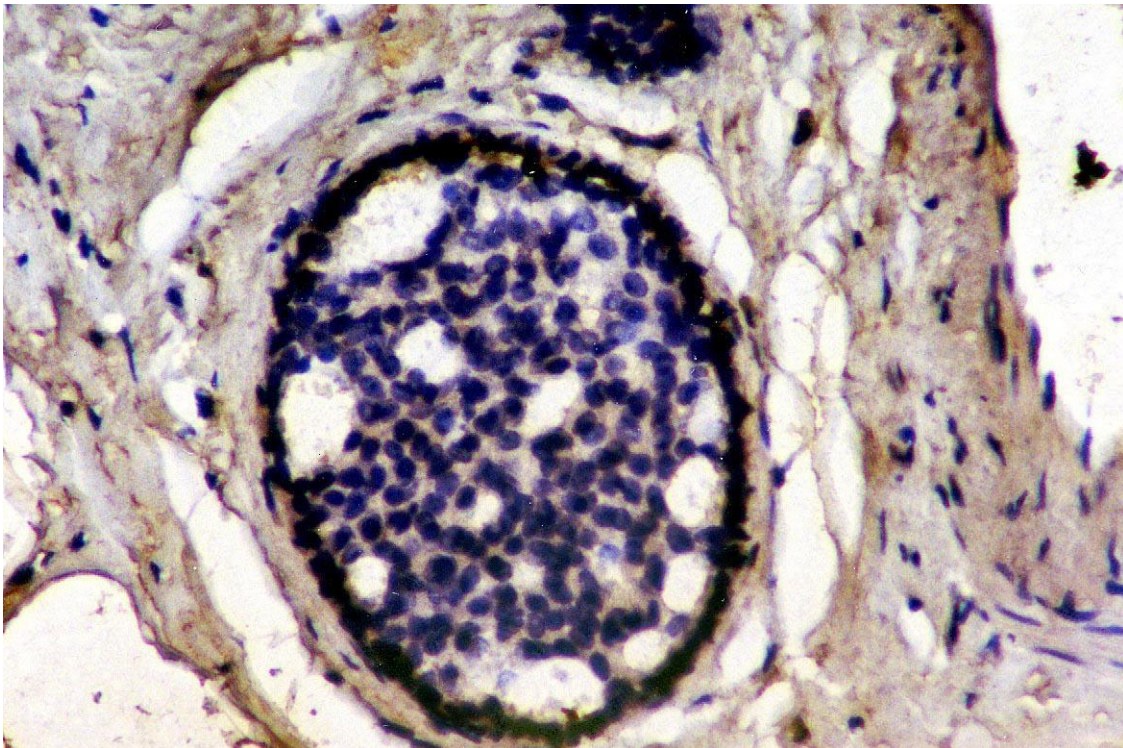


Figura 22 - Hiperplasia ductal atípica. A marcação pelo anticorpo anti-frutalina não ocorreu em nenhum dos casos na membrana e apenas em 14,3% no citoplasma; 160X

4.5.4 Carcinoma ductal *in situ* (CDIS)

A marcação pela frutalina (Técnica I) foi observada em 88,9% dos casos na membrana e 83,3% no citoplasma, com forte intensidade. Com a Técnica II (anticorpo anti-frutalina), apenas 27,8% dos casos da membrana marcaram, enquanto que 61,1% foi positivo para o citoplasma (Tabela 3, Figuras 13, 14, 23 e 24).

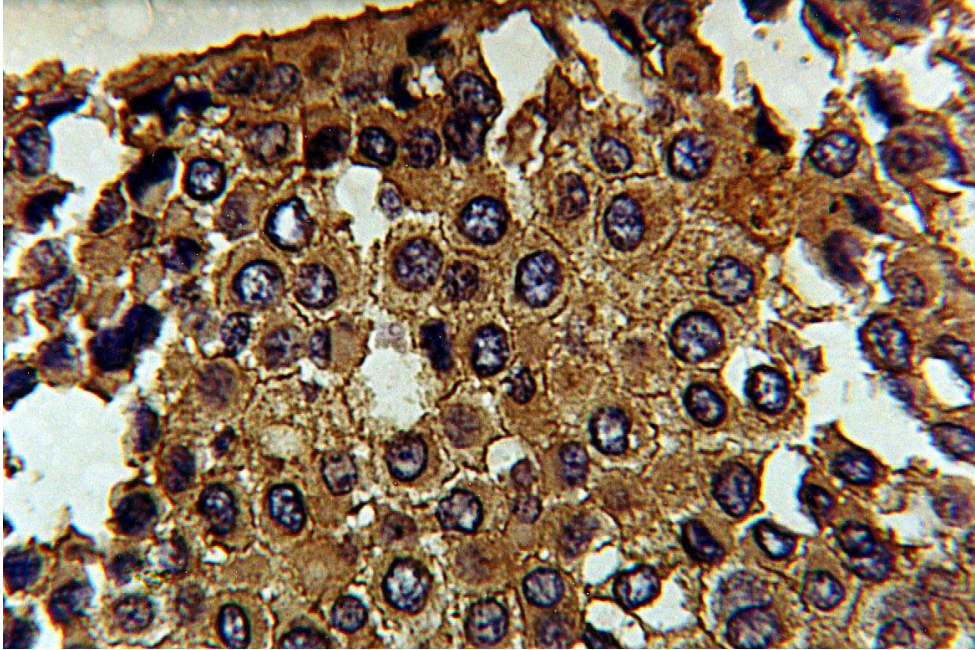


Figura 23 - Carcinoma ductal *in situ*. A marcação pela frutalina foi forte, na membrana e citoplasma; 320X.

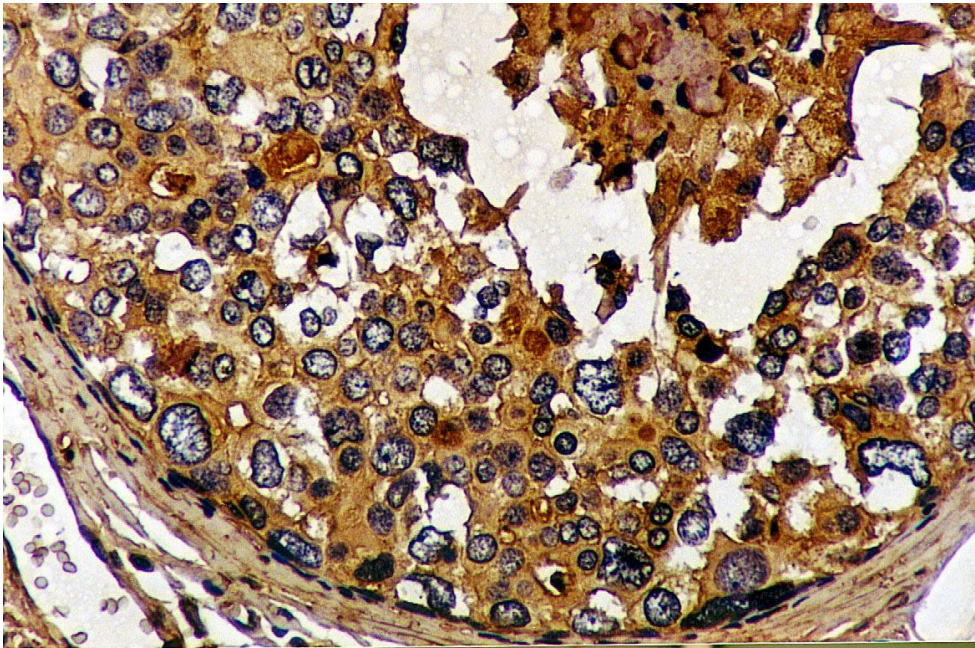


Figura 24 - Carcinoma ductal *in situ*. A marcação pelo anticorpo anti-frutalina predominou no citoplasma (61,1%); 320X.

A diferença entre as duas técnicas em relação à membrana é favorável à Técnica I ($p = 0,0002$).

4.5.5 Carcinomas invasivos

Todos os casos estudados foram de carcinomas ductais. De acordo com ambas as técnicas existiu uma forte intensidade de coloração nos carcinomas ductais invasivos do que no epitélio normal, porém comparável à intensidade das hiperplasias e dos carcinomas *in situ*, mas com diferença no número de casos marcados e na localização da coloração. Assim, houve imunomarcagem citoplasmática em 100% dos carcinomas invasivos, sendo 80,8% de forte intensidade no citoplasma e 73,1% na membrana quando se utilizou a frutalina como marcador (membrana, $p = 0,00001$; citoplasma, $p = 0,0003$). Com relação à Técnica II, chama a atenção que 17 dos 26 (9 coraram, 34,6%) casos não apresentaram coloração de membrana, enquanto que 69,2% tiveram coloração citoplasmática. (Tabela 3 e Figuras 13, 14, 25, 26, 27 e 28).

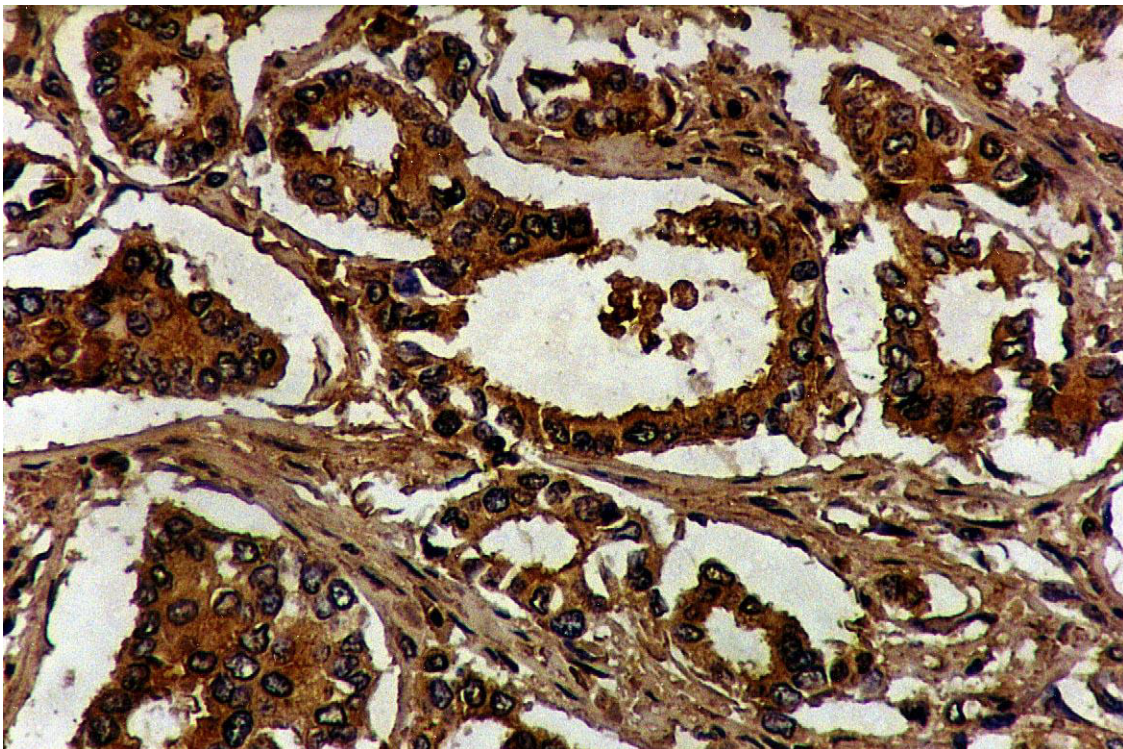


Figura 25 - Carcinoma ductal invasivo Grau I. Forte marcação citoplasmática e de membrana pela frutalina; 160X.

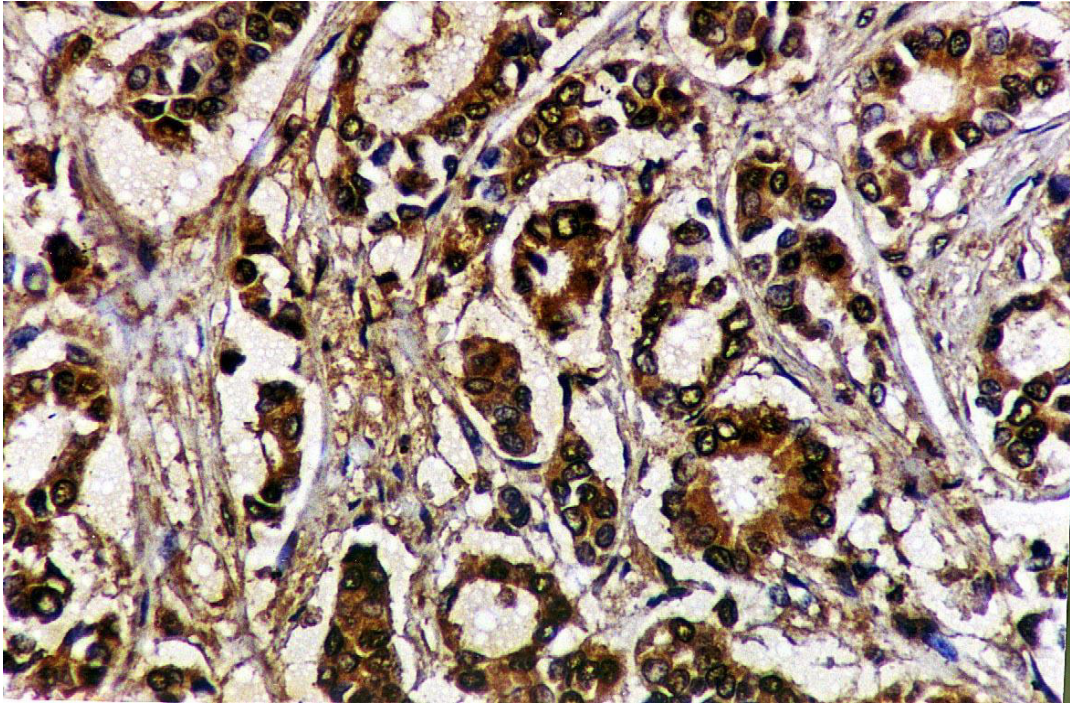


Figura 26 - Carcinoma ductal invasivo Grau I. Forte marcação citoplasmática e de membrana pelo anticorpo anti-frutalina; 160X.

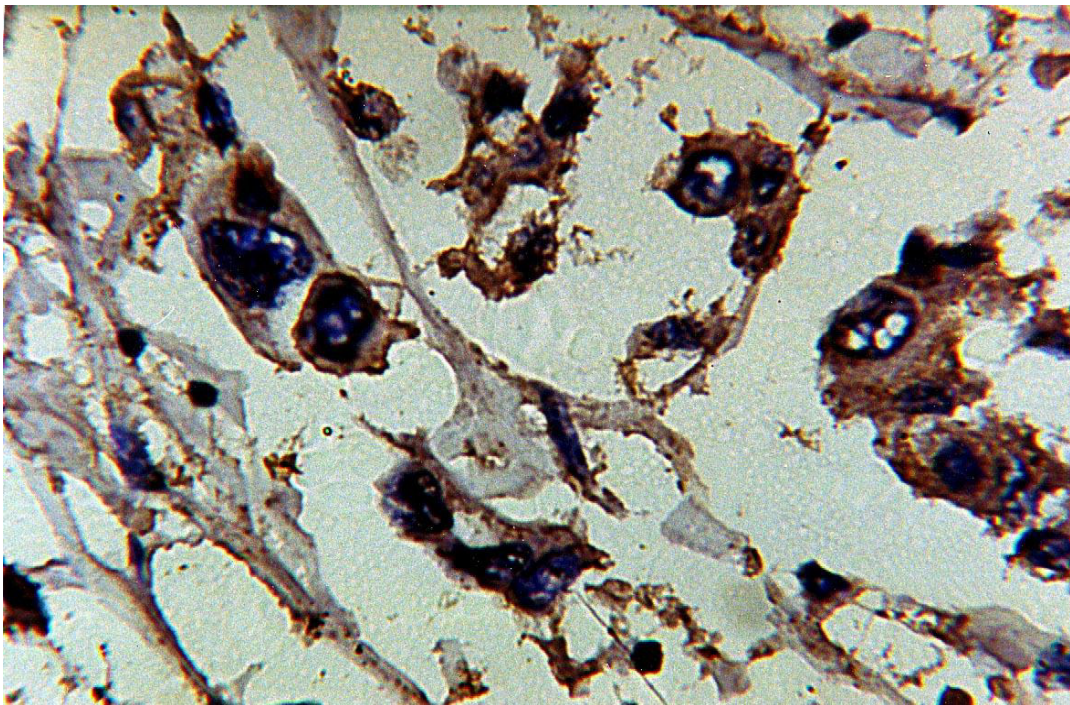


Figura 27 - Carcinoma ductal invasivo Grau III. Forte marcação citoplasmática e de membrana pela frutalina; 320X.

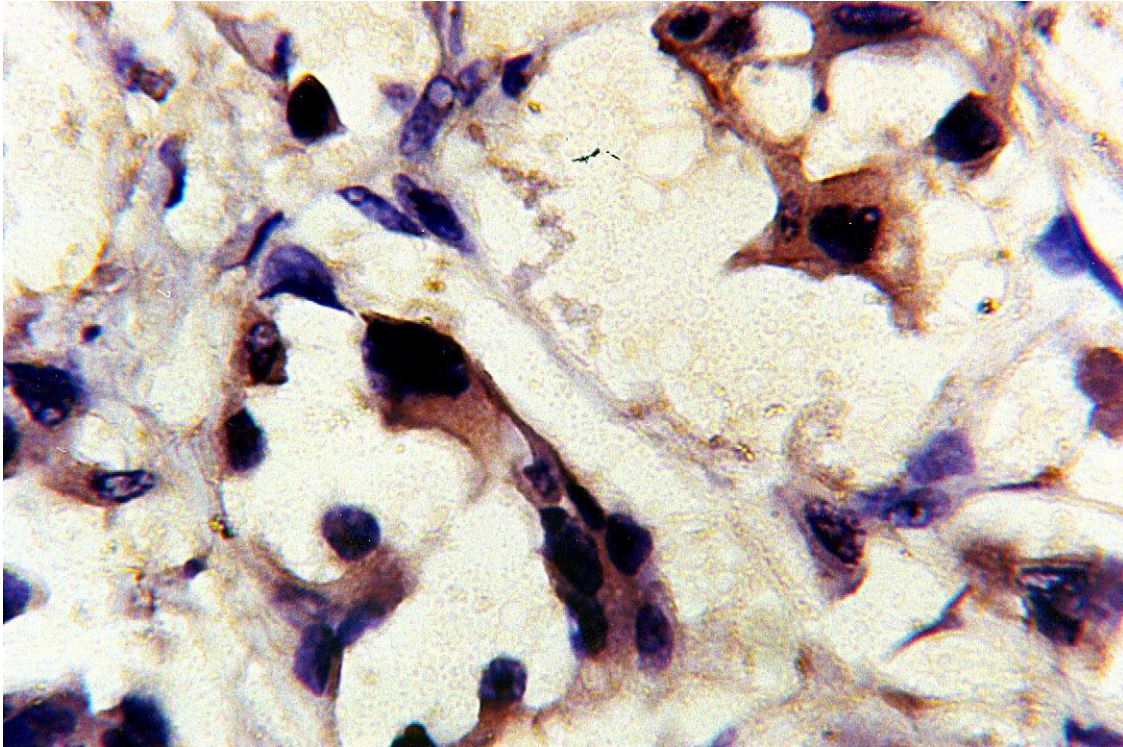
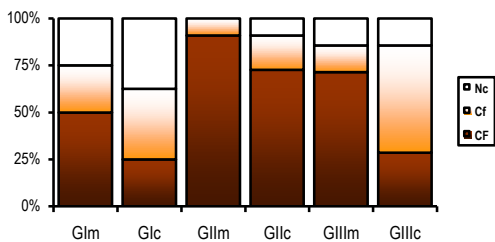


Figura 28 - Carcinoma ductal invasivo Grau III. Forte marcação citoplasmática pelo anti-corpo anti-frutalina; 320X.

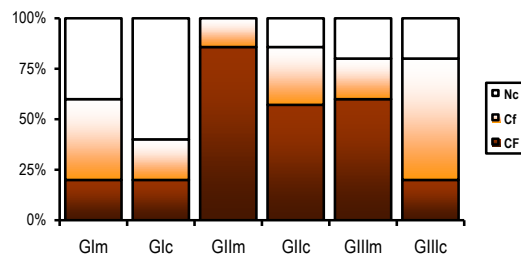
Quando os carcinomas invasivos foram classificados quanto ao grau histológico não houve diferença significativa entre as Técnicas I e II, tanto para a membrana como para o citoplasma - ambos coram bem, como pode ver-se na figura 29.

Figura 29 - Comparação entre as intensidades de coloração de membrana e citoplasma pelas Técnicas I (à esquerda) e II (à direita) dos carcinomas invasivos de graus I, II e III.

Intensidade de coloração com a frutalina de carcinomas ductais invasivos conforme o grau histológico.



Intensidade de coloração com o anticorpo anti-frutalina de carcinomasb ductais invasivos conforme o grau histológico.



LEGENDA - GI, GII e GIII: graus histológicos de carcinomas invasivos; m: membrana; c: citoplasma

4.5.6 Metástase ganglionar

Dos 26 casos de carcinomas invasivos, ocorreu metástase axilar em 13 casos. A frutalina mostrou imunomarcção em 69,2% dos casos tanto de padrão membranar quanto citoplasmático. Novamente, chama a atenção que 10 das 13 metástases não marcaram a membrana com a Técnica II, sendo positivos apenas 23,1% dos casos. (Tabela 3, Figuras 13, 14 e 30). É significativa a diferença entre as Técnicas I e II com $p = 0,05$ - favorável à frutalina.

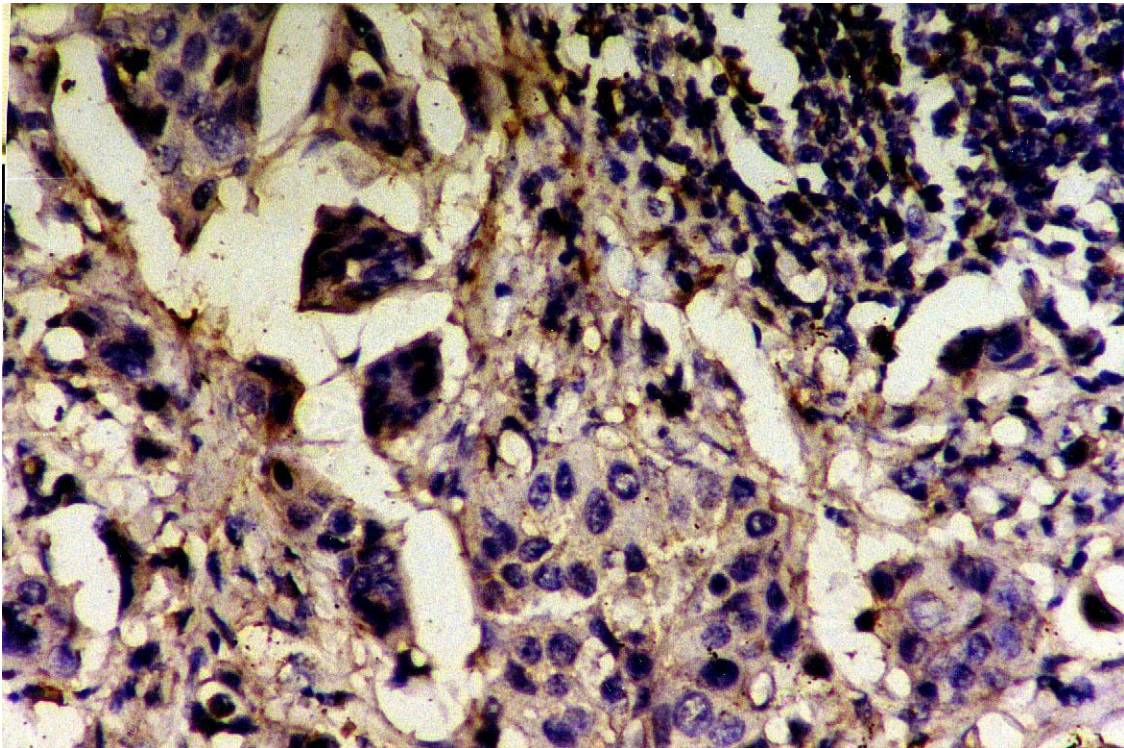
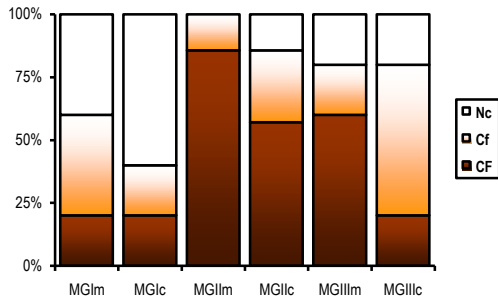


Figura 30 - Metástase ganglionar de carcinoma ductal infiltrante marcado com frutalina; 160X.

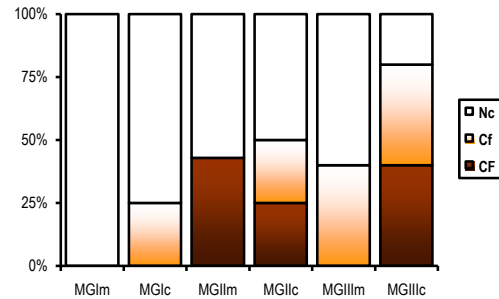
Quando as metástases foram classificadas em relação ao grau histológico, observou-se uma marcação mais intensa das membranas com a Técnica I e uma diminuição de marcação em relação à membrana e ganho em relação ao citoplasma com a Técnica II, como pode ser visto nas Figuras 31 e 32.

Figura 31 – Comparação entre as intensidades de coloração de membrana e citoplasma pelas Técnicas I (à esquerda) e II (à direita) de metástases ganglionares dos carcinomas invasivos de graus I, II e III.

Intensidade de coloração com a frutalina de metástases ganglionares relacionadas com o grau histológico do tumor primário.



Intensidade de coloração a anti-frutalina de metástases ganglionares, relacionadas com o grau histológico do tumor primário.



LEGENDA - GI, GII e GIII: graus histológicos de carcinomas invasivos; m: membrana; c: citoplasma e M: metástase ganglionar.

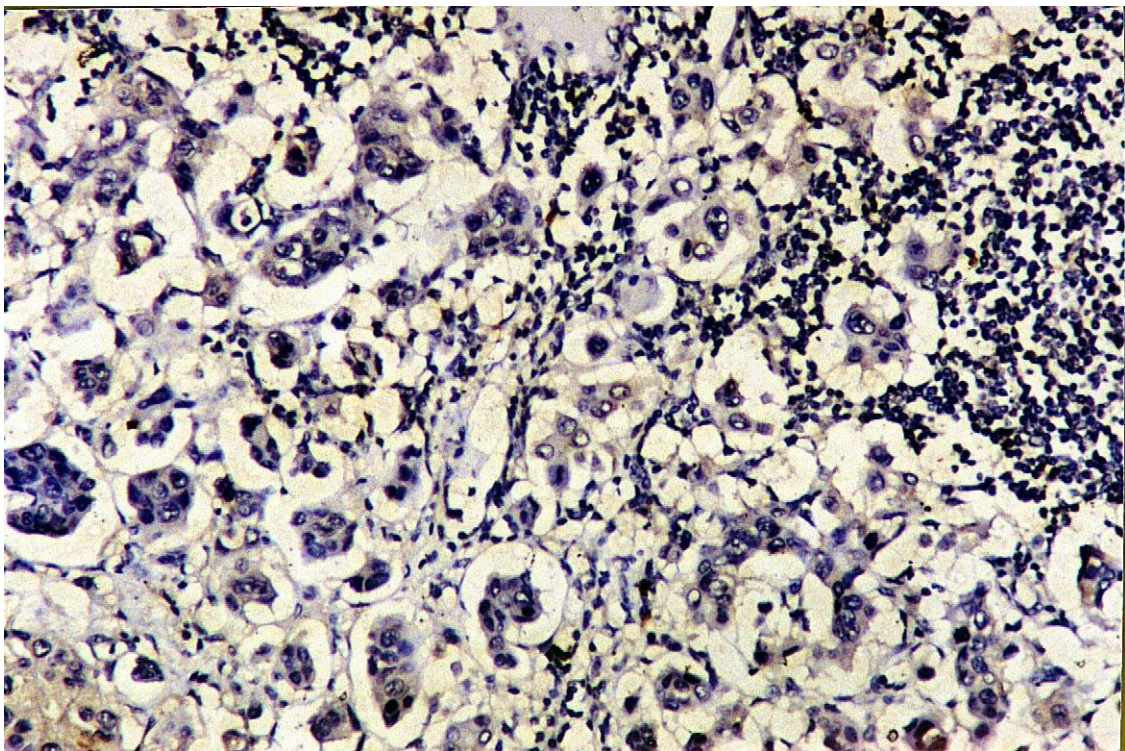


Figura 32 – Metástase de carcinoma ductal infiltrante grau I, negativo para a marcação da membrana e fraco coloração citoplasmática em poucas células; 160X.

4.5.7 Estroma

Os casos marcados pela frutalina mostraram sempre coloração do estroma, o que não ocorreu com o anticorpo anti-frutalina ($p = 0,0000003$). Este aspecto pode ser visualizado em todas as figuras das páginas anteriores.

4.6 Correlação com os fatores prognósticos para câncer de mama

Os fatores prognósticos para o câncer de mama invasivo e as marcações com a frutalina e o anticorpo anti-frutalina, que estão sumarizados na Tabelas 4 e 5, sem significado estatístico.

Tabela 4 – Percentuais e valores absolutos de marcação da membrana e citoplasma pela frutalina (Técnica I) nos carcinomas invasivos da mama e fatores prognósticos

Fatores prognósticos	Membrana		Citoplasma	
	Corou	Não corou	Corou	Não corou
Faixa etária				
≤ 55	(9/10) 90%	(1/10) 10%	(10/10) 100%	(0/10) 0%
> 55	(14/16) 87,5%	(2/16) 12,5%	(16/16) 100%	(0/16) 0%
Tamanho do tumor				
≤ 2 cm	(2/3) 66,7%	(1/3) 33,3%	(3/3) 100%	(0/3) 0%
> 2 cm	(21/23) 91,3%	(2/23) 8,7%	(23/23) 100%	(0/23) 0%
Grau histológico				
GI	(6/8) 75%	(2/8) 25%	(8/8) 100%	(0/8) 0%
GII	(11/11) 100%	(0/11) 0%	(11/11) 100%	(0/11) 0%
GIII	(6/7) 85,7%	(1/7) 14,3%	(7/7) 100%	(0/7) 0%
Metástase ganglionar				
0	(9/9) 100%	(0/9) 0%	(9/9) 100%	(0/9) 0%
1 a 3	(5/6) 83,3%	(1/6) 16,7%	(6/6) 100%	(0/6) 0%
> 3	(9/11) 81,8%	(2/11) 18,2%	(11/11) 100%	(0/11) 0%
Receptores de estrógeno				
Positivo	(17/19) 89,5%	(2/19) 10,5%	(19/19) 100%	(0/19) 0%
Negativo	(6/7) 85,7%	(1/7) 14,3%	(7/7) 100%	(0/7) 0%

Tabela 5 – Percentuais e valores absolutos de marcação da membrana e citoplasma pelo anticorpo anti-frutalina (Técnica II) nos carcinomas invasivos da mama e fatores prognósticos

Fatores prognósticos	Membrana		Citoplasma	
	Corou	Não corou	Corou	Não corou
Faixa etária				
≤ 55	(2/10) 20%	(8/10) 80%	(10/10) 100%	(0/10) 0%
> 55	(7/16) 43,8%	(9/16) 56,2%	(16/16) 100%	(0/16) 0%
Tamanho do tumor				
≤ 2 cm	(2/3) 66,7%	(1/3) 33,3%	(2/3) 66,7%	(1/3) 33,3%
> 2 cm	(7/23) 31,4%	(16/23) 69,6%	(16/23) 69,6%	(7/23) 30,4%
Grau histológico				
GI	(2/8) 25%	(6/8) 75%	(4/8) 50%	(4/8) 50%
GII	(3/11) 27,3%	(8/11) 72,7%	(8/11) 72,7%	(3/11) 27,3%
GIII	(4/7) 57,1%	(3/7) 42,9%	(6/7) 85,7%	(1/7) 14,3%
Metástase ganglionar				
0	(4/9) 44,4%	(5/9) 55,6%	(7/9) 77,8%	(2/9) 22,2%
1 a 3	(2/6) 33,3%	(4/6) 66,7%	(4/6) 66,7%	(2/6) 33,3%
> 3	(3/11) 27,3%	(8/11) 72,7%	(7/11) 63,6%	(4/11) 33,4%
Receptores de estrógeno				
Positivo	(6/19) 31,6%	(13/19) 68,4%	(13/19) 68,4%	(6/19) 31,6%
Negativo	(3/7) 42,9%	(4/7) 57,1%	(5/7) 71,4%	(2/7) 28,6%

4.7 Variação do pH

Não houve imunomarcação da frutalina quando o pH foi igual a 2,6 (Figura 33). A marcação foi positiva para os valores de pH 4,0; 7,0; 8,6 e 10,0 (Figura 34).

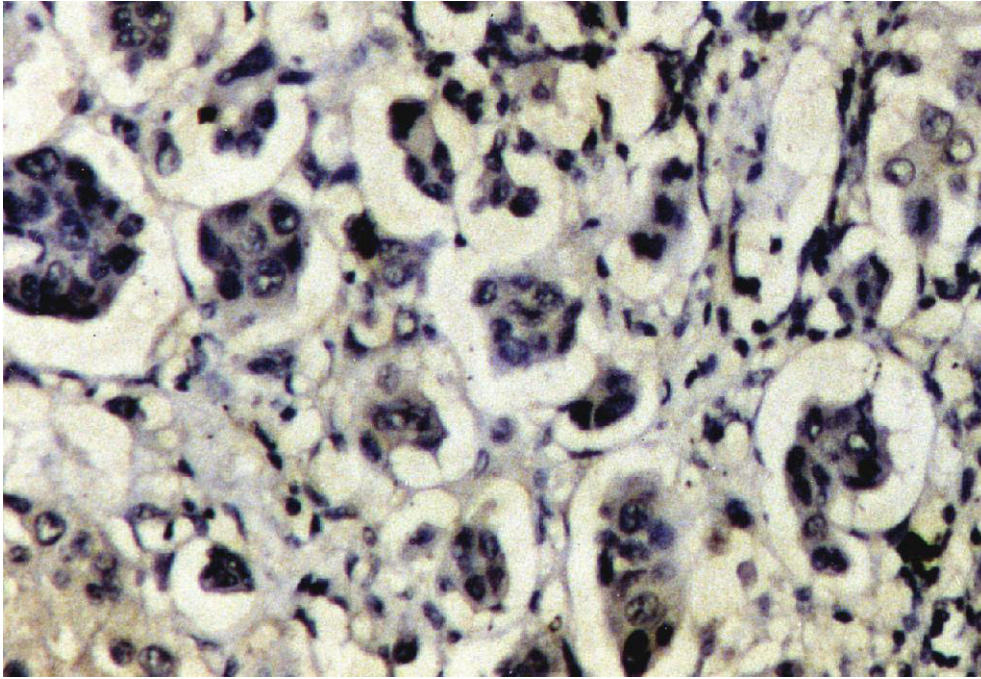


Figura 33 - Marcação negativa para frutalina em pH 2,6; 160X

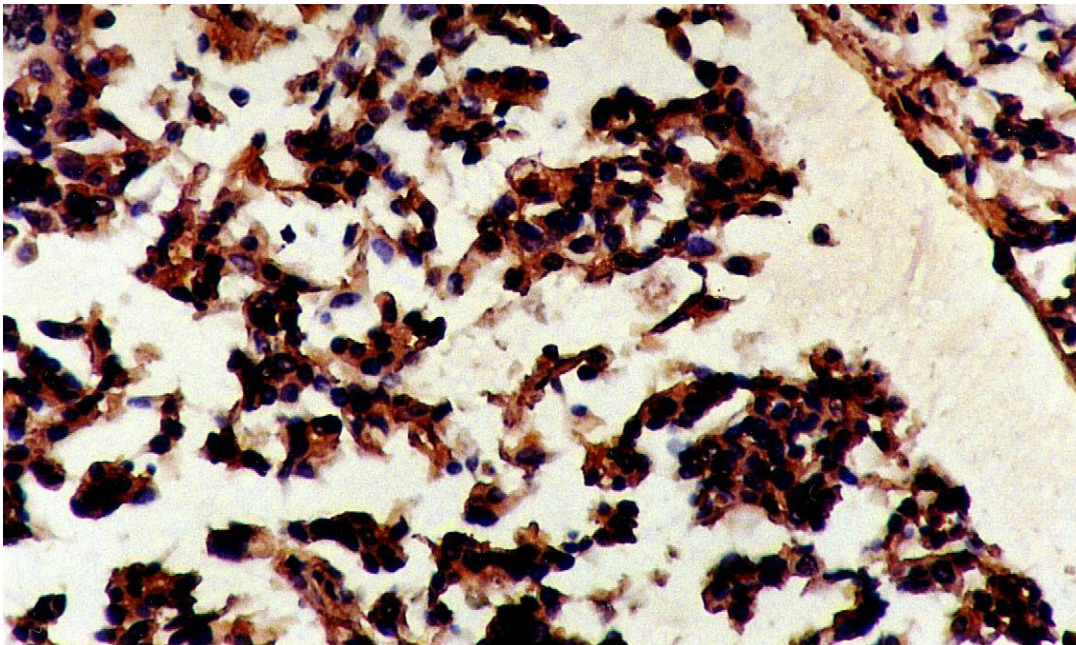


Figura 34 - Marcação positiva para frutalina em pH 10,0; 160X

5 Discussão

5.1 Frutalina como sonda

Acumulam-se evidências de que os carboidratos são os marcadores primários para o reconhecimento celular (SHARON e LIS, 1998). Os resíduos de carboidratos dos glicoconjugados desempenham muitas funções celulares diferentes, tais como, o reconhecimento, inibição por contato, crescimento e diferenciação celular. Essas funções são dependentes do número e tipo de resíduos dos açúcares, de ligações anoméricas, presença ou ausência de ramificações moleculares, tipo e quantidade de ácido siálico. Estas funções contribuem para a heterogeneidade estrutural e servem para o reconhecimento de sinais celulares (MUSTAC *et al*, 1996; SCHUMARCHER *et al*, 1996). Os carboidratos da superfície celular são modificados durante a diferenciação celular, transformação maligna e metástase (MUSTAC *et al*, 1996; SCHUMARCHER, 1996). O acúmulo de carboidratos tipo mucina simples, como Tn, Sialil-Tn e T, em geral são expressos em carcinomas e possivelmente, relacionados ao processo de carcinogênese (SCHMITT *et al*, 1993; SCHMITTI *et al*, 1995; 2000).

Recentes avanços na compreensão dos antígenos associados a tumores os quais incluem muitas glicoproteínas e glicolipídios, têm mostrado especial atenção para antígenos relacionados a cânceres (MUSTAC, 1996). Aberrante glicosilação é um aspecto comum de malignidade, resultando na aparição de antígenos associados a tumores, os quais podem influenciar o crescimento tumoral e disseminação. Muitos trabalhos mostram o encontro de lectinas endógenas novas, presentes apenas em lesões precursoras e carcinomas (SCHOEPNER *et al*, 1995; LALWANI *et al*, 1996). Por outro lado, com o emprego de lectinas vegetais tem sido possível evidenciar alterações de glicoconjugados celulares.

No presente trabalho o epitélio mamário normal cora fracamente com a frutalina, enquanto foi aumentando em intensidade e percentagem de reatividade nas metaplasias apócrinas, hiperplasias, carcinomas *in situ*, carcinomas invasivos e nas metástases. Estes achados sugerem que há um específico rearranjo de glicoproteínas de superfície celular durante a transformação neoplásica, expondo a galactose com a qual a frutalina reage.

Recentemente, foi demonstrado que há uma superexpressão do antígenos Tn e Sialil-Tn em lesões precursoras e invasivas da mama (SCHMITT, *et al*, 1999) e a pesquisa de Sialil-Tn nos carcinomas mamários está recomendada como um fator de prognóstico que deveria ser feito de rotina pois, se correlaciona com pior prognóstico e menor resposta a quimioterapia (SCHMITT *et al*, 2000). Os antígenos T, Tn, e sialil-Tn, representam produtos imaturos iniciais de glicosilação dos resíduos serina-treonina de proteína celular. Estes antígenos estão mascarados nos tecidos normais por sialização e/ou alongamento e ramificação por adição de outros açúcares (SOARES *et al*, 1996).

Como o antígeno Tn possui um resíduo terminal de galactose, poderia funcionar como o local de ligação da frutalina. É importante lembrar, que a jacalina, uma lectina muito semelhante à frutalina, não só tem a capacidade de se ligar a terminais glicídicos contendo α -D-galactopiranosídeo, mas também se liga a oligossacarídeos alfa ligados ao antígeno Thomsen-Friedenreich ($\text{Gal}\beta 1\text{-3-GalNac}\alpha$), mais fortemente que outros dissacarídeos (MONTEIRO, 1998).

Possivelmente há uma glicosilação alterada nas lesões precursoras, refletindo um provável evento precoce no processo da carcinogênese. A fraca expressão no epitélio mamário normal e o crescente aumento nas lesões precursoras, apóiam os estudos epidemiológicos, histológicos e experimentais de que o câncer de mama se desenvolve do epitélio normal através de múltiplos estágios intermediários (DUPONT *et al*. 1993; SLOANE, 1993).

Um comportamento similar tem sido observado utilizado-se diferentes lectinas e diferentes neoplasias. Um estudo com várias lectinas avaliou graus de hiperplasia endometrial e o adenocarcinoma; mostrou que a perda de galactosamina, junto com a reduzida expressão de fucose, é um fenômeno comum de malignização endometrial e pode refletir um comportamento biológico mais agressivo (SIVRIDIS & AGNANTIS, 1996). Também em um trabalho semelhante, utilizando a jacalina e a lectina do gérmen de trigo na mucosa colônica normal, hiperplástica, adenoma e adenocarcinoma, mostrou que estas lectinas são preditoras de lesões pré-malignas e malignas (DESILETS *et al*, 1999).

Estudos sobre câncer de mama e lectina têm demonstrado a heterogeneidade tumoral; outros relacionam a expressão de sítios de ligação com receptores hormonais, com a

ploidia, expressão de oncogenes, fração de fase S, potencial metastático, sobrevida, tempo livre de doença, dentre outros, o que pode ser observado na Tabela 1.

De todas as lectinas utilizadas no estudo do câncer de mama, a HPA e PNA são as mais empregadas, e os trabalhos mostram correlação destas lectinas, principalmente a HPA, com o potencial metastático (MITGHELL *et al*, 1998; BROOKS, 2000). A Tabela 2 mostra uma revisão bibliográfica das lectinas mais usadas no câncer de mama.

A jacalina, uma lectina estruturalmente semelhante à frutalina, é vastamente utilizada em imunohistoquímica em diversas neoplasias, como câncer de mama, neoplasia cervical intraepitelial, carcinomas da cavidade oral, carcinomas da tireóide, astrocitomas, leucemias e linfomas. Nestes trabalhos mostrou-se que células benignas têm somente uma leve ligação com a jacalina; a ligação aumenta com a transformação das células (BEEVI *et al*, 1991; PILLAI *et al*, 1994; SUJATHAN *et al*, 1996; REMANI *et al*, 1990; ENGEL *et al*, 1996; PILLAI *et al*, 1996). Em um trabalho estudando populações histiocitárias, ficou demonstrado que a jacalina marca histiócitos reativos, nas não cora histiócitos tumorais (URDIALES-VIEDMA *et al*, 1995). A jacalina é uma lectina mitogênica para linfócitos TCD4+. Recentemente foi descoberto que esta lectina apresenta uma seqüência similar à proteína gp120 que se liga ao receptor CD4 e tem a capacidade de inibir infecções que utilizam este receptor nas células CD4+. Ainda utilizando este receptor, a jacalina estimula a produção de interleucina 6 (TAIMI *et al*, 1994). Em uma outra publicação a jacalina foi capaz de promover o amadurecimento de células leucêmicas, induzindo ao aparecimento de receptores maduros de linhagem monocítica (YAGI *et al*, 1995).

É razoável admitir que alterações citomorfológicas durante o processo de transformação maligna são também processadas e acompanhadas por alterações bioquímicas na célula transformada. Essas alterações expressadas nas glicoproteínas da superfície celular desempenham um papel vital desde que estas moléculas estão principalmente envolvidas no sinal de transdução (GABIUS, 1988). Estas alterações podem estar relacionadas a alterações funcionais e à capacidade proliferativa das células. Durante a transformação neoplásica, modificações de glicoconjugados de superfície podem estar relacionadas ao potencial metastático. Trabalhos utilizando diferentes lectinas têm comprovado estas alterações (MITGHELL *et al*, 1998; BROOKS, 2000).

Alterações na expressão de glicoconjugados na superfície celular podem resultar da ausência ou alterações de uma glicosiltransferase relacionada a tumores (PILLAI *et al*, 1996). A biossíntese dos componentes de carboidratos da membrana envolve etapa por etapa de ligação com uma glicosiltransferase específica, catalizando a adição de um monossacarídeo para o crescimento da cadeia (PILLAI *et al*, 1996).

O potencial oncogênico de uma célula está associado à perda do controle do crescimento e com a perda da diferenciação celular, levando a aquisição de novos fenótipos, com por exemplo, a produção aberrante de glicoconjugados da superfície celular. É provável que os oncogenes estejam relacionados com o controle da expressão de enzimas envolvidas na glicosilação (FUKUTOMI *et al*, 1991; BROOKS e LEATHEM, 1995). Existem trabalhos correlacionando a expressão de lectinas e oncogenes, como por exemplo, a aumentada expressão para a proteína do p53 (MAEHARA *et al*, 1995), C-erb-B2 (THOMAS *et al*, 1993), C-myc (FUKUTOMI *et al*, 1989).

Pesquisas com ativação celular e sinais de transdução é uma área de investigação ativa. As alterações na expressão de genes codificadores de glicosiltransferases e glicosidases são as responsáveis pela produção modificada de glicoconjugados. Relativamente pouco se conhece sobre a regulação dos mecanismos de transcrição desses genes. Sabe-se que os genes codificadores de GlcNAcT-II e GlcNAcT-IV são regulados por seqüências promotoras que apresentam sítios para vários fatores de transcrição e de crescimento, algumas das quais são definidas como proto-oncogenes ou são reguladas por proto-oncogenes. Por exemplo, a oncoproteína src ativa o gene promotor GlcNAcT-IV (N-acetil-glicosamina transferase). (VARKI *et al*, 1999).

Os achados do presente trabalho mostram que as células normais, têm somente leve ligação com a frutalina ou mesmo não se ligam a ela, ao passo que na metaplasia apócrina, nas lesões hiperplásticas e neoplásicas há positividade, em geral forte (Tabela 3 e Figura 13). Essas diferenças podem ser devidas ao fato de que a frutalina é capaz de identificar formas incompletas, não sializadas de glicoconjugados da membrana que podem estar expressas na superfície das células hiperplásticas e neoplásicas. Um aspecto interessante demonstrado neste trabalho foi a marcação forte de metaplasia apócrina de forma similar aos epitélios alterados e bastante diferente do epitélio normal. Foi demonstrado que na metaplasia apócrina há uma aumentada expressão de Tn e sialyl-Tn, que é similar ao

epitélio maligno (SCHMITT *et al*, 1995). Este achado, provavelmente, reflete mais uma diferenciação anormal do que um evento pré-maligno. Portanto, isso não significa que a metaplasia apócrina seja uma lesão precursora para o câncer de mama (SCHMITT *et al*, 1995). Outros estudos reforçam que a metaplasia apócrina não representa um fator de risco para o câncer de mama (RAJU, *et al*, 1993).

5.2 Anticorpo anti-frutalina como sonda

Os métodos de estudo empregados para avaliar a ligação de uma lectina nos cortes histológicos e esfregaços citológicos são através de testes imunológicos diretos ou indiretos que empregam marcadores, como substâncias fluorescentes (testes de fluorescência), enzimas (testes imunoenzimáticos/imunohistoquímicos) do tipo peroxidase-anti-peroxidase-PAP (EMMERICH *et al*, 1998), ou substâncias radioativas (testes de radioimunoensáio). Os testes à base de marcadores podem ser diretos (marcador ligado diretamente ao antígeno, geralmente) ou indiretos (marcador ligado à anti-globulina que se liga ao anticorpo específico para antígeno). Nos testes imunohistoquímicos, todos os trabalhos citados na literatura utilizam ou a lectina diretamente acoplada à peroxidase ou lectina biotilizada/avidina peroxidase. Alternativamente, a lectina pode ser ligada diretamente a produtos fluorescentes, ou ao anticorpo específico para determinada lectina.

No presente trabalho, testou-se a possibilidade de ligação do soro policlonal anti-frutalina, como um marcador de células epiteliais, evitando-se a intermediação da frutalina. Os resultados apontam que este anticorpo marca células epiteliais, na metaplasia apócrina, nas lesões precursoras, carcinomas e metástases. (Tabela 3 e Figura 14).

Uma diferença importante foi observada na hiperplasia atípica com a perda de reatividade para a membrana (Tabela 3 e Figura 14). Este achado merece investigações futuras com um estudo envolvendo maior número de casos, pois se confirmado, seria resolvido um grande dilema mundial, que é a distinção entre uma hiperplasia atípica e um carcinoma *in situ*, levando em conta apenas aspectos morfológicos de microscopia ótica comum. É possível que esta alteração esteja relacionada à perda de alguma porção da membrana à medida que a célula foi se tornando atípica. Outro aspecto interessante

foi o ganho de positividade de marcação citoplasmática a partir da hiperplasia atípica, continuando no carcinoma *in situ*, invasivo e metástase (Tabela 3 e Figuras 14).

A obtenção de imunomarcção direta como o anticorpo anti-frutalina tanto nas células epiteliais normais quanto nos tecidos pré-neoplásicos e neoplásicos é um resultado curioso, merecendo análise de possíveis hipóteses imunológicas que possam explicar essas observações de forma lógica e satisfatória.

As imunoglobulinas policlonais empregadas no presente estudo, reagem com diferentes segmentos imunogênicos da lectina frutalina, o que vem comprovar que a molécula desta lectina se comporta como um antígeno complexo portador de diferentes “determinantes antigênicos” (ou epítomos) que lhe conferem a imunogenicidade. Levando-se em consideração esta característica molecular da frutalina, as seguintes hipóteses podem ser levantadas para explicar a reação direta dos anticorpos anti-frutalina como o epitélio em estudo:

1. o epitélio em estudo possui moléculas de superfície celular idênticas à frutalina;
2. algumas moléculas da superfície celular possuem, pelo menos, um epítomo igual, ou bastante similar ao da frutalina, gerando, conseqüentemente, uma reação cruzada;
3. as imunoglobulinas anti-frutalina reagem inespecificamente com as membranas mediante ligação com receptores específicos para a porção Fc dos anticorpos;
4. as imunoglobulinas anti-frutalina reagem com anticorpos anti-idiótipos que já existem ligados à membrana, numa cadeia de respostas imunes induzidas no organismo por algum antígeno da família de lectinas, a qual pertence a frutalina.

Devido à complexidade dos conceitos imunobiológicos envolvidos nestas hipóteses formuladas acima, cada uma delas exige uma análise aprofundada para a sua compreensão.

- 1) Estudos imunobiológicos recentes de tecidos humanos, de modo geral, têm revelado a existência de inúmeras moléculas nas superfícies celulares. Geral-

mente denominadas de moléculas de adesão, elas são, de fato, lectinas que possibilitam interações celulares, influenciando as atividades das células ou dos tecidos que coexistem e colaborando nas respostas biológicas do organismo. Várias famílias de moléculas, dentre elas as caderinas, integrinas e selectinas foram descritas na literatura. As células do sistema imunológico, como os macrófagos e linfócitos, se valem abundantemente destas moléculas de adesão, para gerarem e regularem as suas respostas (MALE, D. *et al*, 1996).

Diante desta realidade, é possível imaginar que existam uma ou mais moléculas nas membranas do epitélio em investigação, que se assemelhem o suficiente à frutalina, provocando, conseqüentemente, a reação com os anticorpos anti-frutalina.

- 2) A segunda hipótese baseia-se na possibilidade da reação dos anticorpos anti-frutalina com alguma, ou algumas, moléculas que tenham, possivelmente, no mínimo um determinante antigênico capaz de reagir com algum anticorpo, dentre tantos gerados contra a frutalina. Denominada de reação cruzada, tais reações são freqüentemente encontradas nos testes imunológicos laboratoriais, e também no organismo humano. As reações cruzadas, tipicamente, não exigem a identidade absoluta das moléculas com as quais reage o anticorpo, mas apenas uma semelhança de composição da segunda substância, cuja configuração quaternária do epítipo reativo possibilite um acoplamento estável do anticorpo gerado contra o antígeno primário (BRACIALE, & BRACIALE, 1991). Este princípio proporciona, por exemplo, a reação clássica do anticorpo anti-estreptococos com o coração humano, predispondo o organismo à febre reumática. Surpreendentemente, também deve ser lembrado que já foram descobertas lectinas animais (MR60/ERGIC53 e VIP36), homólogas a lectinas de leguminosas (FIEDLER, & SIMONS, 1994; ROCHE, 1996). De acordo com esta teoria, a existência de alguma molécula própria, ou substância estranha ao organismo “aderida” ao epitélio em estudo, mas com razoável grau de semelhança nos sítios reativos, possibilitaria a reação cruzada com os anticorpos policlonais anti-frutalina.

De fato, desconhece-se a existência nos tecidos humanos normais ou patológicos, de moléculas similares às da frutalina embora se saiba que a etiopatogenia do processo neoplásico de modo geral, e o metastático de forma específica, acarretam o surgimento de moléculas alteradas e até totalmente novas nas células. É possível que algumas destas moléculas possam se comportar, molecularmente, como similares às lectinas do gênero *Artocarpus* (frutalina e jacalina). Há a possibilidade que os produtos vegetais desta família, notadamente a jaca, bastante consumida pela população nordestina, possam proporcionar moléculas que sejam absorvidas, ainda bastante intactas, a ponto de poderem permanecer aderidas aos tecidos humanos, proporcionando reações cruzadas com os anticorpos anti-frutalina empregados no estudo.

É uma possibilidade que merece investigação específica, para se avaliar a hipótese aqui formulada.

- 3) Os anticorpos gerados no sistema imunológico para combater os elementos estranhos imunogênicos instalados no organismo, também vêm dotados da capacidade para se ligarem a estruturas células do organismo – principalmente às do próprio sistema imune. Essa propriedade fisiologicamente normal das imunoglobulinas é explorada no sistema imune tanto para proporcionar mecanismos mais eficazes de eliminação do corpo estranho (ex: a opsoninização de microorganismos e partículas para uma melhor fagocitose pelos macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares), como também para possibilitar a destruição citotóxica de parasitas e células infectadas por microorganismos intracelulares, por células citotóxicas (assassinas ou “*killer cells*”) profissionais (NAIDU, 1998). Em uma condição patológica, anticorpos (“reagínicos” – IgE e algumas IgG) se ligam a células como o mastócito, basófilo e eosinófilo, constituindo o mecanismo principal de mediação das reações anafiláticas de manifestação clínica tão grave quanto o choque anafilático e o edema de glote, capazes de ameaçar a vida.

A facilidade de algumas imunoglobulinas para a ligação também com estruturas do próprio organismo, reside na conhecida bifuncionalidade da sua estrutura: o anticorpo se liga ao epítipo do antígeno por meio do sítio de com-

binação que depende da configuração específica dos terminais N das cadeias leve e pesada dos aminoácidos (segmento Fab); ao passo que os terminais COOH das cadeias pesadas compõem o ponto de ligação inespecífico (fragmento Fc) que se fixa no receptor para Fc existente nas membranas de variados tecidos e células do organismo (ALZARI, *et al*, 1988).

Pelas propriedades inerentes a todas as imunoglobulinas, é de se esperar que os anticorpos policlonais anti-frutalina também se fixem aos tecidos e células, por meio da ligação dos seus terminais Fc. Se isso ocorrer, a ligação dos anticorpos anti-frutalina aos tecidos pode ser detectada tanto na técnica imunohistoquímica direta (a peroxidase ligada diretamente ao anticorpo primário) quanto na indireta (peroxidase ligada ao anticorpo secundário – este ligado ao anticorpo primário ligado ao tecido). Em ambos os casos, a ligação dos anticorpos anti-frutalina ao epitélio será consequencial, podendo acontecer com vários tecidos e células normais ou patológicas, portadores dos receptores para as imunoglobulinas; sem nenhuma seletividade para com os tecidos estudados.

- 4) A última hipótese, formulada para explicar o fato da ligação direta dos anticorpos anti-frutalina aos tecidos humanos estudados, se baseia na mais nova teoria de regulação interna do sistema imune, conhecida por “Rede Idiotípica” e formulada pelo genial (Premio Nobel) Niels K. Jerne na década de 70. Essa teoria redefine o sistema imunológico como uma rede fechada e autoregulada, podendo tanto iniciar respostas imunes específicas a antígenos tanto estranhos quanto próprios, como também encerrar as respostas iniciadas; sempre buscando manter o estado de homeostase do sistema imune e o estado normal do organismo, constituindo-se um estado de exceção a sua ativação para gerar respostas imunes exacerbadas.

De acordo com a teoria da Rede Idiotípica, o encontro de antígeno com o sistema imunológico resulta não somente na geração de respostas imunes celulares e humorais específicas, como também no desencadeamento de uma seqüência de respostas : resposta secundária, para regular a resposta primária; resposta terciária para regular a resposta secundária, evitando assim dessa maneira uma inibição exagerada pela resposta secundária, e assim por diante, até que seja

restabelecida a condição ideal de homeostasia interna. O instrumento principal dessas respostas imunes em seqüência é a porção antigênica (parte imunogênica da própria imunoglobulina) residente no segmento Fab do receptor para o antígeno, conhecido por idiótipo. Em síntese, a teoria da Rede Idiotípica afirma o seguinte: *cada uma das famílias dos linfócitos B (responsáveis pelos anticorpos) e linfócitos T (mediadores de respostas celulares e por citocinas), se constitui como uma rede de clones (pequenos grupos portadores de receptores específicos para reconhecimento de epítomos), na qual cada clone também reconhece o idiótipo de um clone da rede e, por sua vez, é reconhecido por outro clone*. O idiótipo reside no receptor dos clones do linfócito B e T específicos para um determinado epítomo do antígeno; portanto existe uma só rede idiotípica, envolvendo os dois tipos de linfócitos. Nesse esquema, o clone de células B que reconhecem o antígeno será o clone primário (gerador de resposta imune – o anticorpo – contra o agente estranho), e o clone que reconhece o idiótipo da resposta imune (que existe no receptor do clone reconhecedor do antígeno, e também no anticorpo por ele gerado) constituindo-se no clone anti-idiótipo ou clone secundário. Conforme a teoria, há um equilíbrio nas concentrações de idiótipos que existem nos diferentes clones de linfócitos B e T; qualquer aumento exagerado do idiótipo de um clone, resultará na ativação do clone anti-idiótipo secundário do linfócito B. Esse, por sua vez, fica estimulado pelo excesso do idiótipo do clone primário, entra em atividade e gera o *anticorpo anti-idiótipo*, o qual se liga ao receptor do clone primário; impedindo-se a ligação do antígeno estranho a ele e, conseqüentemente, a continuação da resposta imune já iniciada contra o antígeno. O anticorpo anti-idiótipo, desta maneira, desempenha a função de “encerrar” uma resposta imune montada contra um antígeno estranho.

O anticorpo anti-idiótipo é considerado como a “imagem interna” do antígeno, haja vista que ele reage exatamente como o receptor do clone de linfócitos B, com que se liga o epítomo do antígeno. A verificação deste conceito vem das provas experimentais que revelam que é possível empregar o anti-idiótipo no lugar do antígeno como “vacina” para induzir no organismo de animais anticorpos contra o antígeno (HOLT, 1994).

A atuação demasiada do clone anti-idiótipo acarretaria, potencialmente, o prejuízo de bloquear o desencadeamento do anticorpo protetor da resposta primária; portanto, o aumento do clone secundário (aumento do idiótipo do clone secundário) ativaria um clone terciário (clone anti-anti-idiótipo), cujo anticorpo (anti-anti-idiótipo) bloquearia o sítio ativo do receptor do clone secundário, diminuindo a produção do anticorpo anti-idiótipo e liberando o clone primário da regulação pelo anticorpo anti-idiótipo. *O sistema imune estabelece, por via dessa rede idiotípica, os controles positivos e negativos para iniciar e regular as suas respostas imunes aos estímulos imunogênicos.* Dessa forma, a revolucionária teoria da Rede Idiotípica esclarece, em base lógica e coerente, a secular dificuldade para compreender o “por quê e como” as respostas iniciadas são sempre encerradas no organismo.

Partindo-se destes princípios da teoria da Rede Idiotípica, pode-se explicar a reatividade direta dos anticorpos anti-frutalina com as estruturas tanto normais, como patológicas, estudadas no presente trabalho. Lembrando-se que a frutalina faz parte do gênero *Artocarpus* ao qual também pertence a jaca, muito difundida na vegetação nativa do nordeste brasileiro, e consumida pela população local. Vale ressaltar que, além da cobiçada fruta jaca, a frutapão, é também bastante consumida pelos cearenses. A absorção de suas lectinas, em condições que ainda conservam a sua integridade molecular e imunogênica, poderá resultar no desenvolvimento da resposta imune no organismo, com a presença do anticorpo anti-lectina. De acordo com a teoria da Rede Idiotípica, a presença deste anticorpo deverá deslançar, com o tempo, a geração do anticorpo anti-idiótipo, capaz de regular a atividade do clone reconhecedor das lectinas. Haja vista que tanto os anticorpos anti-lectinas quanto os seus anti-idiótipos, são dotados do segmento Fc, é de se esperar, que um entre os dois tipos de anticorpos venha a se ligar a células e tecidos do organismo com que tenham alguma afinidade molecular. *Se os anticorpos anti-idiótipos ficarem ligados aos tecidos imunes, os anticorpos anti-frutalina devem se ligar a eles, numa reação espontânea de idiótipo-anti-idiótipo.* Esta hipótese se fundamenta na probabilidade de que as lectinas do gênero *Artocarpus* tenham

semelhanças moleculares significativas, possibilitando assim as reações cruzada entre elas, como aludido anteriormente.

Pesquisas relevantes futuras podem revelar informações importantes as quais podem sugerir quais das hipóteses aqui levantadas são capazes de explicar de forma mais coerente as observações evidenciadas no presente trabalho.

5.3 Variação do pH

A maneira de demonstrar a importância da estrutura específica das proteínas para a função biológica que exercem é alterar esta estrutura e determinar o efeito que isto causa nesta função. Uma alteração extrema é a perda total da sua estrutura tridimensional que é conhecido como desnaturação, e está relacionada à perda da sua função. Algumas proteínas podem recuperar as suas estruturas nativas e sua função, um processo conhecido como renaturação. Algumas condições são reconhecidamente desnaturantes, tais como aquecimento, alguns solventes orgânicos como o etanol e acetona, substâncias detergentes, variação de pH, dentre outras. Os valores extremos de pH, alteram a carga líquida da proteína, provocando repulsão eletrostática e rompimento de algumas pontes de hidrogênio.

Em um trabalho recente, a frutalina foi submetida a filtração em gel em coluna de Superdex 12 HR, acoplada a um sistema de HPLC, em condições de pH variando de 2,6 a 10. Observou-se que na ausência do ligante e a pH 10, a frutalina apresentou-se na sua forma tetramérica com Mr de 48 KDa. O mesmo não ocorreu em valores de pH mais baixos (8,0, 6,0 e 4,0), quando a lectina apresentou Mr entre 32 e 33,9 kDa, sugerindo uma forma intermediária entre dímero e tetrâmero, talvez um estado de equilíbrio. Em um pH de 2,6, a frutalina assumiu a forma monomérica, com Mr de 17Kda (Figura 6 cedida por MOREIRA *et al*, 1998). Na presença de D-galactose a 0,2 M, a frutalina apresentou massa molecular relativa correspondente à forma tetramérica com Mr de 48,3 kDa, em todos os valores de pH, com exceção para o pH 2,6, no qual o Mr encontrado foi ligeiramente inferior. Dessa forma parece que a D-galactose de alguma maneira, estabiliza a estrutura quaternária da frutalina, mesmo em pH 2,6 (MONTEIRO, 1998). Estes mes-

mos autores, em outro experimento, mostraram que com pH 12 a frutalina apresenta um desenovelamento estrutural (MONTEIRO, 1998).

No experimento realizado neste trabalho observou-se que com o valor de pH de 2,6 as reações de imunohistoquímica foram negativas. Com os valores de pH igual a 4,0, igual a 7,0, igual a 8,6 e igual a 10,0 reações foram positivas. Estes resultados sugerem que a forma monomérica da frutalina não permite a ligação com o ligante e que a forma bimérica e/ou tetramérica é provavelmente a sua conformação funcional (Figuras 33 e 34).

5.4 Comparação de resultados obtidos com a frutalina com os da jacalina citados na literatura

A jacalina e a frutalina são lectinas pertencentes a mesma família (*Moraceae*) e classe (*Magnoliadae*). Ambas são lectinas D-galactose ligantes (MONTEIRO, 1998). A jacalina é uma glicoproteína tetramérica de aproximadamente 50KDa formada por duas subunidades de 133 aminoácidos, ligadas não covalentemente, com massas moleculares aparentes de 12 e 15 KDa, respectivamente (MONTEIRO, 1998) e um pequeno peptídeo de 20 resíduos, a subunidade β . A jacalina apresenta um novo sítio ligante de carboidrato envolvendo o N-terminal da cadeia α e que é produzido por modificação pós-tradução envolvendo proteólise, se constituindo no primeiro exemplo conhecido em que tal modificação foi feita para conferir a especificidade por carboidrato. Este novo tipo de enrolamento deve ser característico das lectinas da família *Moracea*. A estrutura fornece uma explicação para a relativa especificidade por derivados de galactose e fornece detalhes da base estrutural de sua especificidade pelo antígeno T (SANKARANARYANAN, *et al*, 1996).

A estrutura primária da frutalina não foi totalmente resolvida. Sabe-se que os 48 aminoácidos na porção N-terminal da frutalina, quando comparados com a seqüência da jacalina são totalmente semelhantes (Figura 35, MONTEIRO, 1998).

como a mostrar resultados de marcação imunohistoquímica com a frutalina sob diferentes condições de pH.

O anticorpo anti-lectina como marcador celular direto foi pioneiramente utilizado no presente trabalho como uma nova técnica de marcação no estudo de glicoconjugados da superfície celular.

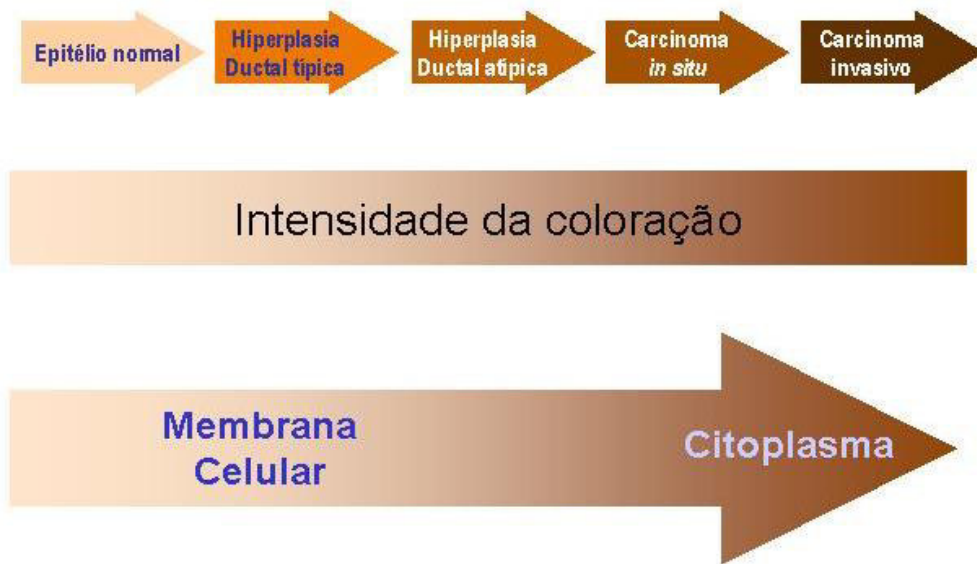
5.6 Resumo de todos os achados deste trabalho:

- 1) A frutalina (Técnica I) marca células epiteliais.
- 2) O anticorpo anti-frutalina (Técnica II) quando usado diretamente, também marca células epiteliais.
- 3) Há tendência a reações mais freqüentes e mais fortes nas lesões hiperplásticas e neoplásicas do que no epitélio normal por ambas as técnicas.
- 4) A frutalina é capaz de se ligar à metaplasia apócrina, às células transformadas nas hiperplasias e carcinomas, evidenciando que estas células apresentam formas incompletas, não sializadas de glicoconjugados da membrana, expondo resíduos ricos em galactose.
- 5) O anticorpo anti-frutalina provavelmente se liga a uma porção da membrana que apresenta alguma semelhança com a frutalina (reação cruzada?).
- 6) O anticorpo anti-frutalina não apresentou nenhuma marcação nos casos de hiperplasia ductal atípica. Este achado deve ser posteriormente aprofundado com maior número de casos, vez que tem importante implicação no diagnóstico.
- 7) A imunomarcação da frutalina e da jacalina é muito semelhante, ambas marcam células epiteliais, como é amplamente citado na literatura.
- 8) A variação de pH desempenha um papel importante na estrutura da frutalina, com perda de atividade em pH igual a 2,6 quando está em sua forma monomérica.
- 9) A frutalina marcou matriz estromal. O mesmo não ocorreu com o anticorpo anti-frutalina.

6 Conclusão

A frutalina marca membrana e citoplasma de células epiteliais com maior expressão no epitélio mamário transformado.

Os resultados do anticorpo anti-frutalina, considerando os controles realizados, levam a crer que provavelmente reflitam reações específicas da célula com este anticorpo, ocorrendo maior expressão no epitélio mamário alterado com predileção para o citoplasma, à medida da progressão tumoral evidenciando, possivelmente, a internalização de moléculas. O esquema abaixo ilustra o fenômeno verificado.



7 Bibliografia

- ACHESON A.; SUNSHINE J.L.; RUTISHAUSER U. NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions. *J. Cell. Biol.*, v. 114, p. 143, 1991.
- AGRAWAL, BBL. & GOLDSTEIN, I.J., Specific binding of concanavalin A to cross linked dextran gels. *Biochem J.*, v. 96, p. 230, 1965.
- ALAM, S.M., WHITFORD, P, CUSHLEY, W., GEORGE, W. D. & CAMPEBELL, A., M. Flow cytometric analysis of cell surface carbohydrates in metastatic human breast cancer. *Br. J. Câncer*, v. 62, n. 2, pp. 238-242, 1990.
- ALBELDA, S.M. The role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab. Invest.*, v. 68, p. 4, 1993.
- ALLEN, A.K.; DESON, N.N.; NEUBERGER, H. Properties of potato lectin and the nature of its glycoprotein linkages. *Biochemical J.*, v. 171, pp. 665-674, 1978.
- ALPERS, C.E.; BECKSTEAD, J.H.; NEWMAN, A.B. Malignant fibrous histiocytoma, myelomonocytic leukemia, and Hodgkin's disease arising in an elderly man. *Cancer*, v.53, p. 1943-1947, 1984.
- ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. (Ed.). *Manual de imuno-histoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira De Patologia, 1999.
- ALZARI, P.M.; LASCOMB, M.B.; POLJAK, R.J. The three-dimensional structure of antibodies. *Ann. Rev. Immunol.*, v. 6, p. 555-572, 1988.
- ANDRE, S., KOJIMA, S., YAMAZAKI, N., FINK, C., KALTNER, H., KAYSER, K., GABIUS, H.J. Galectins-1 and -3 and their ligands in tumor biology. Non-uniform properties in cell-surface presentation and modulation of adhesion to matrix glycoproteins for various tumor cell lines, in biodistribution of free and liposome-bound galactins and in their expression by breast and colorectal carcinomas with/without metastatic propensity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 125 (8-9): p. 461-474, 1999.

- ASSMAN, F. (1911). Beitrage zur Kenntnis pflanzenlicher Agglutinine. *Arch. Ger. Physiol.* 137: 489, citado por Gold & Balding, 1975.
- AUB, J.C.; SANFORD, B.H.; WANG, L. Reaction of normal and leukemic cell surfaces to wheat germ agglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.54, p.400, 1965.
- AUB, J.C.; TRESLAU, C.; LANKESTER, L. Reactions of normal and tumor cell surfaces enzymes. I. wheat germ lipase and associated mucopolisaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 50, pp. 613-619, 1963.
- AUCOUTURIER, P.; MILHAESCO, E.; MILHAESCO, C.; PREUD'HOMME, J.L. Characterization of jacalin, the human IgA1 and IgD binding lectin from jackfruit. *Molec. Immunol.*, v. 24, pp. 503-511, 1987.
- BALDUS, S.E.; ZIRBES, T.K.; WEIDNER, I.C.; FLUCKE, U.; DITTMAR, E.; THIELE, J.; DIENES, H.P. Comparative-quantitative analysis of macrophage populations defined by CD-68 and carbohydrate antigens in normal and pathologically altered human liver tissues. *Anal. Cell Pathol.*, v. 16, pp. 141-150, 1998.
- BARROSO, G.M. *Systematica de angiospermas no Brasil*. São Paulo: EDUSP: 1978. v.1.
- BARRY, J. D., KOCH T. J., COHEN, C., BRIGATI, D. J., SHARKEY, F. E. Correlation of immunohistochemical markers with Patient prognosis in breast carcinoma: a quantitative study. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 82, n. 5, pp. 582-585, 1984.
- BASU, L.A.D.; APPUKUTTAN, P.S. α -glactoside-binding isolectins from wild jack fruit seed (*Artocarpus hirsuta*): purification and properties. *Indian J. Biochem. Biophys.*, v. 26, pp. 361-366, 1989.
- BENCHIMOL, S.; FUKS A.; JOTHY S. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*, v.57, p.327, 1989.
- BERMAN, C.L., YEO E.C., WENZEL-DRAKE J.D. FURIE, B. C. GINSBERG, M. H., FURIE, B. A Platelet alphagranule membrane protein that is associated with plasma membrane after activation. *J. Cil. Invest.*, v. 78, p. 130, 1986.
- BLASCO, E.; NGOG, L.O.; AUCOUTURIER, P.; PREUD'HOMME, J.L. Nitrogenic activity of new lectins from seeds of wild *Artocarpus* species from Vietnam. *C. R. Sci.*, v. 319, pp. 405-409, 1996.

- BOWER, H. (1854). *American Journal of Pharmacy*, 36, 207-209, citado por Franz (1987).
- BOYD, W.C.; REGUERA, R.M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. *J. Immunol.*, v. 62, pp. 333-339, 1949.
- BOYD, W.C.; SHAPHEIGH, E.C. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, v. 119, p. 419, 1954.
- BRACIALE, T.J.; BRACIALE, V.I. Antigen presentation: structural themes and functional variations. *Immunol. Today*, v. 12, pp. 124-129, 1991.
- BROOKS, S.A. The involvement of helix *pomatia* lectin (HPA) binding N-acetylgalactosamine glucans in cancer progression. *Histol. Histopathol.*, v. 15, n. 1, pp. 143-158, 2000.
- BROOKS, S.A.; LEATHEM, A.J. Prediction of Lymph node involvement in breast cancer by detection of altered glycosylation in the primary tumor. *Lancet*, v. 13, n. 338, pp. 71-74, 1991.
- BROOKS, S.A.; LEATHEM, A.J.; CAMPLEJOHN, R.S. *et al.* Markers of prognosis in breast cancer - the relationship between binding of the lectin HPA and histological grade, SPF, and ploidy breast. *Cancer Res. Treat.*, v. 25, n. 3, pp. 247-256, 1993.
- BROOKS, S.A.; LEATHEM, A.J.C. Expression of alpha-GalNac glycoproteins by breast cancers. *Br. J. Cancer*, v. 71, pp. 1033-1038, 1995.
- BROOKS, S.A.; LYMBOURA, M.; SCHUMACHER, U. *et al.* Histochemistry to detect helix *pomatia* Lectin Binding in breast cancer: Methodology makes a difference. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 44, n. 5, pp. 519-524, 1996.
- BROWN, E.; HOOPER, L.; H.O.T.; GRESHAM H. Integrin-associated protein: a 50-KD plasma membrane antigen physically and functionally associated with integrins. *J. Cell Biol.*, v. 111, p. 2785, 1990.
- BUCK, C.A. Adhesion mechanisms controlling and cell-matrix interactions during the metastatic process. In: MENDELSON, J.; HOWLEY, P.M.; ISRAEL, M.A.; LIOTTA, L.A. *The Molecular basis of cancer*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995 p. 172.

- BURGER, M.M.; GOLDBERG, A.R. Identification of an tumor - specific determination on neoplastic cell surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 57, p. 359, 1967.
- BURGER, MM. & NOONAN, KD. Restoration of normal growth by covering agglutination sites on tumor cell surface. *Nature*, v. 228, pp. 512-515, 1970.
- BUXTON RA, MAGEE A.L. Structure and interactions of desmosomal and other cadherins. *Semin. Cell Biol.*, v. 3, v. 157, 1992.
- CALVETE, J.J.; HENSCHEN, A.; GONZÁLEZ-RODÍGUEZ, J. Assingment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa: A disulphide pattern for the β -subunits of the integrin family. *Biochem J.*, v. 274, p. 63, 1991.
- CAMMUE, B.P.; PEETERS, B.; PEUMANS, S.W. Isolation and partial characterization of an n-acetylgalactosamine - specific lectin from winter-aconite (*Eranthis hyemalis*) root tubers. *Biochem. J.*, v. 227, pp. 949-955, 1985.
- CAMP, R.L.; KRAUS, T.A.; PURE, E. Variations in the cytoskeletal interaction and post-translational modification of the CD44. *J. Cell Biol.*, v. 115, p. 1283, 1991.
- CAMPBEL, P. A., HARTMAN, A. L. & ABEL, C. A. Stimulation of B cell, but not T cells or thymocytes, by a sialic acid-specific lectin. *Immunology*, v. 45, pp. 155, 1982.
- CHAMMAS, R.; JASINLIONIS, M.G.; JIN, F. *et al.* Carbohydrate-binding proteins in cell-matrix interactions. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 27, pp. 2169-2179, 1994.
- CHRISPEELS, M.J.; HARTL, P.M.; FAYE, L. Characterization of the endoplamic reticullum-associated precursor of concanavalin A. *J. Biol. Chem.*, v. 261, n. 22, pp. 10021-10024, 1986.
- CUNNINGHAM, B.A.; HEMPERLY, J.J.; MURRAY B.A. *et al.* Neural cell adhesion molecule: Structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science*, v. 236, p. 799, 1987.
- CURTIS, O.D.W.; SLACK, M.P.F. Wheat-germ agglutination of *Neisseria gonor-rhoeae*. A laboratory investigation. *Br. J. Venereal Dis.*, v. 57, pp. 253-255, 1981.

- DANSEY, R., MURRAY, J., NININ, D. & BEZWODA, W. R. Lectin binding in human breast cancer: clinical and Pathologic correlations with fluorescent conjugated peanut, Wheat germ and Concanavalina A binding. *Onconlogy*, v. 45, n. 4, pp. 300-302, 1988.
- DESAI, N.N.; ALLEN, A.; NEUBERGER, H. Some properties of lectins from *Datura stramonium* (thorn apple) and the nature of its glycoprotein linkages. *Biochem. J.*, v. 197, pp. 345-353, 1988.
- DESILETS J. D., DAVIS, K., E., NAIR, P. P., SALATA, K., F., MAYDONOVITCH, C., L., HOWARD, R., S., KIKENDALL, J., W., & WONG, K., H. Lectin binding to human colonocytes is predictive of colonic neoplasia. *Am. J. Gastroenterol.*, v. 94, n. 3, pp. 744-750, 1999.
- DOSET, M.; HENLEY, R.R. (1917) *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 50: 699, citado por Kocourek, 1986.
- DUPONT, W.D. *et al.* Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypial hyperplasia. *Cancer*, v. 71, pp. 1258-1265, 1993.
- DWEK, M.V., ROSS, H.A., STREETS, A.J., BROOKS, S.A., ADAM, E., TITCOMB, A., WOODSIDE, J.V., SCHUMACHER, U. & LEATHEM, A.J. *Helix pomatia* agglutinin lectin-binding oligosaccharides of aggressive breast cancer. *Int. J. Cancer*, v. 95, n. 2, pp. 79-85, 2001.
- EDELMAN, G.M. Morphoregulation. *Dev. Dyn.*, v. 193, p. 2, 1992.
- EHRILICH, P. (1891b). Experimentelle untersuchungen über immunitat I. über Abrin
Dtsch. Med. Wschr., 17, 1218, *citado por* Gold & Balding, 1975.
- ELFSTRAND, M. (1998). Über Blutkörperchenagglutinierend Eiweiss. In: Kobert, R. Ed. Gorbenschofer, *Veroffent-lichungen*, 1-157. Engen, Sttugart, *citado por* Gold & Balding, 1975.
- ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. The Breast. In: SYMMMMERS, W. *Sistemic pathology*. London: Churchill Livingstone, 1998. v. 13.
- EMMERICH, P.; FREDRICH, T.; DALITZ, H. Genesis and importance of so called inflammatory infiltration of the placenta. Immunohistochemical findings. *Anat. Anv.*, pp. 213-209, 1998.

- ENGEL, U. BREBOROWICZ, D. ALBRECHTSEN, J.M., BOG-HANSEN, TC., FRANCIS, D. Lectin staining of renal cell tumours with special emphasis on oncicytomas. *APMIS*, v. 104, n. 12, pp. 933-937, 1996.
- FEARON, E.R.; CHO, K.R.; NIGRO, J.M. *et al.* Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, v. 247, p. 49, 1990.
- FENLON, S., ELLIS, I., BELL, F., TODD, J. H. , ELSTON, C. W. & BLAMEY, R. W. Helix Pomatia and Ulex Europens lectins binding in human breast carcinoma. *J. Pathol.*, v. 152, pp. 196-197,1987.
- FIEDLER, K.; SIMON, K. Título. *Cell*, v. 77, p. 625, 1994.
- FLEXNER, S.; NOGUCHI, H. (1902). *J. Exper. Med.*, 6: 277, citado por Kocourek, 1986.
- FRIXEN, U.H.; BEHRENS, J.; SACHS, L. *et al.* E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell Biol.*, v. 113, p. 173, 1991.
- FUKUTOMI, T., ITABASHI M., TUSUANE, E., YAMAMOTO, H., NANASAWA, T. & HIROTO, S. Prognostic contributions of helix pomatia and carcinoembryonic antigen staining using histochemical techniques in breast carcinomas. *Jpn J. Clin. Oncol.*, v. 19, n. 2, pp. 127-134, 1989.
- FUKUTOMI, T., HIROHASHI S., TSUDA H.,NANASAWA, T., YAMAMOTO, H., ITABASHI, M. & SHIMOSATA, Y. The prognostic value of tumor - associated carbohydrate structures correlated with gene amplification in humen breat. carcinomas. *Jpn. J. Surg.*, v. 21, n. 5, pp. 499-507, 1991.
- GABIUS, H.J.; BODANOWITZ, S.; SCHAUER, A. Endogenous sugar-binding protein in human breast tissue and benign and malignant breast lesion. *Cancer*, v. 61, n. 6, pp. 1125-1131, 1988.
- GAUSERA, R.; SCHURZ, H.; RUDIGLER, H. Lectin associated proteins from the seeds of leguminosae hoppe-seyler's. *Z. Phisiol. Chem.*, v. 360, pp. 1579-1585, 1979.
- GEBAUER, G.; SCHLITZ, E.; SCIMPL. A.; RUDIGER, H. Purification and characterization of a mitogenic lectin and lectin binding protein from *vicia sativa*. Hope-Seyle's *Z. Physiol. Chem.*, v. 360, pp. 1727, 1979.

- GENG, J.G.; BEVILACQUA, M.S.; MOORE K.L. *et al.* Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature*, v. 343, pp. 757, 1990.
- GOLDENSTEIN, I.J.; HAYES, C.E. The Lectins: carbohydrate binding proteins of plant and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, v. 35, pp. 127-340, 1978.
- GOLDENSTEIN, I.J.; PORETZ, R.D. Isolation and properties of lectins. *In: LIENER, I.C.; SHORON, N.; GOLDENSTEIN, I.J. (Ed.). The Lectins: properties, functions and applications in biology and medicine.* London: Academic Press, 1986
- HARBOE, N.; INGILD, A. A Manual of quantitative Immuno-electrophoresis: methods and application *In: AXELSEN, N.H.; KROLL, J.; WEEKE, B. (Ed).* Oxford: Blackwell Scientific publications, 1973.
- HATTA, K.; NOSE, A.; NAGAFUCHI, A.; TAKEICHI, M. Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium- dependent cell adhesion molecule: Its identity in the cadherin gene family. *J. Cell Biol.*, v. 106, v. 873, 1988.
- HEIDER, K-H.; HOFMANN, M.; HORS, E. *et al.* A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J. Cell Biol.*, v. 120, p. 227, 1993.
- HELLE, M. & KRONH, K. Reactivity of monoclonal antibody recognizing an estrogen receptor regulated glycoprotein in relation to lectin histochemistry in breast cancer. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol* v. 410, n. 1, pp. 23-29, 1986.
- HELMER, M.E. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Ann. Rev. Immunol.*, v. 8, p. 365, 1990.
- HELPAP, B. Nucleolos grading of breast Cancer: comparative studies on frequency and localization of nucleoli and histology stage, hormonal receptor status and lectin histochemistry. *Virchows Arch. A Pathol. Anot. Histopathol.*, v. 415. n. 6, pp. 501-508, 1989.
- HEMLER, M.E.; ELICES, M.J.; CHAM, B.M.C. *et al.* Multiple ligand binding functions for VLA-2 and VLA-3 in the integrin family. *Cell Differ. Dev.*, v. 32, p. 229, 1990.

- HENOUE, C.; DIDIER E.; LATOUR, M. *et al.* Association of N-acetyllactosamine with tumor progression in human breast cancer: a study using a 16 kDa chick embryo lectin. *Int. Mol. Med.*, v. 4, pp. 771-775, 1998.
- HIGGINS, T.J.V.; CHANDLER, P.M.; ZURAW, SKI, G.; BUTTON, S.C.; SPENDER, D. The biosynthesis and primary structure of pea seed lectin. *J. Biol. Chem.*, n. 285, n. 15, pp. 9544-9549, 1983.
- HIRANO, S.; KIMOTO, N.; SHIMOYAMA, Y. *et al.* Identification of a neural α -catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell* v. 70, p. 293, 1992.
- HOGERVORST, F.; KUIKMAN, I.; VON DEM BORNE, A.E.G.R.; SONNENBERG, A. Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain. *EMBO J.*, v. 9, p. 765, 1990.
- HOLT, P.G. Immunoprophylaxis of atopy: light at the end of the tunnel? *Immunol. Today*, v.15, p.484-490, 1994.
- ILLES, T.; FISCHER, J. Distribution of lectin binding glycoprotein in osteoclasts. *Histochemistry*, v. 91, pp. 55-59, 1989.
- INBAR, M.; SACHS, L. Interactions of the carbohydrate-binding protein concanavalin A with normal transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 63, p. 1418-1425, 1969.
- INTERNATIONAL (LUDWIG) BREAST CANCER STUDY GROUP. Prognostic value of *Helix pomatia* in breast cancer. *Br. J. Cancer* v. 68, pp. 146-150, 1993.
- ISAACSON, P., JONES, D.B., MILWARD-SADLER, G.H., JUDD, M.A., PAYNE, S. Alpha-1 antitrypsin in human macrophages. *J. Clin Pathol.*, 34, pp. 982-990, 1981.
- JERNE, N.K. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol.*, v. 1235, pp. 373-382, 1974.
- JONIC N., MARÍN-PADURA I., POLLICINO T, *et al.* Regulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human malignant melanoma. *Am J Pathol* v. 141, p. 1323, 1992.

- JONSON, J.P.; STADE, B.G.; HOLZMANN, B. *et al.* De novo expresión of intercellular adhesion molecule-1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 86, p. 641, 1989.
- KARUNA, V., SHANTINI, P., MADHAVAN, M. Lectin binding patterns in benign and malignant lesions of the breast. *Indian J. Pathol. Microbiol.* V. 35, n. 4, pp. 289-297, 1992.
- KAWANO, T.; TAKASAKI, S.; TAO, T-W.; KOBATA, A. Altered glycosylation of 1 integrins associated with reduced adhesiveness to fibronectin and laminin. *Int J Cancer*, v. 53, p. 91, 1993.
- KELLE, M.; KROHN, K. Reactivity of a monoclonal antibody recognizing an estrogen receptor regulated glycoprotein in relation to lectin histochemistry in breast cancer. *Virchows Arch. A Pathol. Anot. Histopathol.*, v. 410, n. 1, pp. 23-29, 1996.
- KIBBELLAR, R.E.; MOOLENAAR, K.E.C.; MICHALIDES, R.J.A.M. *et al.* Neural cell adhesion molecule expression, neuroendocrine differentiation and prognosis in lung carcinoma. *Eur. J. Cancer*, v. 27, p. 431, 1991.
- KLEIN, P.J., VIERBUCHEN, M., FISCHER, J., SCHULZ, K. D., FARRAR, G., UHLEN-BRUCK, G. The Significance of lectin receptors for the evolution of hormone dependence in breast cancer. *J. Steroid. Biochem.*, v. 19, n. 16, pp. 839-844, 1983.
- KOOPMAN, G.; VAN KOOYK, Y.; DE GRAAFF, M. *et al.* Triggering of the CD44 antigen on T lymphocytes promotes T cell adhesion through the LFA-1 pathway. *J. Immunol.*, v. 145, p. 3589, 1990.
- KOULUMIES, R. (1950). *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 28: 160-167, citado por Kocorek, 1986.
- KRICH, O.F. (1857). *Experimenta Quaedam Pharmacofofica de Oleis Ricini Crotonis et Euphorbia lathyridis.* Tese, Dorpati, Livonorun, citado por, Flomets, 1970.
- KROGERUS, L.; ANDERSSON, L. C. Different lectin - binding patterns in primary breast cancers and there metastases. *Cancer*, v. 15, n. 8, pp. 1802-1809, 1990.
- KRUPE, M. (1956). *Blutgruppenspezifische pflanzliche Eiweisskerper. (Phytoag-glutinine).* Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, pp. 1-131.

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, pp. 680-685, 1970.
- LAHM, H., ANDRE, S., HOEFELICH, A., FISCHER, R.J., SORDAT, B., KALTNER, H., WOLF, E., GABIUS, H.J. Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 127 (6): pp. 375-386, 2001.
- LALWANI, A. K., CAREY, T. E., GOLDSTEIN, L. J. & PETERS, B., P. Lectin binding characteristics of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Acta Otolaryngol.*, v. 116, n. 1, pp. 125-131, 1996.
- LANDOIS, L. (1875). Die Transfusion der Blutes. Vögel, Leipzig, *citado por* Kocourek, 1986.
- LANDSTEINER, K. & RAUBITSCHKE, H. (1907). Beobachtungen über Hamolyse und Hamagglutination. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 45, 660, *citado por* Gold & Balding, 1975.
- LANDSTEINER, K. (1902). Über Serumagglutinine. *Nunch. Med. Wschr.*, 49, 1905, *citado por* Gold & Balding, 1975.
- LEATHEN, A.J.; BROOKS, S.A. Predictive value of lectin binding on breast-cancer recurrence and survival. *Lancet*, v. 9, n. 1, pp. 1054-1056, 1987.
- LEATHEN, A.; DOKD, I.; ATKINS, N. Lectin binding to normal and malignant breast tissue. *Diagn. Histopathol.*, v. 6, n. 3/4, pp. 171-180, 1983.
- LENZE, F. (1909). Über Hamagglutinine der Leguminosen. *Inaugural Disseertaion giessen*, *citado por* Gold & Balding, 1975.
- LEONG, A.S.; RAYMOND, W.A. Prognostic parameters in breast cancer. *Pathology*, v. 21, n. 3, pp. 169-175, 1989.
- LEPPA, S.; MALL, M.; MIETTINEN, H.M.; JALKANEN M. Syndecan expression regulates cell morphology and growth of mouse mammary epithelial tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 89, p. 932, 1992.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 55, pp. 35-67, 1986.

- LIS, H. & SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem Rev.*, v. 98, pp. 637-674, 1998.
- MAEHARA, Y. OKUYAMA, T. KAKEJI, Y., ENDO, K., YAMAMOTO, M. & SUGIMACHI, K. A tumour-associated cell-surface glycoprotein accompanying p53 overexpression and higher growth potential for gastric cancer. *Br. J. Cancer*, v. 71, pp. 999-1002, 1995.
- MAKELA, O. Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.*, v. 35 (suppl. 11), pp. 1-156, 1957.
- MALE, D.; COOKE, A.; OWEN, M.; TROWSDALE, J.; CHAMPION, B. Leucocyte surface molecules. In: _____. *Advanced immunology*. 3. ed. London: Mosby, 1996.
- MARCUSSON-BEGUN, H. (1925). Untersuchungen über Hamagglutinin der Kartoffelknolle. *Z. Immun. Forsch.* 45, *citado por*, Gold & Balding, 1975.
- MARTH, C.; DAXENBICHYLER, G., Peanut agglutinin inhibits proliferation of cultured breast cancer cells. *Oncology*, v. 45, n. 1, pp. 47-50, 1988.
- MASOM, D. Y.; SAMMONS, R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J. Clin. Pathol.*, v. 31, pp. 454-460, 1978.
- MATSUYOSHI, N.; HAMAGUCHI, M.; TANIGUCHI, S. *et al.* Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J. Cell Biol.*, v. 118, p. 703, 1992.
- MEIS, J.M.; OSBORNE, B.M.; BUTLER, J.J. A comparative marker study of large cell lymphoma Hodgkin's disease and their histiocytic lymphoma in paraffin-embedded tissue. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 86, pp. 591-599, 1986.
- MEISTER, P.; NATHRATH, W. Immunohistochemical markers of histiocytic tumors. *Hum. Pathol.*, v. 11, pp. 300-301, 1980.
- MELATO, M., MUSTAC, E., VOLCOVIC, T. BOTTIN, C., SASSO, F., JONIC, N. The lectin-binding sites for peanut agglutinin in invasive breast ductal carcinomas and their metastasis. *Pathol. Res. Pract.* v. 194, n. 9, pp. 603-608, 1998.

- MEYKENS JR., F.L. Biology and intervention of the premalignant process. *Cancer Bull.*, v. 43, pp. 475-480, 1991.
- MICHELL, B.S.; VERNON, K.; SCHUMACKER, U. *et al.* Ultrastructural localization of helix pomatia agglutinin (HPA) - binding sites in human breast cancer cell lines and characterization of HPA - binding glycoproteins by western blotting. *Ultrastruct. Pathol.*, v. 19, n. 1, pp. 51-59, 1995.
- MICHELL, B. S., BROOKS, S., A., LEATHEM, A., J., C., SCHUMACHER, U. Do HPA and PHA-L have the same binding pattern in metastasizing human breast and colon cancers? *Cancer Lett.*, v. 123, pp. 113-119, 1998.
- MIRANDA-SANTOS, I.K., DELGADO, M., BONINI, P.V., BUNN-MORENO, M.M. & CAMPOS-NETO, A. A crude extract of *Artocarpus integrifolia* contains two lectins with distinct biological activities. *Immunological Letters*, v. 31, pp. 65-72, 1991.
- MODY, R.; JONSHI, S.; CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, v. 33, n. 1, pp. 1-10, 1995.
- MOLLER, P.; Peanut lectin: a useful tool for detecting Hodgkin cells in paraffin sections. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, v. 396, pp. 313-317, 1982.
- MONRIGNY, M.; ROCHA, A.C.; KIEDA, C. *et al.* Characterization and biological implications of membrane lectins in tumor lymphoid and myeloid cell. *Biochimie*, v. 70, pp. 1633-1649, 1988.
- MONTEIRO, A.C.O., BELTRANINI, LM., SILVA, F.M.B, CARLOS, E.R.C. & MOREIRA, R.A. Isolation of a manose-binding lectin from seeds of *Artocarpus incisa* L. *Simpósio Internacional em Bioquímica de Macromoléculas e Biotecnologia*, UFPE. Recife, 26-28 de novembro, 1997.
- MONTEIRO, A.C.O. *Características químicas, físico-químicas e estruturais da frutalina: uma lectina D-galactose ligante de Artocarpus incisa*. 1998. Tese (Mestrado) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.
- MOORE, K.L.; VARKI, MCEVER, R.P. GMP-140 binds to a protein receptor on human neutrophils. Evidence for a lectinlike interaction. *J Cell Biol* v. 112, p. 491, 1991.

- MOREIRA, R.A. *Lectinas vegetais: uma abordagem química e físico-química*. Tese (Concurso Professor Titular) - Universidade Federal do Ceará, 1998.
- MOREIRA, R.A.; AINOZ, I.L. Lectins from seeds of jack fruit (*Artocarpus integrifolia* L) isolation and purification of two isolectins from the albumin fraction. *Biologia Plantarum*, v. 23, n. 3, pp. 186-192, 1981.
- MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Comparative studies of seed proteins of the genus *Artocarpus* with respect to lectins. *Biologia Plantarum*, v. 25, n. 5, pp. 336-342, 1983.
- MOREIRA, R. A. PERRONE, J. C. Thermal stability of LcPA, a lectin isolated from *Phaseolus vulgaris*, L. *Plant Physiology*, v. 23, p. 57, 1976.
- MOREIRA, R.A. & PERRONE, J.V. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* v. 59, pp. 783-787, 1977.
- MUSTAC, E.; MELATO, M.; SASSO, F. *et al.* The Lectin binding sites for peanut agglutinin in invasive breast ductal carcinomas and their role as a prognostic factor. *Cancer Res. Clin. Oncol.*, v. 122, n. 11, pp. 693-697, 1996.
- NAGAFUCHI, A.; TAKEICHI, M., TSUKITA S. The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell*, v. 65, p. 849, 1991.
- NAIDU, T.G. *Estratégias de sobrevivência de microorganismos parasitos em hospedeiros imunocompetentes: um novo mecanismo de defesa de Staphylococcus aureus b-hemolítico em polimorfos nucleares neutrófilos*. 1998. Tese (Concurso Professor Titular) - Universidade Federal do Ceará, 1998.
- NICOLSON, G.L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. *Int. Rev. Cytol.*, v. 39, pp. 89-190, 1974.
- NOGUCHI, H. (1903). *Zentralbl. Bakterio., Parasitenkd., Infectionskr. Abt. 1: orig. 34: 286, citado por Kocourek (1986)*.
- NOGUCHI, M., THOMAS, M., KITAGAWA, H., KINOSHITA, K., OHTA, N., NAGAMORI, M. & MIYAZAIKI, I. Further analysis of predictive value of *Helix pomatia* lectin binding to primary breast cancer for axillary and internal mammary lymph node metastases. *Br. J. Cancer.*, v. 67, n. 6, pp. 1368-1371, 1993.

- NOGUCHI, M.; THOMAS, M.; KITAGAWA, H. *et al.* DNA ploidy and helix pomatia lectin binding as predictors of regional lymph node metastases and Prognostic in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, v. 26. n. 1, pp. 67-75, 1993.
- NORTON, A.J.; ISAACSON, P.G. Lymphoma phenotyping in formalin-fixed and paraffin wax-embedded tissues. 1. Range of antibodies and staining patterns. *Histopathology*, v. 14, pp. 437-466, 1989.
- NOWEL, P.C. Phytohemagglutinins: an initiator of mitosis in culture of animal and human leucocytes. *Cancer Res.*, v. 20, p. 462, 1960.
- OLIVEIRA, J.T.A. Estudo comparativo das lectinas presentes em sementes de três representantes do gênero *Artocarpus*. UFC (Tese de Mestrado), Fortaleza-Ce, 1980.
- OLSNES, S.; PIHL, A. Toxic lectins and related proteins. *In*: COHEN, P.; VAN HEYNINGEN, S. (Ed.). *Molecular action of toxins and viruses*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press. pp. 51-105, 1982.
- OZAWA, M.; HORSHUTZKY, H.; HERRENKNECHT, K.; KELMER R. A possible new adhesive site in the cell-adhesion molecule uromorulin. *Mech. Dev.*, v. 33, p. 49, 1990.
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. (1994). Proposal for a novel system of nomenclature of plant lectins. *In*: VAN DRISSCH, E.; FISCHER, J.; BEECKAMANS, S.; BOGHANSEN, J.C. (Ed.). *Lectins: biology, biochemistry, chemical biochemistry*. Møllerup: Tesesop. v. 10, 1994.
- PICKER, L.J.; WARNOCK, R.A.; BURNS A.R. *et al.* The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell*, v. 66, p. 921, 1991.
- PILLAI, K. R., REMANI, P., KANNAN, S., SUJATHAN, K., MATHEW, B., VIJAYAKUMAR, T., NAIR, M.K., & MENON, V.P. Jack fruit lectin-specific glycoconjugate expression of cervical intraepithelial neoplasia: a study on exfoliated cells. *Diag. Cytopathol.*, v. 10, n. 4, Pp. 342-346. 1994.
- PILLAI, K. R., *et al.* Lectin Histochemistry of oral Premalignant and Malignant Lesions: Correlation of JFL and PNA Binding Pattern with tumour progression. *Oral Oncol., Eur. J. Cancer*, v. 32b, n. 1, pp. 32-37, 1996.

- PINTO, F.S.C. Isolamento e caracterização das lectinas de sementes de *Artocarpus Incisa* L var. seminífera. UFC (Tese de Mestrado), Fortaleza-Ce, 1987.
- POBER, J.S.; GIMBRONE JR., M.A.; LAPIERRE, L.A. *et al.* Overlapping patterns of activation of human endotelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J. Immunol.*, v. 137, p. 1893, 1986.
- POBER, J.S.; LAPIERRE, L.A.; STOLPEN, A.H. *et al.* Activation of cultured hyman endothelial cells by recombinant lymphotoxin: Comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J. Immunol.*, v. 138, p. 3319, 1987.
- PUSTAI, A.; GRANT, G.; BROWN, D.S.; EWEN, S.W.B.; BARDOCZ, S. Phaseolusvulgaris lectins indices growth and increases the polyamine content of rat small intestine *in vivo*. *Med. Sci. Res.*, v. 16, pp. 1283-1284, 1986.
- RAJU, U.; ZARBO, R.J.; KUBUS, J.; SCHULTZ, D.S. The histologic spectrum of apocrine breast proliferations: a comparative study of morphology and DNA content by image analysis. *Hum. Pathol.*, v. 24, pp. 173-181, 1993.
- RAK, J.W.; MCEACHERN, D.; MILLER, F.R. Sequential alteration of peanut agglutinin binding - glycoprotein expression during progression of murine mammary neoplasia. *Br. J. Cancer*, v. 65, n. 5, pp. 641-648, 1992.
- RANSCHT, B.; DOURS-ZIMMERMANN, M.T. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. *Neuron*, v. 7, p. 391, 1991.
- RAPIN, A.M.C.; BURGER, M.M. (1974). Tumor cell surfaces: general alterations detected by agglutinins. *Adv. Cancer Res.*, v. 20, pp. 1-78, 1974.
- REE, H.J. Lectin histochemistry of malignant tumors: Concavalin A: a new histochemical marker for macrophage-histiocytes in follicular lymphoma. *Cancer*, v. 51, pp. 1639-1646, 1983.
- REE, H.J.; HSU, S.M. Lectin histochemistry of malignant tumors; peanut agglutinin (PNA) receptors in follicular lymphoma and follicular hyperplasia. An immunohistochemical study. *Cancer*, v. 51, pp. 1631-1638, 1983.

- REMANI, P., AUGUSTINE, J., VIJAYAN, K.K. *Jack fruit lectin binding pattern in benign and malignant lesions of the breast.* In Vivo n. 3, pp. 275-278, 1989.
- REMANI, P., JOY, A., VIJAYAN, K., K., RAVINDRAN, A., BEEVI, H. V., M., VASUDEVAN, D., M. & VIJAYKUMAR, T. (1990). Jack Fruit Lectin Binding Pattern in Carcinoma of the Uterine Cervix. *Journal of Experimental Pathology*, v. 5, n. 3, pp. 89-96.
- RENKONEM, H.O. Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family *leguminosae*. *Ann. Med. Exp. Fenn.*, v. 26, p. 66, 1948.
- REMMELE, W., HELDEBRAND, U., HIENZ, H.A., KLEIN, P. J., VIERBUCHEN, M., HEICKE, B., SCHEIDT, E. Comparative histologic-histochemic immunohisto-chemical and biochemical studies on estrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer. *Virchows. Arch A. Pathol. Anat. Histopathol.* v. 409, n. 2, pp. 127-147, 1986.
- ROBERT, B. CALVIN, ATUL K. BHAN, ROBERT T. Mecluskey. Naven Press, 2^a ed., (Capter 38), New York, 1995.
- ROCHE, A.C.; MONSIGNY, M. Chemtracts. *Biochem. Mol. Biol.*, pp. 100-158, 1996.
- ROHOLL, P.J.M.; KLEIJNE, J.; PRINSI, M.E.F.; HOOIJKAA, H.; VROOM, M.; VAN UNNIK, J.A.M. Immunologic marker analysis of normal and malignant histocytes. *Hum. Pathol.*, v. 89, pp. 187-194, 1988.
- ROQUE-BARREIRA, M.C.; CAMPOS NETO, A. Jacalin, an IgA-binding lectin. *J. Immunol.*, v. 134, pp. 1740-1743, 1985.
- ROSE, V. The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast carcinoma: an immunohistologic study of 71 patients and review of the literature. *Cancer*, v. 91, n. 11, pp. 1973-1982, 2001.
- RUCO, L.P.; PERCAMONA, E.; PEZZELLA, E.; UCCINI, S.; TESTI, A.M.; CARTONI, C.; BARONI, C.D. Lectin I of *Ulex* as a marker for a subset of histiocytic tumors of lymph node. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, v. 408, n. 2/3, pp. 229-240, 1985.
- SANKARANARAYANN, R. SEKAR, K., BANERJEE, R., SHARMA, V, SUROLIA, A. & VIJAYAN, M. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plan lectin with a b-prism fold. *Nature Structural Biology*, v. 3, n. 7, pp. 596-603, 1996.

- SANTOS-DE-OLIVEIRA, R., DIAS-BARUFFI, M. THOMAZ, S.M.O., Beltramini, L.M. & Roque-Barreira, M.C. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus intergrifolia*. *The J. Immunol.*, v. 153, pp. 1798-1807, 1994.
- SASTRY, M.V.K.; BARNAJIE, P.; PATANJALI, S.R.; SWAMY, MJ.; SWARNALATHA, G.V.; SUROLIA, A. Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (α -D-Gal(1-3) D-GalNAc). *J. Biol. Chem.*, v. 261, pp. 11726-11733, 1986.
- SCHAEPPNEL, E.; RAZ, A.; HO, S.B. *et al.* Expression of an endogenous Galactose - Binding Lectin correlates with Neoplastic Progression in the colon *Cancer*, v. 75, n. 12, pp. 2818-2826, 1995.
- SCHMITT, F.C. Prognóstico do câncer de mama: avaliação do impacto de novos métodos face aos fatores prognósticos tradicionais. *Arq. Med.*, v. 8, pp. 319-324, 1994.
- SCHMITT, F.C.; FIGUEIREDO, P.; LACERDA, M. Simple mucin-type carbohydrate antigens T, sialosyl-T, Tn and sialosyl-Tn in the breast carcinogenesis. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, v. 425, pp. 251-258, 1995.
- SCHMITT, F.C.; MARINHO, A.; AMENDOEIRA, I. Expression of sialyl-Tn in fine-needle aspirates from mammographically detected breast lesions: a marker of malignancy? *Diagn. Cytopathol.*, v. 18, n. 5, pp. 325-329, 1998.
- SCHMITT, F.C.; PEREIRA, M.B.; REIS, C.A. MUC 5 expression in breast carcinomas. *Hum. Pathol.*, v. 30, n. 10, p. 1270, 1999.
- SCHMITT, F.C.; VALENTÍ-PONSA, C. Facteurs prédictifs dans le traitement du cancer du sein. *J. Le Sein*, t. 10, n. 3, pp. 189-195, 2000.
- SCHNEIDER, E.O. (1912). The memagglutinating and precipitating properties of the bean (*Phaseolus*). *J. Biol. Chem.*, v. 11, p. 47, citado por Gold & Balding, 1975.
- SCHOEPPNER H., L., RAZ, A., HO, S., B. & BRESALIER, R., S. Expression of an Endogenous Galactose-Binding Lectin Correlates With Neoplastic Progression in the Colon. *Cancer*. v. 75, n. 12, pp. 2818-2825, 1995.

- SCHUMACHER, H.; KRETZSCHAMAR, K.; BROOKS, S. *et al.* *Helix pomatia* lectin binding pattern of brain metastases originating from breast cancer. *Pathol. Res. Pract.*, v. 188, n. 3, pp. 284–286, 1992.
- SCHUMACHER, U.; ADAM, E.; BROOKS, S.A. *et al.* Lectin binding properties of human breast cancer cell lines and human milk with particular reference for *helix pomatia* agglutinin. *J. Histochem-Cytochem.*, v. 43, n. 3, pp. 275–281, 1995.
- SCHUMACHER, D. U., RANDALL, C. J., RAMSAY, A. D., SCHUMACHER, U. Is the binding of the Lectin *Helix pomatia* agglutinin (HPA) of prognostic relevance in tumours of the upper aerodigestive tract? *Eur. J. Surg. Oncol.*, v. 22, n.6, p.618–620, 1996.
- SCHUMACHER U., ADAM E., BROOKS S. A., & LEATHERM, A. J. (1996). The use of *Helix pomatia* agglutinin in metastasis research. *Biochemistry*. 11: 307 – 310.
- SCHWONZEN, M.; UHLENBRUCK, G.; SCHAADT, M.; FUNKEN, D.; BURRICHTER, H.; DIEHL, V. Lectin binding pattern of Hodgkin's disease derived cell lines in comparison to other human cell lines *Cancer Detect. Prev. Suppl.*, v. 1, pp. 127-135, 1987.
- SELLA, B.; LIS, H.; SARON, N.; SAXHS, L. (1970). *Journal of Membrane Biology* v. 3 pp. 267-279, 1970.
- SHAEFER, R.L.; KELLER, K.F.; DOYLE, R.J. Lectins in diagnostic microbiology use of wheat germ agglutination for laboratory identification
- SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American*, jan of *Neiseria gonorrhoeae*. *J. Chem. Microbiol.*, v. 10, pp. 669-672, 1979.
- SHARON, N.; LIS, H. (1989). *Lectins*, 126pp. Chapman & Hall, London.,74,1993.
- SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologens proteins. *FASEB J.*, v. 4, pp. 3198-3207, 1990.
- SHARON, N. & REISNER, Y. Soy protein and bubble-children. *Rehovot* v. 10, n. 2, pp. 6-9, 1987.
- SHIMIZU, Y.; NEWMAN, W.; GOPAL, T.V. *et al.* Four molecular pathways of cell adhesion to endothelial cells: Roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in path-

- way hierarchy under different activation conditions. *J. Cell Biol.*, v. 113, p. 1203, 1991.
- SHOWALTER, A.M. Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell*, v. 5, pp. 9-23, 1993.
- SIGURDSSON, H.; BALDE TORP, B.; BORG, A. *et al.* Indications of prognosis in node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, v. 322, pp. 1045-1053, 1990.
- SIVRIDIS, E.; AGHANTIS, N. The loss of lectin reactivity from human endometrium is a feature of malignant change. *Pathol. Res. Pract.*, v. 192, n. 10, pp. 989-997, 1996.
- SKUTELSKY, E., HOENIG, S., GRIFFEL, G., ALROY, J. The distribution of lectin receptor sites in human breast lesions. *Path. Res. Pract.* v. 183, pp. 469-475, 1988.
- SLOANE, J.P. Evidence for premalignant lesions in the human breast. *Eur. J. Cancer Prev.*, v. 2, suppl. 3, pp. 17-21, 1993
- SMETS, L.A.; BEEK, P.V. Carbohydratos of cell surface. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 738, p. 237, 1984.
- SMYTH, S.S.; HILLERY, C.A.; PARISE, L.V. Fibrinogen binding to purified platelet glycoprotein IIb-IIIa (integrin IIb3) is modulated by lipids. *J. Biol. Chem.*, v. 267, p. 15568, 1992.
- SOARES, R.; MARINHO, A.; SCHMITT, F. C. Expression of sialyl-Tn in breast cancer correlation with prognostic parameters. *Pathol. Res. Pract.*, v. 192, pp. 1181-1186, 1996.
- STAMP, G.W.H.; PIGNATELLI, M. Distribution of β_1 , α_1 , α_2 and α_3 integrin chains in basal cell carcinomas. *J. Pathol.*, v. 163, p. 307, 1991.
- STENBERG, P.E.; MCEVER, R.P.; SHUMAN, M.A. *et al.* A platelet alphagranule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J. Cell Biol.*, v. 101, p. 880, 1985.
- STILLMARK, H. (1888). Über rigin ein fiffiges ferment aus samenen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Tese de doutoramento, Universidade de Dorpat, Estônia, *citado por*, Fraor, 1988.

- STINISSEN, H.M.; PEUMANS, W.J. Recent advances in biochemistry. Cell biology, physiology, biosynthesis and genetics of grammine lectins. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, v. 180, pp. 85-106, 1985.
- STREETS, A. J., BROOKS, S. A., DWEK, M. V., LEATHEM, A.J. Identification, purification and analysis of a 55 Kda lectin glycoprotein present in breast cancer tissue. *Clinica Chimica Acta* v, 254, pp. 47-61, 1996.
- SUGAN, T. (1910). Über ein Hamagglutinin in einigen Pflanzesaur. Thesis. Osaka, citado por Gold & Balding, 1975.
- SUJATHAN, K.; KANNAN, S.; REMANI, P.; PILLAI, K., R.; AMMA, B.C.N.S.; NAIR, M., K. Differential expression of jackfruit-lectin-specific glycoconjugates in metastatic adenocarcinoma and reactive mesotelial cells- a diagnostic aid in effusion cytology. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, v. 122, pp. 433-436, 1996.
- SUMNER, J.B.; HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalina A. *J. Bacteriol.*, v. 32, p. 227, 1936.
- TAIMI, M.; DORNAND, J.; NICOLAS, M.; MARTI, J.; FÁVERO, J. Invement of CD4 in interleukin-6 secretion by U937 monocytic cells stimulated with the lectin jacalin. *J. Leuk. Biol.*, v. 35, pp. 214-220, 1994.
- TAKEICHI, M. Cadherin cell adhesion receptors a morphogenetic regulator. *Science* v. 251, p. 1451, 1991.
- TAVARES, R.O. *Galactomanana de Adenathera pavonina L: aplicação para o isolamento de lectinas galactose-específicas*. 1998. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.
- TELDDER, T.F.; ISAACS, C.M.; ERNST, T.J. *et al.* Isolation and chromosomal localization of cDNAs encoding a novel human lymphocyte cell surface molecule LAM-1. *J. Exp. Med.*, v. 170, p. 123, 1989.
- THOMAS, M. *et al.* Prognostic significance of Helix pomatia lectin and c-erbB-2 oncoprotein in breast cancer. *Br. J. Cancer*, v. 68, n. 3, pp. 621-626, 1993.
- THOMAS, P.; TOTH, C.; SAINI, K. *et al.* The structure, metabolism and function of the carcinoembryonic antigen gene family. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1032, p. 117, 1990.

- TÖLG, C.; HOFMANN, M.; HERRLICH, P.; PONTA, H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res.*, v. 21, p. 1225, 1993.
- TOMAS, M.; NOGUCHI, M.; FOURECA, L. *et al.* Prognostic significance of helix pomatia lectin and c-erbB-2 oncoprotein in human breast cancer. *Br. J. Cancer*, v. 68, n. 3, pp. 621-626, 1993.
- TUMNER, G. A.; CATTERDL, B. J. Surface carbohydrates involved in the adhesive interaction of metastatic cells. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 25, n. 1, pp. 234-241, 1997.
- UNDERHILL C. CD44: The hyaluronan receptor. *J Cell Sci* v. 103, p. 293, 1992.
- URDIALES-VIEDMA, M.; DE HARO-MUNÓZ, T.; MARTOS-PADILLA, S.; ABAD-ORTEGA, J.M.; VARELA-DURÁN, J.; GRANDA-PAEZ, R. Jacalin, another marker for histiocytes in paraffin embedded tissues. *Histopathology*, v. 10, pp. 597-602, 1995.
- USA, Y.; DION A.S.; WILLIAMS, C.J. *et al.* Quantitative dot blot analyses of blood - group - related antigens in paired normal and malignant human breast tissues. *Int. J. Cancer.*, v. 2, n. 50, pp. 59-63, 1992.
- VALLÉS, A.M.; BOYER, B.; TUCKER, G. *et al.* The epithelial to mesenchymal transition of rat bladder carcinoma cells: An in vitro model system to study the initial steps of cancer dissemination. *Beitr. Onkol.*, v. 44, p. 49, 1992.
- VALMU, L.; AUTERO, M.; SILJANDER, P. *et al.* Phosphorylation of the α -subunit of CD11/CD18 integrins by protein kinase C correlates with leukocyte adhesion. *Eur. J. Immunol.*, v. 21, p. 2857, 1991.
- VAN DAMME, E.J.M.; PNEUMANS, W.J.; PUSHZTAI, A.; BARDOOZ, S. Handbook of plant lectins: properties and biochemical applications. Chichester: John Wiley & Sons, 1997. 452 p.
- VAN ROY, F.; MAREEL, M. Tumour invasion: effects of cell adhesion and motility. *Trends Cell Biol.*, v. 2, p. 163, 1992.
- VARKI, A.; CUMMINGS, E.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J. Essentials of Glycobiology. Cold Spring Laboratory Press, 1999.

- VIERBUCHEN, M.; KLEIN, P.J.; ROSEL, S. *et al.* Peanut agglutinin (PNA) binding sites: a Useful marker for hormonal dependence in experimental breast cancer. *Cancer Detect. Prev.*, v. 6, n. 1/2, pp. 207-214, 1983.
- VON EISLER, M.; VON PORTHEIM, L. (1911). *Ber. Dtsch. Bot. Ger.*, 29: 419-430, citado por Puzztai *et al.*, 1983.
- WALKER, R. A. The use of lectins in histopathology. *Pathol. Res. Pract.*, v. 185, pp. 826-835, 1989.
- WALKER, R.A. Assessment of milk fat globule membrane antibodies and lectins as Markers of short - term prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer*, v. 62, n. 33, pp. 462-466, 1990.
- WARREN, L.; FUHRER, J.P.; BUCK, C.A. Surface glycoproteins of normal and transformed cells: A difference determined by sialic acid and a growth-dependent sialyl transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 69, p. 1838, 1972.
- WATKINS. W.M. & MORGAN, W.T.J. *Nature*, v. 196, pp. 825-826, 1952.
- WIENHAUS, O. Zur biochemie der phasis. *Biochemistry*, v. 2, p. 18, 228, 1909.
- WILCOX, M. Genetic analysis of the drosophila PS integrins. *Cell Differ. Dev.*, v. 32, p. 391, 1990.
- YAGI, M.; CAMPOS-NETO, A.; GOLLAHON, K. Morphological and biochemical changes in a hematopoietic cell line induced by jacalin, a lectin derived from *Artocarpus integrifolia*. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 209, n. 1, pp. 263-270, 1995
- YEE G., HYNES R.O. A novel, tissue-specific integrin subunit, β expressed in the midgut of *Drosophila melanogaster*. *Development* v. 118, p. 845, 1993.
- YLLANE J., CHEN Y., O'TOOLE T. *et al.* Distinct functions of integrin α and β subunit cytoplasmic domains in cell spreading and formation of focal adhesions. *J. Cell. Biol.* v. 122, p. 223, 1993.