



LECTINAS DA SUBTRIBO **DIOCLEINAE**
COMO FERRAMENTAS HISTOQUÍMICAS

AValiação EM TECIDOS NORMAIS E TRANSFORMADOS
DO SISTEMA NERVOSO, COLO UTERINO E MAMA

MARIA HELENA GOMES MOTA

N.Cham T 574.192 M8711

Autor: Mota, Maria Helena

Título: Lectinas da subtribo Diocleinae



013839028

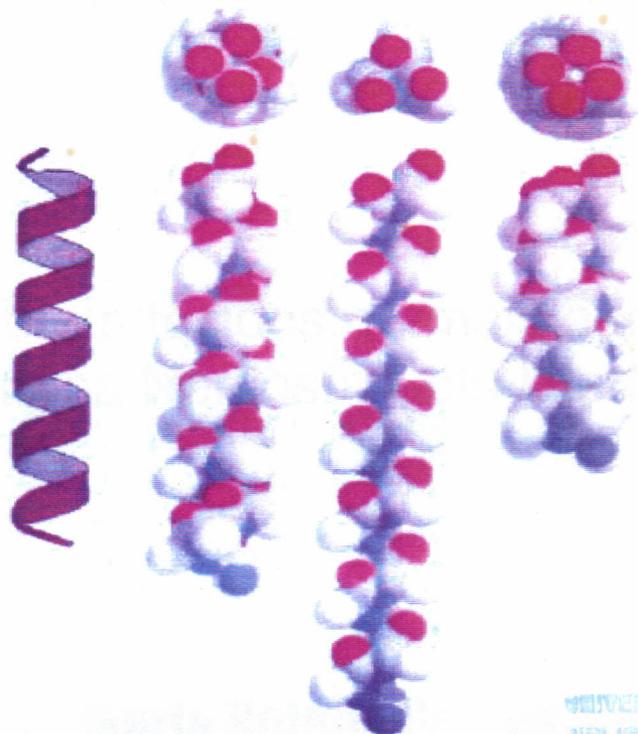
Ac. 70021

BCT

FORTALEZA - CEARÁ

2001

Lectinas da subtribo *Diocleinae* como ferramentas histoquímicas



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Avaliação em tecidos normais e transformados
do Sistema Nervoso, Colo Uterino e Mama

Maria Helena Gomes Mota

**Universidade Federal do Ceará
Fortaleza, 2001.**

Lectinas da subtribo *Diocleinae*
como ferramentas histoquímicas

Avaliação em tecidos normais e transformados
do Sistema Nervoso, Colo Uterino e Mama

Maria Helena Gomes Mota

TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM BIOQUÍMICA

Universidade Federal do Ceará

Fortaleza, 2001

R13839028 (EXEMPLAR DISPONÍVEL)

A70021

T
574.192
M 8711

Mota, Maria Helena Gomes
Lectinas da subtribo *Diocleinae* como ferramentas
histoquímicas. Avaliação em tecidos normais e
transformados do sistema nervoso, colo uterino e mama.
/ Maria Helena Gomes Mota – Fortaleza, 2001. 116p.: il.

1 Lectinas da subtribo *Diocleinae* 2 – Tecidos do sistema
nervoso, colo uterino e mama. 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 a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Maria Helena Gomes Mota

Tese aprovada em 06 de abril de 2001

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

Prof. Dr. José Figueredo da Silva
Departamento de Patologia
Universidade Federal de Pernambuco

Profa Dra Luana Cassandra B. B. Coelho
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco

Profa Dra Ana Cecília Goes Horta
Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular
Universidade Federal do Ceará

Profa Dra Norma Maria Barros Benevides
Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular
Universidade Federal do Ceará

*“À minha mãe, pelo exemplo de coragem, dedicação à família
e amor sem medidas”.*

E aos homens da minha vida:

Meu pai e Flávio (in memoriam)

Meus filhos: Rogério e Eduardo

Meus irmãos: Roberto, Francisco Augusto e Otávio.

E Medeiros (pelo amor, solidariedade e incentivo)

A vocês com amor dedico.

AGRADECIMENTOS

Enquanto trabalhei nesta tese, várias pessoas compartilharam comigo seu tempo tão limitado, responderam às minhas perguntas e me emprestaram livros e material de trabalho. Entre as quais, eu destaco, particularmente, o professor Renato de Azevedo Moreira, meu orientador, de quem eu tive as conversas iniciais de onde nasceu a idéia de esboçar e depois realizar este trabalho. Por seus conhecimentos científicos, aliados a dedicação à pesquisa, sugestões, orientação e amizade, são exemplos que ficam.

À professora Luana Cassandra Breitenbach Coelho, do Laboratório de Glicoconjugados do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, pela sua amizade e confiança por colocar o Laboratório de Glicoconjugados à minha disposição. Foi uma grande colaboradora: orientou, deu sugestões e fez comentários sobre o processo de pesquisa aplicado as lectinas.

Ao professor José Figueredo da Silva, do Departamento de Patologia e do setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo – Asami - LIKA, da Universidade Federal de Pernambuco, pela sua experiência, orientação, amizade, participação na execução e revisão deste trabalho, e, sobretudo, pela sua competência e exemplo de profissional a todos os que privam do seu convívio.

À professora Ana Cecília Goes Horta, pela amizade, orientação, competência, apoio efetivo e sugestões que me ajudaram a superar essa travessia até o presente momento.

A professora Norma Maria Barros Benevides, pela sua colaboração com seus conhecimentos científicos, conselhos e amizade que ajudaram a enriquecer esta tese. E em especial à professora Ana Lúcia Ponte Freitas, por sua amizade, pelo constante apoio e exemplo de formação científica.

Aos companheiros do Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados I e II que estiveram comigo ao longo desta jornada, pelo apoio moral e intelectual imprescindíveis, paciência e atenção que tiveram: Alda, Andréa, André, Carla Celedônio, Carlos Couto, Célio, Clarissa, Cristina, Daniel, Darlio, Fábria, Ivone

Garros, Keline, Kilvia, Marcus Vinícius, Raquel, Renata, Ricardo, Rogildo, Samya, Sara, Vânia Matos, Walbert. Em especial à Daniele, por sua ajuda na execução da apresentação e formatação desta tese.

A todos que fazem parte do Laboratório de Glicoconjugados e do setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami da Universidade Federal de Pernambuco. Pela convivência e pelo apoio que sempre demonstraram, de uma forma ou de outra, me auxiliaram neste trabalho.

Especial atenção à professora Maria Tereza dos Santos Correia, pela convivência agradável, pelo incentivo, estímulo, amizade. Aos técnicos do setor de Patologia do LIKA – Carmelita, Mônica Cavalcante e Paulina que arduamente se empenharam no preparo das lâminas.

A toda a minha família que, com amor, carinho, compreensão e amizade sempre me incentivou a buscar meus ideais. São exemplos de vida, que nortearam meu ser, verdadeiras âncoras que me encorajaram a “continuar continuando”. Estão inseparavelmente presentes neste trabalho.

Enfim, todos os citados foram imprescindíveis colaboradores. Com certeza, aprendi com cada um encontrar procedimentos corretos para consolidar minha tese.

Na realização deste trabalho, contei com inúmeros amigos. Pude conhecer então, o valor da ajuda desinteressada e da solidariedade por um sem número de pessoas. A todas essas pessoas, meu agradecimento nas palavras de Paulo Leminski:

Meus amigos
Quando me dão à mão
Sempre deixam outra coisa
Presença
Olhar
Lembrança
Calor
Meus amigos
Quando me dão à mão
Deixam na minha
A sua mão.

A autora expressa, ainda seus reconhecimentos às seguintes instituições:

Universidade Estadual do Ceará (UECE), pelo afastamento concedido para cursar o doutorado, de modo especial ao Departamento de Ciências Fisiológicas, departamento ao qual pertence.

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (FUNCAP), pela bolsa concedida.

Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), através de convênio firmados com o Curso de Pós Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica e do setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, da Universidade Federal de Pernambuco.

Quando colocarmos a ciência verdadeiramente a serviço do bem estar material e espiritual de toda a humanidade, nos tornaremos todos juntos, os seres do "oitavo dia da criação".

MARIA HELENA

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIV
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	XV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	01
<u>1.1 Considerações preliminares</u>	01
1.1.1 <u>Neoplasias</u>	03
1.1.2 <u>Neoplasias do sistema nervoso central</u>	04
1.1.3 <u>Neoplasias do colo uterino</u>	08
1.1.4 <u>Neoplasias de mama</u>	12
1.1.5 <u>Organização e função dos componentes da superfície celular</u>	15
1.1.6 <u>Organização molecular da membrana plasmática</u>	17
<u>1.2 Lectinas</u>	23
1.2.1 <u>Considerações gerais</u>	23
1.2.2 <u>Atividades biológicas das lectinas como ferramentas biotecnológicas</u>	27
1.2.3 <u>Lectinas de sementes da subtribo <i>Diocleinae</i></u>	41
<u>2 . HIPÓTESE DE TRABALHO</u>	45
<u>2.1 Estratégia experimental</u>	45
<u>3. MATERIAIS</u>	46
<u>3.1 Material vegetal</u>	46
<u>3.2 Tecidos</u>	46
<u>3.3 Carboidratos</u>	46
<u>3.4 Outros materiais</u>	46
3.4.1 <u>Corantes</u>	46
3.4.2 <u>Reagentes</u>	47
<u>4. MÉTODOS</u>	48
<u>4.1 Obtenção da farinha</u>	48

4.2	<u>Obtenção do extrato total das farinhas de sementes</u>	48
4.3	<u>Obtenção de fração das proteínas por precipitação salina</u>	48
4.4	<u>Cromatografia de afinidade em coluna Sephadex G-50</u>	50
4.5	<u>Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose 12- HR</u>	50
4.6	<u>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE - SDS)</u>	51
4.7	<u>Atividade hemaglutinante</u>	51
4.8	<u>Imunodifusão</u>	52
4.9	<u>Preparação dos tecidos</u>	52
4.10	<u>Tratamento dos tecidos e ligação das lectinas</u>	54
4.11	<u>Conjugação das lectinas à peroxidase</u>	54
4.12	<u>Revelação e observação da ligação das lectinas</u>	56
4.13	<u>Inibição da ligação das lectinas aos tecidos</u>	56
5	<u>RESULTADOS</u>	57
5.1	<u>Isolamento e purificação das lectinas</u>	57
5.2	<u>Avaliação da pureza das preparações das lectinas para ensaios histoquímicos</u>	59
5.3	<u>Imunodifusão dupla de Ouchterlony</u>	59
5.4	<u>Avaliação do comportamento das lectinas em diferentes pH</u>	60
5.4.1	<u>Interação com o gel de Sephadex G-50</u>	61
5.4.2	<u>Determinação das massas moleculares relativas a diferentes valores de pH</u>	64
5.5	<u>Utilização de lectinas puras, autóctones, do tipo glucose/manose para marcação dos tecidos.</u>	65
5.5.1	<u>Inibição da ligação das lectinas</u>	82
6	<u>DISCUSSÃO</u>	85
7	<u>CONCLUSÃO</u>	94
8	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	95

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	Sistema nervoso central (SNC) normal com hematoxilina- eosina (HE). 07
FIGURA 2	Sistema nervoso central (SNC) – Glioblastoma Multiforme com hematoxilina-eosina (HE). 07
FIGURA 3	Tecido do colo uterino normal com hematoxilina- eosina (HE). 11
FIGURA 4	Carcinoma invasivo mal diferenciado do tecido do colo uterino com hematoxilina-eosina (HE). 11
FIGURA 5	Tecido mamário com carcinoma ductal infiltrante com hematoxilina-eosina (HE) 14
FIGURA 6	Modelo do mosaico fluido para membranas biológicas 18
FIGURA 7	Estrutura dos três tipos principais de ligações glicopeptídicas. 20
FIGURA 8	Mecanismo de aglutinação celular realizado pelas lectinas. 35
FIGURA 9	A forma cristalizada da <i>Canavalia ensiformis</i> (Con A) por difração de raio-X. 44
FIGURA 10	Esquema utilizado para isolamento das lectinas das farinhas de sementes dos gêneros: <i>Dioclea</i> , <i>Canavalia</i> e <i>Cratylia</i> . 49
FIGURA 11	Métodos indireto (A) e direto (B) de conjugação das lectinas a peroxidase. 55
FIGURA 12	Cromatografia de afinidade da fração 0/70 de <i>Canavalia ensiformis</i> em coluna Sephadex G-50. 58
FIGURA 13	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS das lectinas da sub-tribo <i>Diocleinae</i> . 59
FIGURA 14	Imunodifusão de Ouchterlony, de lectinas da sub-tribo <i>Diocleinae</i> . 60

FIGURA 15	Cromatografia de afinidade em diferentes valores de pH da lectina de <i>Dioclea altissima</i> .	61
FIGURA 16	Cromatografia de afinidade em diferentes valores de pH da lectina de <i>Dioclea virgata</i> .	62
FIGURA 17	Cromatografia de afinidade em diferentes valores de pH da lectina de <i>Dioclea violacea</i> .	62
FIGURA 18	Cromatografia de afinidade em diferentes valores de pH da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> .	63
FIGURA 19	Cromatografia de afinidade em diferentes valores de pH da lectina de <i>Canavalia maritima</i> .	63
FIGURA 20	Cromatografia de afinidade em diferentes valores de pH da lectina de <i>Cratylia floribunda</i> .	64
FIGURA 21	Comportamento das formas moleculares das lectinas da subtribo <i>Diocleinae</i> em coluna de Superose 12HR em diferentes valores de pH.	65
FIGURA 22	Tecido do sistema nervoso central normal marcado com a lectina de <i>Dioclea altissima</i> .	69
FIGURA 23	Meningioma do sistema nervoso central marcado com a lectina de <i>Dioclea altissima</i> .	69
FIGURA 24	Carcinoma metastático mal diferenciado do sistema nervoso central marcado com a lectina de <i>Dioclea altissima</i> .	70
FIGURA 25	Tecido do sistema nervoso central normal marcado com a lectina de <i>Dioclea altissima</i> .	70
FIGURA 26	Astrocitoma fibrilar do sistema nervoso central marcado com a lectina de <i>Dioclea altissima</i> .	71
FIGURA 27	Glioblastoma multiforme do sistema nervoso central marcado com a lectina de <i>Dioclea altissima</i> .	71
FIGURA 28	Tecido do colo uterino normal marcado com a lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> .	74
FIGURA 29	Carcinoma <i>in situ</i> do tecido do colo uterino marcado com a lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> .	75

FIGURA 30	Carcinoma epidermóide invasivo do tecido do colo uterino marcado com a lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> .	76
FIGURA 31	Carcinoma ductal infiltrante do tecido mamário marcado com a lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> .	79
FIGURA 32	Carcinoma ductal infiltrante do tecido mamário marcado com a lectina de <i>Canavalia maritima</i> .	79
FIGURA 33	Carcinoma ductal infiltrante do tecido mamário marcado com a lectina de <i>Cratylia floribunda</i> .	80
FIGURA 34	Carcinoma ductal infiltrante do tecido mamário marcado com a lectina de <i>Dioclea altíssima</i> .	80
FIGURA 35	Carcinoma ductal infiltrantedo tecido mamário marcado com a lectina de <i>Dioclea vlolacea</i> .	81
FIGURA 36	Carcinoma ductal infiltrante do tecido mamário marcado com a lectina de <i>Dioclea vlrkata</i> .	81
FIGURA 37	Meningioma do sistema nervoso central marcado com a lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> .	83
FIGURA 38	Meningioma do sistema nervoso central marcado com a lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> e inibido com metil- α -D-manosídeo.	83
FIGURA 39	Carcinoma <i>in situ</i> do tecido do colo uterino marcado com a lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> .	84
FIGURA 40	Carcinoma <i>in situ</i> do tecido do colo uterino marcado com a lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> e inibido com metil- α -D-manosídeo.	84
FIGURA 41	Tecido mamário normal marcado com a lectina de <i>Dioclea violacea</i> .	84a
FIGURA 42	Tecido mamário normal marcado com a lectina de <i>Dioclea violacea</i> e inibido com metil- α -D-manosídeo.	84a

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 <u>Padrão utilizado para estimar a intensidade de marcação das lectinas</u>	53
TABELA 2 <u>Interação das lectinas da Subtribo <i>Diocleinae</i> pelo método indireto com os tecidos do sistema nervoso central normais e transformados</u>	67
TABELA 3 <u>Interação das lectinas de <i>Dioclea altissima</i>, <i>Canavalia brasiliensis</i> e <i>Cratylia floribunda</i> pelo método direto com os tecidos do sistema nervoso central normais e transformados</u>	67
TABELA 4 <u>Interação das lectinas de <i>Dioclea altissima</i>, <i>Canavalia brasiliensis</i> e <i>Cratylia floribunda</i> pelo método indireto com os tecidos do sistema nervoso central normais e transformados a valores de pH 4 e 7</u>	68
TABELA 5 <u>Interação das lectinas da Subtribo <i>Diocleinae</i> pelo método indireto com os tecidos do colo uterino normais e transformados</u>	73
TABELA 6 <u>Interação das lectinas de <i>Dioclea altissima</i>, <i>Canavalia brasiliensis</i> e <i>Cratylia floribunda</i> pelo método direto com o tecido do colo uterino, normal e transformado</u>	73
TABELA 7 <u>Interação das lectinas da Subtribo <i>Diocleinae</i> pelo método indireto com os tecidos de mama normais e transformados</u>	78
TABELA 8 <u>Interação das lectinas do <i>Dioclea altissima</i>, <i>Canavalia brasiliensis</i> e <i>Cratylia floribunda</i> pelo método direto com os tecidos de mama normais e transformados</u>	78

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

Con A	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
BPA	Lectina de <i>Bauhinia purpúrea</i>
BS-1	Lectina de <i>Banderiaera simplicifolia</i>
CDI	Carcinoma ductal infiltrante
Cra Iso 1	Lectina de <i>Cratylia molis</i>
DBA	Lectina de <i>Dolichos biflorus</i>
FPLC	Cromatografia líquida de rápida performance
GFAP	Proteína ácida glial fibrilar
GS	Lectina de <i>Griffonia simpliciflora</i>
HPA	Lectina de <i>Helix pomatia</i>
HPV	Papilomavírus humano
HR	Alta resolução
IgG	Imunoglobulina
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LTA	Lectina de <i>Lotus tetragonolobus</i>
ML-I	Lectina de <i>Viscum álbum</i>
MPA	Lectina de <i>Maclura pomifera</i>
NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
PAP	Proteína anti-viral de pokeweed
PAS	Reação com ácido periódico de Schiff
PBS	Tampão fosfato de sódio
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PNA	Lectina de <i>Arachis hypogaea</i>
RCA	Lectina de <i>Ricinus cumunins</i>
SBA	Lectina de soja
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
HE	Hematoxilina-eosina
UH	Unidade de hemaglutinação
UEA-1	Lectina de <i>Ulex europaeus</i>
T-Ag	Antígeno de Thomsen-Friedenreich

TCR
WGA

Receptor de antígeno da célula T
Lectina de *Triticum vulgare*

RESUMO

As lectinas de sementes de membros da subtribo *Diocleinae*, mostram uma estrutura quaternária dependente do pH, levando ao equilíbrio entre as formas monomérica, dimérica e tetramérica, e o estabelecimento da forma predominante é essencial para a melhor compreensão de suas atividades. A diferença das propriedades biológicas das lectinas provem da sua habilidade de interagir com carboidratos e, portanto, com resíduos de açúcar da superfície celular. Tais ligações podem induzir uma variedade de mudanças na célula, as quais são expressas em atividade biológica. O estudo destas atividades, e da descoberta de outras ainda desconhecidas, são de interesse por diversas razões: elas são úteis para a detecção e ensaio de lectinas; elas servem como base para uma série de aplicações e para o desenvolvimento de novas e elas podem nos fornecer meios de investigar diferentes processos celulares e sub-celulares, especialmente aqueles que têm origem na superfície da célula.

Numerosos estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de comparar a extensão e o padrão de ligação de células normais e modificadas. Assim, a possibilidade de usar lectinas de sementes de *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* como marcadores moleculares histoquímicos em tecidos normais e transformados do sistema nervoso central, colo uterino e mama foi analisada. O padrão de ligação foi comparado com aquele obtido para a lectina de *Canavalia ensiformis*, Concanavalina A. As lectinas purificadas e conjugadas com peroxidase foram usadas em métodos diretos e indiretos, com tecidos previamente tratados com soluções de tripsina (0,1%) e metanol-H₂O₂ (0,3%). A ligação foi revelada com diaminobezidina-H₂O₂, hematoxilina foi usada para contracoloração, e a intensidade determinada por microscopia óptica. A inibição da ligação foi investigada com D-manose, D-glucose e α -metil-manosídeo, a concentrações entre 20 e 30 mM. Diferentes padrões de ligação das lectinas utilizadas foram observadas, associadas a diferentes patologias dos tecidos mamários, do colo uterino e do sistema nervoso central. Quanto à inibição da ligação, tanto em tecidos normais como tecidos com neoplasias benignas e malignas, os melhores resultados foram obtidos como α -metil-manosídeo, confirmando, assim, que ligações são resultado de interação das lectinas com glicoconjugados da superfície celular.

ABSTRACT

The seed lectins from members of the sub-tribe *Diocleinae*, show a quaternary structure dependent on the pH, leading to an equilibrium among the monomeric, dimeric and tetrameric forms, and the establishment of the predominant form is essential for the best understanding of their activities. The different biological properties of the lectins are due to their ability to interact with carbohydrate and, thus, with the cell surface sugar residues. Such attachment may induce a variety of changes in cell, which are an expression of biological activities of lectins. Studies of these activities, and the search for others, still unknown, are of interest for several reasons: they are useful for detection and assay of lectins; they serve as a basis for the manifold applications of lectins and for development of new ones and they provide us with a means to investigate different cellular and subcellular processes, especially those initiated at the cell surface

Numerous studies have been carried out comparing the extent and pattern of lectin binding to normal and malignant cells. Thus, the possibility of using lectins from *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* species as histochemical molecular marker in mammary, brain and cervix uterine normal and transformed tissues were analysed. The binding pattern, was compared to those obtained from the *Canavalia ensiformis* lectin, Concanavalina A. The purified and peroxidase conjugated lectins were used in direct and indirect methods, with tissues previously treated with 0.1% trypsin solution and 0.3% methanol-H₂O₂ solution. The binding was revealed with diaminobenzidine-H₂O₂, and haematoxylin was used to counterstaining and optic microscopy was used to evaluate the intensity of binding. The binding inhibition were investigated with D- manose, D- glucose and methyl- α -D-mannoside sugars, at concentrations from 20 to 30 mM. Distinct binding patterns of the lectins studied were observed associated to different tissues pathologies of mammary, brain or cervix uterine. In addition, the best inhibition results to normal as well as transformed tissues with benign and malignant neoplasias were obtained with methyl- α -D-mannoside, reinforcing so, that the *Diocleinae* lectins, bound to glucose and/or mannose containing residues in the membrane surface glycoconjugates, and can be used as molecular marker for these transformed tissues.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Preliminares

Câncer é o maior desafio dos problemas de saúde nos países desenvolvidos do fim do século XX. Esse problema é melhor ilustrado, principalmente, por algumas das neoplasias mais comuns nestes países, o câncer de mama, pulmão e o de cólon. O total da taxa de mortalidade por todos esses anos permanece praticamente estática, porque os avanços na detecção e prevenção do câncer têm sido compensados pelo aumento na incidência da doença.

O principal determinante da morbi-mortalidade para pacientes com diagnóstico de tumores malignos encontra-se relacionado ao controle insuficiente da expansão e progressão do estabelecimento de colônias metastáticas. O risco de doenças neoplásicas varia de acordo com a região geográfica, fatores ambientais, hábitos sócio-culturais, idade e a herança genética do indivíduo (FRANCO 1994).

Estímulos ambientais e mutações herdadas conduzem à alterações genômicas celulares, ocasionando ativação de oncogenes produtores de crescimento, alterações nos genes que regulam a apoptose e a inativação de genes supressores. Estas ações induzem a expressão de produtos gênicos alterados e a perda de produtos gênicos regulatórios. Com isso, a expansão clonal ocasiona mutações adicionais (progressão) induzindo heterogeneidade celular e conseqüente formação de um neoplasma maligno (ROBINS *et al.*, 1996).

No tocante às funções bioquímicas dos genes supressores de tumor, sabe-se que as vias de transdução de sinais de inibição do crescimento tumoral são menos compreendidas que aquelas para a progressão tumoral. Todavia, é razoável presumir que, assim como os sinais mitogênicos, a sinalização inibitória do crescimento origina-se na superfície celular, com a participação de receptores, transdutores de sinais e reguladores transcricionais ao nível celular (GRAUBERT & LAY, 1996). Outros fatores, além da cinética celular, como o suprimento sanguíneo, podem alterar significativamente o crescimento tumoral (VAUPEL, 1993).

A razão da deficiência da terapia do câncer é devido, principalmente, ao fracasso do tratamento, uma vez que o tumor tenha se espalhado. A formação da metástase é, por isto, o passo mais importante na determinação do destino dos pacientes com câncer. Felizmente, muitos progressos têm sido alcançados nesta área de pesquisas com câncer e muitos dos promissores resultados obtidos neste campo estão relacionados à glicoproteínas e lectinas.

Várias revisões estão disponíveis sobre o tópico das metástases, mas só recentemente foi acentuada a importância da mudança nas pesquisas para investigar as interações célula/célula e célula/matriz.

A superfície externa da membrana e a matriz extracelular consistem principalmente de glicoconjugados. Assim, estudos contendo lectinas podem criar uma nova luz dentro dos processos que governam a cascata metastática.

Moléculas que aderem às células parecem contribuir de uma maneira dinâmica em processos de diferenciação das células normais em câncer metastático. Metástase é um processo complexo, altamente organizado, formado de muitos passos, seletivo a determinados órgãos e que não ocorre ao acaso. Esse processo envolve o crescimento e a invasão de células malignas no sistema linfático ou sanguíneo, no seu sítio primário; o intravasamento (entrada de células neoplásicas dentro dos vasos); a difusão de células cancerosas nos órgãos; a adesão no sítio secundário ao endotélio de micro vasos; o extravasamento (passagem de um vaso para os tecidos) e, como conseqüência, o crescimento secundário do tumor (YEATMAN & NICOLSON, 1993). Um dos principais mecanismos que contribuem para a disseminação do câncer metastático é a alteração nas propriedades adesivas que promoverão a separação de células malignas do seu sítio primário e se fixarão no sítio secundário, por adesão direta ou por contato mecânico, semelhante aos trombos formados de plaquetas.

Como as lectinas são marcadores versáteis, elas têm sido usadas em uma variedade de estudos, utilizando a histoquímica, a bioquímica e as técnicas funcionais para caracterizar células cancerosas. A maioria dos estudos histoquímicos com lectinas usando material clínico se refere a tumores derivados de tecidos epiteliais mostrando diferenciação glandular, isto é, tumores de mama, cólon e genitália feminina. Isto não é somente devido ao fato de esses tumores serem de grande importância clínica, mas também

porque as lectinas são particularmente satisfatórias nas investigações destes tumores.

Quando se considera os produtos secretados das glândulas, os morfologistas os distinguem separando-os entre glândulas serosas e glândulas mucosas. Glândulas serosas são negativas com marcadores para carboidratos em geral, (a reação com ácido periódico Schiff - PAS), enquanto glândulas mucosas são PAS positivas. Isto também se reflete na sua maneira de ligação com lectinas. Assim, lectinas que reconhecem açúcares N-ligados ao glicocálix da membrana celular, tal como a lectina de sementes de *C. ensiformis* Concanavalina A (Con A) e a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), reagem com células de glândulas serosas. Por outro lado, lectinas que reconhecem glicoproteínas O-ligadas reagem com células mucosas. Essas lectinas ou são específicas para N-acetilgalactosamina, como a aglutinina de *Helix pomatia* (HPA), a aglutinina de soja (SBA) e a aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA), ou reconhecem especificamente L-fucose como a aglutinina de *Ulex europaeus* (UEA-I) (SCHUMACHER, 1995).

Como consequência, as lectinas têm sido largamente usadas como reagentes em histoquímica para estudar os resíduos de carboidratos em cânceres com diferenciação glandular (SCHUMACHER, 1995).

1.1.1 - Neoplasias

O termo "neoplasia" significa crescimento novo, e o que cresceu recentemente neoplasma. A oncologia é o estudo dos tumores ou neoplasmas. Câncer é o termo comum para todos os tumores malignos. As células e tecidos neoplásicos competem com as células e tecidos normais quanto ao fornecimento de energia e substrato nutricional (ROBINS *et al.*, 1996).

Todos os tumores, benignos ou malignos, têm dois componentes básicos: células neoplásicas proliferantes, que constituem seu *parênquima*, e um *estroma de suporte*, feito de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. O crescimento e evolução dos neoplasmas são criticamente dependentes do seu estroma. Na grande maioria dos casos, a diferenciação de um tumor benigno ou maligno pode ser feita morfológicamente com considerável certeza. Existem critérios pelos quais os tumores benignos ou malignos podem ser

diferenciados. Estas diferenças podem ser discutidas sobre os seguintes títulos: diferenciação e anaplasia; taxa de crescimento; invasão local e metástase (ROBINS *et al.*, 1996).

1.1.2 - Neoplasias do sistema nervoso central

O sistema nervoso central (SNC) é constituído de células especializadas para a geração de impulsos elétricos, os neurônios, e pelas células da glia, que atuam como elementos de suporte com diferentes funções conforme o seu tipo (QUEIRÓZ, 1999) (FIGURA 1).

O sistema nervoso central é acometido por diversos tipos de neoplasias benignas e malignas. As neoplasias do SNC seriam responsáveis por 9% das mortes por câncer na população geral. Como os tumores do SNC são muito heterogêneos, é fundamental classificá-los para facilitar o estudo de seu comportamento biológico e estabelecer bases racionais para tratamento e prognóstico (QUEIRÓZ, 1999).

No SNC há tumores primários (originados dos próprios tecidos que o constituem) e secundários ou metastáticos. Os tumores primários são classificados de acordo com o tecido de origem. Os tumores neuroectodérmicos provêm das células derivadas do tubo neural do embrião, e em geral apresentam crescimento infiltrativo, penetrando no tecido nervoso sem limites nítidos e sem formação de cápsula. As mais importantes fontes de neoplasias são as células gliais. Seus tumores são conhecidos como gliomas e constituem 40-50% de todos os tumores intracranianos, primários e metastáticos. A grande maioria dos gliomas origina-se nos astrócitos e se chamam, portanto, astrocitomas. Uma variedade comum e altamente maligna de glioma é o glioblastoma multiforme (FIGURA 2) (QUEIRÓZ, 1999, ROBINS *et al.*, 1996). Os astrocitomas cerebrais podem ter aparência uniforme em toda a sua extensão, mas costumam variar de uma área para a outra, particularmente da periferia para o centro, apresentando cinco formas. A forma fibrilar, referida nesse trabalho, é composta de astrócitos fibrosos bem diferenciados, com núcleos arredondados e cromatina bem distribuída, semelhante aos astrócitos normais. Os astrócitos neoplásicos sintetizam abundantes fibras gliais, presentes em seus prolongamentos, que contêm

grandes quantidades de uma proteína denominada proteína glial ácida fibrilar (GFAP), que pode ser identificada com auxílio de imunoperoxidasas (QUEIROZ, 1999). Os tumores de linhagem conjuntiva têm como principal contingente o tecido conjuntivo do SNC, as meninges. Meningiomas são tumores comuns, oriundos dos fibroblastos da aracnóide. Possuem crescimento exclusivamente expansivo e são bem delimitados e não infiltram o tecido nervoso adjacente, apenas o comprimem, deixando uma área deprimida quando retirados (QUEIROZ, 1999, ROBINS *et al.*, 1996). Cada uma destas neoplasias tem incidência etária, localização preferencial e comportamento biológico próprio.

Glicoconjugados das superfícies de células tumorais representam um papel crítico na expressão das estruturas de carboidratos, nos processos de progressão de células malignas de câncer de cérebro. Por isso, lectinas, que são proteínas que se ligam a moléculas específicas de açúcares, são usadas como provas para detecção e estudo nas superfícies de células associadas com transformações malignas (CUMMINGS, 1994). Métodos histoquímicos, usando glicoproteínas marcadas com biotina, foram usados para determinar açúcares endógenos, receptores de lectinas, em lâminas de tecidos de meningiomas. Modelos diferentes de ligações foram avaliados com vários subtipos de meningiomas (BARDOSI, 1988). Cultura de membrana das células da glia do córtex cerebral de ratos marcou-se intensamente com as lectinas de GS-1 (aglutinina de *Griffonia simplicifolia*), RCA (aglutinina de *Ricinus cumunins*), WGA (aglutinina de *Triticum vulgare*), e Con A (lectina de *Canavalia ensiformis*), fracamente com lectinas de DBA (aglutinina de *Dolicho biflorus*), UEA (aglutinina de *Ulex europaeus*), BPA (aglutinina de *Bauhinia purpurea*) e SBA (aglutinina de *Glycine max*) mas nenhuma marcação foi observada com GS-2 (aglutinina de *Griffonia simplicifolia*), MPA (aglutinina de *Maclura pomifera*) ou PNA (aglutinina de *Arachis hypogaea*) (COLTON *et al.*, 1992).

A superfície das células de carcinoma escamoso, de pacientes com câncer de cabeça e pescoço de várias origens (metástases), foi avaliada usando-se Con A (lectina de *Canavalia ensiformis*), PNA (aglutinina de *Arachis hypogaea*), que ligaram-se a todas as linhas de células testadas; entretanto, a

lectina de germe de trigo - WGA (*Triticum vulgaris*) ligou – se a 12 das 13
linhas de tumores testadas (LALWANI *et al.*,1996).

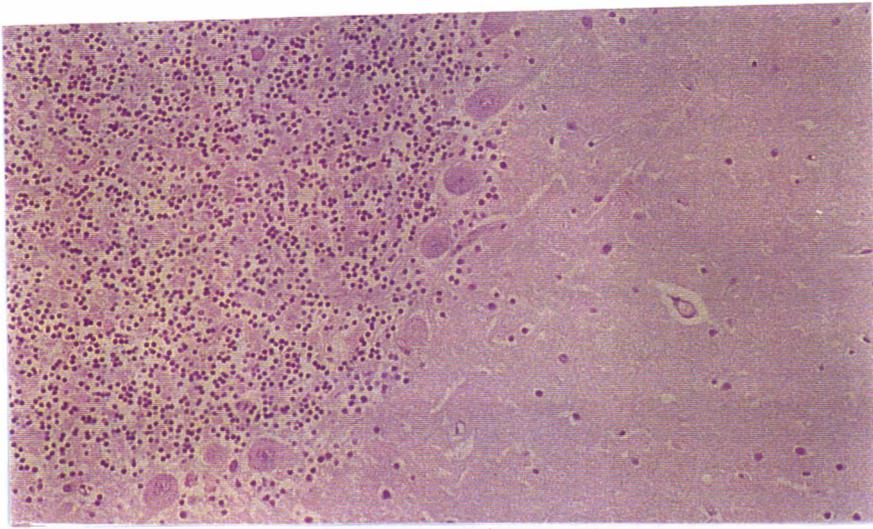


FIGURA 1 – Sistema nervoso central (SNC) normal com hematoxilina-eosina (HE). Aumento 50x.

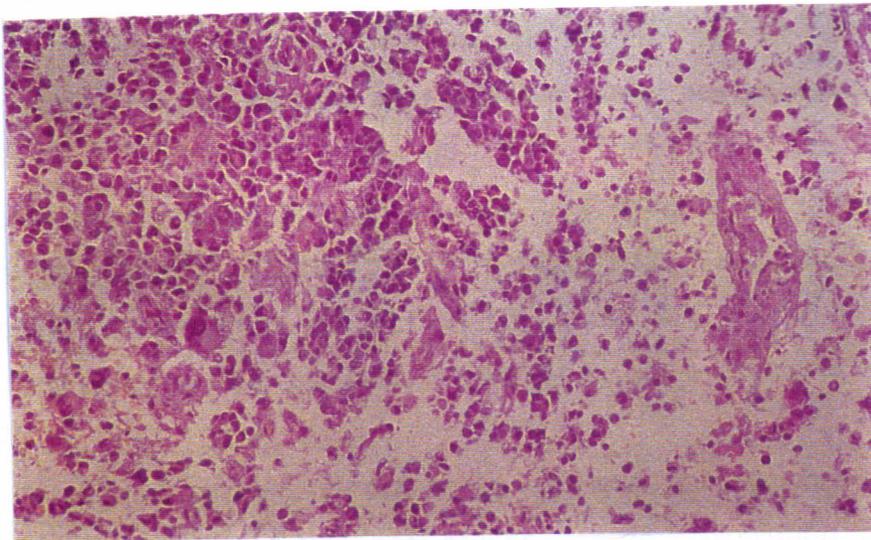


FIGURA 2 – Sistema nervoso central (SNC - Glioblastoma Multiforme com hematoxilina-eosina (HE). Aumento 50x.

1.1.3 - Neoplasias do colo uterino

O útero é dividido em corpo, istmo e colo. O colo é a porção mais inferior do útero que se projeta na porção superior da vagina. Sendo o útero órgão alvo da ação hormonal, os aspectos fisiológicos das diferentes fases da vida da mulher apresentam variações anatômicas e histológicas. Chama-se de junção escamo-colunar a área de transição abrupta entre os dois epitélios do colo uterino, localizada na região do óstio externo. Devido à ação dos hormônios (estrógeno e progesterona), há uma proliferação do epitélio cilíndrico mucoso com conseqüente avanço do epitélio da região do canal cervical para a região da ectocérvice ou porção vaginal do colo(ANDRADE,1999) (FIGURA 3).

Os processos inflamatórios do colo uterino podem ser agudos ou crônicos, infecciosos ou não infecciosos. Dentre estes processos, os mais comuns são as cervicites infecciosas e causadas pelos mais diferentes agentes : bactérias, vírus, fungos e protozoários. As cervicites não infecciosas ocorrem por traumatismo, irritantes químicos usados em lavagens vaginais, desodorantes, presença de corpos estranhos, etc. Há um conjunto de alterações epiteliais pré-cancerosas no colo uterino, que se caracteriza por atipia epitelial, de grau variado, chamadas de lesões pré-cancerosa e que se relaciona com a gênese do carcinoma cervical. Estas alterações são também chamadas de displasias do colo e, mais recentemente, de neoplasia intra-epitelial cervical - NIC. Conforme a intensidade das alterações histológicas, este epitélio é graduado em NIC I, NIC II ou NIC III, correspondendo, respectivamente, à displasia leve, moderada e grave ou carcinoma *in situ* (ANDRADE,1999).

A NIC quase sempre começa na junção escamo-colunar na zona de transformação. As lesões NIC, com menor grau de malignidade, incluindo as infecções pelo vírus do condiloma (papiloma vírus humano), provavelmente não evoluem, enquanto aquelas com maiores graus de atipia celular correm mais risco dependendo do tipo de papilomavírus humano associado (HPV) e outros fatores do hospedeiro. O risco de câncer é conferido, em parte, pelo tipo de papiloma vírus, dependente de outros carcinogênicos ou alterações genéticas (ROBINS *et al.*, 1996). Histologicamente, estas lesões apresentam

elevado grau de atipia colócítica sem qualquer diferenciação na superfície, seguidas do aparecimento de células atípicas nas camadas mais inferiores do epitélio escamoso, com progressiva perda de diferenciação de células de um maior número de camadas do epitélio, correlacionando-se bastante com os tipos de papilomavírus humano (HPV) de alto risco (ANDRADE, 1999).

O carcinoma cervical generalizado responde por cerca de 5% de todas as mortes de câncer por mulheres. O carcinoma epidermóide pode surgir em qualquer idade, desde a segunda década de vida até a senilidade. Este tipo de tumor cresce por continuidade direta, indo acometer todas as estruturas contíguas. Os linfonodos regionais e distantes também são atingidos. Em termos histológicos, 95% dos carcinomas epidermóides são formados por células relativamente longas, quer ceratinizantes (bem diferenciadas) ou não ceratinizantes (moderadamente diferenciadas) (ROBINS *et al.*, 1996).

O câncer cervical é estagiado da seguinte maneira : estágio 0, carcinoma *in situ* (NIC III); estágio 1, carcinoma limitado ao colo uterino; estágio 2, carcinoma vai além do colo uterino, mas não chegou à parede da pelve; estágio 3, carcinoma atingiu a parede pélvica; estágio 4, carcinoma propagou-se além da pelve verdadeira ou comprometeu a mucosa da bexiga ou reto (ROBINS *et al.*, 1996).

Estudos feitos nas mudanças expressas por oligossacarídeos complexos, durante o desenvolvimento de carcinomas invasivos nas células escamosas do colo uterino de mulheres, podem representar um fenótipo característico neste tipo de neoplasia. A ligação da lectina purificada de *Artocarpus integrifolia*, conjugada com peroxidase, foi utilizada no estudo dos tecidos de carcinomas do colo uterino e comparada com controles normais, mostrando intensa ligação nos tecidos neoplásicos (REMANI, 1994). As cinco lectinas - RCA (aglutinina de *Ricinus cumunins*), SBA (aglutinina de *Glycine max*), BS-1 (aglutinina de *Banderiaera simplicifolia*), LTA (aglutinina de *Lotus tetragonolobus*) UEA-1 (aglutinina de *Ulex europaeus*) - foram usadas em histoquímica, tanto no epitélio do colo uterino normal como no epitélio identificado com carcinomas, e demonstraram modificações nas terminações das estruturas dos oligossacarídeos (BANERJEE *et al.*, 1995).

A expressão do antígeno de Thomsen-Friedenreich (T-Ag) está associada com o meio ambiente metastático em potencial, mau prognóstico e

tempo de sobrevivência reduzida em uma variedade de malignidades, e sua detecção e quantificação pode ser usada em diagnósticos sorológicos. No carcinoma de células escamosas de colo de útero a expressão do T-Ag foi medida através de um ensaio com a aglutinina do amendoim (PNA), apresentando uma sensibilidade de 80% nos casos positivos (REDDI *et al.*, 2000).

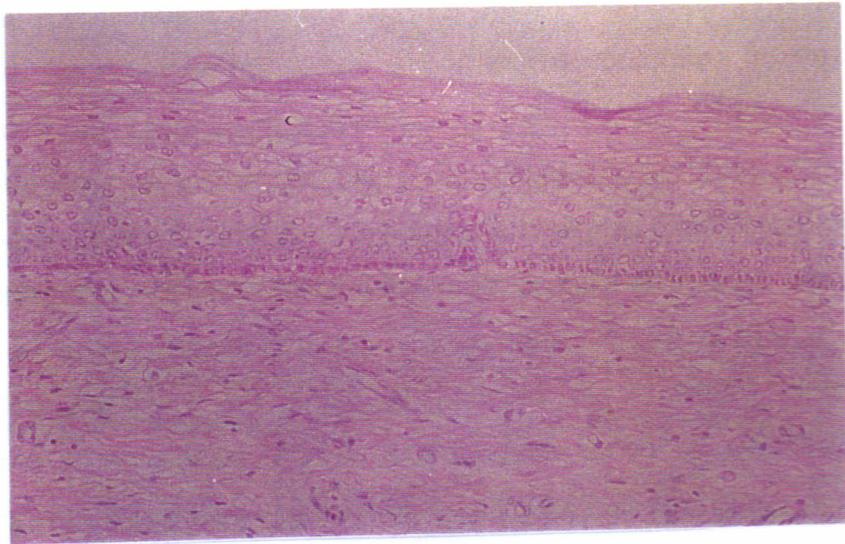


FIGURA 3 – Tecido do colo uterino normal com hematoxilina-eosina (HE). Aumento 50x.

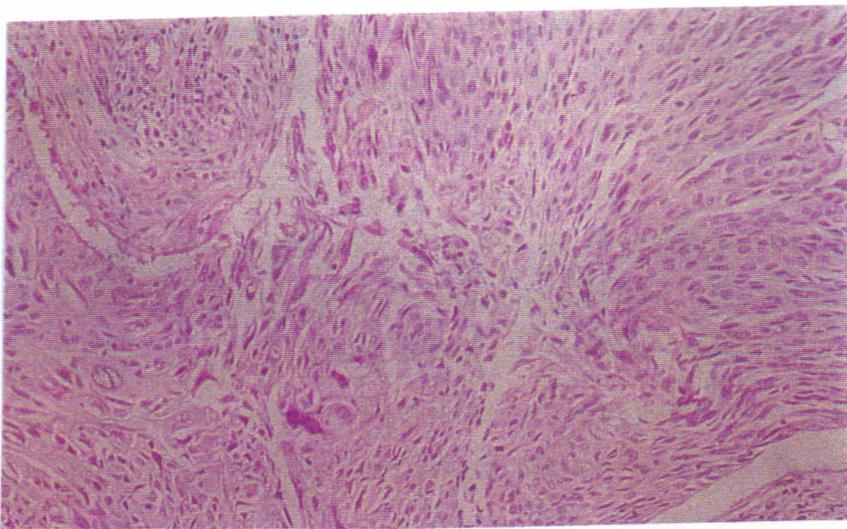


FIGURA 4 – Carcinoma invasivo mal diferenciado do tecido do colo uterino com hematoxilina-eosina (HE). Aumento 50x.

1.1.4 Neoplasias de mama

A glândula mamária é constituída de 20 lobos, que são subdivididos em lóbulos, sendo estes as unidades funcionais do parênquima mamário. A unidade lobular é constituída por uma ramificação do ducto lactífero - que é o *ducto terminal* - por pequenos *ácinos* e por tecido conjuntivo frouxo, com alguns linfócitos de permeio. Os processos patológicos da mama mais freqüentes são: doença cística ou displasia, inflamações e neoplasias. As neoplasias podem existir de dois tipos: benignas e malignas (ANDRADE, 1999).

O fibroadenoma é o tumor benigno mais comum da mama, composto de glândulas e tecido fibroso. Ocorre em qualquer idade, porém é muito freqüente entre os 21 e 30 anos. O aspecto macroscópico típico do fibroadenoma é característico: nódulo arredondado único ou múltiplo, bem delimitado, móvel, mais freqüentemente localizado no quadrante superior externo da mama. Tem consistência dura, pelo componente fibroso, cor branca e o volume médio de 3,5 cm, embora sejam descritos casos de até 15 cm de diâmetro. Microscopicamente há uma combinação variada dos componentes glandular e fibroso, predominando este último. O tecido conjuntivo proliferado pode ser denso, frouxo ou de aspecto mixomatoso (ANDRADE, 1999).

Nos países desenvolvidos, carcinoma da mama é o câncer mais comum das mulheres e, no Brasil, sua freqüência também é alta. O carcinoma de mama ocorre em qualquer idade, porém é raro antes de 25 anos, estando o pico de incidência ao redor dos 50 anos (FIGURA 5). O carcinoma de mama se localiza, em ordem de freqüência, no quadrante superior externo da mama (50% dos casos), nos outros quadrantes (30%) e na região subaureolar (20%). O aspecto macroscópico geralmente se manifesta como um nódulo duro, fixo e indolor e, na maioria dos casos, a superfície de corte mostra nódulo com 1 a 3 cm de diâmetro, mal delimitado devido a infiltração, de cor branca, opaco e consistência dura (ROBINS *et al.*, 1996).

Segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde, os carcinomas são divididos em dois grupos : *não invasivos* e *invasivos*. Dentre os carcinomas de mama, o carcinoma ductal invasivo compreende a grande maioria (75%). Histologicamente é constituído de células de volume médio ou grande, núcleo irregular, com nucléolo evidente, em arranjo ductal e infiltrando

o estroma em cordões sólidos, túbulos, glândulas, massas celulares ou mistura de todos estes aspectos (ROBINS, *et al.*, 1996).

Tn (GalNac- α -1-O-Ser/Thr) e T (Gal β 1 \rightarrow 3GalNac- α -1-O-Ser/Thr) são antígenos específicos que aparecem precocemente nos estágios de carcinomas, associados a glicopeptídeos (epítomos). Câncer de mama têm uma grande quantidade de antígenos, como Thomsen-Friedenreich, Tn e T, no citoplasma e nas membranas das células, associados a glicopeptídeos. Eles são precursores das estruturas imunodominantes dos grupos sanguíneos M e N. Neste estudo foi observada marcação imuno positiva de epítomos de Tn e T em carcinoma ductal infiltrante (CDI) de mama em vários estágios, e sugerido que as imagens imunohistoquímicas podem adicionar novos parâmetros nos prognósticos de câncer de mama (WANG, 1997).

Lectinas são bons marcadores histoquímicos e bastante satisfatórios para estudar as mudanças expressas em carboidratos no desenvolvimento de câncer de mama.

Os primeiros estudos em câncer de mama com lectinas nas técnicas histoquímicas originaram-se dos trabalhos de KLEIN *et al.*,(1981,1983). Estes estudos indicam que a expressão dos sítios ligantes para aglutinina de amendoim (PNA) em células de câncer de mama foi correlacionada com a posição dos receptores de hormônios esteróides e poderia ser usada *in situ* para quantificar receptores esteróides (KLEIN *et al.*, 1981). Entretanto, outros estudos em câncer de mama não revelaram diferenças nas ligações das lectinas entre tecidos de mama normal e hiperplásico, e que em câncer de mama, ligação com PNA, como um indicador para prognóstico, não tem sido bem aceito (LOUIS *et al*, 1983; WALKER, 1985).

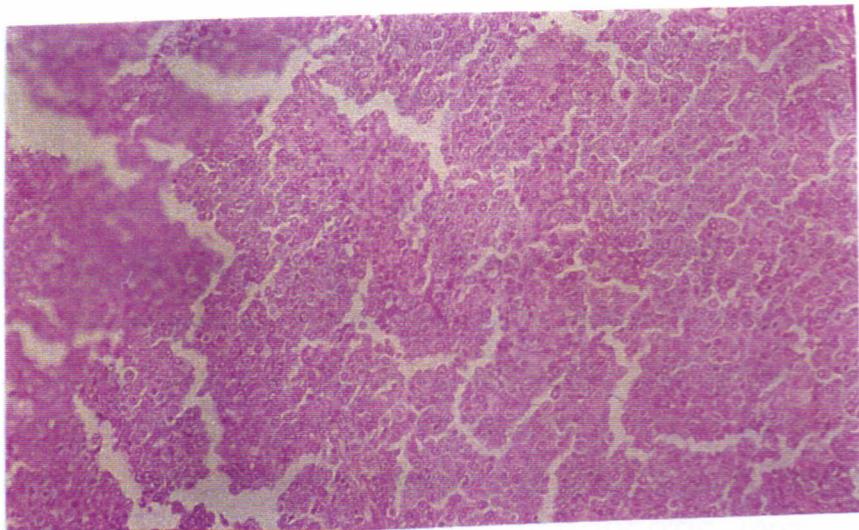


FIGURA 5 – Tecido mamário com carcinoma ductal infiltrante com hematoxilina-eosina (HE).

1.1.5 Organização e função dos componentes da superfície celular

A membrana plasmática das células animais é recoberta pelo glicocálix, uma camada flexível, constituída por glicoproteínas, glicolipídeos e polissacarídeos. O glicocálix está envolvido em diversas funções além de proteção, mas não atua na permeabilidade celular. Ele está envolvido no reconhecimento molecular entre as células, contém enzimas e antígenos e é fundamental para a junção das células nos tecidos (DE ROBERTIS & DE ROBERTIS, 1993).

O estudo da superfície celular é atualmente uma das áreas de maior atividade da biologia celular e molecular, pois abrange não só o transporte de substâncias entre a célula e o seu meio, mas também as muitas outras funções relacionadas à comunicação e interação entre as células de um tecido.

O mecanismo de reconhecimento molecular na superfície da célula, que a torna capaz de reconhecer células semelhantes, é afetado quando as células normais transformam-se em cancerosas. O resultado é um crescimento e divisão incontrolados das células, pela alteração dos mecanismos moleculares de reconhecimento que agem na membrana celular. O estudo dessas alterações pode contribuir para o entendimento das diferenças entre as células normais e as neoplásicas (DE ROBERTIS & DE ROBERTIS, 1993).

Os conhecimentos sobre células progredem paralelamente ao aperfeiçoamento dos métodos de investigação. A princípio, o uso do microscópio composto possibilitou o descobrimento das células e a elaboração da teoria segundo a qual todos os seres vivos são constituídos por células (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999)

Quando, em 1896, foram construídas as primeiras objetivas apocromáticas, a microscopia ótica atingiu plena maturidade. Nos anos seguintes, houve grande aperfeiçoamento da química dos corantes e os citologistas elaboraram numerosas técnicas de coloração, com a finalidade de visualizar e destacar os componentes celulares (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Em 1936 LUCIEN LISON publicou a primeira edição do seu livro *Histochemie et Cytochemie Animales*. Este trabalho marcou época, pois o autor não se limitou a apenas descrever as técnicas citoquímicas então conhecidas.

Como existia grande confusão a respeito do que seria de fato uma técnica citoquímica, LISON propôs critérios de validade, estabelecendo de modo preciso as condições que devem ser satisfeitas por uma técnica para que ela seja considerada de valor citoquímico.

Daí em diante passou a existir uma linha de demarcação precisa entre as técnicas de simples coloração - que apenas demonstram a morfologia dos constituintes celulares- e as técnicas citoquímicas - que fornecem indicações sobre os componentes celulares (JUNQUEIRA & CARNEIRO,2000).

Outro grande passo foi dado pela descoberta da técnica da centrifugação fracionada, que permite o isolamento de componentes celulares em quantidade suficiente para seu estudo bioquímico. O microscópio eletrônico, aperfeiçoado entre 1930-1940, teve que esperar mais de quinze anos para começar a ser empregado com proveito em citologia. Este lapso deveu-se à necessidade de aperfeiçoamento das técnicas de fixação das células, descoberta de materiais de inclusão adequados e desenvolvimento de micrótomos especiais, capazes de cortar os tecidos na espessura conveniente (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Embora seja possível o estudo microscópico das células vivas, muitas vezes há vantagens em obter-se um preparado permanente (lâmina), no qual as células ficam preservadas, isto é, fixadas e coradas, para melhor demonstração dos seus componentes.

Cada um dos fixadores químicos apresenta certos inconvenientes, ao lado de algumas qualidades desejáveis. Por isso, foram elaboradas as misturas fixadoras que contêm proporções variáveis dos fixadores simples com a finalidade de compensar-lhes as deficiências.

Em geral, a solução do fixador simples, ou a mistura fixadora, contém outras substâncias que visam proporcionar pH e pressão osmótica adequados à fixação. A pressão osmótica e o pH devem ser modificados de acordo com o meio onde vivia a célula.

Quase todas as organelas e inclusões são transparentes e incolores, o que dificulta seu estudo microscópico. Para vencer esta dificuldade foram criados numerosos processos de coloração que tornam visíveis os diversos componentes celulares. Entretanto, não existe uma técnica de coloração que, sozinha, ponha em evidência todas as estruturas celulares. Por isso, para se

conhecer a morfologia de todos os constituintes de um tipo de célula, são feitos diversos preparados, cada um deles evidenciando certas estruturas.

Nosso conhecimento sobre a complexa organização celular é relativamente recente. Ele foi conseguido nos últimos anos, principalmente pelos avanços na capacidade resolutive do microscópio óptico, eletrônico de transmissão e de varredura. O microscópio eletrônico de varredura é utilizado com maior frequência no estudo das superfícies celulares, onde são aparentes os detalhes da membrana plasmática.

1.1.6 Organização molecular da membrana plasmática

As membranas biológicas definem o limite externo das células e regulam o trânsito molecular através desse limite; elas dividem o espaço interno em compartimentos definidos para separar processos e componentes.

Membranas intracelulares têm uma percentagem mais alta de proteínas por causa do grande número de atividades enzimáticas. A composição da membrana celular e a sua arquitetura química constituem a estrutura física que propicia suas funções biológicas (DEVLIN, 1998).

Proteínas e lipídeos polares constituem quase toda a massa das membranas biológicas; a pequena quantidade de carboidratos presente é geralmente parte das glicoproteínas ou glicolipídios. As proporções relativas das proteínas e lipídeos são distintas em diferentes membranas, refletindo a diversidade dos papéis biológicos (LEHNINGER, 2000).

A evidência combinada da microscopia eletrônica, da composição química, de estudos físicos de permeabilidade e da mobilidade individual de moléculas de proteínas e lipídios dentro da membrana apoia o modelo do mosaico fluido para a estrutura das membranas biológicas.

O mosaico das membranas é fluido pelo fato das interações entre lipídeos e proteínas serem não covalentes, permitindo que moléculas individuais lipídicas e protéicas movam-se lateralmente no plano da membrana (LEHNINGER,2000) (FIGURA 6).

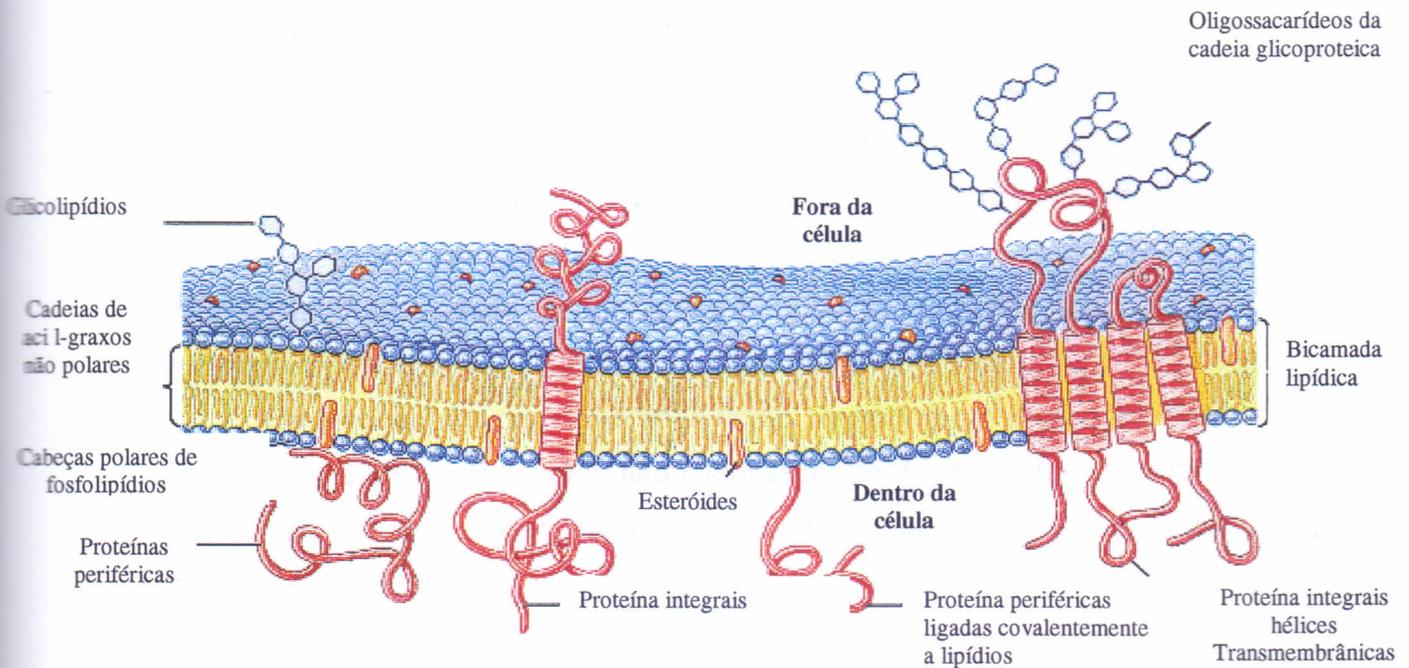


FIGURA 6 – Modelo do mosaico fluido para membranas biológicas (LENINGER, 2000)

As membranas têm aparência trilaminar quando vistas à microscopia eletrônica, com uma faixa escura de cada lado que correspondem às regiões polares dos fosfolípidos e esteróis anfipáticos; apresentam uma faixa clara central com as regiões não polares dos lipídeos. Nesta bicamada de lipídeos, as proteínas globulares estão incrustadas em intervalos regulares, mantidos pelas interações hidrofóbicas entre os lipídeos (LEHNINGER, 2000). As membranas dos mamíferos são de 7-10 nm, mas algumas apresentam larguras significativamente menores. Com o desenvolvimento de técnicas sofisticadas para a preparação de amostras de tecidos e coloração, incluindo coloração negativa e criofatura, a superfície das membranas foi visualizada ao nível molecular, onde as superfícies não são lisas, mas pontilhadas por massas globulares em relevo. As membranas plasmáticas de células eucarióticas também atuam no reconhecimento célula-célula, na manutenção da forma da célula e na locomoção celular (DEVLIN, 1998).

Proteínas de membrana desempenham um papel no movimento transmembrânico de moléculas e como receptores para ligação de hormônios e fatores do crescimento. Em muitas células, tais como neurônios e eritrócitos, as

proteínas de membrana têm um papel estrutural na forma da célula. Assim, proteínas individuais podem exercer funções tais como catalítica, estrutural, de transporte, de receptor, ou de reconhecimento. Não é surpreendente que um alto conteúdo protéico numa membrana se correlacione com a complexidade e a variedade de funções da mesma. As proteínas das membranas se dividem em duas classes: proteínas periféricas (extrínsecas) ou proteínas integrais (intrínsecas). Fazem parte das proteínas integrais as glicoproteínas, cada uma com sua própria composição em carboidratos (STRYER, 1996).

Os carboidratos de membranas estão presentes como glicoproteínas e glicolipídeos. Estes carboidratos são oligossacarídeos covalentemente ligados a proteínas, formando glicoproteínas, e numa quantidade menor, a lipídeos, formando glicolipídeos.

Os açúcares encontrados em glicoproteínas e glicolipídeos incluem glucose, galactose, manose, fucose, arabinose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina, ácido idurônico e ácido siálico. Em geral, as glicoproteínas contêm resíduos de açúcares na forma D, com exceção de L-fucose, L-arabinose, e ácido L-idurônico. A ligação covalente dos açúcares à cadeia peptídica ocupa um lugar central na estrutura das glicoproteínas e apenas um número pequeno de ligações são encontradas. Os três tipos principais de ligações glicopeptídicas são a N-glicosil, a uma asparagina, a O-glicosil, com uma serina ou com uma treonina e a O-glicosil, com uma 5-hidroxilisina (FIGURA 7).

O componente carboidrato consiste de um ou mais resíduos de açúcares e estão localizados no lado externo da membrana plasmática ou no lado luminal do retículo endoplasmático (DEVLIN, 1998).

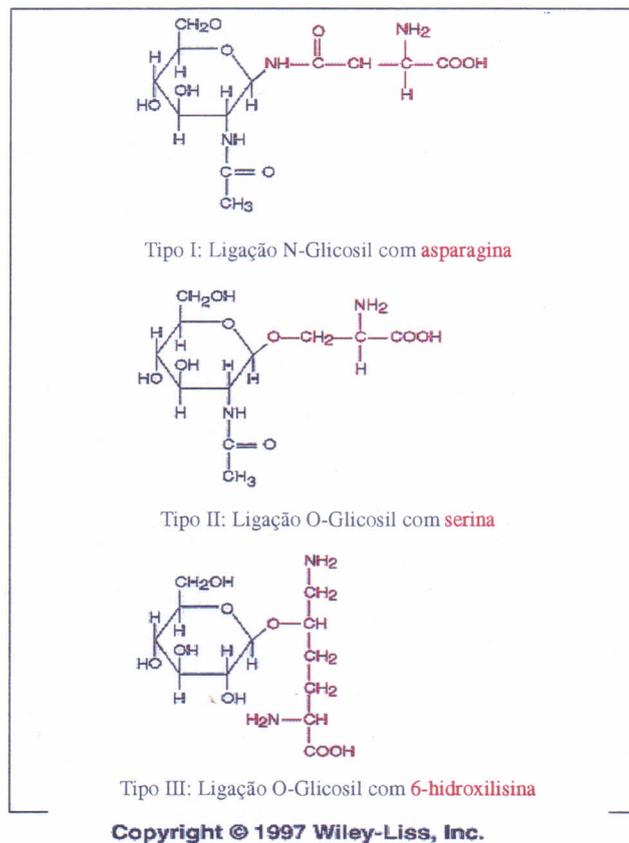


FIGURA 7 - Estrutura dos três tipos principais de ligações glicopeptídicas (DEVLIN, 1998.)

Uma determinada glicoproteína, obtida de diferentes espécies animais, freqüentemente tem estrutura protéica idêntica, mas composição de carboidratos variáveis. A heterogeneidade dos carboidratos ligados às proteínas pode ocorrer no mesmo organismo. As funções desempenhadas pelos carboidratos de membrana incluem reconhecimento célula-célula, adesão e ação como receptor (STRYER, 1996).

Os resíduos de carboidratos dos glicoconjugados podem possuir uma grande quantidade de informações codificadas por unidade de monômeros, diferindo no número e tipo de resíduos de açúcares, sua seqüência, tipo de ligação anomérica, presença ou ausência de ramificação e tipos e quantidades de ácidos siálicos, contribuindo dessa maneira para uma micro heterogeneidade estrutural. Por causa da sua complexidade e variação estrutural, os carboidratos da superfície celular servem como sinais de reconhecimento (SHARON & LIS, 1993). Modificações estruturais do domínio

de oligossacarídeos de glicoconjugados da superfície celular ocorrem durante o desenvolvimento de células normais e estão correlacionadas com funções vitais do organismo, tais como reconhecimento, crescimento, comportamento, inibição e diferenciação celular (HAKOMORI *et al.*, 1974). Esses sinais, codificados por estas diversidades estruturais, são reconhecidos por lectinas divalentes ou polivalentes na superfície de contato de células em um caminho complementar análogo à interação ligante-receptor (SHARON & LIS, 1989). Por isso, lectinas e glicoproteínas podem agir como uma ponte ligando carboidratos de células vizinhas.

Por causa da alta especificidade de interação das lectinas com glicoconjugados, lectinas podem servir como moléculas guias contra glicoconjugados específicos de tumores ou receptores de lectinas. Lectinas podem ser ligadas a agentes hospedeiros para serem transportadas para as células alvo. Estes podem incluir drogas quimioterápicas em células alvo de tumores (ZARCOVIC *et al.*, 1998), radioisótopos (I^{125} e G^{67}) para rádio-imagem, (HOLT *et al.*, 1984; KOJIMA & JAY, 1986) e antioxidante fotoativado para terapia fotodinâmica (KREIMER-BIRNBAUM, 1989).

Um grande número de estudos tem mostrado que os carboidratos da superfície celular são modificados por transformações malignas, tumores de células diferenciadas e metástases (DENNIS, 1992; LU & CHANEY, 1993). As proteínas ligantes de carboidratos da superfície celular (lectinas endógenas) estão alteradas no câncer e suas metástases.

Por causa da analogia da interação entre lectina e sacarídeos com a que ocorre entre antígenos e anticorpos, aplicações de lectinas tanto em soluções como na forma mais usual, imobilizada para a detecção e purificação de uma variedade de compostos contendo carboidratos, é uma extensão natural do uso de anticorpos para isolar seus correspondentes antígenos. Embora a especificidade das lectinas seja restrita a açúcares, elas oferecem muitas vantagens, principalmente por causa da propriedade de precipitar ou adsorver oligo e polissacarídeos e glicoconjugados, podendo ser eluída prontamente com o açúcar disponível.

Além disso, lectinas são estáveis na presença de detergentes em baixas concentrações, permitindo seu uso para a purificação de membranas glicoprotéicas. Por outro lado, dificuldades podem ser encontradas no uso de

lectinas para o isolamento e purificação de glicoconjugados, por causa de interações iônicas e hidrofóbicas não específicas.

A interação específica de um biopolímero com uma lectina pode ser tomada como evidência de que os biopolímeros contêm carboidratos. A cromatografia com lectina imobilizada tem sido largamente usada para demonstrar a natureza glicoprotéica de receptores de membrana para hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores, imunoglobulinas e compostos relacionados (GIOANNINI *et al.*, 1982; HEDO *et al.*, 1981; SHIRAKAWA *et al.*, 1983, DAN *et al.*, 1998).

Embora casos de interação seletiva de lectinas com células malignas tenham sido reportados há muito tempo, advertências contra o uso de lectinas isoladamente, baseado em estudos para diagnóstico e/ou prognóstico de certos tipos de câncer, têm sido feitas por causa da falta de segurança estatística ou pouca disponibilidade de marcadores ou de sondas específicas para tumores (KANNAN *et al.*, 1993; DU *et al.*, 1991; NAKANISHI *et al.*, 1993; WALKER, 1990; BROOKS *et al.*, 2000). Esta situação pode ser mudada com o aumento da disponibilidade de ferramentas e técnicas simples para análise de glicoconjugados e lectinas e com o isolamento de novas lectinas e glicoconjugados característicos de superfícies celulares de tumores. Assim, no momento, estatísticas confiáveis podem somente ser obtidas pela combinação de ferramentas e técnicas, como por exemplo: análise de lectinas-glicoconjugados em paralelo com métodos baseados em anticorpos monoclonais, análise quantitativo micro densitométrica (análise morfométrica de imagens), fracionamento periódico (S-phase), DNA ploidia (em relação ao número de genomas que contém), e outras técnicas existentes (BROOKS, *et al.*, 1993; DI-STEFANO *et al.*, 1991; SAKAMOTO *et al.*, 1993; VIDAL - VANACLOCHA *et al.*, 1991).

As novas estratégias para as análises das lectinas / glicoconjugados conhecidas incluem:

- 1- Oxidação moderada de ácidos siálicos terminais de glicoconjugados. Isto poderá aumentar a ligação lectínica característica preexistente de glicoconjugados permitindo sua detecção sobre a modificação (NORGARD *et al.*, 1993).

2- Remoções de ácidos siálicos terminais de glicoconjugados usando neuraminidases podem desmascarar estruturas ligantes na aglutinina de amendoim (COOPER, 1982). Este estudo tem tido razoável sucesso em determinados tipos de câncer e nas mudanças relacionadas a diferenciação em oligossacarídeos sialoilados que ocorrem no epitélio do cólon humano (BOLAND *et al.*, 1991; LANCE & LEV, 1991).

3- Uso de uma bateria de neoglicoproteínas, pseudopolissacarídeos ou neoglicolipídios (unidades de sacarídeos sintéticos ligados covalentemente ao colesterol ou dipalmitoato de fosfatidiletanolamina) para analisar lectinas em tumores específicos.

4- Uso de uma bateria de lectinas de plantas para examinar glicoconjugados de tumores específicos. Tais ferramentas estão sempre em uso para diagnóstico em muitas situações clínicas, e quase todos os resultados de complemento obtidos até agora por imuno-histoquímica e imuno-citoquímica foram com anticorpos monoclonais (MATSUMOTO *et al.*, 1992; ABRAMNEEKO *et al.*, 1991; GABIUS & GABIUS, 1993).

Um estudo combinado dos glicoconjugados da superfície celular de tumor e lectinas endógenas poderão fornecer um melhor entendimento do seu papel em invasão e metástases.

1.2 Lectinas

1.2.1 Considerações gerais

O termo lectina foi generalizado por SHARON & LIS (1972) para incluir todas as proteínas obtidas de plantas, animais ou microorganismos e de origem não imunológica que ligavam carboidratos, sendo específicas ou não para determinados grupos sangüíneos. DIXON (1981) propôs que lectinas seriam proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, que apresentam um ou mais sítios de ligação para carboidratos. BARONES (1988) e SHARON & LIS (1990) referiram-se à existência de um sítio hidrofóbico adicional. Assim, lectinas seriam uma classe de proteínas de origem não imunológica, de distribuição ubíqua na natureza e que reconhecem carboidratos livres ou

ligados a superfícies celulares através de sítios de ligação nos quais a hidrofobicidade é a principal força de interação (KENNEDY *et al.*, 1995).

PEUMANS & VAN DAMME (1998) propuseram uma nova classificação para as lectinas vegetais levando-se em consideração sua estrutura protéica. Essa divisão incluiu uma gama de proteínas que possuem um sítio ligante a carboidratos: **merolectinas**, **hololectinas** e **quimerolectinas**. As **merolectinas**, proteínas que apresentam um único sítio ligante para carboidratos, como a heveína, proteína ligante de quitina e as proteínas monoméricas ligantes de manose, incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados em função de sua natureza monovalente. As **hololectinas**, proteínas que também apresentam apenas um domínio de ligação a carboidratos, contendo, ainda, dois ou mais sítios de ligação (os quais podem ser iguais ou homólogos) para essas moléculas, estando aptos a aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados; fazem parte deste grupo a maioria das lectinas conhecidas de plantas como a Con A e frutalina. As **quimerolectinas**, proteínas que possuem, além do domínio ligante a carboidratos, outro domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica que age independentemente do domínio ligante do açúcar; neste grupo estão incluídas as quitinases tipo 1 e as RIPs tipo 2. Estas lectinas podem também agir como merolectinas ou hololectinas, dependendo do número de domínios ligantes a carboidratos. Posteriormente, foi sugerido mais um tipo de lectina, as **superlectinas**, que podem ser consideradas como um grupo especial de quimerolectinas. Elas seriam proteínas de fusão, com dois domínios de ligação a carboidratos, os quais são estruturalmente diferentes e reconhecem carboidratos distintos. A natureza quimérica das superlectinas é ilustrada pela lectina de bulbo de tulipa, com dois domínios, um específico para N-acetilgalactosamina e outro para manose.

A primeira descrição, na literatura, de uma lectina foi feita há mais de 100 anos, por STILLMARK (1888) ao observar a aglutinação de hemácias quando estudava o efeito tóxico de extratos de *Ricinus communis* sobre o sangue. Após identificar que o material responsável pela hemaglutinação era uma proteína, este pesquisador denominou-a de ricina. SHARON & LIS (1989) citam que pouco tempo depois HELLIN (1891) descobriu que o extrato tóxico de *Abrus precatorius* também causava aglutinação de eritrócitos, e a aglutinina

foi chamada de abrina. Estas duas proteínas serviram de instrumentos valiosos ao bacteriologista PAUL EHRLICH (1891) na elaboração de conceitos fundamentais da imunologia, quando reconheceu nessas proteínas modelos de antígenos mais úteis para a solução de problemas imunológicos, comparados com as toxinas bacterianas, até o momento utilizadas. Elas eram mais fáceis de isolar, mais estáveis e podiam, quando inoculadas em animais, promover a produção de anticorpos capazes de inibir tanto a atividade tóxica como a atividade hemaglutinante. EHRLICH (1891) mostrou ainda que coelhos alimentados com pequenas quantidades dessas sementes, contendo atividades tóxicas e hemaglutinante, tornavam-se parcialmente imunes à sua toxicidade e que esta resistência era específica, não protegendo o animal contra os efeitos causados pelo extrato de outra semente. Assim, os estudos sobre propriedades biológicas e estruturais das lectinas de origem vegetal aumentaram, desde então, e tornaram-se ferramentas importantes na compreensão dos mecanismos moleculares relacionados com adesão celular e/ou interação com carboidratos ou glicoproteínas.

Apesar de STILLMARK (1888), ainda no fim do século XIX, ter observado que glóbulos vermelhos de diferentes espécies se comportavam de maneiras diversas frente à mesma hemaglutinina, somente após o isolamento da primeira lectina (Concanavalina A) foi possível verificar a inibição da sua atividade hemaglutinante pelo açúcar de cana (SUMNER & HOWELL, 1936). Com isto, tornou-se evidente a necessidade da presença de carboidratos na membrana celular no processo de interação reversível com aglutininas multivalentes, o que provocava a aglutinação da célula.

As lectinas só vieram despertar maiores interesse a partir de 1960, quando duas descobertas alteraram fortemente o quadro para sua utilização. A primeira foi feita por NOWELL (1960), que verificou ser a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) mitogênica, sendo capaz de estimular a proliferação de linfócitos. A segunda foi efetuada por AUB *et al.*, (1963) ao verificarem que a lectina do germe de trigo, *Triticum vulgaris* (WGA), aglutinava muito mais intensamente células transformadas do que células normais, e que as alterações malignas eram acompanhadas por mudanças nas superfícies celulares.

As primeiras tentativas de aplicações de lectinas foram realizadas visando à tipagem sangüínea (MATSUMOTO & OSAWA, 1969). Contudo, as lectinas só tiveram sua aplicação ampliada para estudo de células quando INBAR & SACHS (1969) descobriram que a Con A também aglutinava, de preferência, células malignas.

De particular importância na obtenção de lectinas foi a introdução, por AGRAWAL & GOLDSTEIN (1965), do método de purificação por cromatografia de afinidade.

Assim, a disponibilidade de um número cada vez maior de lectinas, com diferentes especificidades para carboidratos, resultou em uma crescente utilização dessas versáteis proteínas, como instrumentos em pesquisas médicas e biológicas.

As lectinas estão distribuídas amplamente em todas as classes e famílias de organismos: vírus, bactérias, plantas, invertebrados e vertebrados (LIENER *et al.*, 1986; SHARON & LIS, 1989). Entretanto, o maior número de lectinas já estudadas pertence ao Reino *Plantae* (WHITTAKER, 1969).

A grande maioria das lectinas vegetais conhecidas, muitas das quais já foram isoladas e parcialmente caracterizadas, é proveniente de sementes maduras. Embora a semente seja normalmente o órgão mais rico em lectinas, onde nas leguminosas constituem até 10 % do total de proteínas (SHARON & LIS, 1989), elas também estão presentes em pequenas quantidades em outros tecidos vegetativos (bulbos, raízes, embrião, caule, cascas, folhas, fruto, rizomas, floema) e em um número vasto de espécies de plantas nos diferentes grupos taxonômicos (PEUMANS *et al.*, 1985).

Muitas plantas contêm apenas uma lectina, mas há alguns casos em que o mesmo tecido apresenta duas ou mais lectinas diferentes, tanto na especificidade por açúcar como em outras propriedades (DAS *et al.*, 1993).

As lectinas de plantas são geralmente ricas em aminoácidos hidrofóbicos e ácidos, sendo pobres em aminoácidos sulfurados. Algumas exceções são encontradas nas lectinas do gérmen de trigo e da batata. A maioria das lectinas são glicoproteínas com quantidade de açúcar variável. Um grande número de lectinas são metaloproteínas, as quais precisam de cátions divalentes (C⁺² e Mn⁺²) para exibirem uma atividade completa. Seus pesos moleculares variam de 8.500 a 250.000 daltons. Geralmente são oligômeros

constituídos de duas ou mais subunidades idênticas ou não. Porém, a estrutura tetramérica é a mais comum. Devido às suas propriedades, as lectinas têm sido muito utilizadas como ferramentas, por um grande número de pesquisadores, em pesquisa básica, clínica e aplicadas à agricultura.

1.2.2 Atividades biológicas das lectinas como ferramentas biotecnológicas

Lectinas são ferramentas poderosas para o estudo de carboidratos e seus derivados, tanto em solução como na superfície das células. Elas estão sendo largamente usadas em investigações analíticas propostas em bioquímica, biologia celular, imunologia e áreas relacionadas, particularmente com glicoconjugados. A lista de aplicações das lectinas está crescendo rapidamente e o potencial destas proteínas está longe de ser completamente explorado.

As origens do estudo das lectinas e da imunologia são, em grande parte, superponíveis. Os papéis desempenhados pelas lectinas são visíveis ao longo do desenvolvimento da imunologia como ciência e podem ser identificados como de dois tipos principais:

- de ferramenta – moléculas de lectinas exógenas, principalmente de origem vegetal, utilizadas para mimetizar ou bloquear a ação de efetores fisiológicos, permitindo isolar e caracterizar ligantes de superfícies celulares ou avaliar fenômenos decorrentes da interação com tais ligantes e intrincadas vias de transdução de sinal (GRAY & FLATT, 1999; DoPRADO *et al.*, 1998; LAZARUS *et al.*, 1998).

- de protagonista – moléculas de lectinas endógenas com papel fisiológico significativo *in situ*, exercido a partir de sua interação com glicoconjugados, que provoca respostas celulares específicas, relevantes na montagem da imunidade inata ou adquirida – esse papel é exercido fundamentalmente por lectinas de mamíferos; lectinas de microorganismos também vêm sendo identificadas como protagonistas, em fenômenos próprios da relação parasita-hospedeiro (REMMELINK *et al.*, 1999; GANGULY & DAS, 1994; HSU *et al.*, 2000).

As diferentes propriedades biológicas apresentadas pelas lectinas provêm da sua característica química de interagir com carboidratos. Assim, a

presença de açúcares na superfície das células, constituindo a porção glicídica das glicoproteínas e glicolípídios de membrana, fornece sítios de ligação para as lectinas. Essa ligação poderá induzir uma variedade de mudanças, levando à expressão das atividades biológicas (SHARON & LIS, 1989).

As lectinas apresentam vários efeitos biológicos em células, sendo a aglutinação e a mitogenicidade os mais estudados. Outras atividades biológicas incluem: isolamento, purificação e estudos estruturais de glicoconjugados; defesa de plantas contra predadores; diagnóstico e identificação de microorganismos; isolamento de subpopulações de células; carreadora de drogas; estudos dos componentes de superfície de vírus; atividade insulinoimimética em células adiposas; inibição do crescimento de fungos; indução da liberação de histamina; produção de interferon; inibição do crescimento de células neoplásicas; promoção de adesão celular; efeito imunossupressor; atividade nematocida e inseticida; aumento do poder fagocitário por células; entre outros. Lectinas também podem ser utilizadas para explorar superfícies celulares ligando-se à porção carboidrato de glicoproteínas ou glicolípídios que se projetam da célula. No entanto, nem todas as lectinas exibem tais efeitos (LIS & SHARON, 1981).

Ensaio de ligação imunoadsorvente com enzima (ELISA) foi desenvolvido para detecção quantitativa de glicoproteínas dos envelopes dos vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da imunodeficiência em símios (SIV), utilizando a lectina de *Galantus nivalis* (MAHMOOD & HAY, 1992).

Lectinas conjugadas à peroxidase foram úteis em estudos histoquímicos, citoquímicos e transferências eletroforéticas, para elucidar a origem de cistos adquiridos dos rins, e de carcinomas renais, para estudar o perfil dos carboidratos dos esfregaços citológicos de cérvix uterino.

A habilidade que as lectinas têm em aglutinar células as diferencia de outras macromoléculas que apresentam afinidade por carboidratos, sendo também a forma mais facilmente detectável e utilizada para revelar a presença de carboidratos em preparados biológicos.

Para que o processo de aglutinação ocorra, a lectina deve apresentar mais de um sítio de ligação para carboidratos, a fim de poder formar ligações cruzadas entre diferentes células. A grande maioria dos estudos sobre aglutinação celular tem sido feitos em células de animais, apesar de que outras

estruturas como vírus (STEWART *et al.*, 1973), mitocôndrias e ácidos nucléicos também possam ser aglutinadas. No entanto, não existe uma relação simples e direta entre a quantidade de lectina e aglutinação, porque a aglutinação é afetada por diversos fatores, tais como temperatura, pH, concentração celular ou tempo de contato lectina/célula. Para que a aglutinação seja do tipo lectínica a mesma deve mostrar-se inibida por açúcares, provando o envolvimento de receptores de natureza glicídica (LIS & SHARON, 1986).

A mitogenicidade de cinco proteínas com atividade hemaglutinante, isolada de *Phytolacca americana*, foi descrita por WAXDAL (1974). Em contraste com outras lectinas sabidamente mitogênicas, que estimulam apenas a proliferação de linfócitos T (Concanavalina A e jacalina), estas isolectinas provocam a proliferação celular em linfócitos T e B. Esta estimulação linfocitária por lectinas ou outros agentes mitogênicos (não inibidos por açúcares específicos) resulta na liberação de substâncias solúveis (linfocinas e interferons) com ampla atividade biológica (LOVATT *et al.*, 2000) e, em certos casos, um aumento na produção de imunoglobulinas (HAAS *et al.*, 1999).

BARRAL-NETO *et al.*, (1992) observaram o comportamento da proliferação de linfócitos e estimulação da produção de interferon-gama por lectinas da sub-tribo *Diocleinae* (*Canavalia brasiliensis*, *Dioclea grandiflora*, *Dioclea rostrata*, *Dioclea violacea*, *Cratylia floribunda*) e compararam com a Concanavalina A. Os autores verificaram que todas as lectinas mostraram-se mitogênicas, apresentando, no entanto, atividade diferenciada.

As lectinas, mitogênicas ou não, têm sido bastante utilizadas como indutora na produção de interferon natural, a exemplo da *Dioclea grandiflora*, mas, até o momento, não está esclarecido o mecanismo dessa indução (KIYOTA, 1993).

A descoberta das diferentes propriedades das lectinas serviu de base para a sua utilização na biotecnologia e o seu estudo permitiu o desenvolvimento de outras aplicações no campo da bioquímica, biologia celular, imunologia e áreas afins (MOREIRA, *et al.*, 1991).

Lectinas atuam como mediadores no reconhecimento celular em uma vasta linha de sistemas biológicos (SHARON & LIS, 1989; BUSSING *et al.*, 1999). A propriedade de lectinas de atuarem como mediadores da adesão entre leucócitos e endotélio foram inicialmente descrita por STOOLMAN e

colaboradores (1983), quando demonstraram que açúcares poderiam funcionar como inibidores da ligação entre leucócitos e endotélio. SHINAGAWA & ANDERSON (2000) descreveram diversas lectinas de plantas, por sua habilidade de ligar-se seletivamente a monócitos-macrófagos alveolares, como a isolectina I de *Bandiera* (*Griffonia*) *simplicifolia* e a jacalina, permitindo, assim, através de uma lavagem de pulmão, a purificação de eosinófilos por uma seleção negativa com bolinhas magnéticas conjugadas com estreptavidina.

Devido à habilidade dessas proteínas de interagir com células de forma específica, elas são utilizadas na determinação dos grupos sanguíneos humanos e no estudo de receptores químicos estruturais presentes nas hemácias destes grupos. Assim, estudos de inibição por açúcar simples com as lectinas de *Phaseolus limensis* e *Vicia craca*, específicas para o grupo A, e de *Lotus tetragonolobus* e *Anguilla anguilla*, específicas do grupo O, forneceram evidências de que N-acetilgalactosamina e L-fucose desempenham um papel importante na especificidade dos grupos A e O (H), respectivamente (LIS & SHARON, 1986). As lectinas de *Dolichos biflorus* e *Crotalaria striata* diferenciam células A1 de A2 (BIRD, 1951; OLIVEIRA *et al.*, 1989).

Estudos *in vitro* da aplicação de lectinas na estimulação de linfócitos têm possibilitado a análise de diversos eventos bioquímicos. Essa propriedade das lectinas tem sido utilizada para diagnosticar imunodeficiências congênitas ou adquiridas, além de poder monitorar o efeito de drogas imunossupressoras e imunoterapêuticas (LIS & SHARON, 1981). A Concanavalina A é usada como padrão de referência imunológica na indução da proliferação de linfócitos, sendo, tanto a subunidade íntegra como seus fragmentos indutores deste evento (SHARON & LIS, 1989; LOREA *et al.*, 1997). As lectinas mitogênicas também podem ser utilizadas para cariotipagem, determinação de sexo e detecção de cromossomas defeituosos devido, à fácil visualização dos cromossomas nas células estimuladas (SHARON & LIS, 1989).

Algumas lectinas são toxinas potentes e têm sido aplicadas como agentes terapêuticos, como, por exemplo, as lectinas ricina e abrina, que, unidas a anticorpos monoclonais específicos, são utilizadas como imunotoxina na terapia do câncer (BROWN & WHITE, 1997; ANDERSEN *et al.*, 1998). No entanto, as lectinas de algas marinhas, comparadas às lectinas de vegetais

superiores, não necessariamente tóxicas, são mais adequadas para serem empregadas como mísseis biológicos (lectina + droga ou lectina + anticorpo), devido ao seu menor tamanho molecular, dificultando, assim, sua detecção pelo sistema imunológico humano, segundo ROGERS E HORI (1993).

Devido ao fato das lectinas apresentarem alta especificidade por carboidratos, elas são utilizadas como ferramentas sensíveis para diagnóstico na aplicação microbiológica. Como exemplo, distinguindo estreptococos do grupo B e do grupo C; ajudando no diagnóstico da gonorréia, usando lectina de germen de trigo, que aglutina o agente etiológico *Neisseria gonorrhoeae*, não aglutinando o *Neisseria saprophytic* (SCHAEFER *et al.*, 1979) e; podendo, assim, ser utilizadas no laboratório clínico para identificação e classificação microbiana (SLIFKIN & DOYLE, 1990).

FÁBREGAS *et al.*, (1988) relataram os resultados da fixação da lectina da alga marinha vermelha *Codium tomentosum*, para diagnosticar o polimorfismo de glicoproteínas (antígenos leucocitários humanos-HLA), após a focalização isoelétrica do soro humano. Os autores sugerem que algumas lectinas incluindo a de *Codium tomentosum*, poderiam contribuir na tipagem dos HLAs que são responsáveis pela rejeição de transplantes de órgão.

O uso de lectinas em histoquímica para diagnóstico de tecidos malignos tem sido uma valiosa ferramenta em diagnósticos histopatológicos. Lectinas podem detectar alterações na composição de carboidratos das glicoproteínas e glicolipídios das membranas celulares, que parecem formar a base das mudanças nas adesões celulares que acompanham as transformações malignas, levando ao desenvolvimento de propriedades invasivas e metastáticas (REMANI *et al.*, 1994).

Lectinas têm sido usadas para estudar as ligações a tecidos mamários normais e transformados, comparando-as com a reatividade e localização dos nódulos linfáticos transformados (WALKER, 1985). O padrão de ligação das lectinas de *Helix pomatia* (HPA) a metástases cerebrais originadas de câncer mamário e as propriedades dessas ligações permitem identificar quais as glicoproteínas que ligam HPA, para definir mais precisamente as que estão associadas à metástase (SCHUMACHER *et al.*, 1992). Ainda, lectinas têm servido para avaliar linhagem de célula de câncer mamário humano (SCHUMACHER *et al.*, 1995).

Entre as principais aplicações podemos citar:

(a) - reconhecimento celular

Reconhecimento é um evento central em uma gama a fenômenos biológicos e correspondem à primeira etapa de numerosos processos dependentes de interações célula-célula ou célula-moléculas solúvel, como fertilização, embriogênese, migração celular, formação de órgãos, defesa imunitária e infecção bacteriana. O reconhecimento celular inadequado pode causar doença: defeitos na adesão de leucócitos resultam em infecções recorrentes; reconhecimento aberrante leva a crescimento e à motilidade celular descontrolados, característicos de transformação neoplásica e metástase (SHARON & LIS, 1989).

As observações iniciais sobre o papel de carboidratos no reconhecimento celular foram feitas na Austrália, através da demonstração de que a presença de resíduos de ácido siálico na superfície da membrana eritrocitária é um requerimento absoluto para a ligação do vírus influenza, uma vez que o tratamento prévio das células com neuraminidase aboliu a reação de ligação (BURNET, 1951). A partir da década de 70 ficou bem estabelecido que a maioria das células tenha sua superfície recoberta de carboidratos, na forma de glicoproteínas, glicolipídeos e polissacarídeos (COOK, 1986). Concomitantemente tornou-se evidente o enorme potencial dos carboidratos para codificar informações biológicas (SHARON & LIS, 1989).

Uma grande diversidade de estruturas de carboidratos tem sido observada em associação com glicoconjugados solúveis ou ligada à superfícies de células. E ao que parece, tal diversidade é biologicamente significativa, pois, em muitas situações, carboidratos modificam as atividades de proteínas às quais estão associados e também atuam como marcadores de diferenciação celular, desenvolvimento e estados patológicos (RADEMACHER *et al.*, 1988).

A capacidade de ligação seletiva de lectinas a açúcares tem dado à essas proteínas um papel de destaque no reconhecimento celular, numa ampla variedade de sistemas biológicos. A abundância dessas proteínas, assim como a diversidade de suas especificidades de ligação a carboidratos, tornam-as

ferramentas valiosas para a detecção e isolamento de glicoproteínas e caracterização parcial das porções de carboidrato dessas glicoproteínas.

Os primeiros trabalhos relacionados à aplicação de lectinas no estudo e caracterização de glicoconjugados de superfície celular foram :

1) uso rotineiro das lectinas de *Dolichos biflorus* e de *Vicia graminea* em bancos de sangue – respectivamente, para identificação de hemácias do grupo A e N – e da lectina de *Ulex europeus* para identificar indivíduos secretores de substâncias dos grupos sanguíneos A, B ou H na saliva ou outros fluidos biológicos (BIRD, 1951);

2) aglutinação preferencial de células neoplásicas pelas aglutininas de gérmen de trigo(WGA) (AUB *et al.*, 1963; BURGER, 1969), Concanavalina A(Con A) (INBAR & SACHS, 1969) e aglutinina de soja(SBA) (SELA *et al.*, 1970);

3) utilização de Con A, imobilizada em agarose, para isolamento de polissacarídeos e glicoproteínas (LOYD & BITOON, 1971);

4) utilização de Con A fluoresceïnada para identificação de componentes glicosilados específicos em tecidos (STEINEMANN & STRYER, 1973);

5) indução de mitogenicidade de linfócitos pela fitohemaglutinina (PHA) de *Phaseolus vulgaris* (NOWELL, 1960);

6) auxílio no diagnóstico clínico de imunodeficiências (LICHNER *et al.*, 1967) e de doenças genéticas por defeitos cromossômicos (HUNGERFORD *et al.* 1959; MOORHEAD *et al.*, 1960).

(b) - Tipagem e glicotipagem sangüínea

As lectinas vegetais, desde sua descoberta, foram utilizadas como ferramentas para o estudo da estrutura e função de glicoconjugados ligantes localizados nas superfícies celulares. Através de métodos bioquímicos ou microscópicos, foram examinadas as respostas celulares a tais ligações. A partir das observações pioneiras sobre aglutinação seletiva de hemácias por extratos vegetais, identificaram-se lectinas úteis em tipagem sangüínea. O ensaio de mais 2 milhares de extratos de diferentes sementes (ALLEN & BRILLIANTINE, 1969) permitiu identificar centenas de hemaglutininas; dentre

essas 20 aglutinavam hemácias humanas, com especificidade para um dos grupos sangüíneos (PEREIRA & KABAT, 1979). A aglutinação diferencial de hemácias, baseada em tipo sangüíneo, foi indicativa da ligação da lectina a grupos químicos diferentes na superfície celular. A participação de carboidratos como constituinte desses grupos ficou clara quando se observou que a hemaglutinação provocada por uma lectina era especificamente inibida por monossacarídeo.

Aglutinação por lectina específica para o grupo A foi inibida por N-acetil-D-galactosamina, enquanto a específica para o grupo O foi inibida por α -metil-fucose. Esses estudos de determinação da especificidade de ligação a sacarídeos se ampliaram para a maioria das preparações de lectinas (BROWN & HUNT, 1978).

Lectinas de plantas podem ser úteis para a fenotipagem (ou glicotipagem) de células animais. Como anteriormente referido, a primeira utilização de lectinas de plantas, nesse sentido, é conseqüente à identificação de eritrócitos de diferentes tipos sangüíneos, por sua capacidade de discriminar determinantes oligossacarídeos de grupo ABO. Outros estudos referentes a glicotipos de células foram feitos. Em alguns casos, a manifestação do reconhecimento celular pela lectina era a simples visualização da aglutinação, inibida ou não por sacarídeos. Por exemplo, L4-PHA não aglutina eritrócitos humanos, embora aglutine fortemente linfócitos (CUMMINGS, 1997). Numa segunda abordagem, mais quantitativa, um derivado biotilado da lectina é incubado com células, seguindo-se contato com um conjugado estreptoavidina-fluoresceína. A marcação fluorescente da célula é examinada por citometria de fluxo (CHO *et al.*, 1996). A especificidade de ligação pode ser determinada pela inibição da marcação pelo açúcar específico (FIGURA 8).

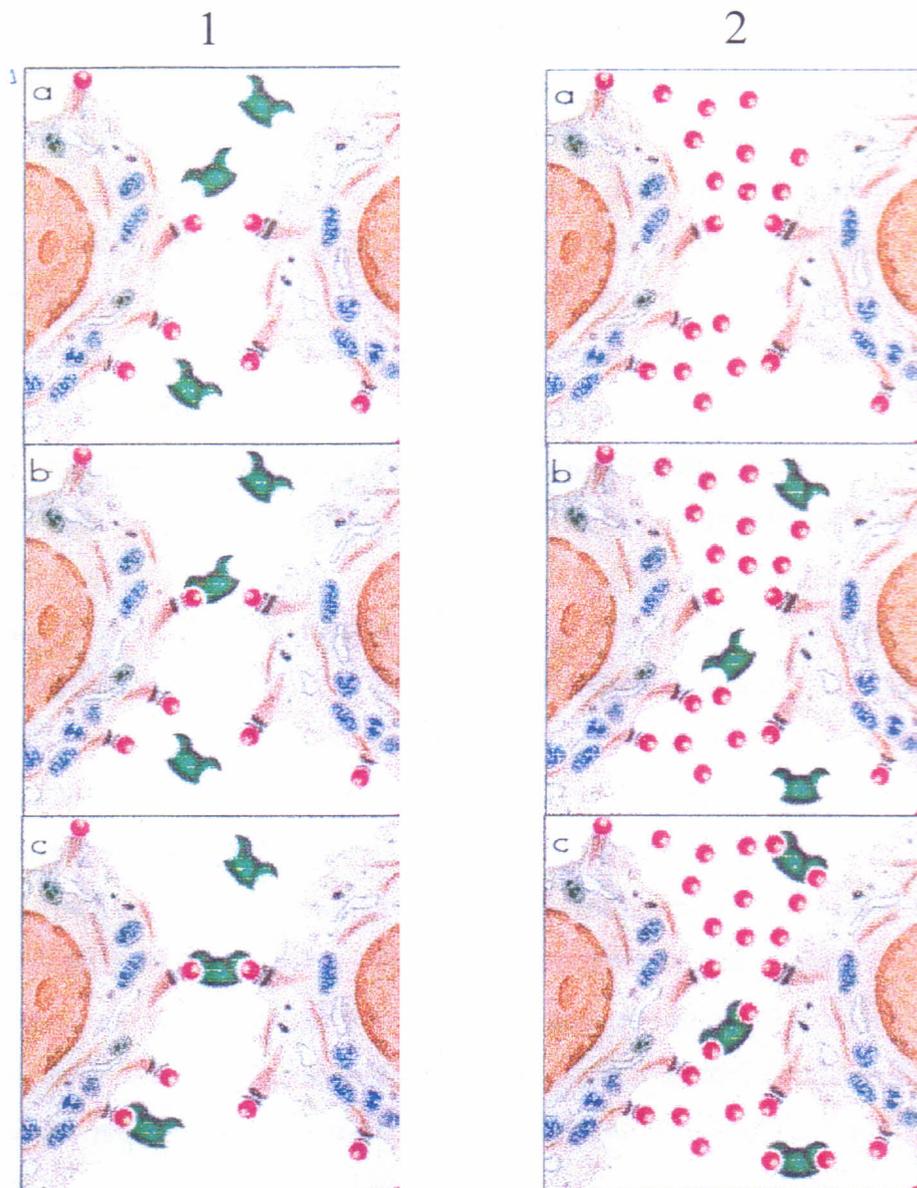


Figura 8 - (1) Mecanismo de aglutinação celular realizado pelas lectinas
 a) Sistema contendo lectinas e células livres
 b) e c) etapas de ligação das lectinas aos carboidratos de membrana

(2) Mecanismo de inibição da aglutinação celular realizada pelas lectinas
 a) Sistema contendo solução de carboidratos e células livres
 b) Adição de lectinas livres
 c) Lectinas ligam-se aos carboidratos livres num processo competitivo, sem promover aglutinação celular.

(c) - Estimulação mitogênica de linfócitos

Um dos mais importantes efeitos da interação de lectinas com células tem relação com a capacidade dessas proteínas de estimular resposta mitogênica em linfócitos. A atividade estimulatória das lectinas está vinculada à ligação com glicoproteínas da superfície celular dos linfócitos, assim, lectinas com capacidade de reconhecimento por diversos açúcares pode diferir na estimulação de linfócitos. Essa propriedade foi descoberta por NOWELL (1960) ao observar que a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) era capaz de induzir a proliferação de linfócitos, e que tal efeito era observado num grande número de clones de células com especificidade antigênica distintas.

Várias lectinas com atividade mitogênica foram identificadas, tais como a Con A, a lectina de lentilha, a lectina de *Lens culinares*, *Phaseolus lunatus*, *Phytolacca americana*, *Ulex europeus*, *Vicia faba* (BROWN & HUNT, 1978).

Os efeitos mitogênicos de lectinas refletem a sua capacidade de ligação específica a receptores relevantes para a ativação fisiológica da célula. Há indicações de que algumas lectinas mitogênicas para linfócitos T, como PHA e Con A, ligam-se a cadeias C α e C β do receptor de antígeno da célula T (TCR). Ligação adicional à molécula CD3 ocorre para que Con A ative a célula T (LICASTRO *et al.*, 1993). Um outro mecanismo de ação de lectinas mitogênicas proposto é dependente da sua capacidade de estabelecer pontes (reticulação) entre receptores adequados da superfície do linfócito, associando moléculas envolvidas no processo de ativação celular, como TCR e CD2, CD3, CD43 ou CD45 (KILPATRICK, 1991).

A mitogenicidade de lectinas tem sido determinada através de ensaios, onde suspensões de células são incubadas com diferentes concentrações de lectinas, sendo determinado o aumento da incorporação de timidina triciada no DNA após um tempo de 48 a 72 horas. Muitas lectinas têm sido descritas como mitogênicas. WAXDAL (1974) descreve o isolamento de proteínas de raízes de *Phytolacca americana* que possui atividades mitogênica e aglutinante. BARRAL-NETTO *et al.*, 1992, descreve a indução da proliferação de linfócitos e a produção de interferon gama por oito lectinas pertencentes à família das leguminosas, sub-tribo *Diocleinae*.

(d) - Inibição do crescimento de células tumorais

Modificações da estrutura de glicoproteínas de membrana durante a divisão celular têm sido associadas com malignidade. As variações na topografia da superfície celular podem estar relacionadas a um estágio preciso da doença, e as lectinas podem ser ferramentas úteis no diagnóstico e prognóstico da doença (DALL'OLIO, 1996). A lectina de *Ricinus communis* e outras lectinas citotóxicas de plantas vêm sendo usadas com sucesso na terapia do câncer (LORD, 1987; BROWN & WHITE, 1997). O emprego dessas lectinas no tratamento de pacientes leucêmicos, dentre os quais, vítimas do acidente de Chernobyl, tem sido demonstrado (SHARON & LIS, 1987).

A propriedade de inibição da síntese protéica manifestada pela ricina, e outras lectinas tóxicas tem sido usada na construção de imunotoxinas, aplicáveis na terapia do câncer, doença do enxerto *versus* hospedeiro, doenças autoimunes e AIDS. Para tanto, as cadeias A e B da ricina são dissociadas e rigorosamente purificadas. A cadeia tóxica A, capaz de inibir a síntese protéica por inativar o RNA 28S, através de atividade N-glicosidase, é acoplada a um ligante celular específico.

No caso da construção de uma imunotoxina dirigida para linfócitos B e T, aplicável à terapêutica de linfomas, a toxina é mais freqüentemente acoplada a um ligante do receptor de IL-2 (BRINKMAN & PASTAN, 1994). As toxinas vegetais mais freqüentemente utilizadas na construção de imunotoxinas são as de cadeia única, como a proteína anti-viral de pokeweed (PAP), em detrimento das toxinas de duas cadeias, como ricina e abrina, tornando desnecessário o rigoroso processo de purificação para eliminar a cadeia B (THRUSH *et al.*, 1996).

As lectinas têm sido também utilizadas para caracterizar os glicoconjugados contidos em uma variedade de tumores. Como a maioria desses estudos não foi correlacionada com dados clínicos, sua utilização é limitada. Entretanto, dois grupos determinaram uma correlação entre dados clínicos e histoquímicos com lectina: KAKEJI *et al.*, (1991), que encontraram associação entre a lectina de *Roman snail* (HPA)-ligante usando-a no prognóstico de câncer gástrico, e MATSUMOTO *et al.*, (1992), que

encontraram associação entre a aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA)-ligante usando-a para o prognóstico do câncer de pulmão.

O câncer de mama é um importante problema clínico, e o leite, produto secretado de mama lactante normal, é uma rica fonte de uma grande variedade de sacarídeos. Em consequência disso, lectinas são bons marcadores para o estudo de mudanças na expressão de carboidratos durante o desenvolvimento do câncer de mama (SCHUMACHER, 1995). Os primeiros estudos de câncer de mama empregando lectinas pelo emprego de técnicas histoquímicas remetem-se ao trabalho de KLEIN *et al.* (1981). Esses estudos indicaram que a expressão de sítios ligantes para a aglutinina do amendoim (PNA) nas células cancerígenas estava correlacionada com o receptor do hormônio esteróide da mama e, portanto, esse método poderia ser usado, ao invés da estimação do receptor esteróide (KLEIN *et al.*, 1981). Esta lectina é também utilizada na histoquímica do câncer de cólon, segundo uma técnica de extração para medir a quantidade de sítios ligantes, em (WGA) e PNA nas colônias de células de cólon, normal e cancerosa (BOLAND & ROBERTS, 1988). LOREA *et al.*, (1997), investigando o efeito *in vitro* das lectinas (PNA), (WGA), (Con A), (GSA-IA4) e (PHA-L), na proliferação de linhagem de células do melanoma (SK-MEL-28, HT-144 e C32), observaram que, das lectinas testadas, quatro obtiveram um significativo efeito tóxico do tipo dose-dependente na proliferação celular do melanoma. A PNA teve um efeito estimulatório na linhagem de células C32, bastando, para tal efeito, baixas doses para produzir um aumento na proliferação celular. A cinética celular mostrou que a inibição do crescimento era devido à morte celular.

O uso de agentes quimioterápicos é umas das poucas alternativas no tratamento do câncer, e o problema principal no uso de tais agentes é o efeito tóxico colateral dessas drogas sob as células normais de um organismo. Um método apropriado para solucionar tal problema é o emprego dos inibidores de crescimento do tumor de origem natural. Nos últimos anos a utilização de extratos naturais ou componentes purificados tem se tornado um meio bem estabelecido para o estudo de várias características do câncer. Em pesquisas recentes utilizando-se substâncias naturais, pode-se observar o interessante aumento na atividade biológica de lectinas de plantas no seu efeito antitumoral (ABDULLAEV & deMEJIA, 1997).

(e) - Apoptose

A morte programada de diferentes tipos de células (apoptose) tem sido produzida por diversas lectinas de origem vegetal. A lectina de *Griffonia simplicifolia* é internalizada por células tumorais de murina, desencadeando a apoptose (KIM *et al.*, 1993).

Produzindo efeito semelhante, a Con A demonstra sua toxicidade sobre células normais e transformadas (KULKARNI & MCCULLOCH, 1995). Recentemente, pulchelina 1, de sementes de *Abrus pulchellus*, foi identificada como citotóxica e indutora de apoptose de células peritoneais murinas (MOTA, 1997).

Três lectinas da subtribo *Diocleinae* (*C.brasiliensis*, *D.grandiflora* e *D.violacea*), já referidas como estimuladoras da proliferação de células dos linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c, mostraram-se capazes também de induzir apoptose celular. Focos mais abundantes foram, detectados nos linfonodos estimulados, com a lectina de *D.violacea* (COSTA-BARBOSA, 1997).

A identificação de que apoptose de macrófagos alveolares participa de uma parte significativa no mecanismo de toxicidade, seguido da exposição a ricina, conduziu BROWN & WHITE (1997) ao desenvolvimento de uma estratégia terapêutica contra o envenenamento por ricina.

(f) - Mudanças na glicosilação em câncer

Alterações na glicosilação é um modelo universal em células cancerosas, e, certamente estruturas tipo glicanas são marcadores bem conhecidos na progressão de tumores.

Como as células normais durante a embriogênese, células tumorais sofrem ativação e rápido crescimento, aderem a uma variedade de outros tipos de células e invadem tecidos. O desenvolvimento embrionário e a ativação celular em vertebrados são tipicamente acompanhados por mudanças no perfil de glicosilação celular. Assim, não é surpresa que mudanças na glicosilação

sejam também um modelo universal nas transformações malignas e progressão de tumores (VARKI, *et al.*, 1999).

As últimas evidências destas observações podem ser verificadas no aumento das ligações das lectinas de plantas (Con A e WGA) nos tumores de células animais. Além disso, foi encontrado que transformações celulares são freqüentemente acompanhadas por um aumento geral no tamanho dos glicopeptídeos do metabolismo. Com o advento da tecnologia de anticorpos monoclonais no final da década de 1970, pesquisadores, visando à construção de uma molécula dirigida contra as células de câncer "magic bullet", encontraram que muitos dos anticorpos "tumor-específicos" reconheciam os epítomos carboidratos, especialmente os de glicoesfingolípídios. Outros estudos mostraram que esses epítomos eram "antígenos-onco-fetais", isto é, eram também expressos em tecidos embrionários, células tumorais e alguns tipos de células de adultos normais. Correlações significativas entre certos tipos de glicosilação alterada e o atual prognóstico de tumores referidos de animais ou de humanos aumentam o interesse nestas mudanças. Em alguns casos, ensaios celulares *in vitro* têm, além disso, fortalecido a noção de que essas mudanças podem, na verdade, ser críticas no aspecto do comportamento das células tumorais. Entretanto, em muitas situações, provas definitivas do mecanismo pelo quais essas mudanças de glicosilação alteram o comportamento do tumor ainda são necessárias.

As mudanças que ocorrem nas células malignas podem tomar uma variedade de formas. Exemplos têm sido encontrados, tanto para a perda como para a excessiva expressão de certas estruturas, a persistência de estruturas incompletas ou truncadas, o acúmulo de precursores e, menos comumente, a perda da aparência de novas estruturas. Mudanças prematuras em pontos de ramificação em caminhos de biossíntese podem marcadamente afetar a relativa quantidade de uma classe de estrutura, enquanto causa dominância de outra. Entretanto, isto não é simplesmente conseqüência de desordem biológica ao acaso nas células tumorais. Como a maioria das informações têm se tornado disponíveis, está evidente que somente um limitado subgrupo de caminhos biossintéticos está freqüentemente correlacionado com transformações malignas e progressão do tumor (VARKI, *et al.*, 1999).

1.2.3 Lectinas de sementes da subtribo *Diocleinae*

A família *Leguminosae* possui o maior número de lectinas isoladas. Um grande número já foi purificado a partir de espécies distribuídas em diferentes subfamílias, tribos e subtribos desta família (SHARON & LIS, 1990). Somente de plantas do gênero *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* (todas da subtribo *Diocleinae*) mais de 15 lectinas foram isoladas nos últimos anos, sendo muitas delas, nativas do Brasil. A disponibilidade de sementes, o alto teor de lectinas e a facilidade de obtenção destas proteínas com alto grau de pureza têm permitido a investigação de várias propriedades biológicas das mesmas.

Todas as lectinas isoladas desta subtribo possuem especificidade por resíduos de glucose, manose e derivados.

Os principais grupos de especificidades encontrados entre as lectinas de *Leguminosae* são os seguintes: **manose, glucose e seus α -glicosídeos** – neste grupo, todas as lectinas ligam igualmente, tanto manose como glucose; **galactose e N-acetilgalactosamina** – as lectinas incluídas neste grupo são específicas para ambos os açúcares, entretanto, em alguns casos, a ligação de um deles à lectina pode ser feita mais fortemente; **N-acetilglicosamina** – geralmente a ligação mais forte se faz através de suas formas oligoméricas do tipo β -1,4; **α -L-fucose**; e **oligossacarídeos complexos** (RÜDIGER, 1997).

A Con A é a lectina mais estudada até hoje e a primeira isolada por cromatografia de afinidade, usando um gel de povidextrana (Sephadex). Da mesma forma que a Con A, todas as outras lectinas desta subtribo, já estudadas, foram isoladas por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex. Essas proteínas, à semelhança da Con A, são tetrâmeros compostos por uma mistura de subunidades intactas, formadas por uma única cadeia polipeptídica com 237 resíduos de aminoácidos e subunidades fragmentadas, nas quais a mesma cadeia polipeptídica está subdividida em dois fragmentos, por não ter havido a formação de uma ligação peptídica entre os resíduos 118 – 119 (CHRISPEELS *et al.*, 1986). Apesar de não estarem ligados covalentemente, os dois fragmentos, denominados β e γ , são mantidos juntos por ligações não covalentes e formam um protômero, cuja estrutura tridimensional é essencialmente a mesma unidade da subunidade formada pela

cadeia polipeptídica íntegra, sem descontinuidade na sua estrutura primária (BECKER *et al.*, 1975; SHARON & LIS, 1989).

Os fragmentos β e γ são característicos das lectinas de leguminosas da subtribo *Diocleinae*, como *Dioclea grandiflora* (MOREIRA *et al.*, 1983), *Canavalia brasiliensis* (MOREIRA & CAVADA, 1984), *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al.*, 1991), *Dioclea virgata* (CAVADA *et al.*, 1996), *Dioclea violacea* (MOREIRA *et al.*, 1996), e *Canavalia maritima* (PEREZ *et al.*, 1991). A elucidação da seqüência de aminoácidos da subunidade intacta da lectina de *Dioclea grandiflora* (RICHARDSON *et al.*, 1984), como também dos seus fragmentos (AINOUZ *et al.*, 1987), revelou que tais fragmentos são oriundos da subunidade intacta, sugerindo um mecanismo de biossíntese semelhante ao da Con A.

O sítio de ligação a carboidratos da Con A, um por cada subunidade, está localizado em uma depressão na superfície da proteína e distante 10 a 14 Å do íon Mn^{+2} (ALTER & MAGNUSON, 1974; HARDMAN & AINSWORTH, 1976). A presença de sítios para ligantes hidrofóbicos tem sido investigada com mais freqüência em lectinas de leguminosas. Estes sítios podem ocorrer dentro de uma única subunidade ou se estabelecerem no centro do tetrâmero. Apesar de exibirem a mesma especificidade por resíduos de glucose, manose e seus derivados e de serem estruturalmente muito semelhantes, as propriedades biológicas induzidas por estas lectinas apresentam uma grande variabilidade e, atualmente, pelo menos do ponto de vista da afinidade, com relação ao mesmo ligante glicídico, estas proteínas têm mostrado diferenças significativas (RAMOS, 1996) (FIGURA 9).

As lectinas de sementes da subtribo *Diocleinae* têm mostrado uma grande variabilidade de ação sobre vários sistemas biológicos e, por isso, é cada vez maior a potencialidade destas proteínas como ferramentas no estudo de fenômenos biológicos. Assim, tem sido mostrado que estas lectinas são mitogênicas (BARRAL-NETO *et al.*, 1992), induzem a produção de interferon (BARRAL-NETO *et al.*, 1992), provocam a formação de edemas de patas em animais de laboratório (BENTO *et al.*, 1993), induzem a liberação de histamina (GOMES *et al.*, 1994), ativam macrófagos (RODRIGUES *et al.*, 1992), desencadeiam o fenômeno de apoptose (BARRAL-NETO *et al.*, 1998) e

conferem proteção parcial, in vivo, em animais infectados com *Leishmania amazonensis* (BARRAL-NETO *et al.*, 1996).

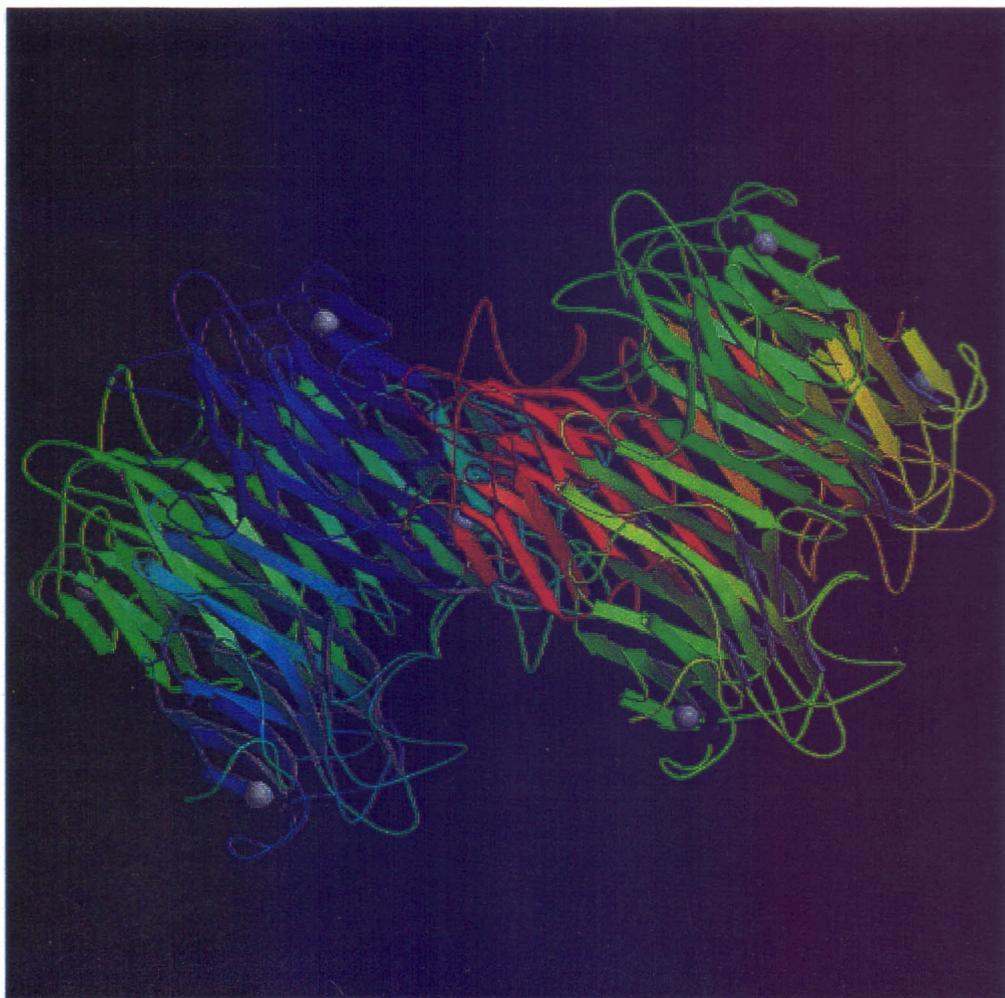


FIGURA 9 – A forma cristalizada da lectina de sementes *Canavalia ensiformis* (Con A) por difração de raio X (lectina da subtribo *Diocleinae*), por Kanellopoulos *et al.*, (1997)

2. HIPÓTESE DE TRABALHO

2 . HIPÓTESE DE TRABALHO

Diante da capacidade de lectinas vegetais de interagirem com membranas celulares, através de seus terminais glicídicos, estas podem reconhecer grupos específicos de carboidratos presentes em células transformadas. Assim, lectinas dos gêneros *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* podem ser utilizadas como marcadores histoquímicos.

2 .1 Estratégia experimental

- Purificar as lectinas presentes em sementes de representantes dos gêneros *Canavalia* (*C. brasiliensis*, *C. ensiformis*, *C. maritima*), *Cratylia* (*C. floribunda*) e *Dioclea* (*D. altissima*, *D. violacea* e *D. virgata*), em escala preparativa.

- Verificar o grau de pureza das lectinas, isoladas através de estudos de eletroforese em gel de poliacrilamida e imunoreatividade em gel de ágar.

- Avaliar a capacidade de ligação à dextrana, das lectinas estudadas - *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Dioclea altissima* - em diferentes condições de pH.

- Avaliar a capacidade das lectinas isoladas, quanto à sua possível utilização como marcadores histoquímicos, nas superfícies dos tecidos do sistema nervoso central, colo de útero e mama, tanto normais quanto transformados.

- Comparar a ligação das lectinas das espécies *Dioclea altissima*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda* às superfícies dos tecidos normais e transformados do sistema nervoso central, colo de útero e mama nos valores de pH 4,0 ; 5,0 e 7,2, visando seu uso como marcadores histoquímicos.

3. MATERIAIS

3. MATERIAIS

3.1 Material vegetal

Neste trabalho foram utilizadas farinhas e lectinas de sementes de espécies vegetais identificadas no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará, pertencentes aos gêneros *Canavalia* (*C. brasiliensis*, *C. ensiformis* e *C. maritima*), *Cratylia* (*C. floribunda*) e *Dioclea* (*D. altissima*, *D. violacea* e *D. virgata*).

3.2 Tecidos

Os tecidos do sistema nervoso central, colo de útero e mama transformados, foram obtidos no Departamento de Patologia do Hospital do Câncer de Pernambuco. Os tecidos normais do sistema nervoso central, colo de útero e mama foram obtidos no Serviço de Verificação de Óbito da UFPE.

3.3 Carboidratos

D-glucose, D-manose e metil- α -manosídeo foram obtidos da SIGMA CHEMICAL Co.

3.4 Outros materiais

3.4.1 Corantes

Os corantes utilizados foram: Hematoxilina (MERCK), Eosina (Cica), Ponceau (NAKARAI CHEMICALS LTD), Fucsina Ácida (CARLO ERBA), Escarlata de Biebrich (SIGMA) e Azul de anilina (Kodak-Cica).

3.4.2 Reagentes

Os reagentes utilizados nos diferentes protocolos desenvolvidos foram: metanol (MERCK), tripsina (SIGMA), 3,3' diaminobenzidina (DAB) tetrahydroclorídrica (SIGMA), albumina sérica bovina (SIGMA). As resinas Sephadex G-50 foram obtidas da PHARMACIA, Upsala - Suécia. Os demais reagentes foram de grau analítico.

4.MÉTODOS

4 . MÉTODOS

4.1 Obtenção da farinha

A farinha das sementes, livres dos tegumentos, oriundas de um mesmo lote, foram trituradas em moinho de lâminas e manualmente (em almofariz) até obter-se farinhas finas.

As farinhas obtidas foram estocadas em frascos hermeticamente fechados e mantidos em temperatura ambiente, até uso posterior.

4.2 Obtenção do extrato total das farinhas de sementes

As farinhas das sementes estudadas foram submetidas à extrações, com solução de NaCl 0,15 M, na proporção de 1:10 (m/v) e deixada em agitação constante, durante 3 h em temperatura ambiente. As suspensões obtidas foram centrifugadas a 15000 x g por 30 min a 4°C, obtendo-se resíduos que foram reextraídos e posteriormente descartados, e os sobrenadantes reunidos foram denominados de extrato total.

4.3 Obtenção de fração das proteínas por precipitação salina

Aos extratos obtidos no item anterior foi adicionado sulfato de amônio, de modo a atingir 70% de saturação, e as suspensões foram deixadas em repouso por 24 h. Os precipitados, obtidos após centrifugação, foram redissolvidos em NaCl 0,15 M e dialisados exaustivamente contra NaCl 0,15 M, até eliminação do sulfato de amônio. As frações obtidas (F0/70), foram centrifugadas a 15000 x g para eliminar material insolúvel, e estocadas para uso posterior (FIGURA 10).

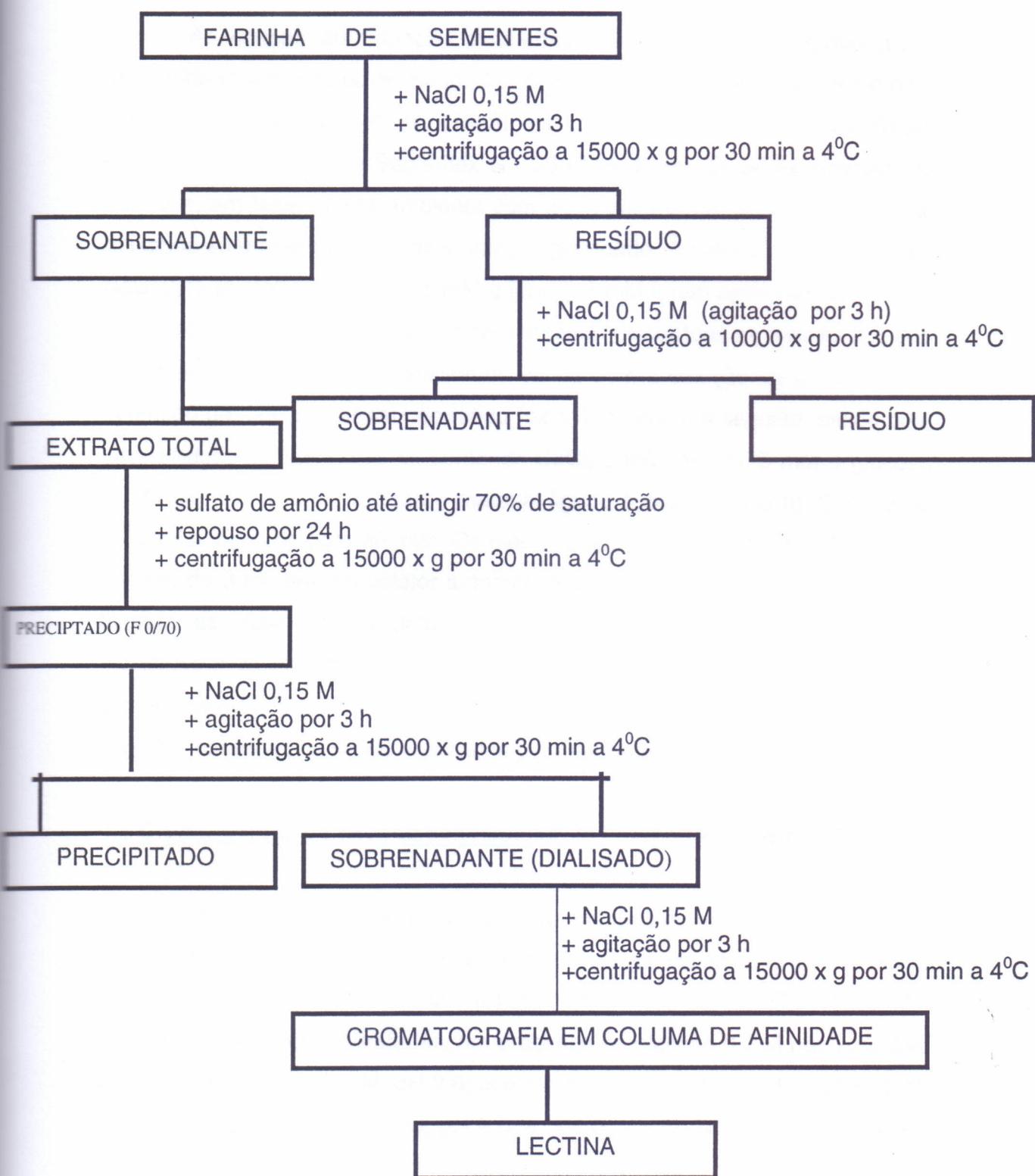


FIGURA 10 - Esquema utilizado para isolamento das lectinas das farinhas de sementes dos gêneros : *Dioclea*, *Canavalia* e *Cratylia*

4.4 Cromatografia de afinidade em coluna Sephadex G-50

As lectinas das espécies estudadas foram isoladas por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50, de acordo com o procedimento descrito por MOREIRA et. al., (1983). As cromatografias de afinidade foram realizadas em coluna de Sephadex G - 50 (40 x 1 cm). O gel foi intumescido por 12 h, em temperatura ambiente com água deionizada; a coluna montada, deixando-se o referido gel sedimentar por gravidade. À coluna equilibrada com NaCl 0,15 M, contendo CaCl_2 5 mM e MnCl_2 5 mM foram aplicadas as frações 0/70, obtidas conforme descrito no item anterior, dissolvidas na mesma solução de equilíbrio. A coluna foi inicialmente eluída com a solução de equilíbrio até obtenção de todo o material não retido (pico I), sendo, em seguida, eluída com uma solução de NaCl 0,15 M, contendo CaCl_2 5 mM, MnCl_2 5 mM e glucose 0,1 M, para a retirada de todo o material ligado à coluna (pico II). O fluxo da coluna foi regulado para 30 ml/h. Os eluentes das colunas foram recolhidos em frações de 3 ml, em um coletor automático de frações da LKB - Pharmacia e tiveram as absorvâncias determinadas a 280 nm, em espectrofotômetro Novaspec II da Pharmacia. Para cada espécie estudada, as frações contendo lectina (pico II) foram reunidas, dialisadas contra ácido acético 0,2 M e, em seguida, contra água, sendo liofilizadas para utilização posterior.

4.5 Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose 12- HR

As lectinas isoladas foram analisadas quanto à estrutura quaternária, em solução por filtração em gel, em sistema FPLC da Pharmacia, utilizando-se Superose 12 HR como matriz cromatográfica (MUNIZ-FILHO, 1997). As amostras foram cromatografadas, em presença de glucose 0,2 M nas soluções tampões: glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6; acetato de sódio 0,1 M, pH 4,0; acetato de sódio, pH 6,0 e Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, todos contendo NaCl 0,15 M, CaCl_2 5 mM, MnCl_2 5 mM.

As lectinas foram inicialmente diluídas com os diferentes tampões de corrida, concentradas em membrana semi-permeável (centricon) e, a seguir, aplicadas à coluna de Superose 12 HR.

4.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE - SDS)

A eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS e β -mercaptoetanol foi feita segundo a técnica descrita por LAEMMLI (1970), adaptada para o uso de placas. Foram utilizados um gel de aplicação e um gel de separação, contendo 3,5% de acrilamida em tampão tris HCl 0,5 M pH 6,8 e 12% de acrilamida em tampão tris-HCl 3 M, pH 8,8, respectivamente, ambos com SDS a 1%.

As amostras das lectinas liofilizadas (2 mg/ml), obtidas em cromatografia de afinidade em Sephadex G-50, a serem submetidas a eletroforese, foram dissolvidas em tampão tris-HCl 0,0625 M, pH 8,3, contendo SDS a 1% e β -mercaptoetanol 1% e tratadas a 100°C por 10 min. Após centrifugação a 15000 x g por 20 min em centrífuga tipo Eppendorf, o precipitado foi desprezado e, ao sobrenadante, adicionados azul de bromofenol a 0,02% e cristais de sacarose a 10%.

Após aplicação das amostras no gel, a corrida eletroforética foi realizada durante aproximadamente 4 h com amperagem constante (25 mA) e as bandas protéicas reveladas com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,05% em metanol, ácido acético e água (1,0: 3,5: 8,0, v/v/v), o descoloramento foi efetuado, com uma solução de metanol, ácido acético e água (1,0: 3,5: 8,0, v/v/v).

4.7 Atividade hemaglutinante

Na determinação da atividade hemaglutinante foi utilizado o método de MOREIRA & PERRONE (1977), segundo o qual hemácias a 2% (v/v) são adicionadas a diluições seriadas da amostra. O ensaio foi feito em placas de microtitulação, onde foram adicionados em cada poço 50 μ l de NaCl 0,15 M contendo CaCl_2 5 mM e MnCl_2 5 mM. No primeiro poço de cada fileira foi acrescentado 50 μ l da amostra, e diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8...) foram feitas, homogeneizando-se antes de cada transferência. Em seguida, foram adicionados em todos os poços 50 μ l de uma suspensão de eritrócitos a 2%. As placas foram incubadas a 37°C por 30 min e, posteriormente, deixadas em

repouso por mais 30 min em temperatura ambiente. A visualização dos aglutinados foi feita a olho nu e os resultados foram expressos como atividade específica (UH/mgP), onde uma UH representa o inverso da maior diluição ainda capaz de aglutinar eritrócitos.

4.8 Imunodifusão

A fim de comparar simultaneamente vários sistemas antigênicos contra um mesmo anticorpo, podendo incidir em padrões diferenciados de identidade, foi utilizado o método de imunodifusão dupla de Ouchterlony descrito por CLAUSEN (1969).

Foi feita uma preparação estoque de agarose a 2% em água destilada (contendo 0,04% p/v de azida sódica), diluído duas vezes em NaCl 0,3 M contendo glicose 0,2 M e montada em lâminas de microscópio sobre uma superfície nivelada. Após solidificação, foi feito um orifício central e outros radiais eqüidistantes, com o auxílio de um furador de 2,5 mm.

Aos orifícios centrais foram aplicadas amostras de IgG contra extrato total de *Canavalia brasiliensis* e de *Dioclea altissima* (20 µg) e nos orifícios radiais, as soluções de lectinas (20 µg), dissolvidas em NaCl 0,15 M.

Depois da incubação em câmara úmida por 48 h e conseqüente formação dos arcos de precipitação, as lâminas foram lavadas em NaCl 0,15 M (contendo azida sódica 0,02%) por 48 h, com diversas trocas, para a retirada das proteínas que não reagiram.

Subseqüentemente, a solução salina foi eliminada pela imersão das lâminas em água destilada, sendo trocada várias vezes por um período de 24 h. O gel foi seco em estufa a 37°C e fotografado contra um fundo escuro.

4.9 Preparação dos tecidos

Os tecidos humanos utilizados para a avaliação das lectinas - sistema nervoso central, colo uterino e mama - foram processados em histotécnico automático (Sakura, Japão), incluído em emblocador Tissue-Tec (Miles Scientific, E.U.A.) e cortes de 4 µm foram obtidos em micrótomo horizontal

(Yamato Kohki, Japão), e analisados em microscópio ótico Olympus BH-2 (Olympus Optical Co. Ltd. Japão).

Todo o processamento técnico e o exame histológico foram feitos no Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE.

No tecido do sistema nervoso central se utilizou um total de 28 casos: 6 (seis) de tecidos normais, 6 (seis) de carcinoma metastático, 4 (quatro) de astrocitoma fibrilar, 8 (oito) de glioblastoma multiforme e 4 (quatro casos de meningioma).

Para os tecidos uterinos se utilizou 3 (três) casos de tecido de colo de útero normal, 13 (treze) casos de carcinoma *in situ* e 7 (sete) de carcinoma epidermóide.

O número total de casos em tecido mamário ficou assim distribuído: 2 (dois) de tecido normal, 17 (dezesete) de carcinoma ductal infiltrante, e 15 (quinze) de fibroadenoma.

A localização e a intensidade de marcação do tecido normal e de cada lesão estudada foram avaliadas individualmente. A intensidade da marcação dos tecidos pelas lectinas foi estimada de forma qualitativa, sendo adotados três níveis de intensidade quanto à marcação (TABELA 1). Este padrão foi determinado por observação ao microscópio ótico.

TABELA 1 – Padrão utilizado para estimar a intensidade de marcação das lectinas

MARCAÇÃO	SIMBOLO
Fraca	+
Moderada	++
Intensa	+++

4.10 Tratamento dos tecidos e ligação das lectinas (método direto)

No tratamento dos tecidos humanos do sistema nervoso central normal e transformados foram utilizados diferentes valores de pH nas seguintes soluções tampões: acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 e fosfato de sódio (PBS) – 10 mM, pH 7,2. No tratamento dos tecidos humanos de colo uterino e mama normais e transformados utilizou-se tampão fosfato de sódio (PBS) 10 mM, pH 7,2. As lâminas contendo os cortes de 4 μ m dos tecidos humanos do sistema nervoso central, colo uterino e mama, tanto, normais como transformados, foram desparafinadas em xilol-p.a. (5 min), xilol-p.a. II, III e IV (10 imersões cada) e reidratadas em soluções de álcool etílico absoluto I, II e III (10 imersões cada) e álcool etílico 70% (10 imersões cada). Em seguida, os tecidos foram lavados em água corrente (3 min) e água destilada (10 imersões), permanecendo em tampão fosfato de sódio (PBS) 10 mM, pH 7,2, contendo NaCl 0,15 M por 10 min (2 x 5 min). Os tecidos foram, então, tratados com uma solução de tripsina 0,1% (p/v), por 2 min a 37°C, seguidos por uma solução de metanol 0,3% contendo peróxido de hidrogênio (0,5 ml de H₂O₂ para 100 ml da solução de metanol) por 20 min em temperatura ambiente. As lâminas com os respectivos tecidos foram, em seguida, incubadas com as lectinas em temperatura de 10°C, em ausência de luz, por um período nunca inferior a 12 h. Duas lavagens de 5 min cada, em PBS, foram realizadas depois de cada etapa de tratamento e incubação dos cortes (FIGURA 11B).

4.11 Conjugação das lectinas à peroxidase (método indireto)

As lectinas de *Dioclea altissima*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda*, 3 mg/ml cada, contendo metil- α -manosídeo 20 mM foram dialisadas contra tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,8 e, em seguida, misturadas a 12 mg de peroxidase. À cada mistura de lectina foi adicionado, por agitação branda, 50 μ l de uma solução aquosa de glutaraldeído (50%) a 1% (v/v) gota a gota. A mistura permaneceu em repouso durante 2 h, em temperatura ambiente, antes de ser dialisada, por 20 h, em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 6,8, contendo NaCl 0,15 M a 4°C (FIGURA 11A).

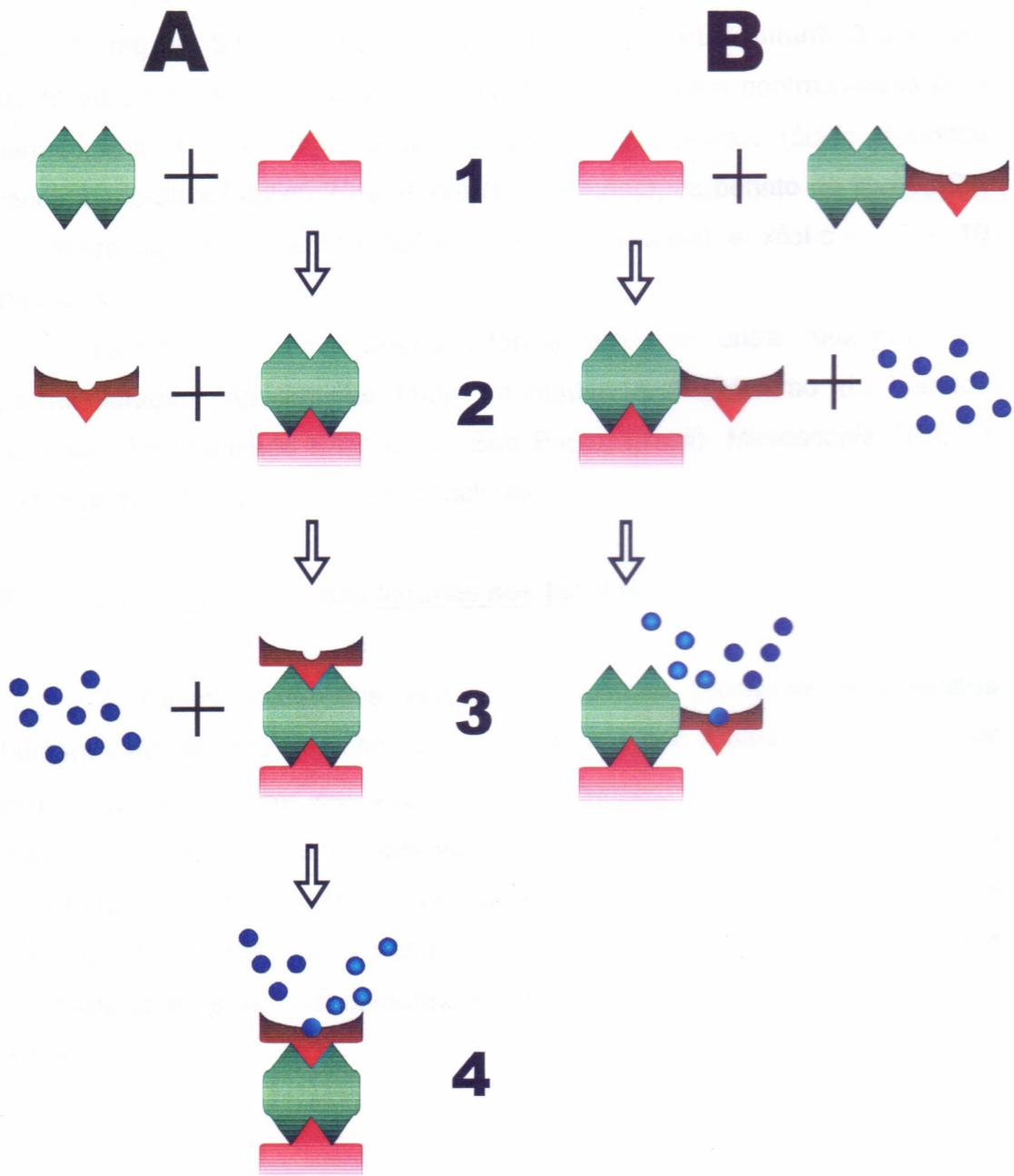


Figura 11: Métodos indireto (A) e direto (B) de marcação de receptores celulares com lectina.

() Lectina; () Receptor celular;

() Peroxidase;

() Complexo Lectina-peroxidase;

() DAB.+ H₂O₂

4.12 Revelação e observação da ligação das lectinas

A reação de revelação da peroxidase foi realizada com uma solução de DAB (10 mg em 50 ml), contendo 10 µl de H₂O₂ em PBS durante 3 a 5 min, sendo interrompida com água destilada. Os cortes foram contracorados com hematoxilina (1 min), seguido de soluções de álcool-ácido (ácido clorídrico concentrado-álcool etílico 70% 1/100) (10 imersões), carbonato de lítio 0,05% (10 imersões), álcool etílico 100% (5 x 10 imersões) e xilol-p.a. (5 x 10 imersões).

Lavagens em água destilada foram realizadas entre cada etapa de contracoloração. As lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá (Química Especializada Erich Ltda., São Paulo, Brasil). Microscopia ótica foi usada para avaliar as ligações das lectinas.

4.13 Inibição da ligação das lectinas aos tecidos

A especificidade das lectinas da subtribo Diocleinae aos tecidos humanos do sistema nervoso central, colo uterino e mama foi avaliada por incubação prévia com os carboidratos D-glucose, D-manose e metil- α -D-manopiranosídeo, nos diferentes valores de pH testados. Esta incubação foi feita tratando-se as lectinas com os açúcares em concentrações variando entre 10 e 30 mM, em PBS, por 2 min em temperatura de 20°C. A mistura foi então incubada com os tecidos, conforme descrito no item 4.10 (AVRAMEAS *et al.*, 1976).

5.RESULTADOS

5 . RESULTADOS

5 .1 Isolamento e purificação das lectinas

MOREIRA *et al.*, (1983), estudando a lectina de *Dioclea grandiflora* (leguminosa da subtribo *Diocleinae*), obtida a partir da farinha de semente íntegra, utilizou cromatografia de afinidade em Sephadex G-50 da F50/70 dissolvida em NaCl 1 M contendo CaCl_2 5 mM e MnCl_2 5mM. Neste método obtia em um terceiro pico (PIII), praticamente toda a atividade lectínica eluida com tampão glicina-HCl 0,1M pH 3,0, contendo CaCl_2 5 mM e MnCl_2 5 mM. Neste trabalho, na tentativa de otimizar e proporcionar um isolamento rápido onde quantidades significativas de lectinas foram obtidas, com grau de pureza bastante satisfatório, a metodologia utilizada no isolamento e purificação das lectinas de leguminosas da subtribo *Diocleinae* estudadas foi a descrita por OLIVEIRA *et al.*, (1991) com algumas modificações. A purificação das lectinas foi realizada através de um único procedimento cromatográfico, utilizando-se a aplicação da F 0/70 em uma coluna montada com gel de Sephadex G-50. O volume de gel de Sephadex G-50 utilizado em cada cromatografia (150 ml) permitiu que em cada procedimento de purificação fossem obtidos 100 mg de lectina pura liofilizada. A FIGURA 12 mostra um perfil cromatográfico típico de sementes de *Diocleinae* onde se pode perceber a obtenção de um pico de lectina eluído com 0,1 M de D-glucose contendo CaCl_2 5 mM e MnCl_2 5 mM em NaCl 0,15 M.

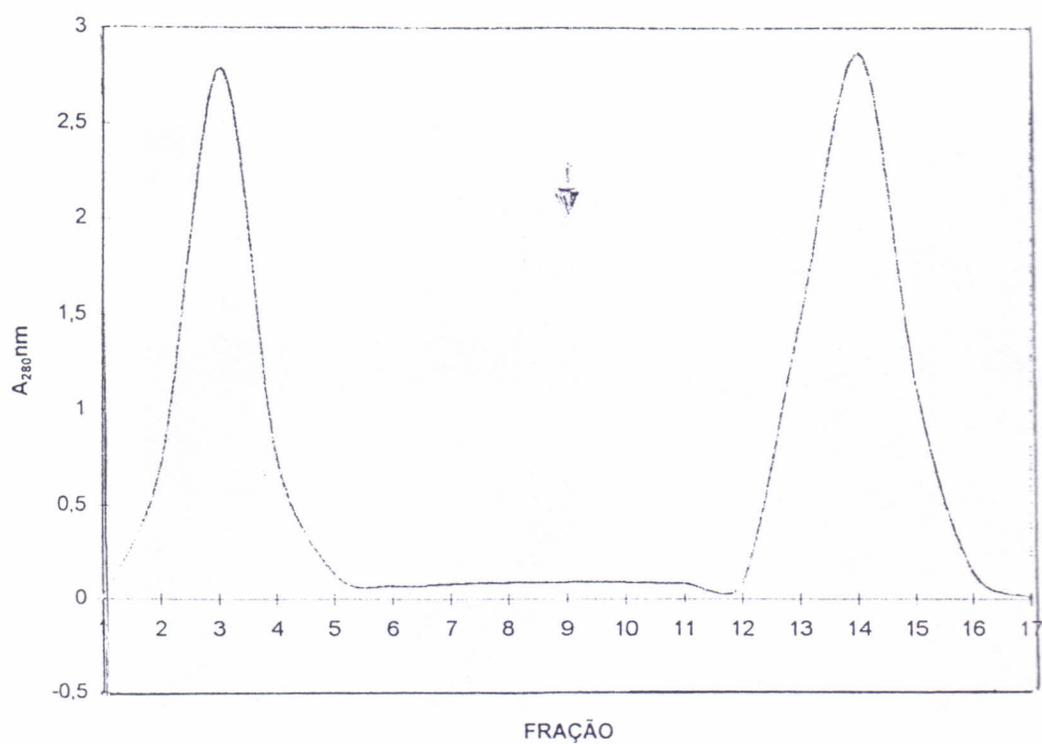


FIGURA 12 – Cromatografia de afinidade da F0/70 de *Canavalia ensiformis* em coluna Sephadex G-50 equilibrada com NaCl 0,15 M contendo CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5 mM e eluída com a solução de equilíbrio, seguida de solução de NaCl 0,15 M contendo CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5 mM e glucose 0,1 M. Fluxo de 30 ml/h, frações de 3,0 ml por tubo e coluna com tamanho 40 x 1 cm.

As lectinas dos gêneros *Dioclea*, *Canavalia* e *Cratylia* também foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS, apresentando três bandas protéicas, em cada uma das espécies. A primeira banda corresponde à subunidade íntegra (α), com Mr em torno de 26,0 kDa e seus fragmentos β e γ com Mr em torno de 14,0 e 9,0 kDa, respectivamente (FIGURA 13).

O material foi então conjugado à peroxidase pelo método direto e indireto segundo os tópicos 4.10 e 4.11.

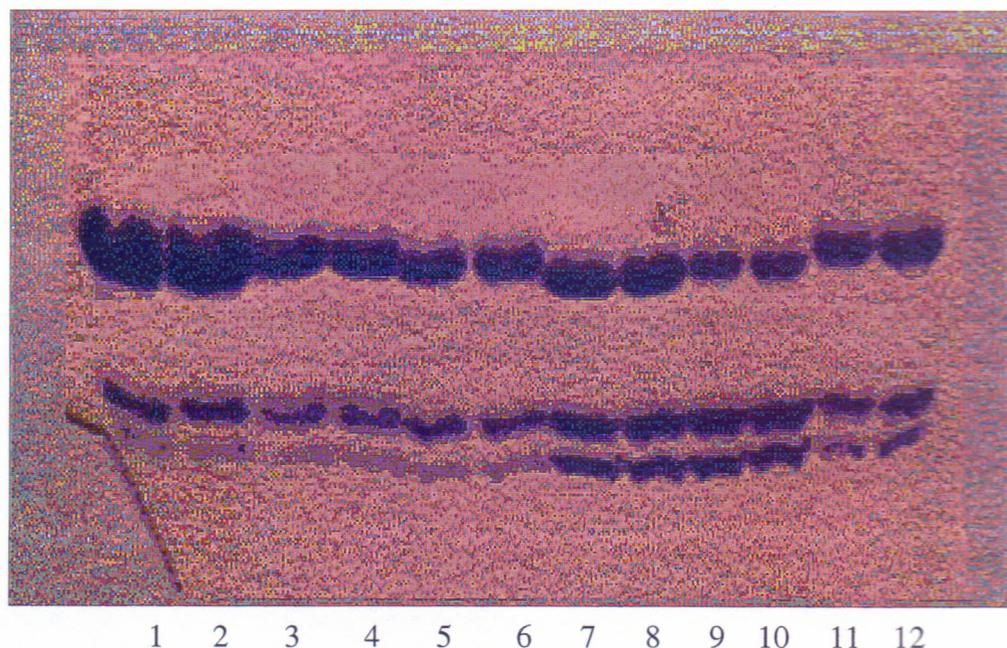


FIGURA 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS das

lectinas da subtribo *Diocleinae*. 1 e 2 - *C. brasiliensis*; 3 e 4 - *C. maritima*;

5 e 6- *C. ensiformis*; 7 e 8- *D. altissima*; 9 e 10- *D. violacea*;

11 e 12- *C. floribunda*.

5 3 . – Imunodifusão dupla de Ouchterlony

As soluções de lectinas de *Canavalia* (*C. brasiliensis*, *C. ensiformis* e *C. maritima*); *Cratylia* (*C. floribunda*) e *Dioclea* (*D.altissima*, *D.violacea*, e *D. virgata*) foram submetidas à imunodifusão dupla de Ouchterlony em gel de agarose, utilizando como anticorpo IgG policlonal de coelho contra as lectinas de *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea altissima*. Pelos resultados, observa-se que as lectinas da subtribo *Diocleinae*, citadas, formam entre elas um único arco de precipitação, evidenciando identidade total (FIGURA 14).

Visando verificar a atividade biológica das lectinas, foram utilizadas as lectinas de *Dioclea altissima*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda* no preparo e purificação de imunoglobulinas específicas. A pureza das lectinas foi ainda comprovada por imunodifusão dupla de Ouchterlony, utilizando, como anticorpos, IgG de coelho poliespecífica contra as lectinas de *C. brasiliensis* e *D. altissima*.

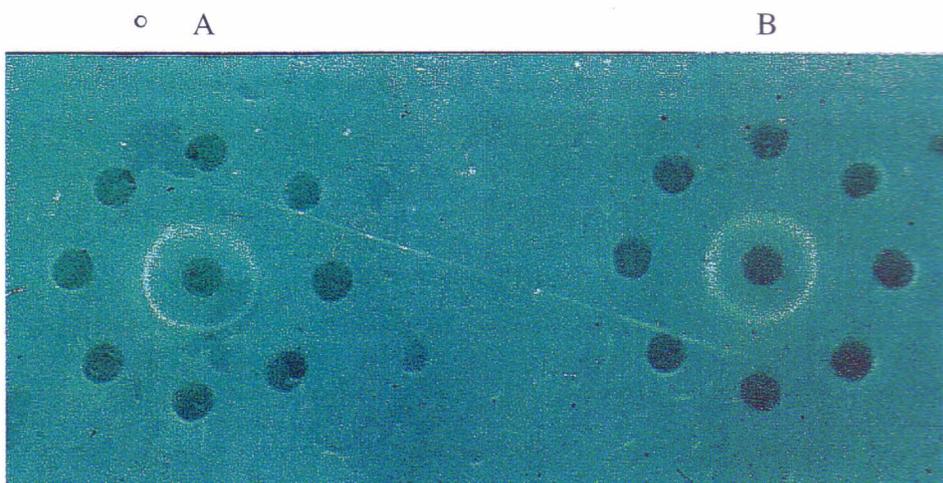


Figura 14: Imunodifusão de Ouchterlony, de lectinas de *Diocleinae*, contra soro anti-lectina de *Dioclea altissima* (A) e anti-lectina de *Canavalia brasiliensis* (B). Antígenos: 1 – *Dioclea altissima*, 2 - *D. violacea*, 3 - *D. virgata*, 4 - *Canavalia brasiliensis*, 5 - *C. ensiformis*, 6 - *C. maritima*, 7 – *Cratylia floribunda* e 8 - Con A (Sigma).

5.4 Avaliação do comportamento das lectinas em diferentes valores de pH

5.4.1 Interação com o gel de Sephadex G-50

As lectinas puras foram cromatografadas em colunas de afinidade usando-se os seguintes tampões: tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,0 e pH 5,0 e tampão tris-HCl pH 6,0 e pH 7,0; todos contendo CaCl_2 5 mM e MnCl_2 5mM. As cromatografias de afinidade com os diferentes valores de pH são mostradas nas FIGURAS 15-20. Os perfis cromatográficos são semelhantes à pH 4,0 e pH 5,0 assim como à pH 6,0 e pH 7,0, para todas as lectinas da subtribo *Diocleinae* estudadas.

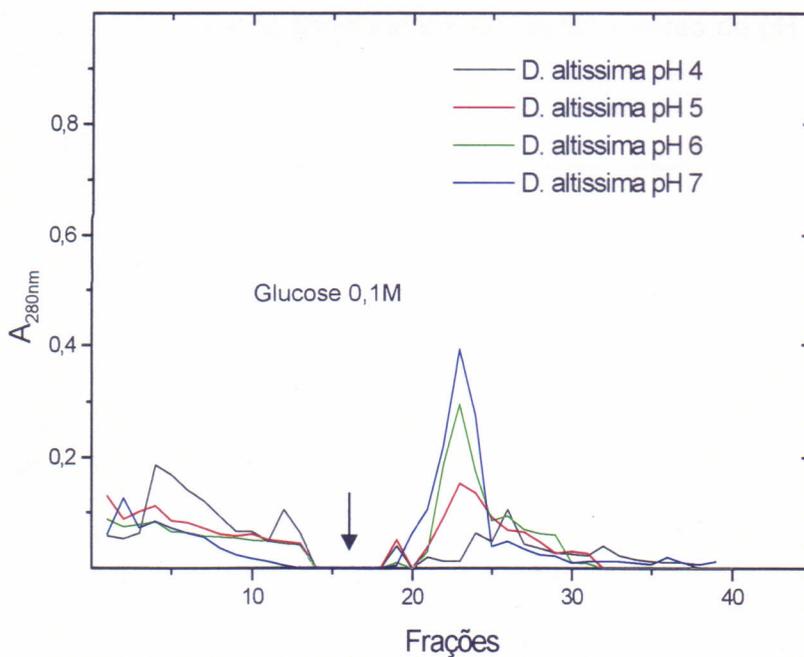


FIGURA 15 – Cromatografia de afinidade em diferentes valores de pH da lectina de *Dioclea altissima*.

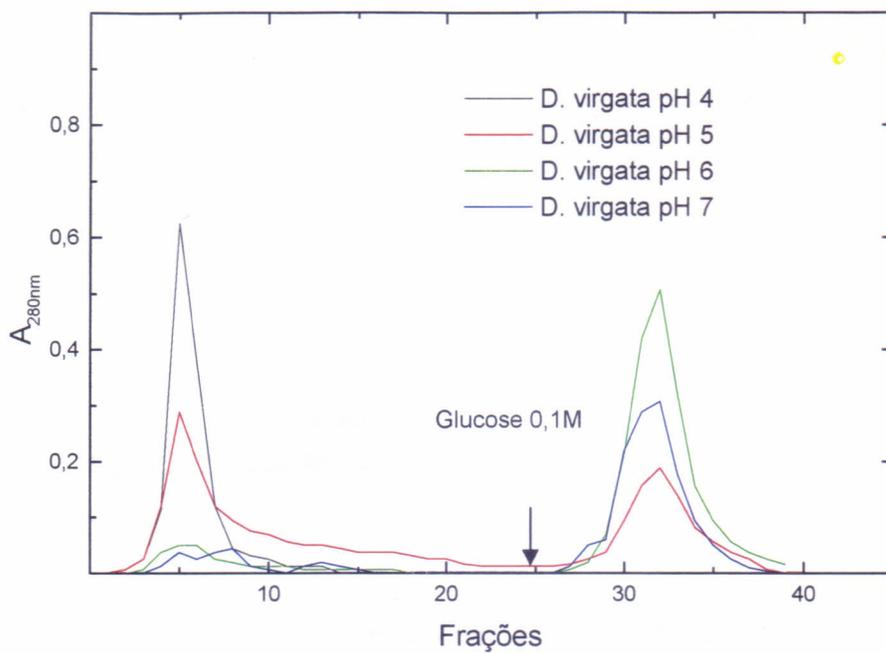


FIGURA 16 – Cromatografia de afinidade em diferentes valores de pH da lectina de *Dioclea virgata*.

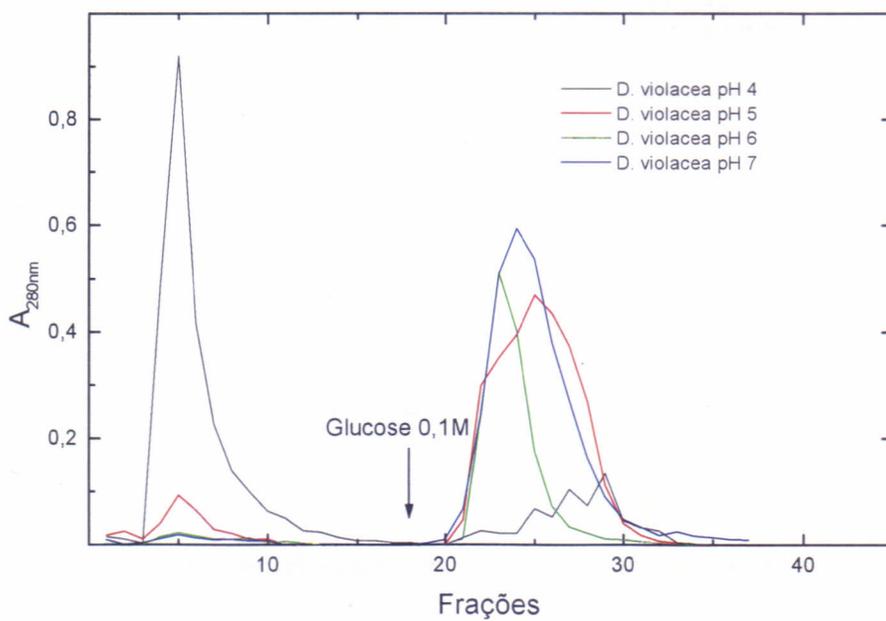


FIGURA 17 – Cromatografia de afinidade em diferentes valores de pH da lectina de *Dioclea violacea*.

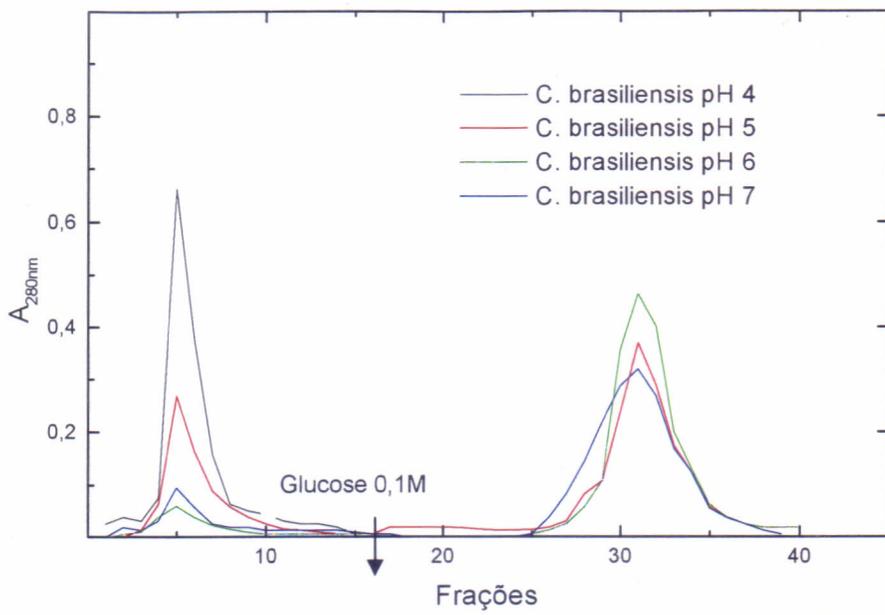


FIGURA 18 – Cromatografia de afinidade em diferentes valores de pH da lectina de *Canavalia brasiliensis*.

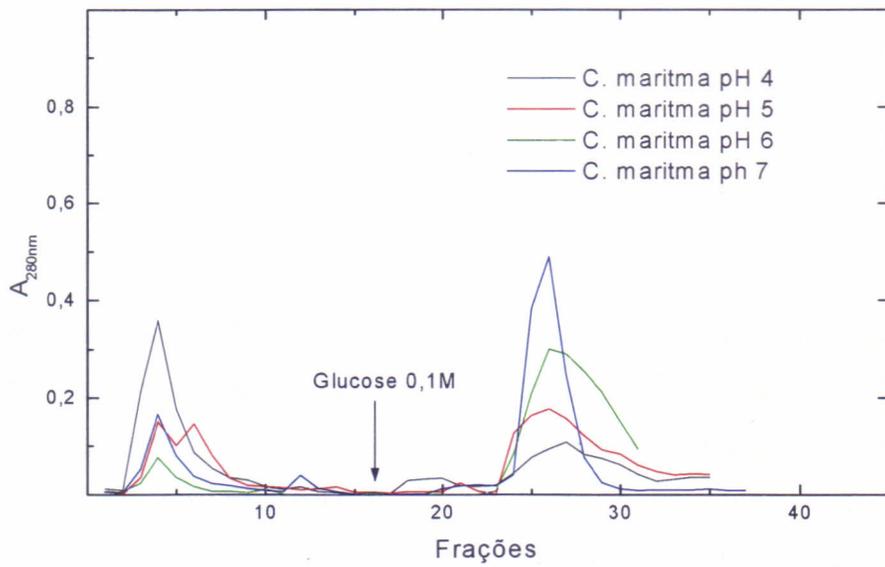


FIGURA 19 – Cromatografia de afinidade em diferentes valores de pH da lectina de *Canavalia maritima*.

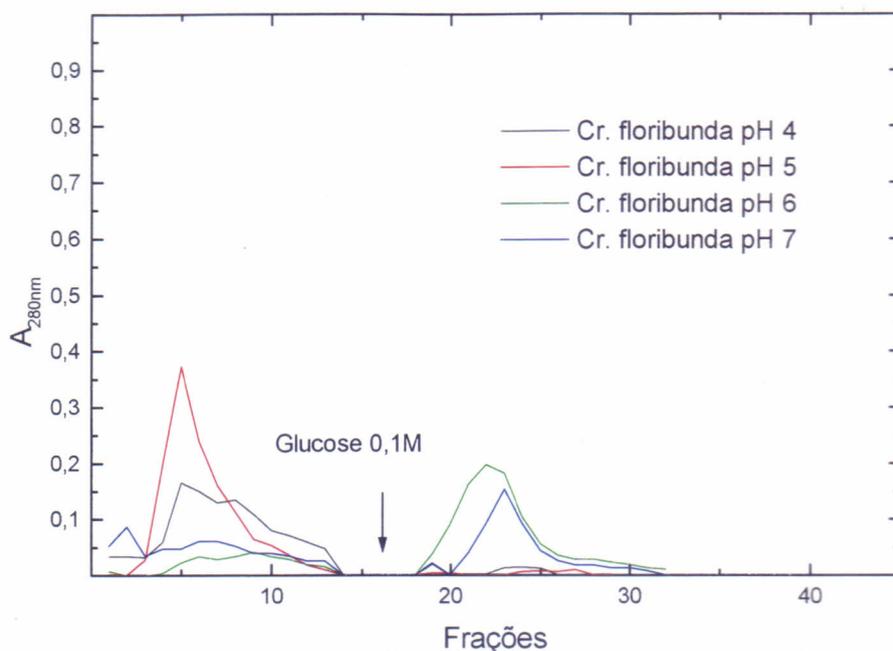


FIGURA 20 – Cromatografia de afinidade em diferentes valores de pH da lectina de *Cratylia floribunda*

5.4.2 Determinação das massas moleculares relativas a diferentes valores de pH

As lectinas purificadas foram cromatografadas em coluna de exclusão molecular de Superose 12HR, acoplada a sistema FPLC. Os resultados obtidos, quando as lectinas foram cromatografadas em presença de glicose 0,2 M, estão mostrados na FIGURA 21. Os valores observados sugerem a existência de uma forma monomérica a pH 2,6 e, ao serem submetidas a valores crescentes de pH, vão tomando novas formas intermediárias (entre pH 4,0 e 6,0) para obterem, a pH 8,0, a forma dimérica (M_r em torno de 50 kDa).

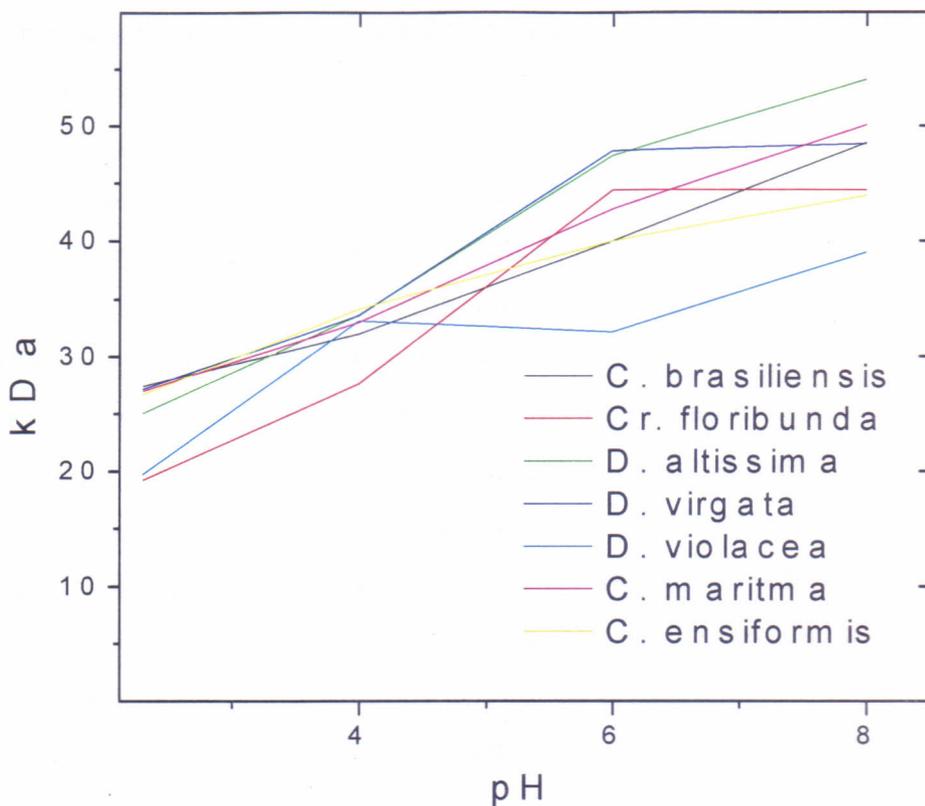


FIGURA 21 – Comportamento das formas moleculares das lectinas de *Canavalia* (*C. brasiliensis*, *C. ensiformis* e *C. maritima*) *Dioclea* (*D. altissima*, *D. violacea* e *D. virgata*) e *Cratylia floribunda* fracionada por filtração em gel de Superose 12HR, em diferentes valores de pH, em presença de glicose.

5.5 - Utilização de lectinas puras, autóctones, do tipo glucose/manose para marcação dos tecidos.

Os ensaios com tecidos normais e transformados foram efetuados para definir um potencial uso das lectinas de sementes do grupo *Diocleinae* como marcadores de superfícies tumorais. Experimentos iniciais mostraram a ligação de todas as lectinas testadas à células epiteliais do tecido tumoral e que a incubação com peróxido de hidrogênio, veiculado em metanol, por 20 min, foi suficiente para eliminar a peroxidase endógena; a pré-incubação com tripsina favoreceu a reação.

Foram efetuados controles com todos os casos estudados, observando-se resultados negativos para estes controles. Após serem

definidas as condições do ensaio, avaliações das ligações foram efetuadas, definindo-se as melhores concentrações a serem trabalhadas tanto nos tecidos normais quanto nos transformados.

Para a avaliação das lectinas testadas, foram usados os seguintes tecidos humanos: sistema nervoso central, colo uterino e mama.

No sistema nervoso central as lectinas apresentaram marcação que variou entre fraca, moderada e intensa. Os tecidos normais do sistema nervoso central apresentaram na sua maioria, uma marcação fraca nos neurônios para a totalidade das lectinas testadas. Os casos diagnosticados como carcinomas metastático mal diferenciados apresentaram marcação intensa nas células neoplásicas, quando utilizamos as concentrações de 25 µg/ml para *Dioclea altissima*, *D. violacea*, *Cratylia floribunda* e moderada para *D. virgata*. Entretanto, quando trabalhamos em casos diagnosticados como meningioma, astrocitoma fibrilar e glioblastoma multiforme, nas mesmas condições referidas acima, as marcações mostraram-se mais intensas, para as lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *C. ensiformis* e *C. maritima* na concentração de 50 µg/ml, com exceção da *C. brasiliensis*, que mostrou marcação moderada (TABELA 2 e FIGURAS 22 a 27). Nos tecidos do sistema nervoso central as lectinas de *Dioclea altissima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis*, conjugadas com peroxidase pelo método direto, mostraram uma marcação moderada bastante uniforme com meningioma e mais intensa com glioblastoma multiforme. Quando se compararam as lectinas de *Dioclea altissima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis*, em diferentes tampões com variações nos valores pH, como tampão acetato de sódio 0,1 M em NaCl 0,15 M pH 4,0 e 5,0 e PBS 0,01M pH 7,2 foram obtidos resultados mais uniformes com o tampão acetato de sódio, pH 5,0 do que em pH 4,0, tanto nas células neoplásicas do astrocitoma fibrilar como do glioblastoma multiforme, onde predominou a marcação dos neurônios e das células da glia para todas as lectinas estudadas (TABELA 4).

Já no tecido normal, apresentaram uma marcação muito fraca tanto dos neurônios como das células gliais. No cerebelo praticamente não houve distinção de marcação das células de Purkinge entre as lectinas estudadas (TABELA 3).

TABELA 2 – Interação das lectinas da subtribo *Diocleinae* pelo método indireto com os tecidos do Sistema Nervoso Central (SNC), normais e transformado.

<u>LECTINAS</u>								
TECIDOS		D.ALT	D.VIO	D.VIR	C.BRA	C.ENS	C.MAR	CR.FLO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL	Normal	+	+	+	+	+	+	+
	Meningioma	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
	Astrocitoma Fibrilar	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
	Glioblastoma multiforme	+++	+++	+++	+++	++	++	+++
	Carcinoma Metastático	+++	+++	++	++	++	++	+++

TABELA 3 – Interação das lectinas de *Dioclea altissima*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda* pelo método direto com os tecidos do sistema nervoso central (SNC), normais e transformados.

<u>LECTINAS</u>					
TECIDOS		D.ALT	C.BRA	CR.FLO	ConA
SISTEMA NERVOSO CENTRAL	Normal	+	+	+	+
	Meningioma	++	++	++	+
	Glioblastoma multiforme	+++	+++	+++	++

D.ALT = *Dioclea altissima* D.VIR = *D. virgata* D.VIO = *D. violacea*

C.BRA = *C. brasiliensis* C.ENS = *C. ensiformis* C.MAR = *C. maritima*

CR.FLO = *Cratylia floribunda*

TABELA 4 – Interação das lectinas *Dioclea altissima*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda* pelo método indireto com os tecidos do Sistema Nervoso Central (SNC), normais e transformados a valores de pH 4 e 7.

LECTINAS											
TECIDOS		pH	<i>D. altissima</i>			<i>C. brasiliensis</i>			<i>Cr. Floribunda</i>		
			Forma Molecular	Interação Sephadex	M*	Forma Molecular	Interação Sephadex	M*	Forma Molecular	Interação Sephadex	M*
SISTEMA NERVOSO CENTRAL	Normal	4	Monomérica (35kDa)	+	+	Monomérica (34KDa)	-	++	Monomérica (28KDa)	+/-	+
		7	Dimérica (52kDa)	+++	+	Dimérica (47kDa)	+++	++	Dimérica (44kDa)	+++	+
	Astrocitoma Fibrilar	4	Monomérica (35kDa)	+	++	Monomérica (34KDa)	-	++	Monomérica (28KDa)	+/-	++
		7	Dimérica (52kDa)	+++	+++	Dimérica (47kDa)	+++	++	Dimérica (44kDa)	+++	+++
	Glioblastoma Multiforme	4	Monomérica (35kDa)	+	+	Monomérica (34KDa)	-	+	Monomérica (28Kda)	+/-	++
		7	Dimérica (52kDa)	+++	+++	Dimérica (47kDa)	+++	+++	Dimérica (44kDa)	+++	+++
	Carcinoma Metastático	4	Monomérica (35kDa)	+	++	Monomérica (34KDa)	-	+	Monomérica (28Kda)	+/-	+
		7	Dimérica (52kDa)	+++	+++	Dimérica (47kDa)	+++	+++	Dimérica (44kDa)	+++	+++

M = marcação de tecidos

(-) = sem interação (-/+) = interação muito fraca (+) = interação fraca

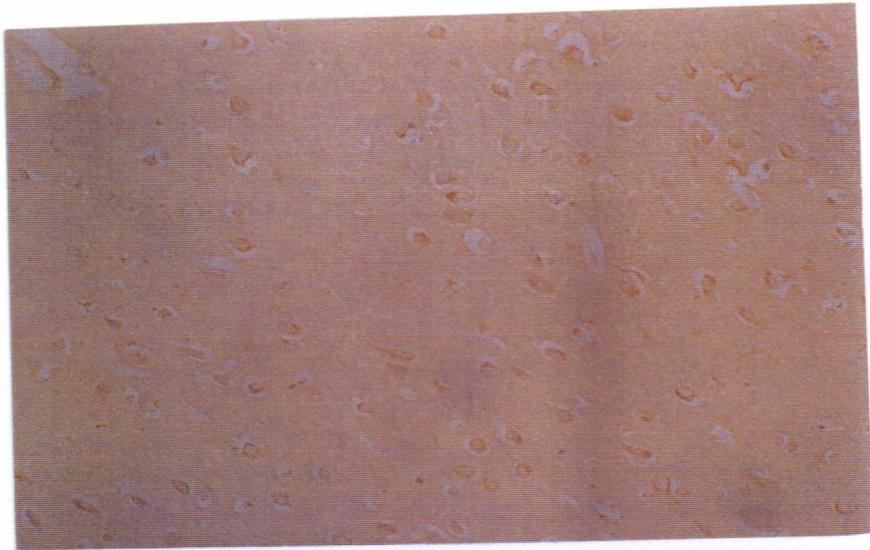


FIGURA 22 – Tecido do sistema nervoso central normal marcado com a lectina de *Dioclea altissima*. Aumento 50x.

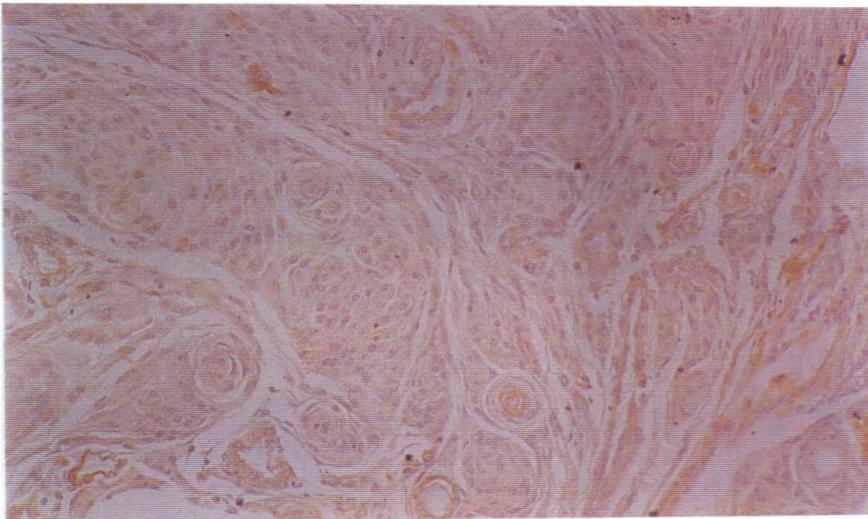


FIGURA 23 – Meningioma do sistema nervoso central marcado com a lectina de *Dioclea altissima*. Aumento 50x.



FIGURA 24 – Carcinoma metastático mal diferenciado do sistema nervoso central marcado com a lectina de *Dioclea altissima*. Aumento 50x.

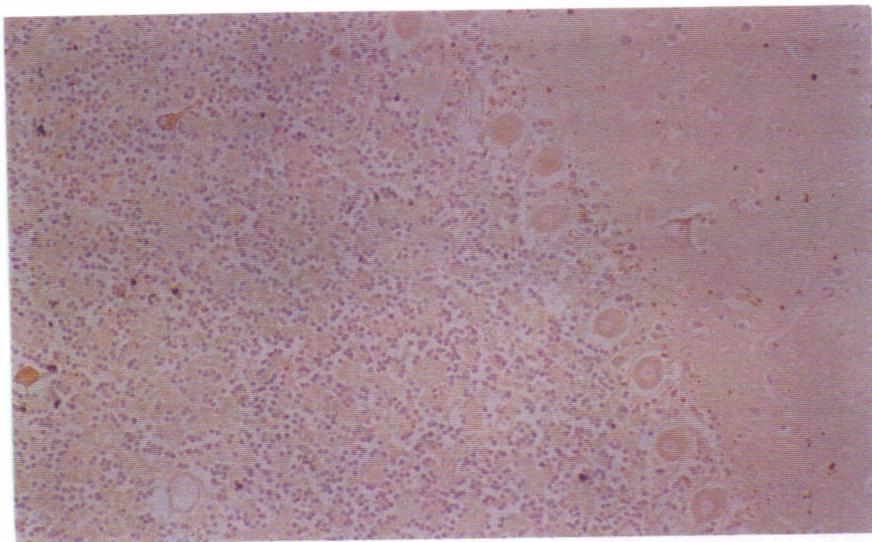


FIGURA 25 – Tecido do sistema nervoso central normal marcado com a lectina de *Dioclea altissima*. Aumento 50x.



FIGURA 26 – Astrocitoma fibrilar do sistema nervoso central marcado com a lectina de *Dioclea altissima* pH = 5,0. Aumento 50x.

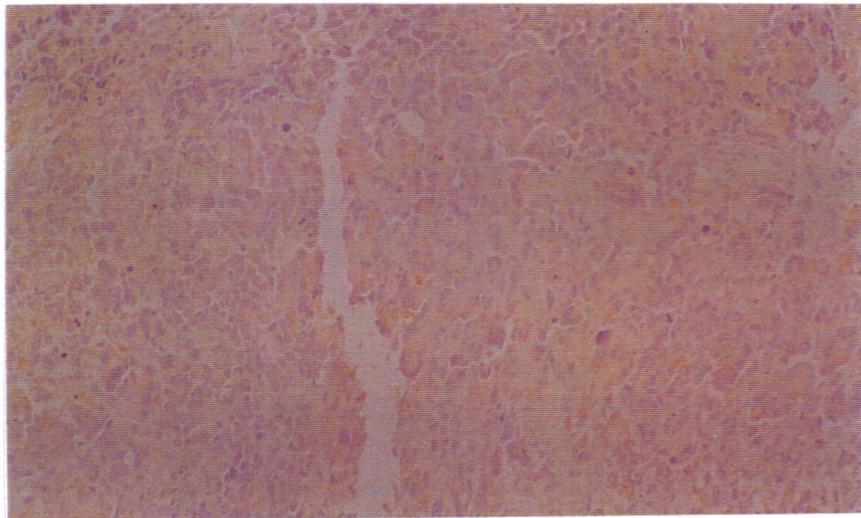


FIGURA 27 – Glioblastoma multiforme do sistema nervoso central marcado com a lectina de *Dioclea altissima* conjugada. Aumento 50x.

No tecido normal de colo de útero, observou-se que o epitélio escamoso estratificado de colo de útero mostra marcação fraca, tanto nas concentrações de 30 µg/ml, para as lectinas de *Dioclea*, como nas concentrações de 50 µg/ml para as lectinas de *Canavalia* testadas. Entretanto, quando essas mesmas lectinas foram testadas no processo neoplásico (carcinoma *in situ* e carcinoma epidermóide invasivo mal diferenciado), onde se observam células epiteliais atípicas, polimórficas e com figuras de mitose, constatou-se que, à medida que as células se transformam, a marcação se acentua e torna-se mais difícil distinguir qual é a lectina mais eficiente independente da concentração utilizada (TABELA 5, FIGURAS 28 a 30).

As lectinas citadas a seguir também foram trabalhadas utilizando-se o método direto de conjugação com a peroxidase: *Dioclea altissima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasilienses*. Observou-se que se repete a mesma situação para a maioria das lectinas estudadas, predominando nas células do epitélio escamoso normal de colo de útero uma fraca coloração, contrastando com coloração mais intensa nas células transformadas (TABELAS 5 e 6, FIGURAS 31 a 33).

TABELA 5 – Interação das lectinas da subtribo *Diocleinae* pelo método indireto com os tecidos do colo uterino, normais e transformado.

LECTINAS								
TECIDOS		D.ALT	D.VIO	D.VIR	C.BRA	C.ENS	C.MAR	CR.FLO
COLO UTERINO	Normal	+	+	+	+	+	+	+
	Cervicite	+	+	nd	++	+	++	++
	Carcinoma <i>in situ</i>	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Carcinoma epidermóide invasivo	++	nd	nd	++	+++	Nd	+++

nd – não determinado

TABELA 6 – Interação das lectinas de *Dioclea altissima*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda*, pelo método direto, com o tecido do colo uterino, normal e transformado.

LECTINAS CONJUGADAS					
TECIDOS		D.ALT	C.BRA	CR.FLO	ConA
COLO UTERINO	Normal	+	+	+	+
	Carcinoma epidermóide invasivo	++	++	+++	+++

D.ALT = *Dioclea altissima* D.VIR = *D. virgata* D.VIO = *D. violacea*

C.BRA = *C. brasiliensis* C.ENS = *C. ensiformis* C.MAR = *C. maritima*

CR.FLO = *Cratylia floribunda*

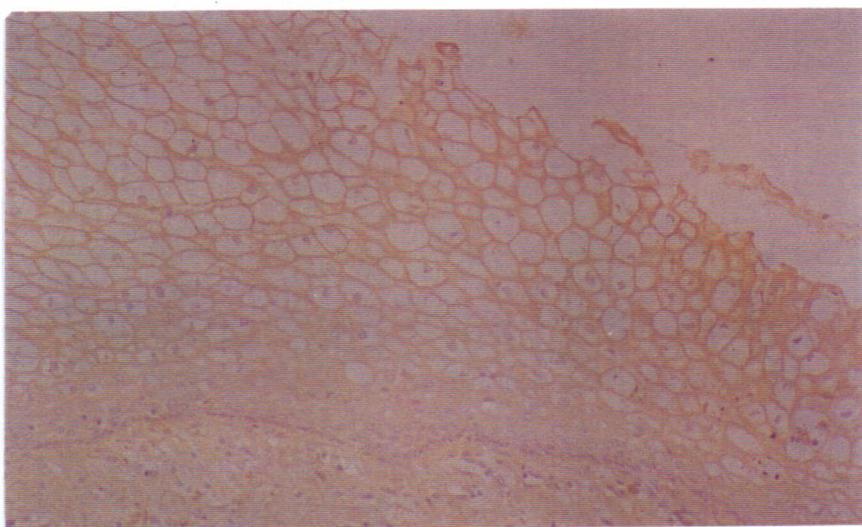


FIGURA 28 – Tecido do colo uterino normal marcado com a lectina de *Canavalia brasiliensis*. Aumento 50x

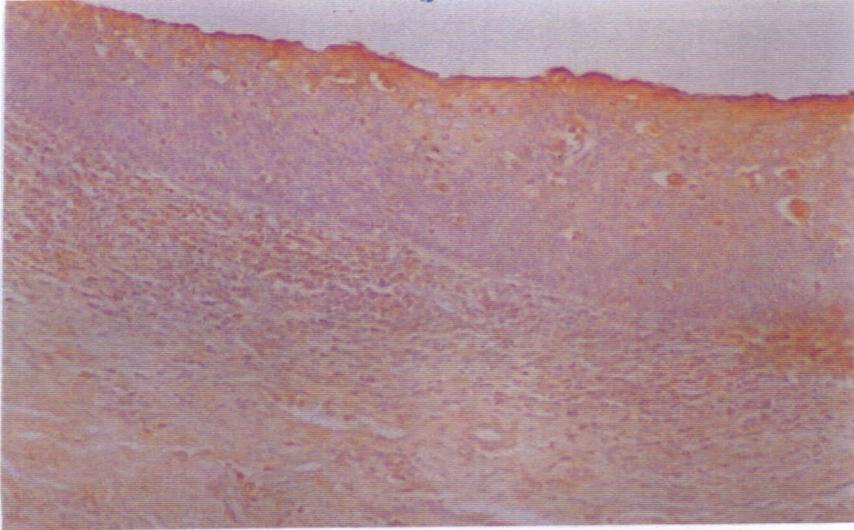


FIGURA 29 – Carcinoma *in situ* do tecido do colo uterino marcado com a lectina de *Canavalia brasiliensis*. Aumento 50x.

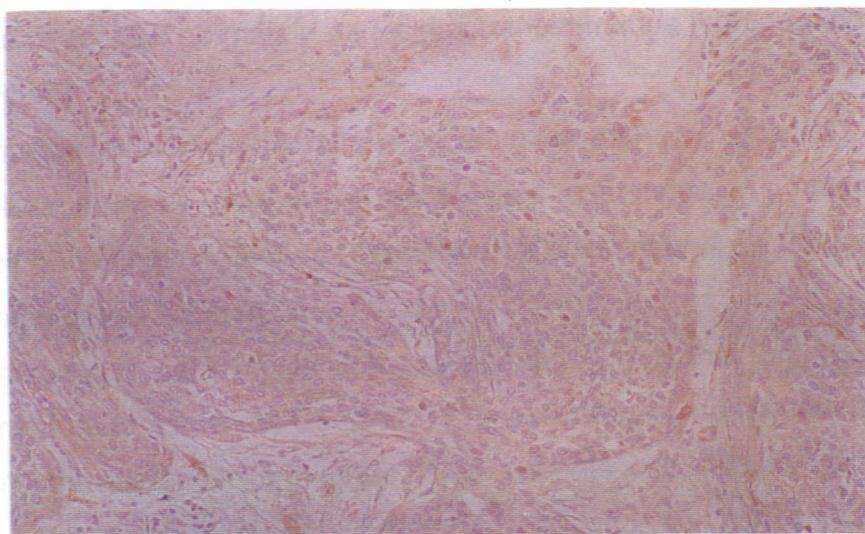


FIGURA 30 – Carcinoma epidermóide invasivo do tecido do colo uterino marcado com a lectina de *Canavalia brasiliensis*. Aumento 50x.

Os ensaios com os tecidos mamários humanos, para definir um potencial uso das lectinas do grupo *Diocleinae*, revelaram também um padrão diferente entre os tecidos normais e os tecidos transformados (fibroadenoma e carcinoma ductal infiltrante).

Os lóbulos mamários normais apresentaram marcação discreta das células epiteliais acinares para todas as lectinas estudadas. As melhores concentrações trabalhadas foram de 20 µg/ml, *Cratylia floribunda*, e 25 µg/ml - 30 µg/ml para as outras lectinas.

As marcações com os tecidos transformados mostram um padrão, variando de moderado a intenso. Os casos diagnosticados como fibroadenoma apresentaram uma marcação moderada, mas evidente das células epiteliais neoplásicas benignas dos ductos. Entretanto, quando se trabalhou com carcinoma ductal infiltrante verificou-se uma intensa ligação das lectinas às células neoplásicas malignas, contrastando com o tecido normal, onde as células epiteliais dos ácinos estavam levemente marcadas. Estes resultados estão representados na TABELA 7 e nas FIGURAS 34 a 36.

Nos tecidos mamários, a localização e a intensidade da marcação também foram avaliadas individualmente, quando utilizamos o método direto para estimar a marcação dos tecidos pelas lectinas *Dioclea altíssima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis*. As lesões de mama apresentaram um padrão de marcação, variando de moderada a intensa. Os casos diagnosticados como fibroadenoma apresentaram, na sua totalidade, uma marcação moderada, enquanto o carcinoma ductal infiltrante foi caracterizado, na sua maioria, pela marcação intensa; estes resultados estão mostrados na TABELA 8 e FIGURAS 37 a 39.

TABELA 7 – Interação das lectinas da subtribo *Diocleinae* pelo método indireto, com os tecidos de mama, normais e transformados.

LECTINAS								
TECIDOS		D.ALT	D.VIO	D.VIR	C.BRA	C.ENS	C.MAR	CR.FLO
MAMA	Normal	+	+	+	+	+	+	+
	Fibroadenoma	++	++	++	++	++	++	++
	Carcinoma ductal infiltrante	+++	+++	+++	+++	++	++	+++

TABELA 8 – Interação das lectinas do *Dioclea altissima*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda*, pelo método direto, com os tecidos de mama, normais e transformados.

LECTINAS CONJUGADAS					
TECIDOS		D.ALT	C.BRA	CR. FLO	ConA
MAMA	Fibroadenoma	++	++	++	++
	Carcinoma ductal infiltrante	+++	+++	+++	+++

D.ALT = *Dioclea altissima* D.VIR = *D. virgata* D.VIO = *D. violacea*

C.BRA = *C. brasiliensis* C.ENS = *C. ensiformis* C.MAR = *C. maritima*

CR.FLO = *Cratylia floribunda*

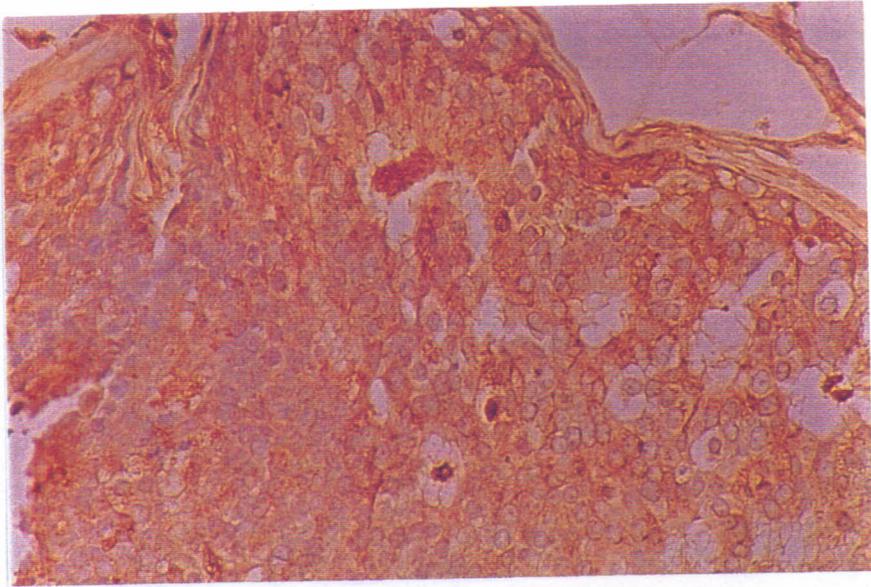


FIGURA 31 – Carcinoma ductal infiltrante (CDI) do tecido mamário marcado com a lectina de *Canavalia brasiliensis*. Aumento 100x.

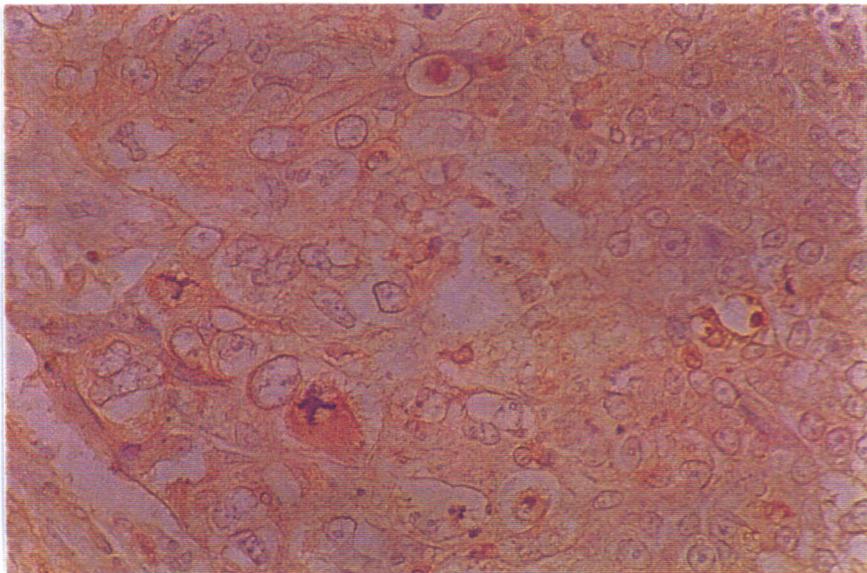


FIGURA 32 – Carcinoma ductal infiltrante (CDI) do tecido mamário marcado com a lectina de *Canavalia maritima*. Aumento 100x.

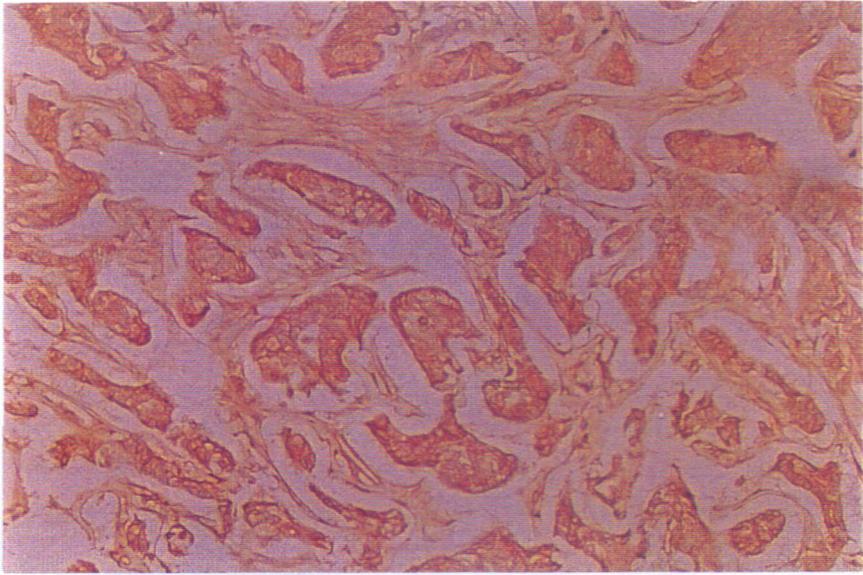


FIGURA 33 – Carcinoma ductal infiltrante (CDI) do tecido mamário marcado com a lectina de *Cratylia floribunda*. Aumento 100x.

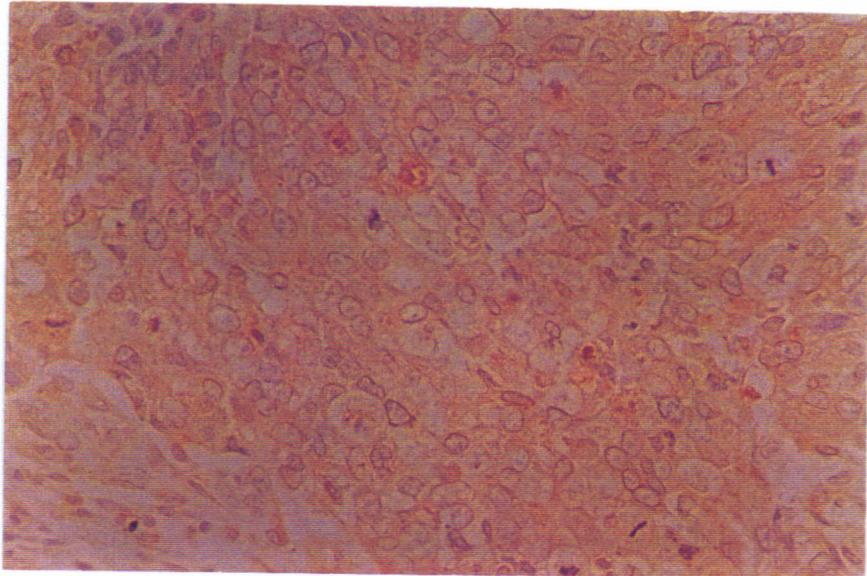


FIGURA 34 – Carcinoma ductal infiltrante (CDI) do tecido mamário marcado com a lectina de *Dioclea altissima*. Aumento 100x.

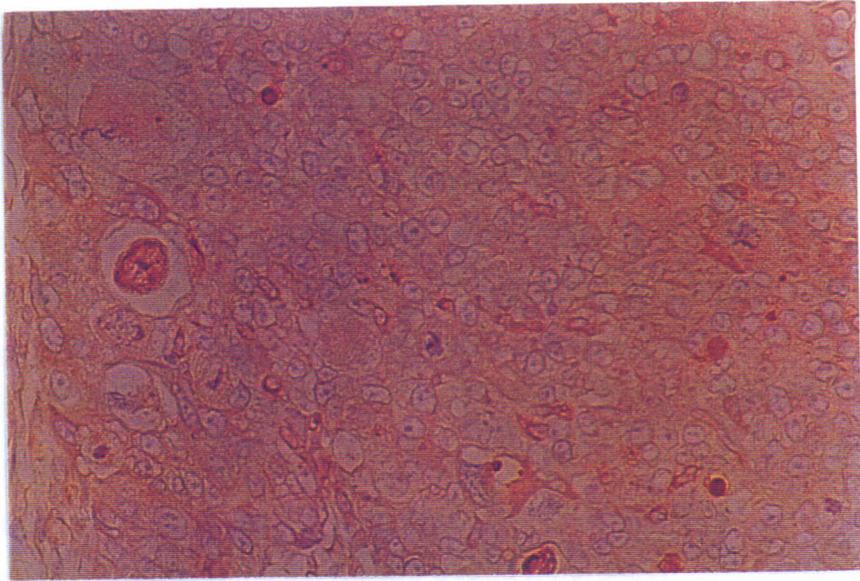


FIGURA 35 – Carcinoma ductal infiltrante (CDI) do tecido mamário marcado com a lectina de *Dioclea violacea*. Aumento 100x.

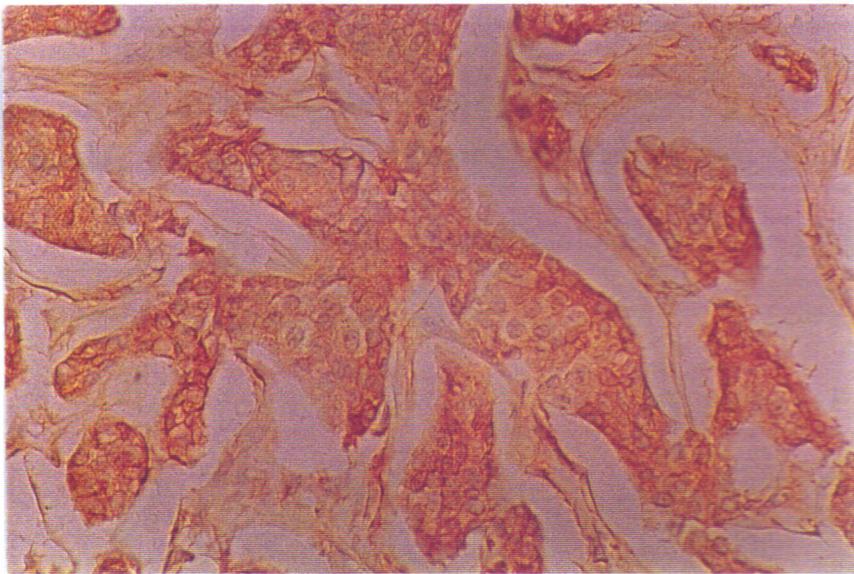


FIGURA 36 – Carcinoma ductal infiltrante (CDI) do tecido mamário marcado com a lectina de *Dioclea virgata*. Aumento 100x.

5.5.1 Inibição da ligação das lectinas

Inibições foram feitas com a finalidade de avaliar o potencial da ligação das lectinas estudadas. Os açúcares, usados para testar o grau de inibição das lectinas trabalhadas, foram D-glucose, D-manose e metil- α -D-manopiranosídeo, pois todas as lectinas puras autóctones do grupo *Diocleinae*, utilizadas neste estudo, são do tipo glucose/manose específicas.

As amostras testadas evidenciaram, como inibidor mais potente da ligação lectina - carboidrato da superfície celular, o metil- α -D-manopiranosídeo. A menor concentração que inibiu as ligações de forma mais satisfatória foi a de 25 mM, independente da relação lectina /tecido usada no ensaio.

O comportamento das lectinas inibidas com os tecidos de mama, colo uterino e sistema nervoso central, foi verificado para os tecidos normais e para os com lesões, e apresentaram padrões de inibição compatíveis com os obtidos em outros estudos envolvendo lectinas. Os resultados da inibição para cada uma das lectinas/tecidos trabalhados estão representados nas FIGURAS 40 a 42, para os tecidos normais e transformados citados acima.

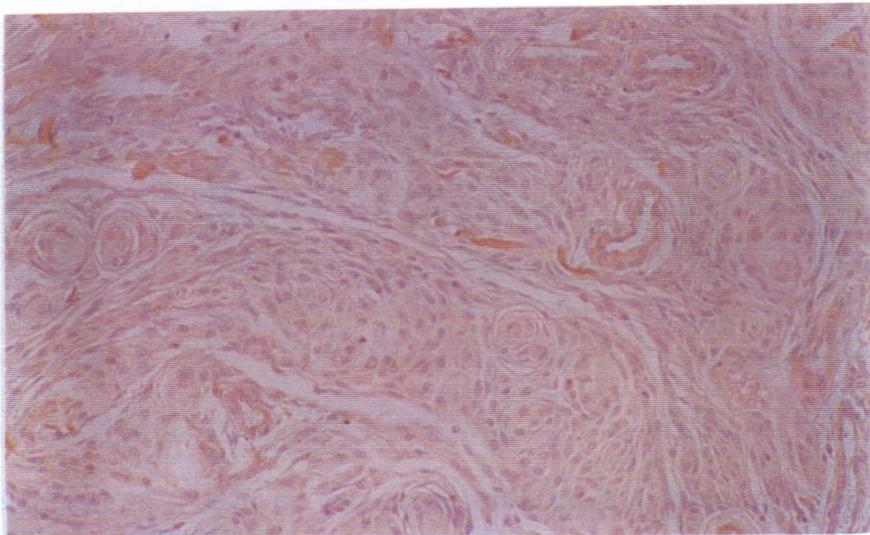


FIGURA 37 – Meningioma do sistema nervoso central marcado com a lectina de *Canavalia brasiliensis*. Aumento 50x.

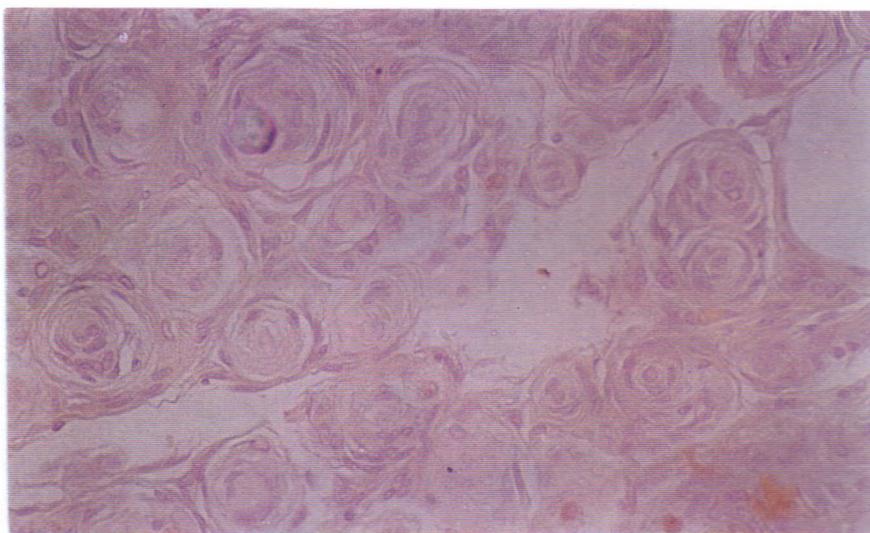


FIGURA 38 – Meningioma do sistema nervoso central marcado com a lectina de *Canavalia brasiliensis* e inibido com metil- α -D-manosídeo. Aumento 50x.

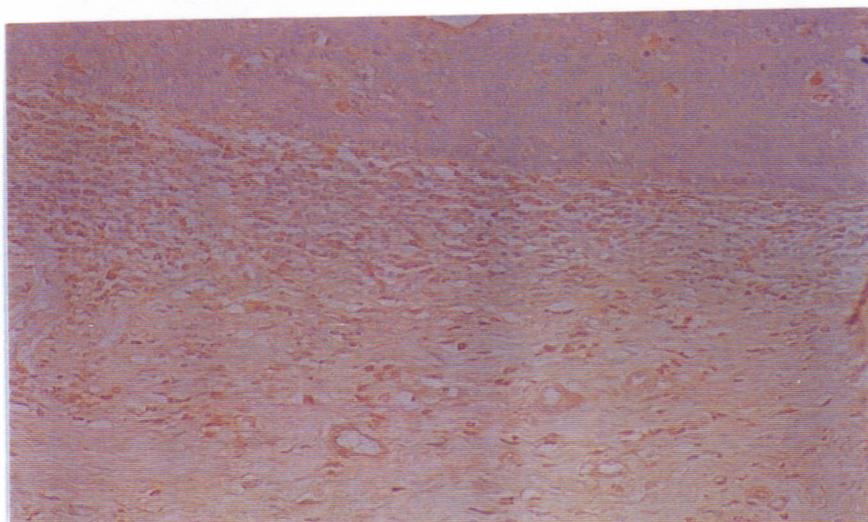


FIGURA 39 – Carcinoma *in situ* do tecido do colo uterino marcado com a lectina de *Canavalia brasiliensis*. Aumento 50x.



FIGURA 40 - Carcinoma *in situ* do tecido do colo uterino marcado com a lectina de *Canavalia brasiliensis* e inibido com metil- α -D-manosídeo. Aumento 50x.

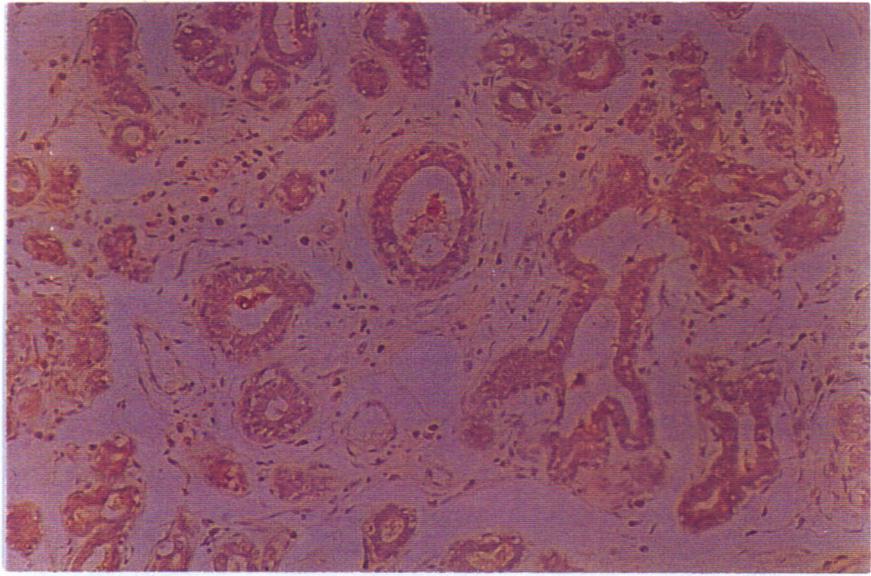


FIGURA 41 – Tecido mamário normal marcado com a lectina de *Dioclea violacea*. Aumento 50x.

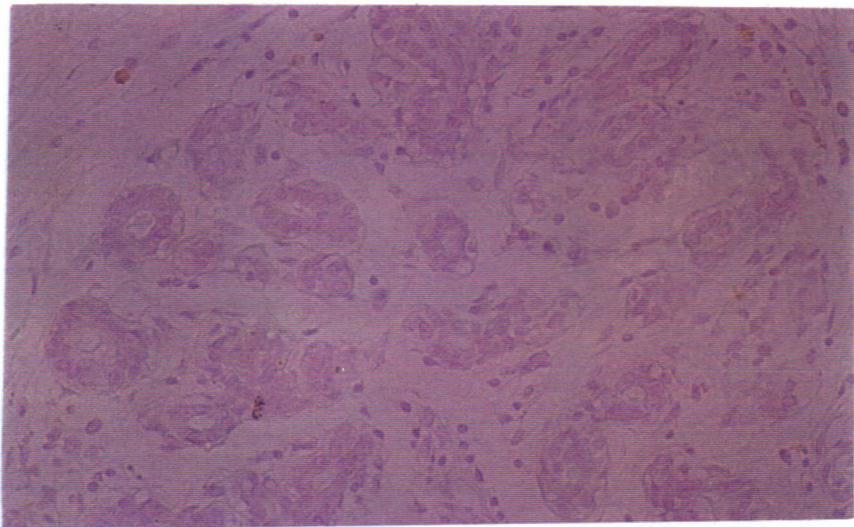


FIGURA 42 - Tecido mamário normal marcado com a lectina de *Dioclea violacea* e inibido com metil- α -D-manosídeo. Aumento 50x.

... (1991) e

6.DISSCUSSÃO

6 . DISCUSSÃO

A família *Leguminosae* constitui uma das maiores e mais importantes famílias das dicotiledôneas, pertencentes à divisão *Angiosperma*. Economicamente, elas se destacam como fonte de alimento e forragem na agricultura mundial, utilidades médicas, dispondo de uma série de características que qualificam sua utilidade na natureza.

Taxonomicamente, a família *Leguminosae* é classificada em três subfamílias: *Cesalpinoideae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae*, dentre as quais, esta última, se sobressai como a maior delas, com cerca de dois terços de todos os gêneros e espécies da família. Conforme esta divisão, a subfamília *Papilionoideae* concentra 30 tribos, na qual se encontra a tribo *Phaseoleae*, que contém 8 subtribos, onde destacamos a subtribo *Diocleinae*, onde se encontram os gêneros *Dioclea*, *Canavalia* e *Cratylia*.

De acordo com MOREIRA (1998), todas as lectinas já isoladas da subtribo *Diocleinae* apresentam uma característica em comum, que se evidencia pela sua afinidade pelos monossacarídeos glucose e manose. Por isso, para essas lectinas, nada mais lógico do que isolá-las pela cromatografia de afinidade em coluna de SEPHADEX.

As interações dos sítios das lectinas com carboidratos formam um complexo que envolve o deslocamento de moléculas de água, que estão associadas a grupos polares das proteínas, que, junto a porções polares dos carboidratos, estabelecem novas pontes de hidrogênio; as interações Vander Waals e as pontes de hidrogênio são as forças dominantes que estabilizam a formação do complexo (QUIOCHO, 1986).

AGRAWAL & GOLDSTEIN (1967) observaram que o rendimento na obtenção da Con A, por cromatografia em Sephadex, diminuía quando o fracionamento com sulfato de amônio não era efetuado. Por conseguinte, a precipitação das lectinas do grupo *Diocleinae* por sulfato de amônio, como uma primeira etapa de purificação, se apresentou como um método bastante eficiente na faixa de 70-80% de saturação.

Segundo MOREIRA *et al.*, (1983), VASCONCELOS *et al.*, (1991) e MOREIRA & CAVADA (1984), algumas das lectinas da subtribo *Diocleinae*, quando precipitadas com sulfato de amônio na faixa de 60 a 80 % de saturação

apresentam melhores resultados, pois, além de concentrar as proteínas, há eliminação de substâncias de baixo peso molecular e redução de seus prováveis inibidores.

COELHO & SILVA (2000) isolaram uma lectina galactose específica das folhas de *Bauhinia monandra*, utilizando o método de fracionamento com sulfato de amônio a 60% seguidos de cromatografia de afinidade em gel de ágar, comprovando a eficiência desse método rápido e simples no isolamento de lectinas com outro tipo de especificidade.

As cromatografias utilizadas para isolamento das lectinas das farinhas de semente dos gêneros *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*, nesse trabalho, mostraram-se em concordância com os resultados anteriormente obtidos para a subtribo *Diocleinae*.

Os picos obtidos para as lectinas das farinhas de semente dos gêneros: *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* foram bastante característicos para cada uma delas, confirmando a escolha do Sephadex G-50 como suporte de excelência para a purificação das referidas lectinas por cromatografia de afinidade. O padrão de pureza das preparações obtidas através do fracionamento com sulfato de amônio e das cromatografias realizadas, foi avaliado por eletroforese em gel de poli(acrilamida) para as lectinas das farinhas de semente dos gêneros: *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*.

As amostras retidas na Sephadex G-50 apresentaram padrões eletroforéticos semelhantes aos citados na literatura com três subunidades quando o gel de poli(acrilamida) é usado em SDS e β -mercaptoetanol. Estas três subunidades α , β e γ têm peso molecular que variam entre, 29-31 kDa, 16-18 kDa e 12-14 kDa, respectivamente, e são encontradas em todas as formas ativas, de acordo com os trabalhos de PEREZ *et al.*, 1991, VASCONCELOS *et al.*, 1991, OLIVEIRA *et al.*, 1991, CAVADA *et al.*, 1993, CAVADA *et al.*, 1996 e MOREIRA *et al.*, 1996.

Para comprovar a alta pureza na preparação dessas lectinas, também foi realizada a técnica de imunodifusão dupla de Ouchterlony, que mostrou a homogeneidade das lectinas do grupo *Diocleinae* com um único arco de precipitação. Esses resultados estão de acordo com os encontrados entre as lectinas de *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*, os quais demonstraram completa

identidade imunológica entre as lectinas (MOREIRA *et al.*, 1983; MOREIRA *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1991, MOREIRA *et al.*, 1997).

As hololectinas se caracterizam por serem proteínas compostas de dois ou mais domínios ligantes a carboidratos, permitindo, assim, a reação de aglutinação entre as células e a lectina. Partindo desta afirmação, as lectinas desta subtribo, aqui estudadas enquadram-se nesta classificação, uma vez que mostram uma especificidade por resíduos de glicose/manose.

Os resultados encontrados na avaliação do comportamento das lectinas em diferentes valores de pH, estão em concordância com os encontrados por MOREIRA (1998), para as lectinas de *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea virgata* na interação com o gel de SEPHADEX G-50 e com os analisados por MUNIZ-FILHO (1997) na determinação das massas moleculares relativas em diferentes valores de pH. Desta maneira, por cromatografia de afinidade em coluna de SEPHADEX G-50 foi observado que, enquanto a pH 4,0 nenhuma lectina ficou retida, a pH 6,0 e pH 7,0 toda lectina ficou retida, e a pH 5,0, apenas parte da lectina ficou presa na coluna de afinidade, sugerindo que apenas quando a lectina estava sob a forma dimérica se ligava na coluna e na forma monomérica não interagia com a dextrana da coluna.

Segundo MUNIZ-FILHO (1997), estudos feitos com quinze lectinas da subtribo *Diocleinae*, dentre as quais se encontram as utilizadas neste trabalho, todas as lectinas em pH 2,6 apresentaram uma massa relativa na faixa de 23,0 a 28,0 kDa, característica do monômero, na presença do ligante. Em pH 4,0 e pH 6,0 ocorrem valores de Mr maior que o monômero, porém menor que o valor correspondente ao dímero, possivelmente, uma forma molecular de equilíbrio entre os dois. Por fim, a pH 8,0, estas lectinas exibem uma forma molecular dimérica.

Todas as membranas biológicas compartilham de certas propriedades fundamentais. As membranas plasmáticas são mosaicos fluidos que contêm muitos glicoconjugados - glicoproteínas, glicolipídios e proteoglicanos - na superfície celular. O estudo da superfície celular é atualmente uma das áreas de maior atividade da biologia celular e molecular, pois abrange não só o transporte de substâncias entre a célula e o seu meio, mas também as muitas outras funções relacionadas à comunicação e interação entre as células de um tecido (DE ROBERTIS & DE ROBERTIS, 1993; LEHNINGER, 2000).

Algumas células animais são envolvidas por uma camada do tipo cimento flexível denominada glicocálix, que é formada de glicanos na interface onde ocorrem as interações do tipo célula-célula, célula-parasita.

O mecanismo de reconhecimento molecular na superfície da célula, que a torna capaz de reconhecer células semelhantes, é afetado quando as células normais transformam-se em cancerosas. O resultado é um crescimento e divisão incontrolados das células pela alteração dos mecanismos moleculares de reconhecimento que agem na membrana celular.

O estudo destas alterações pode contribuir para o entendimento das diferenças entre as células normais e as neoplásicas.

O uso de lectinas em histoquímica, para diagnóstico de tecidos malignos, tem sido uma valiosa contribuição e ferramenta em diagnósticos histopatológicos. Lectinas podem detectar alterações na composição de carboidratos das glicoproteínas, glicolipídios e proteoglicanos das membranas plasmáticas, que parecem formar a base das mudanças nas adesões celulares que acompanham as transformações malignas, levando ao desenvolvimento de propriedades invasivas e metastáticas (REMANI *et al.*, 1994).

Lectinas, com suas propriedades e afinidades para determinados açúcares, têm sido empregadas como marcadores histoquímicos para glicoconjugados da superfície celular de células normais e transformadas. Sua especificidade de reconhecimento a carboidratos é análoga a do anticorpo em relação ao antígeno e os detalhes da técnica dos métodos histoquímicos são semelhantes (WALKER, 1990; KARUNA *et al.*, 1992 e BROOKS & LEATHEM, 1993).

As lectinas da subtribo *Diocleinae*, quando utilizadas, tanto pelo método direto como pelo indireto, para marcar células normais e neoplásicas do sistema nervoso central de tecidos humanos, mostrou graus distintos entre os casos das lesões estudadas, resultados que estão de acordo com a literatura. No caso das células normais, as membranas, os neurônios, as células gliais e as células de Purkinge mostraram o mesmo padrão de marcação para todas as lectinas. Entretanto, quando foram utilizadas células transformadas, o padrão de marcação modificou-se, tornando-se mais intenso, à medida que as células se diferenciavam. Esse efeito ocorre também com

lectinas de PNA, Con A, WGA (lectina de trigo) e RCA (*Ricinus communis*), dentre outras.

Con A e PNA foram estudadas em 18 casos de gliomas mistos. A ConA foi capaz de marcar melhor as áreas citoplasmáticas dos processos tumorais dos astrócitos, enquanto que a PNA marcou mais evidentemente as membranas celulares dos oligodendrócitos dos gliomas mistos. Uma parte das células foi positiva duplamente para ambas as lectinas, onde existia a expressão de um oligossacarídeo comum para os tipos de gliomas estudados (SCHILL & CERVOS-NAVARRO, 1998).

Pacientes com glioma foram tratados de acordo com as recomendações internacionais de oncologia e divididos ao acaso em dois grupos. Um grupo recebeu imunoterapia complementada com uma lectina galactose específica, denominada ML-1, originada de *Viscum album*, e o outro grupo, sem o tratamento complementar adicional. Foi observado que o grupo com o tratamento complementar, usando ML-1, mostrou uma melhora na qualidade de vida, avaliada pela não reincidência da doença/sobrevida prolongada (LENEARTZ *et al.*, 2000).

As lectinas dos gêneros *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* apresentaram evidências de que os padrões específicos de ligação podem estar associados à transformações do epitélio escamoso de colo de útero. Todos os ensaios foram feitos observando o mesmo padrão, e as fotos das lâminas o quanto possível no mesmo campo. Tanto nas lesões malignas quanto nas benignas um certo grau de marcação citoplasmática foi observado para todas as lectinas. Essa ligação se deve ao reconhecimento de resíduos de glucose da porção glicídica presente nas proteínas do epitélio escamoso uterino. Entretanto, quando foram marcados os processos neoplásicos, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo mal diferenciado, apresentando células epiteliais atípicas, figuras de mitose e alterações da polaridade, observou-se que, à medida que as células se transformavam, a marcação se acentuava, corroborando com a literatura citada que a ligação das lectinas está associada ao estado de malignidade.

Estudos foram realizados por DAVIDSON *et al.*, (1999) em carcinoma de células escamosas do colo uterino, para avaliar a significância no prognóstico da quantidade de microvasos e infiltração de macrófagos peritumorais. Para verificar as marcações imunohistoquímicas compararam-se

setenta e cinco carcinomas de células escamosas com dois marcadores endoteliais: anti-CD31 e lectina de *Ulex europaeus* (UEA-I), e um marcador específico para macrófagos. Os dois marcadores para microvasos mostraram uma diferença estatisticamente desprezível em relação a coloração ($p < 0,001$). Os mesmos marcadores foram testados em diferentes estágios de tumores, com um nível de significância de marcação $p < 0,05$.

Outro trabalho utilizando a lectina de *Ulex europaeus* (UEA-I), que se liga especificamente a L-fucose, testou cinco casos de endométrio proliferativo, cinco de hiperplasia, e cinquenta e quatro de carcinoma do endométrio. Nos casos de endométrio proliferativo, a lectina mostrou marcação somente no lúmen, nos casos de hiperplasia e carcinoma foi constatada uma coloração difusa do citoplasma. Carcinomas mais avançados apresentaram um alto percentual de células marcadas e possuíam maior tendência à invasão vascular e miometrial. O estudo sugere que o aumento na fucosilação das proteínas em células cancerosas do endométrio representa um importante papel na invasão vascular e miometrial (AMBROS & KURMAN, 1993).

Lectinas de *Canavalia ensiformis* (Con A), *Lens culinaris* (LCA), *Phaseolus vulgaris* eritroaglutinina (e-PHA) e *Phaseolus vulgaris* leucoaglutinina (l-PHA), marcadas com biotina, foram estudadas em endométrio (camada mucosa uterina) normal, com hiperplasia e neoplasia. Pelos resultados, os autores concluíram, com pouca diferença na marcação, que a mudança na distribuição da ligação das moléculas de lectinas nas células endometriais está associada com o estado de malignidade, enquanto que a extensão de ligação da lectina Con A-lat (ação prolongada da tireóide) reflete o comportamento biológico do tumor (SIVRIDIS *et al.* 2000).

Nos tecidos humanos normais e transformados de mama, as lectinas da subtribo *Diocleinae* reconheceram estruturas com resíduos de manose e/ou glucose disponíveis para a sua ligação. Entre os casos das lesões estudadas com as lectinas trabalhadas, observamos nos ensaios que foram marcados os epitélios ductar e acinar em graus diferenciados. Tanto nas lesões benignas (fibroadenoma) quanto malignas (carcinoma ductal infiltrante), uma pequena marcação do estroma foi observado. Semelhante aos outros tecidos relatados acima, constatou-se uma diferença na intensidade de marcação nas células

transformadas, o que mostra que as mesmas apresentam uma reatividade que acompanha o grau de diferenciação histológica, de acordo com a literatura.

Lectinas têm sido usadas para estudar as ligações a tecidos mamários normais e transformados, comparando-as com a reatividade e localização dos nódulos linfáticos transformados (WALKER, 1985). O padrão de ligação das lectinas de *Helix pomatia* (HPA) à metástases cerebrais, originadas de câncer mamário, e as propriedades dessas ligações permitem identificar quais as glicoproteínas que ligam HPA, para definir mais precisamente as que estão associadas à metástase (SCHUMACHER *et al.*, 1992). Ainda, lectinas têm servido para avaliar linhagem de célula de câncer mamário humano (SCHUMACHER *et al.*, 1995).

BELTRÃO, *et al.* (1998), avaliando a ligação da isoforma 1 da lectina de *Cratylia molis* (Cra Iso 1) em tecidos mamários humanos, mostrou que a Cra Iso 1 ligava-se a tecidos neoplásicos com mais intensidade do que normais, quando comparou com Con A.

Identificar marcadores confiáveis de potenciais metastáticos é crucial para o desenvolvimento do sucesso no tratamento da terapia do câncer. As lectinas de *Helix pomatia* (HPA), que têm especificidade pelo monossacarídeo N-acetil galactosamina (GalNAc), e a lectina de *Phaseolus vulgaris* leucoaglutinina (PHA-I), a qual reconhece oligossacarídeos β -1-6 ramificados, têm sido relatadas por serem valiosas na marcação de células cancerosas de mama e cólon. Essas duas lectinas oferecem padrões muito diferentes de marcação e a HPA foi mais freqüentemente associada com metástase do que a PHA-I (MITCHELL *et al.*, 1998).

Nossos resultados mostram que em todos os tecidos humanos estudados - sistema nervoso central, colo de útero e mama - as lectinas do gênero *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*, reconhecem glicoconjugados, do tipo glicoproteína, glicolípido e proteoglicanos, com resíduos disponíveis de glucose e/ou manose para sua interação com os mesmos.

A estrutura final da porção de oligossacarídeos em uma glicoproteína depende, além da natureza da glicoproteína e do tipo de célula que a produz, do estado de diferenciação da célula. Para células transformadas, depende do nível de transformação. Isso também é verdadeiro para os glicolípidos. Tem sido reconhecido que modificações na porção do carboidrato de glicoproteínas

e glicolípídeos da superfície de células transformadas estão envolvidas nas propriedades metastáticas destas células.

Tecidos com lesões benignas e malignas possuem normalmente uma maior quantidade de açúcares nas suas superfícies celulares, passíveis de reconhecimento pelas lectinas, o que pode representar um aumento no número de sítios para a ligação dessas moléculas. Essas evidências podem justificar o aumento da intensidade de marcação, à medida que essas modificações se tornam histologicamente menos diferenciadas.

Todas as lectinas testadas neste trabalho apresentaram claras evidências de que padrões específicos de ligação estão associados às transformações celulares que ocorrem durante os processos neoplásicos e que estas lectinas aumentaram a intensidade de marcação com o aumento na malignidade dos tecidos.

Quando, por outro lado, se comparam os resultados obtidos com a marcação nos tecidos humanos do sistema nervoso central, normais e neoplásicos, das lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Dioclea altissima*, utilizadas em diferentes situações de pH, observamos que em pH 4,0, as lectinas, embora possuam a forma molecular monomérica com Mr em torno de 27-30 kDa e apresentarem pouca interação com a coluna de Sephadex, mostraram marcação diferenciada com as células.

As lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Dioclea altissima*, tanto no pH 4,0 como no pH 7,0 nas células normais, comportaram-se da mesma maneira, apresentando marcação fraca. Entretanto, quando estas mesmas lectinas em pH 4,0 foram analisadas nos tecidos neoplásicos, pode ser observado que, mesmo na forma monomérica, marcaram moderadamente os astrocitomas fibrilares do sistema nervoso central, enquanto que nos tecidos do glioblastoma multiforme, somente a lectina de *Cratylia floribunda* mostrou um padrão idêntico de marcação; já as lectinas *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea altissima* interagiram fracamente nestas mesmas superfícies celulares. Por outro lado, nos carcinomas metastáticos do sistema nervoso central, as lectinas de *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda* também mostraram o mesmo padrão de marcação (+), enquanto que a lectina de *Dioclea altissima*, mesmo na forma monomérica, apresentou um padrão de marcação moderado (++) . Desta maneira, podemos afirmar que o

comportamento das lectinas nas estruturas glicanas das membranas plasmáticas de células humanas do SNC não correspondem ao mesmo observado com carboidrato presente na coluna de SEPHADEX.

Estes resultados mostraram que as lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Dioclea altissima*, representantes da subtribo *Diocleinae*, quando analisadas em diferentes valores de pH, apresentaram um equilíbrio pH dependente entre as formas monoméricas e diméricas quando interagiram com a coluna de Sephadex, mas o mesmo comportamento não torna-se evidente quando analisadas nas superfícies celulares de tecidos normais e transformados. Estes resultados sugerem que as lectinas possuem uma larga flexibilidade de reconhecimento e interação com monossacarídeos e estruturas glicanas complexas, presentes nas glicoproteínas das membranas celulares, e que esta interação independe da forma molecular.

As lectinas puras autóctones da subtribo *Diocleinae* estudadas, tanto nas lesões malignas e benignas como nos tecidos normais, foram inibidas por D-glucose, D-manose e metil- α -D-manopiranosídeo, nos diferentes valores de pH testados, sendo este último carboidrato o mais potente inibidor da superfície celular. Estes resultados concordam que a interação das lectinas com os açúcares não é afetada pela variação do pH nas superfícies celulares. Por outro lado, estas lectinas mostraram competências semelhantes como marcadores histoquímicos.

CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar o desempenho de um sistema de controle de qualidade em um processo de fabricação de peças metálicas. Para isso, foram coletados dados de inspeção durante um período de seis meses, analisando-se a incidência de defeitos e a conformidade com as especificações técnicas. Os resultados demonstraram que o sistema adotado é eficaz para a detecção precoce de falhas, permitindo a correção imediata e a redução da taxa de rejeição. Além disso, a implementação de controles estatísticos contribuiu para a melhoria da estabilidade do processo e para a redução da variabilidade das dimensões das peças. Conclui-se que a adoção de um sistema robusto de controle de qualidade é essencial para garantir a qualidade e a eficiência em processos industriais.

7. CONCLUSÃO

7 . CONCLUSÃO

Todas as lectinas testadas neste trabalho apresentaram claras evidências de que padrões específicos de ligação estão associados às transformações celulares que ocorrem durante os processos neoplásicos, e que estas lectinas aumentaram seu padrão de marcação com o aumento na malignidade dos tecidos.

As lectinas avaliadas neste trabalho podem servir de marcadores histoquímicos para neoplasias benignas e malignas nos tecidos humanos do sistema nervoso central, colo uterino e mama.

8 - Referências Bibliográficas

- ABDULLAEV, F.I. & deMEJIA, E.G., (1997) Antitumor activity of natural substances: lectins and saffron. **Archivos Latinoamericanos De Nutricion**, 47 (3): 195-202.
- ABRAMNEKO, I.V., GLUZMAN, D.F., SKLYARENKO, L.M., PISNYACHEVSKAYA, G.V., PINCHOUK, V.G., (1991). Immunocytochemical staining of cells in 153 pleural effusions with a panel of monoclonal antibodies and lectins. **Anticancer Res.** 11 (2): 629-634.
- AGRAWAL, B. B. & GOLDSTEIN, I. J., (1965). Specific binding of Concanavalin A to cross-linked dextran gels. **The Biochemical Journal**, 96: 23-25.
- AINOUZ, I. L., MOREIRA, R. A., CAMPOS, F. A. P., RICHARDSON, M., BEGBIE, R., STEWART, J. C., WATT, W. B. & PUSZTAI, A. (1987). The isolation and amino acid sequence of the beta and gama subunits of the lectin fro the seeds of *Dioclea grandiflora*. **Phytochemistry**, 26 (5): 1435-1440.
- ALLEN, N. K., BRILLIAN, L., (1969). A survey of hemagglutinins in various seeds. **Journal of Immunology** 102 (5), 1295-&.
- ALTER, G. M., MAGNUSON, J. Á., (1974) Characterization of concanavalin a sugar binding-site by f-19. **Nuclear Magnetic-Resonance Biochemistry**, 13 (19): 4038-4045
- AMBROS, R. A., KURMAN, R. J, (1993) Association of ulex-europaeus agglutinin-i binding with invasion in endometrial carcinoma. **International Journal of Gynecological Pathology** 12 (4) 301-306.

- ANDRADE, L.A. (1999) Aparelho gênito-urinário In FARIA, J.L. 2ª edição, **Patologia especial com aplicações clínicas**, Ed. Guanabara Koogan.
- ANDERSEN, B. L., FARRAR, W. B., GOLDEN-KREUTZ, D., KUTZ, L. A., MACCALLUM, R., COURTNEY, M. E., GLASER, R., (1998) **Journal of the national cancer institute** 90 (1) 30-36.
- AUB, J.C., TIESLAU, C. & LANKESTER, A. (1963) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 50, p. 613.
- AVRAMEAS, S., KARSENTI, E., BORNES, M. (1976) Peroxidase – Concanavalina A. Method : Application in light and electron microscopy. In: BITTIGER, H., SCHNEBLI, H.P. **Concanavalina A as a Tool**. London, John Wiley e Sons, 85-93.
- BANERJEE, S., ROBSON, P., SOUTTER, W.P., FOSTER, C.S., (1995) Modulated expressoion of glycoprotein oligosaccharides identifies phenotypic differentiation in squamous carcinomas of the human cervix. **Human pathology** 26 (9) : 1005- 1013.
- BARDOSI, A., DIMITRI, T., GABIUS, H-J., (1988) (Neo)glycoproteis as tools in neuropatholy : histochemical patterns of the extent of expression of endogenous carbohydrate-binding receptors, like lectins, in meningiomas. **Virchows Arch. B. Cell. Pathol.** 56: 35 – 43.
- BARONDES, S.H., GITT, M.A., LEFFLER, H. & COOPER, D.N.W. (1988) Multiple soluble vertebrate galactoside-binding lectins. **Biochimie**, 70: 1627-1632.
- BARRALNETTO, M., SANTOS, S. B., BARRAL, A., MOREIRA, L. I. M., SANTOS, C. F., MOREIRA, R. A, OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B. S., (1992). **Immunological Investigations**, 21: (4) 297-303.

- BARRALNETTO, M., VONSOHSTEN, R. L. , TEIXEIRA M. , DOS SANTOS, W. L. C., POMPEU, M. L., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B. S., FALCOF, F. E., BARRAL, A., (1996). **Acta Tropica** **60**: (4) 237-250.
- BASHAM, T. Y., WAXDAL, M. J., (1974). Mitogenic activities of 5 lectins from *Phytolacca americana*. **Federation Proceedings** **33**: (3) 793-793.
- BECKER, J.W., REEKE, G.N., WANG, J.L., CUNNINGHAM, B.A. & EDELMAN, G.M. (1975). The covalent structure and three-dimensional structure of concanavalin A III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **J. Biol. Chem.**, **250**(4): 1513-1524
- BELTRÃO, E. I. C., CORREIA, M. T. S., FIGUEREDO-SILVA, J., COELHO, L. C. B. B., (1998) Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Biochemistry and Biotechnology** **74**: 125-134.
- BENTO, C. A. M., CAVADA, B. S., OLIVEIRA, J. T. A., MOREIRA, R. A., BARJAFIDALGO C., (1993). rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant-lectins. **Agents and Actions** **38**: (1-2) 48-54.
- BIRD, G. W. G., (1951) Specific agglutinating activity for human red blood corpuscles in extracts of *Dolichos biflorus*. **Current Science**, **20**:298-299.
- BOLAND, C. R., & ROBERTS, J. Á., (1988). Quantitation of lectin binding-sites in human-colon mucins by use of peanut and wheat-germ agglutinins. **Journal Of Histochemistry & Cytochemistry** **36**: (10), 1305-1307.
- BOLAND, C.R., CHEN, Y.F., RINDERLE, S.J., RESAU, J.H., LUK, G.D., LYNCH, H.T., (1991). Use of lectin from *Amaranthus caudatus* as a histochemical probe of colonic epithelial cells. **Cancer Res.** **51** (2) : 657-665.
- BRINKMANN, U. & PASTAN, I., (1994) Immunotoxins against cancer. **Biochim. Biophys. Acta.**, **1198**, 27-45.

- BROOKS, S.A. & LEATHEM, A. J (1995) Expression of alpha-GalNAc glycoproteins by breast cancer. **British Journal of Cancer** **71** : 1033-1038.
- BROOKS, S.A., LEATHEM, A. J., CAMPLEJOHN, R.S., GREGORY, W. (1993) Markers of prognosis in breast cancer : The relationship between binding of the lectin HPA and histological grade, SPF, and ploidy. **Breast Cancer Res Treat** **25** (30): 247-256.
- BROWN, J.C. & HUNT, R.C., (1978) Lectins. **Int. Ver. Citol.**, **52**, 277-349.
- BROWN, R. F. R. & WHITE, D. E., (1997) Ultrastructure of rat lung following inhalation of ricin aerosol. **International Journal of Experimental Pathology** **78** (4) : 267-276.
- BURES, L., MOTYCKA, K., BOSTIK, J., SLAVIK, K., JIRASEK, A., (1986). The use of protein as carrier of methotrexate for experimental cancer chemotherapy. II Chemotherapy of Gardner lymphosarcoma with pea seed lectin-methotrexate derivative. **Neoplasma** **33** (4): 409-416.
- BURGER, M. M., (1969) A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells. **Proc Natl Acad Sci USA.**, **62**, 994-1001.
- BURNET, F.M. (1951) Mucoproteins in relation to virus action. **Physiol. Ver. V.** **31**, p.131-150.
- BUSSING, A., STEIN, G.M., PFULLER, U., SCHIETZEL, M. (1999) Differential binding of toxic lectins from *Viscum album* L. ML I and ML II, to human lymphocytes. **Anticancer Res** ,**19** (6B) : 5095-5099.
- CAVADA, B. S., RAMOS, M.V., CORDEIRO, E.F., GRANGEIRO, T.B., OLIVEIRA, J.T.A., CARVALHO, A.F.F.V. & MOREIRA, R.A. (1996)

Purification and parcial chacterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth. Seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8 (1): 34-42.

CHO, S. K., YEH, J. C., CHO, M., (1996). Transcriptional regulation of α 1,3-galactosyltransferase in embrional carcioma cells by retinoic acid: masking of Lewis x antigens by α -galactosylation. In **J. Biol. Chem.**, **271**, 3238-3246.

CHRISPEELS, M.J.; HARTL, P.M.; STURM, A. & FAYE, L. (1986). Characterization of the endoplasmatic reticulum-associated precursor os Concanavalin A. **J. Biol. Chem.**, v. **261(22)**: 10021-10024.

COLTON, C. A., ABEL, C., PATCHETT, J., KERI, J., YAO, J. B. (1992). Lectin staining of cultured cns microglia. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, **40**: (4) 505-512.

CLAUSEN, J. (1969). Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules, in T. S. Work and E. Work **Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology**. North-Holland Publishing Company-Amsterdam-London.

COOK, G.M., (1986). Cell surface carbohydrates: molecules in search of a funtion. **J. Cell. Sci., suppl. 4**, 45-70.

COOPER, H. S. (1982). Peanut lectin-binding sites in large bowel carcinoma. **Lab. Invest.** **47** : 383-390.

COSTA-BARBOSA, T. (1997). Ativação linfocitária e apoptose em linfonodos de camundongos BALB/c tratados com lectinas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, 70pp, Salvador, BA.

CUMMINGS, R. D. (1994). Use of lectins in analysis of glycoconjugates. **Meth. Enzymol.** **230**: 66-86.

CUMMINGS, R. D. (1997). Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization. In glyco-sciences, status and perspectives. Edited by Gabius, H.J. & Gabius, S. Chapter 10. **Published by Champman & Hall GmbH**, Weinheim, Germany, 191-199.

DAM, T. K., CAVADA, B.S., GRANGEIRO, T. B., SANTOS, C. F., DE SOUSA, F.A.M., OSCARSON, S., BREWER, C. F., (1998) Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagines-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **Journal of Biological Chemistry** **273** : (20) 12082-12088.

DAS, R. H., KALSI, G., BABU,C.R. (1993) Lectins activities in developing roots of peanuts (*Arachis hypogaea*) . In: J. Basu, M. Kandu and P. Chakrabati, Eds. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Wiley Eastern Ltda, Índia vol 9 pp 35-43.

DALL'OLIO, F. (1996). Protein glycosylation in cancer biology: an overview. **J. Clin. Pathol: Mol. Pathol.** **49**: M126-M135.

DAVIDSON, B., GOLDBERG, I., GOTLIEB, W. H., LERNER-GEVA, L., BEN-BARUCH, G., NOVIKOV, I., KOPOLOVIC, J., (1999). Macrophage infiltration and angiogenesis in cervical squamous cell carcinoma-clinicopathologic correlation. **Acta Obstet Gynecol Scand** **78(3)** : 240-244.

DE ROBERTIS, E.D.P.& DE ROBERTIS, E.M.F. (1993). **Bases da Biologia Celular e Molecular** 2^a edição. Ed. Guanabara Koogan.

DETERMANN, H. (1969). Gel filtration. Gel permeation. Molecular sieves. In: **Gel Chromatography**. 2^a ed. Springer-Verlag. New York, 202 pp.

DEVLIN, T. M. (1998). **Manual de Bioquímica com correlações clínicas.**

Tradução da 4^a edição americana. Ed. Edgard Blucher

DI-STEFANO, D., MINGAZZINI, P.L., SCUCCHI, L., DONNETTI, M., MARINOZZI, V., (1991). A comparative study of histopathology, hormone receptors, peanut lectin binding, Ki-67 immunostaining, and nucleolar organizer region-associated proteins in human breast cancer. **Cancer** **67** (2) : 463-471.

DIXON, H. B. F. (1981), Defending a Lectin. **Nature** **292**: 192

DoPRADO, F. J., ZAMBELLI, J. E., MELO-LIMA, M.H., DaSILVA, R. G., (1998). The hyperinsulinemia produced by concanavalin A in rats is opioid-dependent and hormonally regulated. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **31** (5): 697-703.

DU, M. Q., HUTHCINSON, W. L., JOHNNSON, P. J., WILLIAMS, R., (1991). Differential alpha-fetoprotein lectin binding in hepatocellular carcinoma : Diagnostic utility at low serum levels. **Cancer** **67** (2): 476-480.

EHRlich, P., (1891). Experimentelle Untersuchungen uber Immunitat. I. Uber Ricin. **Dtsch. Med. Wschr.**, **17**: 976, apud Gold & Balding 1975.

FABREGAS, J., MUÑOZ, A., LLOVO, J. & CARRACEDO, A., (1988). Purification and partial characterization of tomentine: na N-acetylglucosamine-specific lectin from the green alga *Codium tomentosum* (Huds.) Stackh. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, **124**: 21-30.

FRANCO, E. L., (1994). Cancer epidimiology : Substances and Methods. **Ciência e Cultura** , **46** (1/2): 49-52.

GABIUS, H. J., GABIUS, S., (1993). Detection of tumor-associated expression of carbohydrate-binding proteins (lectins) : The use of neoglycoproteins and

neoglycoenzymes in glycohistochemical and glyco cytological studies.
Methods Mol. Biol, **14** : 263-275.

GAHMBERG, C. G., HAKOMORI, S. (1974). Organization of glycolipids and glycoproteins in surface membranes - dependency on cell-cycle and on transformation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **59** (1) : 283-291.

GANGULY, C., DAS, S. (1994) Plant lectins as inhibitors of tumour growth and modulators of host immune response. **Chemotherapy**, **40** (4) : 272-8.

GIOANNINI, T., FOUCAUD, B., HILLER, J. M., HATTEN, M. B., SIMON, E. J., (1982). The Opiate Receptor Is A Glycoprotein - Evidence From Lectin. **Affinity-Chromatography Federation proceedings**, **41** (4), 1031-1031.

GOMES, J. C., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A. (1994) Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins isolated from Brazilian plants. Comparison with Concanavalin A. **Agents and Action**, **41** : 132-135.

GRAUBERT, T. A., LEY, T. J. (1996). How do lymphocytes kill tumor cells? **Clinical Cancer Res.**, **2**: 785-789.

GRAY, A.M., FLATT, P.R. (1999) Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant *Viscum album* (mistletoe) **J. Endocrinol**; **160**(3) : 409-14.

HAAS, H., FALCONE, F. H., SCHRAMM, G., HAISCH, K., GIBBS, B. F., KLAUCKE, J., POPPELMANN, M., BECKER, W. M., GABIUS, H. J., SCHLAAK, M. (1999) Dietary lectins can induce in vitro release of IL-4 and IL-13 from human basophils. **Eur J Immunol**; **29**(3) : 918-27.

- HARDMAN, K. D., AINSWORTH, C. F. (1976) Structure of the concanavalin A-methyl alpha-D-mannopyranoside complex at 6-A resolution. **Biochemistry** **15(5)** : 1120-8.
- HEDO, J. A., HARRISON, L. C., ROTH, J., (1981). Binding of insulin-receptors to lectins - evidence for common carbohydrate determinants on several membrane-receptors. **Biochemistry**, **20**: (12) 3385-3393.
- HELLIN, H. (1891). Der giftig Eiweisskörper Abrin und dessen Wirkung auf das Blut. Tese de doutorado, Dorpat, apud GOLD & BALDING 1975. **Histology and Histopathology** **13 (1)**: 73-79 .
- HOLT, S., WILKINSON, A., SURESH, M. R., (1984). Radiolabelled peanut lectin for scintigraphic detection of cancer. **Cancer Lett.** **25**: 55-60.
- HSU, D. K., YANG, R. Y., PAN, Z., YU, L., SALOMÓN, D. R., FUNG-LEUNG, W. P., LIU, F.T. (2000) Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. **Am J Pathol.** ; **156 (3)** 1073-83.
- HUNGERFORD, D. A., DOHNELLY, A. J., NOWELL, P. C. & BECK, S., (1959). The chromosome constitution of a human phenotype intersex. **Am. J. Hum. Genet.**, **11**, 215.
- INBAR, M. & SACHS, L., (1969). Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin a with normal and transformed cells. **Proc. Natl. Acad. Sic. USA**, **63**, 1418.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J., (2000). **Biologia Celular e Molecular** 7ª edição, Ed. Guanabara- Koogam .

KAKEJI, Y., TSUJITANI, S., MORI, M., MAEHARA, Y., SUGIMACHI, K.(1991)
Helix-pomatia agglutinin binding-activity is a predictor of survival-time for
patients with gastric-carcinoma. **CANCER. 68** (11) 2438-2442.

KANNAN, S., BALARAM, P., CHANDRAN, G. J., PILLAI, M. R., MATHEW, B.
NAIR, M. K., (1993). Expression of lectin-specific cellular glycoconjugates
during oral carcinogenesis. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** **119** (11): 689-694.

KARUNA, V., SHANTHI, P., MADUDVAN, M. (1992). Lectin binding patterns in
benign and malignant lesions of the breast. **Indian J. Pathol. Microbiol.**
35(4): 289-297.

KENNEDY, J. F., PALVA, P. M. G., CORELLA, M. T. S., CAVALCANTI, M. S.
M., COELHO, L. C. B. B., (1995). Lectins, versatile proteins of recognition -
a review. **Carbohydrate Polymers**, **26** (3): 219-230.

KILPATRICK, D. C., (1991). Lectin interactions with a human leucocytes:
mitogenicity, cell separations, clinical applications. **Lectins Reviews.**, **1**,
69-80.

KIOTA, S. (1993) Lectina de sementes de *Dioclea grandiflora* Mart. Atividade
mitogênica e indução da produção de interferon **Dissertação de Mestrado**
apresentado ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da
Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 66p.

KIM, M., RAO, M. V. & TWEARDY, D. J. (1993). Lectin-induced apoptosis of
tumor cells. **In Glycobiol.**, **3**: 447-453.

KLEIN, P. J, VIERBUCHEN, M., SCHULZ, K D., FARRAR, G., FISCHER, J.,
UHLENBRUCK, G., FISCHER, R., (1983). Histochemical tumor-markers for
evaluation of hormone dependence in breast-cancer. **Cancer Detection**
and Prevention 6: (1-2), 199-206.

- KLEIN, P. J., VIERBUCHEN, M., WURZ, H., SCHULZ, K. D. & NEWMAN, R. A., (1981). Secretion-associated lectin-binding sites as a parameter of hormone dependence in mammary carcinoma. **British Journal of Cancer**, **44**:4 76-478.
- KOJIMA, S., JAY, M., (1986). Applications of lectins to tumor imaging radiopharmaceuticals. **Eur. J. Nucl. Med.** **13**: 366-370.
- KREIMER-BIRNBAUM, M., (1989) Modified porphyrins, chlorins, phthalocyanines, and purpurins: Second generation photosensitizers for photodynamic therapy. **Semin Hematol.** **26** (2): 157-173.
- KULKARNI, G. V. & McCULLOCH, C. A. G., (1995). Concanavalin A Induced Apoptosis in Fibroblasts: The Role of Cell Surface Carbohydrates in Lectin Mediated Cytotoxicity. **Journal of Cellular Physiology**, **165**:119-133.
- LAEMMLI, U. K., (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the Bacteriophage T4. **Nature**, v. **227**: 680-685.
- LALWANI, A. K., CAREY, T. E., GOLDSTEIN, I. J., PETERS, B. P., (1996). Lectin binding characteristics of squamous cell carcinomas of head and neck. **Acta. Otolaryngol.** **116**: 125-131.
- LANCE, P., LEV, R., (1991). Colonic oligosaccharide structures deduced from lectin-binding studies before and after desialylation. **Hum. Pathol.** **22**(4): 307-312.
- LASKY, L. A. () Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. **Science** **258**: 964-969.
- LAZARUS, D.D., TRIMBLE, L.A., MOLDAWER, L. L. (1998) The metabolic effects of pokeweed mitogen in mice. **Metabolism** **47** (1) : 75-82.

- LEATHEM, A. J. C., (1995). Expression of alpha-galnac glycoproteins by breast cancers. **British Journal of Cancer**. **71**: (5) 1033-1038.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M., (2000) **Princípios de Bioquímica**, 2^a reimpressão, Ed. Sarvier.
- LENNARTZ, D., DOTT, U., MENZEL, J., SCHIERHOLZ, J. M., BEUTH, J. (2000) Survival of glioma patients after complementary treatment with galactoside-specific lectin from mistletoe. **ANTICANCER RESEARCH**, **20**: (3B) 2073-2076.
- LICASTRO, F., DAVIS, L. J. & MORINI, M. C., (1993). Lectins and superatigens: membrane interactions of this compounds with T-lyphocytes affcts immune responses. **Int. J. Biochem.**, **25**, 845-852.
- LIENER, I. E., SHAROH, N. & GOLDSTEIN, I. J., (1986). The Lectins. Properties, Functions and Applications. In: **Biology and Medicine**, Academic Press. Inc. New York, 600.
- LIS, H. & SHARON, N., (1981). Affinity-chromatography for the purification of lectins - (A review). **Journal of Chromatography**, **215**:(1-3) 361-372.
- LIS, H. & SHARON, N. (1986) Application of lectins in Liener, I.E. Sharon, N. & Goldstein, I.J. The Lectins: **properties, functions, and applications in biology and medicine**. Academic Press, Inc. New York.
- LOYD, K. O, BITOON, M.A. (1971). Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from yeast form of sporothrix-schenckii - structural and immunochemical studies. **Journal of Immunology**, **107** (3) 663.
- LO, S. K., LEE, S., RAMOS, R. A., LOBB, R., ROSA, M., ROSSO, C. G., WRIGHT, S. P. (1991). Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac 1, $\alpha\text{M}\beta_2$) on human neutrophils. **J. Exp. Med.**, **173**: 1493.

- LOREA, P., GOLDSCHMIDT, D., DARRO, F., SALMON, I., BOVIN, N., GABIUS, H. J., KISS, R. & DANGUY, A. (1997). *In vitro* characterization of lectin-induced alterations on the proliferative activity of three human melanoma cell lines. **Melanoma Research**, 7 (5): 353-363.
- LORD, J.M., ROBERTS, L.M., ROBERTUS, J.D. (1994) Ricin : struture, modo of action and some current applications. **The Faseb Journal**, 308 (8): 201-208.
- LORD, J.M., ROBERTS, L.M. (1987) Plant Toxins **Microbiol Sci.**, 4 (12) : 376-8.
- LOVATT, M., YANG, T.H., STAUSS, H.J., FISHER, A.G., MERKENSCHLAGER, M. (2000) Different doses of agonistic ligand drive the maturation of functional CD4 and CD8 T cells from immature precursors. *Eur J Immunol*, 30 (2) : 371-81.
- LOUIS, C. J., SZTYNDA, T., CHENG, Z. M., WYLLIE, R. G., (1983). Lectin-binding affinities of human-breast tumors. **Cancer**, 52 (7), 1244-1250.
- LU, Y., CHANEY, W., (1993). Induction of n-acetylglucosaminyltransferase-v by elevated expression of activated-ha-ras oncogenes or proto-ha-ras oncogenes. **Molecular and Cellular Biochemistry** 122 (1), 85-92.
- MAHMOOD, N., HAY, A. J. (1992). An ELISA utilizing immobilized snowdrop lectin GNA for the detection of envelope glycoproteins of hiv and siv. **Journal of Immunological Methods** 151 : 9-13.
- MATSUMOTO, H., MURAMATSU, H., MURAMATSU, T., SHIMAZU, H., (1992). Carbohydrate profiiles shown by a lectin and monoclonal antibody correlates with metastatic potential and prognosis of human lung carcinoma. **Cancer**, 69 (8) : 2084-2090.

- MATSUMOTO, I., OSAWA, T., (1969). Purification and characterization of an anti-h(o) phytohemagglutinin of *ulex europaeus*. **Biochimica et Biophysica Acta** **194** (1), 180-&.
- MELCHERS, F, ANDERSSO, J., (1973). Synthesis, surface deposition and secretion of immunoglobulin m in bone marrow-derived lymphocytes before and after mitogenic stimulation. **Transplantation Reviews** **14**: 76-130.
- MITCHELL, B. S., BROOKS, S. A., LEATHEM, A. J. C., SCHUMACHER, U. (1998) Do HPA and PHA-L have the same binding pattern in metastasizing human breast and colon cancers?. **Cancer Letters** **123**: (1) 113-119.
- MONSIGNY, M., ROCHE, A. C., MIDOUX, P., (1988). Endogenous lectins and drug targeting. **Ann. N.y. Acad. Sci.** **551**: 399-414.
- MOREIRA, R.A., BARROS, A.C.H.; STEWART, J.C. and PUSZTAI, A (1983). Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* Mart. **Planta**, **158**: 63-69.
- MOREIRA, R. A. & CAVADA, B. S. (1984). Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.) Isolation, Characteization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, v. **26** (2): 113-120.
- MOREIRA, R. A. & PERRONE, J. C., (1977). Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. **59**, p. 783-787.
- MOREIRA, R. A., AINOUZ, I. L., OLIVEIRA, J. A. T. & CAVADA, B. S., (1991). Plant lectins, chemical and biologics aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **86** (II): 211- 218.
- MOREIRA, R. A.; CORDEIRO, E. F.; RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, T. D. & OLIVEIRA, J. T. A. (1996). Isolation and partial characterization of a lectin

from the seeds of *Dioclea violacea* Mattius (ex-Benth.) **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8 (1): 23-30.

MOREIRA, R. A.; MONTEIRO, A.C.O., HORTA, A.C.G., OLIVEIRA, J. T. A. & CAVADA, B.S. (1997). Isolation and characterization of *Dioclea altissima* var. *megacarpa* seed lectin, **Phytochemistry**, v.46 (1): 139-144.

MOREIRA, R.A. (1998) **Lectinas vegetais. Uma abordagem química e físico-química**. Tese de Titular. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 600p.

MOTA, D. M., (1997). **Pulchelinas, lectinas galactose-específicas de semente de *Abrus pulchellus*: purificação e estudos de propriedades químicas e biológicas**. Dissertação de Mestrado apresentado ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 120p.

MUNIZ-FILHO, W. E., (1997). **Estudo comparativo de representantes da sub-tribo *Diocleinae* (*Leguminosae-Phaseolae*) usando lectinas de sementes como modelos**. Dissertação de Mestrado apresentado ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 124p.

NAKANISHI, K., KAWAI, T., SUZUKI, M., (1993). Lectin binding and expression of blood group-related antigens in carcinoma-in-situ and invasive carcinoma of urinary bladder. **Histopathology** 23 (2): 153-158.

NORGARD, K. E., HAN, H., POWELL, L. KRIEGLER, M., VARKI, N. M., (1993). Enhanced interaction of L-selectins with high endothelial venule ligand via selectively oxidized sialic acids. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90(3) : 1068-1072.

- NOWELL, P. C., (1960). Phytohemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes. **Cancer Res.**20:462-466.
- OLIVEIRA, J. T. A., RAMOS, M. V., MOREIRA, R. A. & CAVADA, B. S. (1989). An anti-blood group A lectin from *Crptalaria striata* seeds. **Rev Bras. Bot.**, 14: 61-66.
- OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. & MOREIRA, R. A., (1991). Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. seeds. **Rev. Bras. Bot.**, v. 14: 61-66.
- PEREIRA, M. E. A, KABAT, E. A. (1979). Versatile immunoabsorbent capable of binding lectins of various specificities and its use for the separation of cell-populations. **Journal of Cell Biology**, 82: (1) 185-194.
- PEUMANS, W., DE LEY, M., STINISSEN, H.M. & BROEKAERT, W.F. (1985). Isolation and partial characterization of a new lectin from seeds of the greater celandine (*Chelidonium majus*). **Plant Physiol.**, 78: 379-383.
- PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M., (1994). Proposal for a novel system of nomenclature of plant lectins, IN VAN DRIESSCH, E., FISCHER, J., BEECKMANS, S. & BOGHANSEN, T. C. eds. **Lectins: Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 10. Textop Hellerup, denmark.
- PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M., (1998). Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 33(3): 209-258.
- PEREZ, G., PEREZ, C., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A. & RICHARDSON, M., (1991). Comparasion of the amino acid sequencis of the lectins from seeds od *Dioclea lehmanni* and *Canavalia matitma*. **Phytochemistry**, 30(8): 2619-2621.

- QUEIROZ, L.S.(1999) Sistema nervoso. In FARIA, J.L. 2^a edição, **Patologia especial com aplicações clínicas**, Ed. Guanabara Koogan.
- QUIOCHO, F. A., (1986). Carbohydrate-binding proteins - tertiary structures and protein-sugar interactions. **Annual Review of Biochemistry** **55**: 287-315 1986.
- RADEMACHER, T. W., PAREKH, R. B. & DWEK, R. A., (1988). Glicobiology. **Annu. Rev. Biochem.**, **57**, 785-838.
- RAMOS, M. V., (1996). **Características estruturais e funcionais de lectinas de *Diocleinae***. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará..120 p, Fortaleza.
- RAZI, N., VARKI, A. (1999) Cryptic sialic acid binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment or cellular activation. **Glycobiology** : **9 (11)** : 1225-34.
- REDDI, A. L., SANKARANARAYANAN, K., ARULRAJ, H.S., DEVARAJ, N., DEVARAJ, H. (2000). **Cancer Letters** **149**: 207.
- REMANI, P., PILLAI, K. R., HASEENABEEVI, V. M., ANKATHIL, R., BHATTATHIRI, V. N, NAIR, M. K., VIJAYAKUMAR, T. (1994). Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. **Neoplasma**, **41** (1): 39-42.
- REMMELINK, M., DARRO, F., DECAESTECKER, C., DE DECKER, R., BOVIN, N. V., GEBHART, M., KALTNER, H., GABIUS, H. J., KISS, R., SALMON, I., DANGUY, A. (1999). **Journal of Cancer research and clinical oncology**. **125 (5)** : 275-285.

- RICHARDSON, M., ROUGÉ, P., SOUSA-CAVADA, B. & YARWOOD, A. (1984). The amino acid sequences of the alfa1 and alfa2 subunits of the isolectins from seeds of *Lathyrus ochrus* (L) DC. **FEBS Letters**, 175(1): 76-81.
- ROBINS, S. L., COTRAN, R. S. KUMAR, V., (1996) **Patologia Estrutural e Funcional** 5ª edição; Ed. Guanabara Koogan
- ROGERS, D.J., FISH, B. & BARWELL, C.J. (1990). Isolation and properties of lectin from two red marine algae: *Plumaria elegans* and *Ptilota serrata*. In: BOG-HANSEN, T.C. ed.: **LECTINS. BIOLOGY, BIOCHEMISTRY, CLINICAL BIOCHEMISTRY.** Walter de Gruyter. Berlin/New York. pp. 49-52.
- RÜDIGER, H. (1997) Structure and function of plant lectins. In : **Glycosciences: Status and Perspectives**. Edited by Gabius, H.J. & Gabius, S. Published by Chapman & Hall Gmbh, Weinheim, Germany, 415-438.
- SAKAMOTO, M., INTO, Y., FUJJI, T., HIROHASHI, S., (1993). Phenotypic changes in tumor vessels associated with the progression of hepatocellular carcinoma. **Jpn. J. Clin. Oncol.** **23** (2): 98-104.
- SCHAEFER, R.L., KELLER, K.F. & DOYLE, R.J. (1979). Lectins in diagnostic microbiology: use of wheat germ agglutination for laboratory identification of *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Clin. Microbiol.** **10**: 669-672.
- SCHILL, J., CERVOS-NAVARRO, J., (1998). Lectin histochemistry of mixed gliomas demonstrating an intermediate cell type. (1998). **Histology and Histopathology** **13**: (1) 73-79.
- SCHUMACHER, U. (1995), Lectins and cancer – An old field revisited. In: **Lectins Biomedical perspectives** Edited by Pusztai, A. & Bardocz, S. Published by Taylor & Francis London, U.K., p, 211-224.

- SCHUMACHER, U., KRETZSCHMAR, H., BROOKS, S., LEATHEM, A., (1992). *Helix-Pomatia* Lectin Binding Pattern Of Brain Metastases originating from breast cancers. **Pathology Research and Practice** **188**: (3) 284-286.
- SCHWARTZ, N.B. (1998) Metabolismo de carboidratos II: Vias especiais In **DEVLIN T. M. 4ª edição Manual de bioquímica com correlações clínicas** Ed. Edgard Blücher.
- SELA, B. A., LIS, H., SHARON, L. & SACHS, J., (1970). Different locations of carbohydrate-containing sites in the surface membrane of normal and transformed mammalian cells. **J. Membrane Biol.**, **3**: 267.
- SEZAKI, H., HASHIDA, M., (1984). Macromolecule-drug conjugates in targeted cancer chemotherapy. **Crit. Rev. Ther Drug Carrier Syst.** **1** (1): 1-38.
- SHARON, N. & LIS, H., (1987). A century of lectin research (1888-1988). **TIBS**, **12**:488-491.
- SHARON, N. & LIS, H., (1989). Lectins as cell recognition molecules. **Science** **246**: 227.
- SHARON, N. & LIS, H., (1989). **Lectins**. 126 pp., Chapman and Hall. London. New York.
- SHARON, N., LIS, H., (1972). Lectins - cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, **177**: 949- 959.
- SHARON, N. & LIS, H., (1990). Legume lectins – a large family of homologous proteins. **FASEB J.** **4** : 3198-208.
- SHARON, N. & LIS, H., (1993). Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**, **268**:74.

- SHINAGAWA, K. & ANDERSON, G.P., (2000). Rapid isolation of homogeneous murine bronchoalveolar lavage fluid eosinophils by differential lectin affinity interaction and negative selection. **J. Immunol. Methods**, **237**: (1-2) 65-72.
- SIVRIDIS, E., GIATROMANOLAKI, A., KOUKOURAKIS, M., AGNANTIS, N. (2000). Lectin-binding patterns in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium : the prognostic value of concanavalin A. **Virchows Arch** **436** : (1), 52-58.
- SLIFKIN, M. & DOYLE, R. J., (1990). Lectins and their application to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, **3** (3), 197-218.
- SPRINGER, G.F. DESAI, P.R.(1982) Extent of desialation of blood group MM, NN, and MN antigens required for reativity with human anti-T antibody and *Arachis hypogaea* lectin. **J. Biol. Chem.** **257** (6) : 2744-2746.
- STEWART, L., SUMMERES, D. F., SOEIRO,R., FIELDS, B.N., MAIZEL, J. V. (1973) **Jr. Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **70** : 1308-1312.
- STEINEMA, A., STRYER, L. (1973). Accessibility of carbohydrate moiety of rhodopsin. **Biochemistry** **12**: (8) 1499-1502.
- STILLMARK, H (1888). **Über ricin, ein giftigs ferment aus den samen von *Ricinus communis*. L. und einigen anderen euphorbiaceen.** Thesis, Univ. Dorpad. (Citado por KOKOUREK, 1986).
- STOOLMAN, L.M. & ROSEN, S.D., (1983). Possible role for cell-surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation. **J. Cell. Biol.**, **96**(3): 722-729.
- STRYER, L. (1996) **Bioquímica** 4^a edição, Ed. Guanabara –Koogan

- SUMNER, J. B. & HOWELL, S. F. (1936) The identification of the hemagglutinin of the jack bean with cocanavalin A. **Journal of bacteriology**, **32**: 227.
- TEWS, D. S. (2000). Adhesive and invasive features in gliomas. **Pathology Research and Practice**. **196**: (10) 701-711.
- THRUSH, G., LARK, L. R., CLINCHY, B. C. & VITETTA, E.S. (1996). Immunotoxins: an update. **Annu. Rev Immunol.**, **14**, 49-71.
- VASCONCELOS, I. M.; CAVADA, B.S.; CAVADA; MOREIRA, R. A. & OLIVEIRA, J. T. A., (1991). Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **J. Food Biochemistry**, v. **15**: 137-154.
- VAUPEL, P., (1993) Oxigenation of solid tumors In : Tiercher BA (ed) **Drug resistance in oncology**. Marcel Dekker, New York, 53-85.
- VARKI, A.; CUMMININGS, R.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J.; (1999) **The essentials of glycobiology**. 653 pp., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- VIDAL-VANACLOCHA, F., GLAVES, D., BARBERA-GUILLEM, E., WEISS, L.(1991) Quantitative microscopy of mouse colon 26 cells growing in different metatatic sites. **Br. J. Cancer**₆₃ (5) : 748-752.
- WALKER, R.A., (1990). Assessment of milk fat globule membrane antibodies and lectins as markers of short-term prognosis in brest cancer. **Br. J. Cancer**₆₂ (3) : 462-466.
- WALKER, R. A., (1985). The binding of peroxidase-labeled lectins to human-breast epithelium .4. The reactivity of breast carcinomas to peanut, soy bean and dolichos-biflorus agglutinins. **Journal of Pathology** **145**: (3) 269-277.

- WANG, BAO-LE., SPRINGER, G.F., CARISTEDT, S. C., (1997). Quantitative computerized image analysis of Tn and T (Thomsen-Friedenreich) epitopes in prognostication of human breast carcinoma. **J. Histochem. And Cytochem** 45 (10) : 1393-1400.
- WAXDAL, M.J. (1974). Isolation, characterization, and biological activities of five mitogens from pokeweed. **Biochemistry**, 13(18): 3671-3677.
- WHITTAKER, R.H. (1969). New concepts of Kingdoms of organisms. **Science** 163: 150 -160.
- WILCHEK, M. & MIRON, T., (1999). Thirty years of affinity chromatography. **Reactive & Functional Polymer**, 41:263-268.
- YEATMAN, T. J., NICOLSON, G. L., (1993). Molecular-basis of tumor progression - mechanisms of organ-specific tumor-metastasis. **Seminars in Surgical Oncology**. SEMINARS IN SURGICAL ONCOLOGY. 9:(3) 256-263.
- YOUNG, A., SUMAR, N., BODMAN, K.B., GOYAL, S., SINCLAIR, H., ROITT, I. & ISENBERG, D. (1991). Agalactosyl IgG: an aid to differential diagnosis in early synovitis. **Arth. Rheum.**, 34, 1425-1429.
- ZARKOVIC, N., KALISNIK, T., LONCARIC, I., BOROVIĆ, S., MANG, S., KISSEL, D., KONITZER, M., JURIN, M. & GRAINZA, S., (1998). Comparison of the effects of *Viscum album* lectin ML-1 and fresh plant extract (Isorel) on the cell growth *in vitro* and tumorigenicity of melanoma B16F10. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, 13: (2) 121-131.