

**UTILIZAÇÃO DE LECTINAS NA CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ANTÍGENOS  
DE NATUREZA GLICÍDICA PRESENTES NA MEMBRANA DE CINCO VARIANTES  
DE CÉLULAS DE CANCER DE CÓLON HUMANO**

**VICENTE DE PAULO TEIXEIRA PINTO**

**TESE APRESENTADA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
DOUTOR EM BIOQUÍMICA PELA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FORTALEZA – 2001**

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

A transcrição de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que sejam respeitadas as normas da ética científica.

Vicente de Paulo Teixeira Pinto

Tese aprovada em 24 / 08 / 2001

Dr. Benildo Sousa Cavada  
Orientador de Tese - Presidente  
DBBM – UFC

Dr. Henri Debray  
Co-Orientador  
Université des Sciences et  
Technologie de Lille

Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro  
Conselheiro  
Depto. Farmacologia e Fisiologia – UFC

Dra. Ilka Maria Vasconcelos  
Conselheira  
DBBM – UFC

Dr. Carlos Bloch  
Conselheiro  
EMBRAPA/CENARGEM/UNB

“Fantasiar com um motivo, contemplar com  
consideração, ser feliz suavemente, sofrer  
com nobreza – e, depois, esvaziar a taça  
para que o amanhã a encha de novo”

Gibran Khalil Gibran

A minha esposa Alrieta e a nosso filho Matheus

A meus Pais e amigos

A meus orientadores Benildo e Henri

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Benildo Sousa Cavada, orientador desta Tese, pela desmedida amizade e determinação que sempre procurou semear em mim; pela confiança em mim depositada ao longo de toda minha vida acadêmica; por sua humildade e pelo jeito paterno com o qual sempre me tratou. Por me fazer acreditar num futuro grandioso, vendo em mim aquele que na maioria das vezes desconheço. Por sua obstinação em viabilizar a realização de experimentos que fazem crescer a todo grupo de Pesquisa BioMol-Lab, o qual lidera com severa leveza. Pelo apoio que me deu quando de sua visita a Lille, durante a realização de parte dos experimentos desta Tese; Por ter acreditado no meu trabalho e nas idéias que ousei ter desde o princípio da Iniciação Científica. Que a sua loucura nos cure da mediocridade, nos poupe da melancolia e nos presenteie com a possibilidade de sucesso.

Ao Dr. Henri Debray, do Laboratoire de Chimie Biologique - Université des Sciences et Technologies de Lille, pela maneira entusiástica com a qual me orientou durante o período em que fiz parte de sua equipe. Por me ter acolhido de modo tão distinto; pela orientação criteriosa e extrema dedicação dispensada a meu tema de pesquisa. Por seu empenho em viabilizar um estágio de pesquisa no Laboratório de Imunologia do Câncer em Wrocław – Polônia, sem o qual não haveríamos realizado os experimentos de microscopia confocal. E, principalmente, pelo importantíssimo apoio e, mas que isso, amizade, dispensado a mim e minha esposa, estrangeiros num País distante e discriminador.

Aos professores, pesquisadores, estudantes de Doutorado e Técnicos do Laboratoire de Chimie Biologique - Université des Sciences et Technologies de Lille, em especial a: Mr. Montreuil, Mr. Mazurier, Mr. Strecker, Mr. Timmerman, Mr. Leroy, Mr. Ricard, Mr. e Mme Bohin, Manu, Gui, Mme Brassart, Mme, Janine, Mme Dondeinne, Mme Autexier.

Ao Dr. Marcio Viana Ramos pelo incentivo que sempre me deu e por seu empenho, fundamental para a aprovação do Projeto CAPES/COFECUB através do qual obtive a bolsa de Doutorado Sanduíche.

A Dr. Danuta Dus e sua equipe do Laboratório de Imunologia do Câncer – Wrocław/Polônia, pelo valioso auxílio concedido na forma de estágio em sua equipe de pesquisa e por haver-me presenteado com sua atenção e amizade, o que possibilitou nosso perfeito entrosamento, mediado por toda a transcendência do verbo To be.

Aos brasileiros e demais amigos que dividiram comigo os momentos de alegria e de dor em Lille, em especial: Marcio, Lia, Julio, Aroldo, Bruno, Fabio, Laurival, Gislaine, Julio Reies, Veronica.

Aos estudantes da Ecole Centrale des Ingenieres de Lille, que muito contribuíram com momentos de felicidade e para a manutenção de minha (nossa) sanidade, pois sempre perdiam de goleada para nós brasileiros no futebol.

A Dra. Ilka Maria Vasconcelos, pela amizade, companheirismo e pelo estímulo a minha carreira docente.

Ao Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pelo exemplo de competência científica e pelas sugestões relevantes na elaboração desta Tese.

Ao Dr. Carlos Bloch, pelas sugestões apresentadas e por sua participação na avaliação final deste trabalho.

Aos colegas de Doutorado, Darlio e Flavia, pela verdadeira amizade e pela força dispensada ao longo de nossa trajetória no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Aos Professores Alexandre Holanda Sampaio e Albenísio Gomes da Silveira, pela amizade e incentivo que sempre me dispensaram, fazendo-me acreditar na possibilidade de realizar algo digno.

Aos amigos do BioMol-Lab, pela amizade, carinho, compreensão e por toda ajuda que direta ou indiretamente me deram durante a realização deste trabalho.

De coração agradeço a todos: Bia, Kátia, Fernanda, Carlinhos, Marcelo, Tércio, Kyria, Karoline, Ingrid, Rolando, Pepeu e Nagano.

Aos colegas professores e ao secretário do curso de medicina da UFC, do campus avançado de Sobral, pela amizade e compreensão a mim dispensadas e por haver-me apoiado durante a parte final deste trabalho.

A meus eternos companheiros e amigos: Marquinhos, Silvério e Cléber pela força que sempre me deram e pela desmedida amizade que sempre me dispensaram.

A minha família: Jauro, Mariinha, Carlinhos, Valda e Nicole que me ensinaram que ser bom e justo é a forma mais simples de se tornar feliz.

A minha esposa Alrieta, formidável companheira, que a tudo abdicou para me acompanhar a Lille durante o doutorado. Sem ela tenho certeza que dificilmente teria conseguido realizar esta Tese. Entretanto, juntos, conseguimos bem mais que a Tese, sendo presenteados com a benção de Deus que nos deu nosso filho Matheus.

**ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXÍLIO DAS SEGUINTE  
INSTITUIÇÕES:**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Doutorado Sanduíche concedida ao candidato através do convênio CAPES/COFECUB, o que possibilitou a realização de grande parte deste trabalho no Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille - França e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Doutorado no País que viabilizou a realização dos experimentos realizados no BioMol-Lab do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, bem como pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos a nosso laboratório.

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), através de convênios mantidos com vários pesquisadores do BioMol-Lab do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Ao Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille – França, onde a maior parte dos experimentos foi desenvolvida.

Ao Instituto de Imunologia do Câncer de Wrocław – Polônia, onde foram realizados os experimentos de microscopia confocal.

Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), através de convênio com o BioMOI-Lab, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da UFC.

Ao BioMol-Lab do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, onde parte deste trabalho foi realizado.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
RÉSUMÉ	xix
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>1.1. LECTINAS</b>	<b>01</b>
1.1.1. Considerações Gerais	01
1.1.2. Especificidade	02
1.1.2.1. Monossacarídeos	02
1.1.2.2. Oligossacarídeos	03
1.1.3. Estrutura molecular	06
<b>1.2. GLICOPROTEÍNAS</b>	<b>08</b>
1.2.1. Estruturas comuns a diferentes tipos de glicanos	09
1.2.1.1. Cadeias tipo I	09
1.2.1.2. Cadeias tipo II	09
1.2.1.3. Polilactosaminas	10
1.2.1.4. Ramificações $\beta$ 1-6GlcNAc	10
1.2.1.5. Estruturas do sistema A, B e O(H)	11
1.2.1.6. Estruturas do sistema Lewis	11
1.2.2. Glicoproteínas tipo mucina	12
1.2.2.1. Alterações de glicoproteínas tipo mucina em câncer	12
<b>1.3. LECTINAS COMO INDICADORES DE GLICOFORMAS ASSOCIADAS A ESTADOS PATOLÓGICOS</b>	<b>16</b>
<b>1.4. GLICOBIOLOGIA DA DISSEMINAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS</b>	<b>18</b>
1.4.1. Metástase	20
1.4.2. Interações célula-célula e matrix extracelular	25
1.4.3. Integrinas	28
1.4.4. Fucosiltransferases	29
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
2.1. Gerais	34

2.2.	Específicos	34
3.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	35
3.1.	<b>LECTINAS</b>	35
3.1.1.	Isolamento e caracterização de lectinas	35
3.1.1.2.	Avaliação do grau de pureza das lectinas utilizadas	35
3.2.	<b>MARCAÇÃO DE LECTINAS COM FITC</b>	36
3.3.	<b>CÉLULAS</b>	37
3.3.1.	Seleção <i>in vitro</i> de células LS 180	37
3.3.2.	Seleção <i>in vitro</i> de células EB3	38
3.3.3.	Seleção <i>in vivo</i> de células 3LNLN, 5W e 8W	38
3.4.	<b>CULTURA DE CÉLULAS</b>	39
3.5.	<b>PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA AS CÉLULAS</b>	39
3.6.	<b>CITOMETRIA DE FLUXO</b>	39
3.7.	<b>DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS NO LISADO CELULAR</b>	40
3.8.	<b>DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FUCOSILTRANSFERASES PRESENTES NO LISADO CELULAR</b>	40
3.8.1.	Cromatografia em coluna de DOWEX (1W*8, Cl-) para os aceptores LacNAc, Lacto-N-Biose, Lacto-N-Tetraose e Lacto-N(neo)-Tetraose	41
3.8.2.	Cromatografia em colunas C18 para o acceptor fenilgalactose	41
3.8.3.	Cromatografia em Papel Whatman N° 3	42
3.8.4.	Cromatografia em sistema DIONEX para os aceptores Lacto-N-Tetraose e Lacto-N(neo)-Tetraose	42
3.8.5.	Cromatografia de camada delgada em placas de celulose	43
3.8.6.	Autoradiografia	44
3.8.7.	Microscopia confocal	44
4.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	45
4.1.	<b>INTERAÇÃO DO COMPLEXO LECTINA/FITC COM VARIANTES DE CÉLULAS DE CÂNCER DE CÓLON HUMANO</b>	45
4.2.	<b>INTERAÇÃO DO COMPLEXO LECTINA/FITC COM VARIANTES DE CÉLULAS DE CÂNCER DE CÓLON HUMANO NA PRESENÇA DO AÇÚCAR INIBIDOR</b>	50
4.3.	<b>DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FUCOSILTRANSFERÁSICA</b>	53
4.4.	<b>DETECÇÃO DE GLICANOS DE SUPERFÍCIE MEMBRANAR POR MEIO DE TÉCNICA DE MICROSCOPIA CONFOCAL</b>	58

5.	CONCLUSÃO	60
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
7.	APÊNDICE	93

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Legenda	Página
2	Interação da lectina Con A/FITC frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M	76
3	Interação da lectina Con Br/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M	76
4	Interação da lectina Con Bo/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M	77
5	Interação da lectina Con Gr/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M	77
6	Interação da lectina Con M/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M	78
7	Interação da lectina DGL/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M	78
8	Interação da lectina DGui/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M	79
9	Interação da lectina Dvir/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M	79
10	Interação da lectina Dvio/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M	80
11	Interação da lectina Dros/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M	80

12	Interação da lectina CFL/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M	81
13	Interação da lectina VML/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de galactose 0,15 M	81
14	Interação da lectina PPL/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de manose 0,15 M	82
15	Interação da lectina LTA/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de fucose 0,15 M	82
16	Interação da lectina UEA-I/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de fucose 0,15 M	83
17	Cromatografia em Sistema DIONEX PA - 100 dos Glicanos Fucosilados por Fucosiltransferases de Variantes de Células de Câncer de Cólon Usando-se como Aceptor Lacto-N-Tetraose	83
18	Cromatografia em Sistema DIONEX PA - 100 dos Glicanos Fucosilados por Fucosiltransferases de Variantes de Células de Câncer de Cólon Usando-se como acceptor Lacto-N(neo)-Tetraose	84
19	Cromatografia em Sistema DIONEX PA - 100 dos Glicanos Fucosilados por Fucosiltransferases de Variantes de Células de Câncer de Cólon sem a Utilização de Aceptor	84
20	Cromatografia em Papel Whatman 3 dos Glicanos Fucosilados por Fucosiltransferases de Variantes de Células de Câncer de Cólon usando-se como acceptor Lacto-N-Biose	85
21	Cromatografia em Papel Whatman 3 dos Glicanos Fucosilados por Fucosiltransferases de Variantes de Células de Câncer de Cólon usando-se como acceptor N-Acetilactosamina	85
22	Cromatografia em Papel Whatman 3 dos Glicanos Fucosilados por Fucosiltransferases de Variantes de Células de Câncer de Cólon usando-se como acceptor Fenilgalactose	86

23	Autoradiografia de produtos fucosilados por fucosiltransferases de variantes celulares de câncer de cólon humano usando-se Lacto-N-Biose e N-acetilactosamina como aceptores	87
24	Célula da linhagem LS 180	88
25	Célula da linhagem EB3	88
26	Célula da linhagem 3LNLN	89
27	Célula da linhagem 5W	89
28	Célula da linhagem 8W	90
29	Microscopia confocal de células da variante 3LNLN marcadas com UEA-I/FITC	91
30	Microscopia confocal de células da variante EB3 marcadas com LTA/FITC	91
31	Microscopia confocal de células da variante EB3 marcadas com Con Bo/FITC	92
32	Microscopia confocal de células da variante 5W marcadas com Dros/FITC	92

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Legenda	Página
1	Lectinas específicas para oligossacarídeos	05
2	Alterações fenotípicas comuns às células neoplásicas	15
3	Marcadores tumorais de natureza glicoprotéica associados ao câncer epitelial	24
4	Famílias de moléculas de adesão celular	26
5	Aceptores exógenos utilizados na determinação da atividade fucosiltransferásica	43
6	Seqüência N-terminal de lectinas da sub-tribo <i>Diocleinae</i>	47
7	Classificação de fucosiltransferases presentes em tecidos humanos	55
8	Estruturas fucosiladas por enzimas de 05 variantes de células de câncer de cólon usando-se como aceptores endógenos N-acetilactosamina, Lacto-N-biose, Lacto-N-tetraose e Lacto-N(neo)-tetraose	57
9A	Determinação da interação dos complexos lectina/FITC(expressos em Unidade de Fluorescência) com células de câncer de cólon na presença e ausência do monossacarídeo inibidor	73
9B	Determinação da interação dos complexos lectina/FITC(expressos em Unidade de Fluorescência) com células de câncer de cólon na presença e ausência do monossacarídeo inibidor	74
9C	Determinação da interação dos complexos lectina/FITC(expressos em Unidade de Fluorescência) com células de câncer de cólon na presença e ausência do monossacarídeo inibidor	75

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

$^{14}\text{C}$ -FUC	Fucose com isótopo de carbono 14
EB3	Linhagem celular obtida de carcinoma de cólon com elevado poder invasivo
DIONEX	Sistema de cromatografia de alta pressão aplicado ao isolamento de carboidratos
DPM	Desintegrações por minuto
GDP	Guanina di-nucleotídeo fosfato
GlcNH <sub>2</sub> [ $^{14}\text{C}$ ]	Glicosamina com isótopo de carbono 14
GlcNH <sub>2</sub> [ $^3\text{H}$ ]	Glicosamina com isótopo de hidrogênio 3
FITC	Fenilisotilcianato
HPAEC	Cromatografia de troca iônica em pH elevado
IFN- $\gamma$	Interferon gama
LacNAc	N-acetilactosamina
LS 180	Linhagem celular obtida de carcinoma de cólon com elevada afinidade por células endoteliais
3LNLN	Linhagem celular obtida de carcinoma de cólon a partir de metástase em linfonodos
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salino
PED	Detector de pulso eletroquímico
PI	Percentual de inibição
RMN	Ressonância magnética Nuclear
SBF	Soro bovino fetal
TEMED	Tri-etililenodi-amina
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
UF	Unidade de fluorescência
5W	Linhagem celular obtida de carcinoma de cólon a partir de metástase hepática
8W	Linhagem celular obtida de carcinoma de cólon a partir de metástase em linfonodos sub-mandibulares

## RESUMO

Neste trabalho foram analisados os carboidratos de membrana de 05 variantes celulares derivadas do câncer de cólon humano (LS 180, EB3, 3LNLN, 5W e 8W). No intuito de discriminar os tipos de glicanos de superfície presentes nestas células, foram utilizadas 15 lectinas vegetais, de especificidade conhecida, acopladas a FITC: Lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis* (Con A), *Canavalia brasiliensis* (Con Br), *Canavalia bonariensis* (Con Bo), *Canavalia grandiflora* (Con Gr), *Canavalia marítima* (Con M); *Dioclea grandiflora* (DGL), *Dioclea guianensis* (Dgui), *Dioclea virgata* (Dvir), *Dioclea violacea* (Dvio), *Dioclea rostrata* (Dros); *Cratylia floribunda* (CFL); *Parkia platycephala* (PPL); *Vatairea macrocarpa* (VML); *Lotus tetragonolobus* (LTA) e *Ulex europeus* (UEA-I).

Os resultados de citometria de fluxo revelaram que com exceção de DGL e VML, todas as demais lectinas foram capazes de reconhecer estruturas glicanas na superfície das células estudadas. Contudo, algumas das lectinas utilizadas foram capazes de discriminar uma ou mais variantes celulares (como no caso de Con Bo). Apesar do alto grau de homologia, lectinas da sub-tribo *Diocleinae* exibiram capacidade de reconhecimento diferente frente as células das diferentes linhagens. Dentre as lectinas utilizadas, UEA-I e LTA (ambas fucose específicas) apresentaram maior capacidade de ligação, revelando a presença de níveis elevados de glicanos fucosilados na membrana celular.

A análise da atividade de fucosiltransferases revelou a presença exacerbada de enzimas que catalizam formação de estruturas fucosiladas do tipo Lewis, sendo mais elevados os níveis de Lewis<sup>x</sup> e Lewis<sup>a</sup>, com baixa formação de Lewis<sup>b</sup>, não sendo detectada a presença de estruturas do tipo Lewis<sup>y</sup>.

Através de avaliação da capacidade bioadesiva das lectinas utilizando-se microscopia confocal, foram confirmados os teores elevados de estruturas fucosiladas (reconhecidas por UEA-I e LTA). De modo interessante, foi constatado que as lectinas Con Bo e Dros parecem potencializar sua internalização, mostrando-se quase que completamente em meio citoplasmático após uma hora de contato a 37°C.

## ABSTRACT

In the present work carbohydrate of membrane from 05 cellular cellular variants of the human colon cancer (LS 180, EB3, 3LNLN, 5W and 8W) were analysed. In order to discriminate the types of glycan present on those cell surfaces, 15 lectins with known specificity and coupled to PITC were used. They were obtained from seeds plants namely *Canavalia ensiformis* (Con A), *Canavalia brasiliensis* (Con Br), *Canavalia bonariensis* (Con Bo) *Canavalia grandiflora* (Con Gr) and *Canavalia maritima* (Con M); *Dioclea grandiflora* (DGL), *Dioclea guianensis* (Dgui), *Dioclea virgata* (Dvir), *Dioclea violacea* (Dvio) and *Dioclea rostrata* (Dros); *Cratylia floribunda* (CFL); *Parkia platycephala* (PPL); *Vatairea macrocarpa* (VML); *Lotus tetragonolobus* (LTA) and *Ulex europeus* (UEA-I).

The results of flow cytometry revealed that all lectins tested are able to recognise were the glycans structures on the cell surface studied. However, some of the lectins assayed were able to differentiate one or more variant cell (as in the case of Con Bo). Despite the high homology, lectins from Diocleinae sub-tribe exhibited different capacity to recognise the cells from different strands. From all lectins tested UEA-I and LTA (both fucose-specific) have showed higher binding capacity indicating the presence of high levels of fucosylated glycans.

The fucosyltransferases analysis has revealed the presence of a great amount of enzymes that catalyse the formation of fucosylated type Lewis structures with higher levels of Lewis<sup>x</sup> and lewis<sup>a</sup>, and low levels of Lewis<sup>b</sup>. Lewis<sup>y</sup> type structures were not detected.

Upon the bioadhesive capacity of the lectins using confocal microscopy it was possible to confirm the high levels of fucosylated structures (recognized by UEA-I and LTA). Interestingly, it was been found that both Con Bo and Dros lectins seem to potentialize theiruptake, since they appear almost completely in the cytoplasm after a hour at 37° C.

## RÉSUMÉ

Dans le présent travail, les glycoconjugués membranaires de cinq variants cellulaires isolés à partir d'un cancer du colon humain (LS180, EB3, 3LNLN, 5W et 8W) ont été étudiés. De façon à comparer les différentes structures glycaniques présentes à la surface de ces cellules, 15 lectines de spécificités bien définies ont été utilisées après marquage par l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC). Ces lectines ont été purifiées à partir de graines de *Canavalia ensiformis* (Con A), *C.brasiliensis* (Con Br), *C.bonariensis* (Con Bo), *C.grandiflora* (Con Gr), *C.maritima* (Con M), *Dioclea grandiflora* (DGL), *D.guianensis* (Dgui), *D.virgata* (Dvir), *D.violacea* (Dvio), *D.rostrata* (Dros), *Cratylia floribunda* (CFL), *Parkia platycephala* (PPL), *Vatairea macrocarpa* (VML), *Lotus tetragonolobus* (LTA) et *Ulex europeus* (UEA-I).

Les résultats obtenus par cytométrie de flux ont montré qu'à l'exception de la DGL et de la VML, toutes les lectines utilisées reconnaissaient des structures glycaniques présentes à la surface de ces cellules. Cependant, et en dépit d'une grande homologie structurale, certaines lectines telle que Con Bo sont capables d'interagir différemment avec ces variants cellulaires. Parmi toutes les lectines utilisées, les deux lectines fucose-spécifiques LTA et UEA-I interagissent très fortement avec les cellules, montrant ainsi que celles-ci expriment des taux élevés de glycannes fucosylés.

La détermination des activités fucosyltransférasiques d'extraits préparés à partir des cinq variants cellulaires a montré l'existence des enzymes permettant une production élevée d'antigènes fucosylés de type Lewis<sup>x</sup> et Lewis<sup>a</sup> ainsi qu'un peu d'antigène Lewis<sup>b</sup>. Une synthèse d'antigène Lewis<sup>y</sup> par ces cellules n'a pu être mise en évidence. L'utilisation de la microscopie confocale a permis de confirmer l'expression importante de ces structures glycaniques fucosylées dans les lignées cellulaires dérivant d'un cancer du colon humain. D'autre part, cette dernière étude a permis de montrer qu'à 37 °C, deux de ces lectines, Con Bo et Dros, étaient très rapidement et totalement internalisées.

## 1 - INTRODUÇÃO:

### 1.1 - LECTINAS

#### 1.1.1 - Considerações Gerais

A capacidade de se combinar específica e reversivelmente com várias substâncias é uma característica da maioria das proteínas. Enzimas que se ligam a seus substratos e inibidores ou anticorpos que se ligam ao antígeno, são exemplos bem conhecidos (SHARON & LIS, 1989). Lectinas, entretanto, são proteínas definidas inicialmente como moléculas que se ligam reversivelmente a carboidratos, aglutinam células e/ou precipitam polissacarídeos e glicoproteínas. A primeira definição de lectinas foi proposta por BOYD & SHAPLEIGH (1954) que utilizaram o termo "lectina", oriundo da palavra latina *legere*, que significa selecionar ou escolher, para definir uma classe de aglutininas de plantas superiores, algumas das quais mostraram especificidade para grupos sanguíneos humanos.

GOLDSTEIN *et al.* (1980) propuseram uma nova definição de lectinas, na qual estas foram descritas como "proteínas de origem não imune, que se ligam a carboidratos ou glicoproteínas, aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados". Esta definição foi modificada posteriormente por KOCOUREK & HOREJSI (1981), que sugeriram serem as lectinas "proteínas ou glicoproteínas de natureza não imune que se ligam a carboidratos, sem apresentar atividade enzimática frente a esses açúcares e não requerem grupos hidroxilas livres para sua ligação".

Atualmente, a definição mais aceita para lectinas é a proposta por PEUMANS & VAN DAMME (1995), que definem lectinas como proteínas de origem não imune contendo pelo menos um domínio não-catalítico capaz de ligar-se reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos. Baseados no conhecimento da estrutura das lectinas, PEUMANS & VAN DAMME (1995) classificaram as lectinas em três grupos: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas. As merolectinas possuem um único sítio de ligação a carboidratos sendo desprovidas de atividade hemaglutinante. As hololectinas são semelhantes as merolectinas, entretanto, possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos podendo, desta forma, aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. As quimerolectinas se diferenciam das duas outras classes por possuírem além do sítio de ligação a carboidratos, um outro domínio não relacionado que apresenta atividade biológica distinta e independente, podendo ou não apresentar atividade hemaglutinante, dependendo do número de sítios de ligação a açúcares. No ano de 1998 os mesmos autores introduziram o termo superlectinas, referindo-se a

lectinas que possuem pelo menos 02 sítios de ligação a carboidratos com especificidades diferentes.

### 1.1.2 – Especificidade

#### 1.1.2.1 - Monossacarídeos

A especificidade de lectinas frente a monossacarídeos permite sua classificação em 05 grupos distintos: Man, Gal/GalNAc, Glc/GlcNAc, Fuc e NeuAc (todos açúcares da série D, exceto a fucose, da série L) (MAKELA, 1957). Dentro desta classificação chama a atenção o fato de que dentre os diversos monossacarídeos encontrados na natureza, somente estes acima descritos são encontrados normalmente fazendo parte de estruturas que compõem a superfície de células eucarióticas.

Via de regra, a afinidade de lectinas por monossacarídeos é fraca, com constantes de associação da ordem de milimolar (SHARON & LIS, 1989). Lectinas são bastante seletivas, capazes de discriminar 02 ou mais monossacarídeos por mais elevada que seja a semelhança entre as moléculas. Deste modo, lectinas específicas por glicose não reconhecem galactose (epímero C-4) ou manose (epímero C-2) e vice-versa. Com exceção da WGA (lectina de germe de trigo), lectinas específicas por GlcNAc não reconhecem GalNAc. Entretanto, a seletividade de lectinas pode admitir certa tolerância quanto à variação de grupos hidroxila do anel piranosídico. Assim, lectinas manose específicas podem reconhecer o epímero glicose e vice-versa. Do mesmo modo, muitas lectinas que se ligam a galactose interagem também com GalNAc. Em alguns casos até preferencialmente, como é observado com a lectina de soja (SBA), na qual a afinidade por GalNAc é 25-30 vezes maior que por galactose (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986). Entretanto, outras lectinas se ligam a estes carboidratos com a mesma afinidade, como no caso da lectina de sementes de *Erythrina collarodendro* (EcorL). Por esta razão, tais lectinas são classificadas como pertencentes ao grupo Gal/GalNAc específico, mesmo que algumas dentre elas não reconheçam fortemente GalNAc como no caso da lectina de amendoim (PNA).

Ocasionalmente, uma lectina pode reconhecer monossacarídeos que parecem não estar relacionados estruturalmente, mas que apresentam características topográficas similares quando vistos em ângulos apropriados. Por exemplo, WGA reconhece GlcNAc e NeuAc. Considerando-se a estrutura tridimensional destes dois açúcares, observa-se similaridade nas posições C-2 (grupo acetamida) e C-3 (grupo

OH) do anel piranosídico com C-5 e C-4 do NeuAc, respectivamente. Estas posições são determinantes para o contato com o sítio de ligação da lectina (LIS & SHARON, 1998).

Algumas lectinas pertencentes ao mesmo grupo de especificidade combinam-se, preferencialmente, com monossacarídeos  $\alpha$  ou  $\beta$ , enquanto outras não apresentam especificidade anomérica. De modo particular, glicosídeos aromáticos são fortemente reconhecidos por muitas lectinas quando comparados com outros alifáticos, indicando o envolvimento de uma região hidrofóbica no sítio de ligação (LIS & SHARON, 1984).

Lectinas de um mesmo grupo podem diferir consideravelmente em relação a sua especificidade por outros ligantes. Por exemplo, Con A (lectina de sementes de *Canavalia ensiformis*) e favina (lectina de sementes de *Limux favus*) reconhecem glicose com constantes de associação similares, enquanto que seus derivados metil ou fenil são reconhecidos de forma distinta. Con A apresenta 10-20 vezes menos afinidade por estes açúcares ao passo que favina apresenta afinidade 04 vezes maior.

Por outro lado, Con A também reconhece e interage com peptídeos que contenham motivos Tyr-Pro-Tyr com afinidade semelhante aquela apresentada para  $\alpha$ -metilmanosídeo (OLDENBURG *et al*, 1992). De fato, peptídeos podem ser reconhecidos por lectinas sendo a ligação mediada por pontes de hidrogênio entre grupos OH de tirosina (que mimetiza o oxigênio do açúcar) e interações hidrofóbicas entre carbonos das cadeias laterais (que mimetizam os carbonos do açúcar). Este tipo de ligação (lectina-peptídeo) tem sido relatada e nela, ambos ligantes ocupam a mesma posição no sítio, o que representa um glicomimetismo (KAUR *et al*, 1997).

#### 1.1.2.2 - Oligossacarídeos

Comparada à sua especificidade por monossacarídeos, lectinas costumam apresentar constantes de associação 100 vezes mais elevadas quando interagem com di-, tri- ou tetrassacarídeos, havendo casos de lectinas que reconhecem apenas oligossacarídeos (TABELA 1). Entretanto, lectinas pertencentes a um mesmo grupo podem diferir consideravelmente em relação a suas afinidades por determinados oligossacarídeos. Do ponto de vista funcional, o reconhecimento de oligossacarídeos apresenta um aspecto especial, na medida em que são estas as estruturas glicídicas encontradas freqüentemente, quer na superfície celular ou em suspensão nos fluidos orgânicos (FRENETTE & WAGNER, 1996).

A afinidade de lectinas pode ser influenciada pela forma como estes oligossacarídeos se encontram geralmente ligados, uma vez que se tratam de moléculas flexíveis, com considerável liberdade de rotação em torno das ligações glicosídicas dos açúcares constituintes. Estas observações têm sido confirmadas por técnicas de modelamento molecular e RMN (HOMANS *et al*, 1998).

TABELA 1. Lectinas específicas para oligossacarídeos

Lectina	Abreviação	Oligossacarídeo
<i>Escherichia coli</i>	fimbria tipo P, k99	Gal $\alpha$ 4Gal-R NeuGc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 4GlcNAc
Galectinas		Gal $\beta$ 4Glc; Gal $\beta$ 4GlcNAc
<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSIV	Fuc $\alpha$ 2Gal $\beta$ 3(Fuc $\alpha$ 4)GlcNAc
<i>Phaseolus vulgaris</i>	E-PHA  L-PHA	Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6 GlcNAc $\beta$ 4Man $\beta$ 4-R GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 3  Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 6 Man $\beta$ Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 2
Batata	STA	(GlcNAc $\beta$ 4) <sub>2-4</sub>
Selectinas		Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 4GlcNAc Fuc $\alpha$ 3  (sLe <sup>x</sup> )
Tomate	LSA	(GlcNAc $\beta$ 4) <sub>3-4</sub>

R = GlcNAc $\beta$ (1,4)GlcNAc.

Adaptada de SHARON, 1990.

Por causa de sua flexibilidade, oligossacarídeos que diferem em sua estrutura química podem apresentar características topográficas similares e, como resultado, ligarem-se a uma mesma lectina. Por outro lado, diferentes lectinas específicas pelo mesmo oligossacarídeo podem reconhecer diferentes regiões na superfície da molécula. Apesar da flexibilidade em torno de ligações glicosídicas induzirem uma heterogeneidade conformacional, lectinas parecem discriminar e se ligar a ramificações de conformação simples as quais não são necessariamente as mais abundantes (HOMANS *et al*, 1993). Todavia, após a ligação, a liberdade de rotação do oligossacarídeo torna-se restrita, resultando na diminuição da entropia do sistema.

### 1.1.3 - Estrutura molecular

Do ponto de vista estrutural, as lectinas podem ser classificadas de acordo com a complexidade da molécula. Ao longo dos últimos anos, a classificação estrutural proposta por SHARON & LIS (1990) tem sido acatada pela maioria dos lectinólogos. Nesta classificação, lectinas são divididas em 03 classes principais: 1- Lectinas simples; 2- Multidomínios; 3- Resultantes de arranjos moleculares.

1 – Lectinas simples consistem de um pequeno número de subunidades, não necessariamente idênticas, que apresentam massa molecular inferior a 40 kDa e cadeias laterais contendo sítios de ligação a carboidratos. Nesta classe estão contidas quase todas as lectinas vegetais, bem como as galectinas ou s-lectinas, uma família de lectinas animais galactose específicas.

#### 1.1- Leguminosas

Lectinas vegetais obtidas em sua maioria a partir de sementes de plantas pertencentes à família das leguminosas figuram entre as mais estudadas, contando com mais de 100 proteínas já completamente caracterizadas bioquimicamente, dentre as quais muitas com estruturas determinadas por técnicas cristalográficas. Neste grupo destaca-se a Con A (lectina de sementes de *Canavalia ensiformis*), isolada por SUMNER (1919) e descrita por SUMNER & HOWELL (1936) como sendo específica por glicose/manose.

Como a Con A, outras lectinas desta família têm sido estudadas, entre elas PHA (lectina de sementes de *Phaseolus vulgaris*), SBA (lectinas de sementes de *Glicine*

max), PNA (lectina de sementes de *Arachis hypogea*), Ecor1 (lectina de sementes de *Erythrina collarodendro*). Particularmente, outras espécies do gênero *Canavalia* vêm sendo exaustivamente estudadas, sendo a Con Br (lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis*) a primeira lectina do mesmo grupo a ter sido clonada com sucesso após a Con A (GRANGEIRO *et al*, 1997).

Em alguns casos, diferentes lectinas têm sido isoladas de sementes provenientes de uma mesma planta, como no caso das 03 lectinas Gal/GalNAc, GlcNAc e oligossacarídeo específicas isoladas de sementes de *Griffonia simplicifolia*. Por outro lado, lectinas de leguminosas podem se apresentar como uma mistura de proteínas estreitamente relacionadas denominadas de isolectinas. Tipicamente, lectinas de leguminosas são compostas de 02, 04 ou mais unidades idênticas ou quase idênticas (protômeros) de 25-30 kDa, cada uma apresentando um sítio de ligação a carboidratos de mesma especificidade. Elas também costumam conter em sua maioria dois sítios de ligação a metais (geralmente  $Ca^{++}$  e  $Mn^{++}$ ) por subunidade, sendo estes determinantes para a ligação a carboidratos. Além disto, algumas lectinas parecem apresentar em sua estrutura um sítio hidrofóbico capaz de ligar-se a adenina ou ao ácido indolacético (LIS & SHARON, 1998).

As subunidades de lectinas de leguminosas são comumente constituídas de cadeias polipeptídicas simples de aproximadamente 250 resíduos de aminoácidos que podem conter 01 ou 02 oligossacarídeos N-ligados. Em algumas lectinas (Ex. ervilha e lentilha), as cadeias polipeptídicas são fragmentadas em frações  $\alpha$ (leve) e  $\beta$ (pesada) (LIS & SHARON, 1998).

Lectinas de leguminosas exibem elevada homologia, apresentando cerca de 20% dos aminoácidos invariáveis. Entre os aminoácidos conservados, incluem-se a maioria daqueles implicados em pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas estabelecidas durante a ligação lectina-carboidrato, bem como um elevado percentual de resíduos de aminoácidos que coordenam o sítio de ligação a metais (LIS & SHARON, 1998).

A Con A apresenta uma propriedade especial que a distingue das demais lectinas de leguminosas, esta é descrita como sendo uma homologia circular, observada a partir do alinhamento de seu resíduo 119 com o aminoterminal de outras lectinas de leguminosas. Isto é resultado de um re-arranjo não usual da cadeia polipeptídica que ocorre durante o último passo da síntese desta lectina (MIN and JONES, 1994).

Lectinas de leguminosas podem se apresentar na forma de tetrâmero ou dímero de dímero. Na Con A e, provavelmente, nas demais lectinas de sementes de espécies de *Canavalia* e *Dioclea*, a formação de tetrâmeros parece envolver a parte central de ambos os dímeros e os contatos são basicamente estabelecidos pelos loops (RINI, 1995).

## 1.2 – GLICOPROTEÍNAS

Glicoproteínas constituem um grupo de macromoléculas complexas que são freqüentemente encontradas em quase todas as formas de vida: animal, vegetal e microbiana. Bactérias, em geral, não parecem conter glicoproteínas. Contudo, sua presença tem sido relatada em espécies do gênero *Halobacterium* e *Bacillus stearothermophilus* (KENT, 1989).

Várias classes importantes de macromoléculas apresentam estrutura glicoprotéica, como hormônios, enzimas, imunoglobulinas, proteínas de transporte, moléculas de adesão celular, toxinas, lectinas, proteínas estruturais, além de proteínas presentes no invólucro nuclear. Entre as diversas funções desempenhadas por esta classe molecular destacam-se a catálise enzimática, controle hormonal, proteção imunológica, transporte de íons, lubrificação, proteção de superfícies, suporte estrutural, diferenciação de antígenos sanguíneos, adesão, interação e reconhecimento celular, dentre outros. Em geral, glicoproteínas são encontradas em fluidos extra e intracelulares, tecido conectivo e membranas. Segundo GOTTSCALK *et al* (1966), glicoproteínas são melhor definidas como sendo agregados protéicos contendo como grupo prostético 01 ou mais heterossacarídeos covalentemente ligados a uma cadeia polipeptídica.

Muito embora compostos de natureza glicoprotéica sejam conhecidos a mais de um século, sua presença na linha de frente de investigações científicas só passou a ser verificada a partir de meados da década de 70. Durante muito tempo, o desinteresse da comunidade científica em relação às glicoproteínas pode ser atribuído à presença do componente de natureza glicídica nesta molécula, cujo papel reconhecido até então, era o de moléculas energéticas ou de proteção da superfície celular, não lhes sendo atribuída qualquer função de carreadoras de informação (SHARON and LIS, 1982). Deste modo, muitos carboidratos covalentemente ligados a proteínas não atraíram a

atenção de pesquisadores. Na verdade, a presença de carboidratos em preparações protéicas era tida como mera contaminação.

Somente a partir da descoberta de que glicoproteínas desempenhavam importante papel no reconhecimento de outras moléculas, como durante os processos de interação patógeno-hospedeiro, célula-célula e célula-molécula é que seu estudo passou a ser intensificado. Outros fatores que contribuíram para o renovado interesse foram os que apontam para a freqüente alteração de estruturas glicanas em diversas fases do desenvolvimento celular, seja este normal ou patológico.

## 1.2.1 - Estruturas comuns a diferentes tipos de glicanos

### 1.2.1.1 - Cadeias Tipo I

São estruturas glicanas encontradas em N-, O-glicanos, proteo e lipoglicanos que se caracterizam pela adição de resíduos de galactose, pela ação de  $\beta(1,3)$ galactosil transferases, diretamente sobre resíduos de GalNAc terminal. Em humanos, a expressão de cadeias tipo 1 está freqüentemente restrita ao epitélio (trato gastrointestinal/aparelho reprodutor), podendo ocorrer glicosilações subseqüentes tanto no resíduo GalNAc subterminal como no resíduo galactose terminal (HAKOMORI,1989).

### 1.2.1.2 - Cadeias Tipo II

Semelhante ao que ocorre nas cadeias tipo 1, em N-, O-, proteo e lipoglicanos, as cadeias tipo 2 são o resultado da adição de galactose a um resíduo GalNAc terminal, sendo que pela ação de  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferases. No entanto, a expressão dessa estrutura pode ser considerada como sendo constitutiva uma vez que ela se apresenta como acceptor para uma série de modificações subseqüentes que podem ocorrer sobre o resíduo GalNAc subterminal bem como no resíduo galactose terminal (HAKOMORI,1989).

### 1.2.1.3 - Polilactosaminas

São estruturas glicanas encontradas em glicoproteínas e glicolípídeos formados pela ação dirigida de uma ou mais  $\beta(1,3)$ -galactosiltransferases/ $\beta(1,4)$ -galactosiltransferases. Isto implica que a maquinaria enzimática responsável pela biossíntese das polilactosaminas é capaz de discriminar moléculas (glicoproteínas e glicolípídeos) distintas mas que apresentam a mesma composição no que diz respeito a exposição dos resíduos de GalNAc e galactose terminal. Uma característica comum a estas estruturas é que elas freqüentemente se apresentam na forma multiantenária (HAKOMORI, 1989).

### 1.2.1.4 - Ramificações $\beta(1,6)$ GlcNAc

Tais ramificações são encontradas freqüentemente em resíduos Gal terminal de polilactosaminas através da ação de  $\beta(1,6)$  N-Acetilglicosamina Transferase ( $\beta(1,6)$ GlcNAcTs), e correspondem aos antígenos do sistema sanguíneo I, i, que foram descobertos a partir da investigação de um anticorpo termolábil (frio-dependente) encontrado em um paciente com Anemia Hemolítica Adquirida. Neste caso, anticorpos reagiam com as células vermelhas do indivíduo doador. Doadores não reativos foram então classificados como tendo grupo sanguíneo i, enquanto doadores reativos foram classificados como grupo sanguíneo I. Polilactosaminas  $\beta(1,6)$  ramificadas correspondem ao antígeno do grupo I, um precursor do sistema A,B,O em eritrócitos, enquanto cadeias lineares de polilactosamina correspondem ao antígeno do grupo i. Em humanos, o grupo i é abundante na superfície de células vermelhas do embrião, eritrócitos do cordão umbilical e durante a eritropoese alterada. Entretanto, durante os primeiros 18 meses de vida a reatividade do antígeno I em hemácias alcança os níveis encontrados no adulto, ao passo que o antígeno i é reduzido a níveis irrisórios (HAKOMORI, 1989).

### 1.2.1.5 - Estruturas do sistema A, B e O(H)

Em humanos, polilactosaminas e suas ramificações  $\beta(1,6)$  estão sujeitas a modificações tecido-específicas que concorrem para a formação de glicanos do sistema A, B O(H). Este sistema (descoberto no início século XX) por LANDSTEINER, (1901), dividia os indivíduos em diferentes classes, de acordo com a presença ou ausência de componentes séricos capazes de aglutinar células vermelhas provenientes de outros doadores. Hoje se sabe que estes constituintes do soro são, na verdade, anticorpos e que seus antígenos correspondem a estruturas glicanas geneticamente polimórficas. Antígenos A, B e O (H) são grupos oligossacarídicos formados a partir de precursores glicanos tipo 1 e tipo 2, sendo este polimorfismo determinado por glicosiltransferases de alelos distintos, o que lhes confere diferentes propriedades funcionais. Deste modo, os antígenos A, B e O são formados a partir de precursores comuns através da ação seqüencial de distintas glicosiltransferases codificadas por 3 loci gênicos (A, BOH e secretor). Assim sendo, o antígeno grupo H é, na verdade, a forma inalterada do precursor, podendo resultar no grupo O. A via de síntese dos antígenos A, B e O inicia-se pela modificação do glicano precursor por  $\alpha(1,2)$ fucosiltransferases; Estas enzimas formam o determinante H, representado por uma unidade dissacarídica  $\text{Fu}\alpha(1,2)\text{Gal}\beta 1$ . Determinantes dos grupos A e B são subseqüentemente formados por adição de resíduos monossacarídicos. No grupo A, à molécula precursora é adicionado um resíduo GalNAc (pela ação da  $\alpha(1,3)\text{GalNAcT}$ ) e, no grupo B um resíduo de galactose (pela ação da  $\alpha(1,3)\text{GalT}$ ). Os antígenos A, B e O são expressos na superfície de células vermelhas, bem como em muitos outros tecidos incluindo o endotélio vascular. Desta forma, estes antígenos são apresentados por proteínas de membrana e glicolipídeos associados a membrana. Porém, alguns tecidos também sintetizam antígenos A, B e O na forma solúvel como glicanos ou glicoproteínas secretadas, em glicoesfingolipídeos ou como oligossacarídeos livres (HAKOMORI, 1989).

### 1.2.1.6 - Estruturas do Sistema Lewis

O termo Lewis corresponde ao nome de uma família de indivíduos que apresentam um problema de incompatibilidade eritrocitária, o que levou a descoberta

deste sistema. O sistema Lewis é constituído pelos grupos Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Le<sup>x</sup> e Le<sup>y</sup>, e pelas formas sialiladas e fucosiladas de Le<sup>a</sup> e Le<sup>x</sup> (HAKOMORI, 1989).

### 1.2.2 - Glicoproteínas tipo mucina

Glicoproteínas tipo mucina são constituídas de um esqueleto protéico rico em serina, treonina e hidroxiprolina, ao qual estão ligados diversas cadeias laterais contendo carboidratos que variam em comprimento, composição e ligações anoméricas. Apresentam massa molecular elevada (400 a 1.000 kDa) e, muitas cadeias laterais são ligadas O-glicosidicamente, podendo constituir de 50-85% do peso molecular total. A maioria das cadeias laterais de carboidratos das glicoproteínas mucinas são ligados ao esqueleto protéico através de O-glicosilações entre resíduos de N-acetilgalactosamina (GalNAc) a resíduos de serina ou treonina, sendo comumente observado a presença de 05 monossacarídeos: N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglicosamina (GlcNAc), ácido N-acetilneuramínico (NeuAc), galactose (Gal) e fucose (Fuc). As mucinas podem ser divididas em duas formas: mucinas associadas à membrana e mucinas secretadas (YOUNG *et al*, 1996).

#### 1.2.2.1 - Alterações de glicoproteínas tipo mucina em câncer

Estudos histoquímicos têm demonstrado que alterações qualitativas e quantitativas são observadas em mucinas ao longo do processo oncogênico. A modificação de resíduos de Ser/Thr em proteínas, por adição de um resíduo GalNAc, resulta num oligossacarídeo O-ligado (O-glicano ou glicano tipo mucina). Estruturalmente, O-glicanos podem ser divididos em grupos distintos de acordo com sua estrutura nuclear: Gal $\beta$ 1,3GalNAc (núcleo 1), GlcNAc $\beta$ 1,6(Gal $\beta$ 1,3)GalNAc (núcleo 2), GlcNAc $\beta$ 1,3GalNAc (núcleo 3). Esta definição é também distinta para outros tipos de proteínas glicosiladas ao nível de resíduos Ser/Thr. De modo geral, a biossíntese de O-glicanos é mais simples que a de N-glicanos, bem como de oligolipídeos uma vez que não é requerido um precursor protéico para a transferência de resíduos carboidratos. Normalmente, o evento inicial da O-glicosilação se caracteriza pela adição de um resíduo GalNAc (por uma UDP-GalNAc) a um resíduo de Ser/Thr catalisada por uma polipeptidil GalNAC Transferase (GalNAcT). A transferência de

resíduos GalNAc para peptídeos apomucina pode ser realizada por várias UDP-GalNAc: polipeptidil-N-acetilgalactosaminil transferases, que controlam a glicosilação O-ligado. Em estudos utilizando o gene MUC1 comoceptor, foi demonstrado que a glicosilação sítio-específica pode regular a adição de GalNAc para resíduos Ser/Thr em posições adjacentes ou distantes, indicando que a adição de GalNAc pode ser afetada pela glicosilação prévia de outros sítios no substrato peptídico (OSINAGA *et al*, 2000).

Também em contraste com a N-glicosilação, uma seqüência consenso para a adição de GalNAc não foi encontrada nos modelos até então estudados.

Muitos O-glicanos são formados por longas cadeias com terminações variáveis que podem ser, ou não, similares às terminações encontradas em N-glicanos. Entretanto, O-glicanos são menos ramificados e, freqüentemente, apresentam estrutura biantenária. A O-glicosilação pode resultar, via de regra, na formação de moléculas tipo mucina, que são definidas como glicoproteínas de membrana ou produto de secreção celular com grande diversidade de agrupamentos (HAKOMORI, 1989). De modo geral, a expressão de mucina é abundante em células epiteliais, especializadas na produção de muco. Contudo, nem todos O-glicanos são encontrados em mucinas denominadas como sendo clássicas, que contêm relativamente, poucas cadeias de O-glicanos ou estruturas biantenárias alongadas. No entanto, em células tumorais, O-glicanos podem ser bem mais abundantes que N-glicanos.

No caso do câncer de cólon, estas alterações incluem a redução no conteúdo de carboidratos das cadeias laterais, modificando ou invertendo a relação massa/massa entre carboidratos e proteína. Objetivamente as alterações podem ser classificadas em 04 categorias, a saber:

- aquelas provenientes de uma síntese incompleta de cadeias laterais de carboidratos;
- aumento no nível de expressão acima dos valores observados em tecidos normais;
- modificação de estruturas pré-existentes;
- expressão antigênica inapropriada ou incompatível.

Estas alterações podem ser observadas em qualquer parte da estrutura desde o núcleo até a periferia da cadeia oligossacarídica. A glicosilação alterada é uma característica universal de células cancerosas e certos tipos de estruturas glicanas têm sido definidas como marcadores de progressão tumoral ao longo dos últimos anos. Semelhante ao que ocorre em células normais durante a embriogênese, células tumorais sofrem ativação e crescimento rápidos, aderem a uma variedade de células e

invadem tecidos. Deste modo, não é surpreendente que a glicosilação alterada se constitua numa via universal de transformação maligna e progressão tumoral. Assim, tem sido observado que a transformação de células "in vitro" se faz acompanhar do aumento no tamanho dos glicopeptídeos metabolicamente marcados (YOUNG *et al*, 1996).

A partir do advento dos anticorpos monoclonais (Mabs), na década de 70, pesquisadores vêm buscando a "bala mágica" contra células cancerosas e descobriram que muitos dos Mabs tumor específicos são, na verdade, dirigidos contra epítomos de natureza glicídica, especialmente contra aqueles presentes em glicoesfingolipídeos (HAKOMORI, 1989). Na maioria dos casos tais epítomos são antígenos oncofetais os quais são comumente encontrados em tecidos embrionários, células tumorais, bem como em alguns tipos de células presentes em tecidos saudáveis.

As transformações que ocorrem em células malignas podem apresentar-se sob várias formas (TABELA 2). São normalmente relatadas a redução da expressão ou a expressão excessiva de determinados glicanos, a presença de estruturas incompletas, o acúmulo de precursores e, menos comumente, o surgimento de novas estruturas (WESCHE *et al*, 1998).

TABELA 2. Alterações fenotípicas comuns as células tumorais

- 
- Perda do controle de crescimento e diferenciação
  - Diminuição do teor de fibronectina da superfície celular
  - Expressão exarcebada de seqüências iniciadoras (TATAS, TAAs e TSA), incluindo antígenos oncofetais
  - Alterações nos componentes da superfície celular (proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos e ácido siálico)
  - Glicosilação alterada
  - Aumento da sensibilidade a aglutinação por lectinas
  - Aumento da mobilidade de receptores de membrana
  - Alterações na permeabilidade e transporte de nutrientes
  - Redução do conteúdo mitocondrial
  - Junções e comunicação celulares alteradas
  - Deformidade aumentada
  - Alterações do citoesqueleto
  - Alterações nas projeções das superfícies celulares
  - Motilidade celular alterada (incluindo resposta a fatores quimiotáticos)
  - Alterações no conteúdo e na secreção enzimática e hormonal
  - Aumento da heterogeneidade histológica (basofilia citoplasmática, pleomorfismo nuclear)
  - Aumento das aberrações cromossômicas
  - Presença de produtos de oncogenes ativados
  - Produção excessiva de proto-oncogenes.
- 

Adaptado de EVAS, 1991.

Alterações nos primeiros pontos de ramificação de estruturas glicanas em vias biossintéticas normais podem afetar, sobretudo, as características dos glicoconjugados membranares. Entretanto, isto não parece ser um fenômeno casual, em consequência da desordem biológica de uma célula tumoral, uma vez que há indícios de que somente um número limitado de vias biossintéticas se apresenta relacionada com a transformação maligna e a progressão tumoral. Um exemplo é o aumento do tamanho de glicoconjugados de células tumorais que apresentam N-glicanos unidos por ligações  $\beta(1,6)$ , resultado do aumento da expressão de GlcNAc transferase V (HAKOMORI, 1989). Esta modificação na expressão da enzima parece ocorrer, inicialmente, a nível transcripcional, podendo ser induzido por vários agentes, incluindo carcinógenos virais e químicos. Deste modo, células que apresentam uma expressão aumentada de GlcNAc transferase V são, freqüentemente, propensas a metástases e a reversão espontânea deste processo pode ser obtida através da redução da atividade enzimática.

### **1.3 - LECTINAS COMO INDICADORES DE GLICOFORMAS ASSOCIADAS A ESTADOS PATOLÓGICOS**

Alterações na glicosilação de proteínas estão associadas a muitas doenças e podem ser úteis como marcadores de estados patológicos. Tanto a estrutura de um determinado carboidrato, quanto sua concentração numa proteína podem apresentar-se alteradas durante o curso de uma doença, o que permite sua utilização como informação diagnóstica.

Exemplos de glicoproteínas que tem sido encontradas apresentando alguma forma de alteração de glicosilação durante o estado patológico incluem:  $\alpha$ -feto proteína, gonadotrofina coriônica,  $\alpha$ -antitripsina, proteínas tipo IgG,  $\alpha_1$ -ácido glicoproteína e fibrinogênio (HAKOMORI, 1989).

Glicosilação anormal pode também contribuir para a patogênese, particularmente pelo fato de que muitas funções biológicas importantes, semelhantes a adesão celular e endocitose, dependem do reconhecimento de oligossacarídeos específicos presentes em órgãos alvo. A expressão de um determinado oligossacarídeo pode, por exemplo, contribuir para o comportamento metastático de uma célula tumoral. Isto é observado quando do aumento da expressão de GalNAc em células renais de hamster (BHK) utilizando-se polioma vírus. O efeito resultante desta

modificação se traduz numa grande quantidade de oligossacarídeos tetra-antenários, sintetizados a partir de precursores tri-antenados pela adição de resíduos GalNAc, modificando consideravelmente a glicosilação da superfície celular (YAMASHITA *et al*, 1985).

A utilização de lectinas na investigação de alterações de glicosilação durante processos normais e patológicos tem gerado novos conhecimentos referentes ao processo de glicosilação e contribuído com novas técnicas voltadas para o diagnóstico destas alterações.

Ao longo dos últimos anos tem sido estabelecido alguns conceitos básicos aplicados à interação lectina-carboidrato, que podem servir de base para a compreensão do mecanismo através do qual lectinas são capazes de distinguir ligantes ditos normais de outros anormais, em se tratando de testes diagnósticos:

- 1- Um açúcar multivalente, ou uma proteína multiglicosilada, pode unir-se a diferentes ligantes, sendo possível obter-se ligações cruzadas.
- 2- Oligossacarídeos podem contribuir com acomodação espacial favorável a estabilidade da interação lectina-carboidrato.
- 3- Lectinas podem apresentar alguma flexibilidade, contribuindo para a estabilização da interação com carboidratos.
- 4- Lectinas são extremamente sensíveis, discriminando um mesmo ligante apenas através de diferenças na apresentação deste (pH, Temperatura., etc).
- 5- Alguns resíduos de carboidrato de um oligossacarídeo presentes numa glicoproteína podem interagir efetivamente com a proteína a qual estão ligados.
- 6- Carboidratos ligados a glicoproteínas que possuem domínios lectínicos, podem interagir internamente com estes domínios, protegendo, assim, tanto o sitio lectínico quanto o carboidrato durante o transporte (BOON & OLD, 1997).

De um modo geral, algumas razões contribuem para o desenvolvimento de técnicas de detecção utilizando-se lectinas, na medida em que parecem apresentar melhores resultados quando comparadas a ensaios imunológicos convencionais usando-se anticorpos como ferramentas (OSINAGA *et al*, 2000).

O crescente interesse na pesquisa de proteínas tipo mucina, as quais são dificilmente detectadas por meio de anticorpos devido a sua estreita especificidade, tem estimulado a aplicação de lectinas como ferramenta de primeira escolha. Muitos anticorpos anti-mucina reconhecem epítomos de natureza glicídica, presumivelmente

em função do difícil acesso ao núcleo protéico desta classe de moléculas, em geral fortemente glicosilado, o que se traduz numa redução do potencial imunogênico. Existe, entretanto, elevada heterogeneidade entre as diferentes cadeias oligossacarídicas numa mesma molécula de mucina. Deste modo, a utilização de um anticorpo capaz de reconhecer um carboidrato complexo pode mostrar uma variação considerável na ligação entre moléculas do tipo mucina. A bem da verdade, este fato pode ser útil na caracterização de mucinas, mas se torna inconveniente quando o objetivo da análise é quantitativo (OSINAGA *et al*, 2000).

De acordo com os dados a cerca da orientação espacial precisa dos epítomos requeridos por muitos anticorpos anti-carboidrato observa-se que tais moléculas costumam reconhecer fragmentos maiores e mais complexos, quando comparados a lectinas (OSINAGA *et al*, 2000).

Estes indícios favorecem a aplicação de lectinas para fins de quantificação de glicoproteínas tipo mucina, possibilitando sua diferenciação de outras glicoproteínas que contenham carboidratos de estrutura similar, numa mesma preparação. Técnicas de detecção contendo lectinas ligadas a enzimas são, em geral, altamente sensíveis e podem ser aplicadas a frações contendo mucinas obtidas por meio de biopsia. Outra importante razão que contribui para o emprego de lectinas em técnicas de detecção é o reconhecimento de que a maioria dos ensaios com marcadores usados para diagnóstico sorológico de tumores epiteliais depende da detecção de mucina em amostras de soro (MAGNANI *et al*, 1983).

Em geral, mucinas associadas a câncer podem ser facilmente detectadas, mas nem sempre facilmente quantificadas. Neste ponto, a utilização de blotting a partir de material transferido de PAGE-SDS, revelados com lectinas acopladas a cromóforos se apresenta como ferramenta ideal para a quantificação de proteínas tipo mucina (CHING & RHODES, 1988).

#### **1.4 - GLICOBIOLOGIA DA DISSEMINAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS**

Apesar de todos os avanços e conquistas da ciência, acumulados ao longo das duas últimas décadas, nossa compreensão sobre o sistema de progressão do câncer é indiscutivelmente pobre. Por exemplo, não sabemos quantas e quais aberrações estão presentes, nem quais os genes expressos, durante o processo de invasão tecidual e disseminação. Ainda não sabemos quais células derivadas de um tumor primário

conseguem sobreviver em sítios ectópicos e nem quais alterações determinam o início do processo metastático numa célula disseminada. Também não está totalmente esclarecido de que modo as mutações podem se acumular em células disseminadas durante o estágio de dormência do tumor, tão pouco a maneira como esta dormência é estabelecida e mantida.

Na verdade, sabemos tão somente que o câncer resulta da ação de variantes celulares que não respondem aos mecanismos regulatórios normais que previnem ou compensam a proliferação celular em animais multicelulares e que a perda dos mecanismos de regulação ou controle, semelhantes ao ciclo celular, morte celular programada, diferenciação e imunovigilância, conduzem a ondas de expansão clonal de variantes celulares que resultam em sua disseminação pelo organismo (BODMER, 1997). Como conseqüência, a instabilidade genética garante que 02 tumores oriundos de um mesmo tumor primário não são exatamente iguais, bem como que um único tumor não é composto de células geneticamente idênticas (LENGAUER *et al*, 1998). Deste modo, uma vez que algumas mutações, e a seleção imposta por estas mutações, levam a uma expansão clonal do tumor, a independência dos mecanismos regulatórios reflete uma seqüência particular de eventos mutacionais e seletivos durante o desenvolvimento tumoral.

Estudos de análise citogenética, envolvendo a perda da heterozigoticidade e hibridização genômica comparativa, tem revelado uma elevada heterogeneidade genética em tumores sólidos primários, a ponto de, em 70% dos tumores de mama se observar uma total divergência de clones. Isto descarta qualquer semelhança entre células tumorais de áreas diferentes de uma mesma lesão (TEIXEIRA *et al*, 1996).

Durante os processos de disseminação e metástase, a transição de uma forma de carcinoma *in situ* para carcinoma invasivo apresenta divergências genéticas proeminentes em diferentes pontos de infiltração da lesão. Entretanto, metástases encontradas em linfonodos de uma mesma região apresentam uma composição menos complexa, quando comparada com o tumor primário (PANDIS *et al*, 1998). Estes dados apontam para um processo de seleção passo-a-passo de um clone, capaz de se expandir. Comparado com um tumor primário, metástases distantes em câncer de mama são também caracterizadas por diferenças relevantes em sua composição genética (supressão ou deleção cromossômica, inversão de seqüências repetitivas, etc), refletindo uma instabilidade genética clonal e seleção de variantes de células tumorais derivadas de um clone progenitor comum (KUUKASJARVI *et al*, 1997).

Em muitos casos, tumores primários e clones de células metastáticas divergem quanto à duração da progressão tumoral. Exemplos clínicos deste cenário são tumores capazes de originar metástase sem, contudo, apresentar uma neoplasia primária identificável a qual pode, em alguns casos, regredir ou desaparecer durante o curso da propagação metastática (BELL *et al*, 1989).

#### 1.4.1 - Metástase

A propagação metastática de células tumorais se constitui numa das causas mais comuns de morte de indivíduos portadores de doenças neoplásicas. Não obstante, a elucidação dos mecanismos moleculares, que são a base de formação de novas colônias tumorais, tem sido um dos maiores objetivos da pesquisa oncológica durante as duas últimas décadas.

Uma característica comum a todos os tumores malignos é a sua habilidade de originar colônias secundárias ou metástases, que envolvem uma série de eventos complexos, cujos passos são fortemente interligados. Inicialmente, células de um tumor primário penetram no sistema circulatório como células simples ou em pequenos aglomerados celulares (êmbolos). Estas células sobrevivem a eventos potencialmente letais, específicos ou inespecíficos, desencadeados pelo sistema imune, e que ocorrem na luz dos vasos sanguíneos, até chegarem a um órgão alvo. Neste órgão, as células têm que extravasar o tecido e, finalmente, proliferar, invadindo o parênquima de órgãos vizinhos e dando origem a colônias secundárias, após o que todo o ciclo pode ou não ser repetido (EVAS, 1991).

Esta seqüência de eventos define o fenômeno metastático como um processo altamente específico, nos quais somente poucos órgãos estão geralmente envolvidos e se distinguem como alvo a partir das características inerentes ao tumor primário. Deste modo, muitas metástases parecem seguir rotas bem definidas que culminam em sua propagação em determinados órgãos, dependendo do tecido de origem do tumor primário.

Contudo, para que isso ocorra, faz-se necessária a participação de muitas classes de proteínas, envolvidas na estrutura celular de tecidos e que se encontram freqüentemente alteradas em células que apresentam capacidade invasiva ou metastática (TABELA 3). As proteínas afetadas incluem moléculas de adesão celular (CAMs) – notadamente membros da superfamília das imunoglobulinas e das caderinas

Ca<sup>++</sup> dependentes, ambas envolvidas na interação célula-célula e integrinas, as quais ligam células a substratos da matrix extra celular. De modo geral, todas estas interações levam sinais regulatórios para a célula (APLIN *et al.*, 1998).

A alteração observada com maior frequência em interações no ambiente celular envolve E-caderina; uma molécula de interação célula-célula expressa em células epiteliais. O acoplamento entre células adjacentes mediado por pontes de E-caderina resulta na transmissão de fatores anti-crescimento e outros sinais (TABELA 4). A função da E-caderina é aparentemente perdida na maioria dos cânceres epiteliais, por mecanismos que incluem a inativação mutacional da E-caderina, repressão transcripcional ou proteólise do domínio caderínico extra-celular (CHRISTOFORO and SEMB, 1999).

A indução da expressão de E-caderina em cultura de células de câncer e em modelos de carcinogênese reproduzidos em camundongos transgênicos diminui os fenótipos invasivos e metastáticos enquanto o bloqueio da função da E-caderina promove o aumento desses dois parâmetros (CHRISTOFORO and SEMB, 1999).

Alterações na expressão de moléculas da superfamília das imunoglobulinas também parece desempenhar um papel crítico no processo de invasão e metástase (JOHNSON, 1991). O caso mais claro envolve a participação de (Neural-Cell Adhesion Molecules) N-CAM que, frequentemente, se apresenta expressa na sua isoforma menos adesiva ou mesmo desprovida dessa propriedade, em neuroblastoma e em câncer de pulmão (KAISER *et al.*, 1996) e, praticamente ausente, em câncer coloretal e pancreático (FOGAR *et al.*, 1997). Do mesmo modo, experimentos em camundongos transgênicos evidenciaram o papel funcional de N-CAM na supressão de metástase (PERL *et al.*, 1999).

Modificações na expressão de integrinas são também evidenciadas em células invasivas e metastáticas, nas quais frequentemente são observadas alterações que se caracterizam pela modificação da estrutura de  $\alpha$  e  $\beta$  integrinas. Estas modificações resultam em diferentes sub-tipos de integrinas (mais de 22 detectadas até o momento) que apresentam preferências distintas por substratos (LUKASHEV and WERB, 1998). A expressão forçada de subunidades de integrina em cultura de células pode inibir ou induzir o comportamento adesivo e metastático, conferindo a estes receptores um papel de determinante central desse processo (VARNER & CHERESH, 1996).

Fatores angiogênicos também aparecem como indicadores da progressão tumoral e do desenvolvimento metastático. Este grupo de fatores inclui citocinas, fatores de crescimento semelhantes a FGF (Fator de Crescimento de Fibroblastos), EGF (Fator de Crescimento Epidérmico), PDGF (Fator de Crescimento Endotelial Derivado de Plaquetas), angiogenina, HGF/SF (Fator de Crescimento de Hepatócitos) e muitos outros que, embora não relacionados, desempenham um importante papel no crescimento tumoral.

Alguns dos fatores angiogênicos (Ex.: quimiocinas) apresentam um padrão diferenciado de expressão durante o desenvolvimento tumoral. Recentemente, LUAN *et al* (1997) descreveram o aumento da expressão de MGS/GRP (Atividade Estimulatória do Crescimento do Melanoma/ Proteínas Relacionadas ao Crescimento), com concomitante redução dos níveis de IP-10 em lesões tipo melanoma. Interessante notar que os subtipos de NSCLC (Células de Câncer de Pulmão), adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas também apresentam desenvolvimento distinto, relacionado ao padrão de expressão de diferentes quimiocinas (ARENBERG *et al*, 1997). Carcinomas de células escamosas mostram elevados níveis de IP-10 e baixo potencial metastático, com taxas elevadas de sobrevida de pacientes acometidos por esta patologia, sendo o tumor menos vascularizado que os adenocarcinomas, os quais estão associados a um péssimo prognóstico.

As quimiocinas e seus receptores em angiogênese, também parecem estar envolvidas no processo de migração, invasão e metástase da célula tumoral. Sabe-se que alguns tumores exibem padrões característicos de propagação metastática ou invasão tecidual, acometendo sempre determinados tecidos ou órgãos. Em outras palavras, células tumorais não parecem migrar ao acaso. Uma explicação para este fenômeno é que a migração sítio-específica de células tumorais pode ser determinada por receptores de quimiocinas presentes nas células e por quimiocinas presentes em órgãos alvo. De fato, existem evidências apontando para a veracidade desta hipótese. YOUNGS *et al* (1997) tem relatado que diferentes linhagens de células de carcinoma mamário respondem de modo distinto quando em presença de diferentes quimiocinas. Entretanto, é limitada a aceitação de que as quimiocinas podem, isoladamente, determinar os sítios de desenvolvimento de metástase. Outras moléculas, como as CAMs (integrinas/caderinas), proteases, fatores angiogênicos, etc, podem, também, estar envolvidas na propagação metastática.

Via de regra, tumores originados num mesmo órgão apresentam alto grau de similaridade no que diz respeito a seu comportamento metastático e, deste modo as

metástases podem, freqüentemente, ser geradas nos mesmos órgãos alvo. Por exemplo, carcinomas metastatizam comumente para linfonodos, o que sugere que a localização anatômica, bem como as circulações sanguínea e linfática contribuem para este processo. Contudo, a drenagem anatômica por si só é insuficiente para explicar a localização de metástases em sítios específicos (MASAYUKI *et al*, 1995).

Tem sido relatado que carcinomas de cólon originam metástases, preferencialmente, em linfonodo e fígado; carcinoma de mama em ossos; carcinoma de pulmão em cérebro, fígado e adrenal. Estudos recentes têm confirmado que moléculas de adesão celular desempenham um papel importante no processo metastático e que a desregulação dos mecanismos de adesão contribui para a formação de metástase. (KUUKASJARVI *et al*, 1997; PANDIS *et al*, 1998).

TABELA 3. Marcadores tumorais de natureza glicoprotéica associados ao câncer epitelial

---

**Epítomos carboidratos**

Alterações periféricas e centrais de carboidratos

A, B,H,Le<sup>a</sup>,Le<sup>b</sup>

Sialyl Le<sup>a</sup> (CA19-9), sialil tipo I (CA 50), Span I

Sialyl Le<sup>x</sup>, Le<sup>x</sup>, Le<sup>x</sup> polimerico

Le<sup>y</sup>

Alterações na região nuclear de carboidratos

T, Tn, Sialyl Tn

**Epítomos peptídeos**

Apomucinas

MUC1-MUC-6

**Epítomos indeterminados**

M1, SIMA, LIMA, NCC-CO-450, DU-PAN2, Ypan-1, CA-125

---

Adaptada de YOUNG *et al.*, 1996.

#### 1.4.2 - Interações célula-célula e matrix extracelular

Independente do sexo (M/F) a forma mais comum de câncer é, sem dúvida, o carcinoma (tumores derivados de estruturas epiteliais). Em seu estado normal, o epitélio é caracterizado por um discreto, porém altamente organizado, arranjo de células adjacentes em uma ou mais placas unidas à membrana basal. Este arranjo ocorre em função das proteínas de adesão celular presentes na membrana plasmática de células epiteliais. Algumas dessas proteínas se encontram relacionadas a funções complexas enquanto outras são difusamente distribuídas ao longo da membrana plasmática. Componentes adicionais, a começar pelas proteínas que conferem adesão a matrix extracelular, participam da adesão celular à membrana basal (TABELA 4).

Em verdade, a adesão celular se divide de acordo com os tipos celulares participantes, bem como pelo tipo de moléculas responsáveis por sua união. A adesão célula-célula é denominada homotípica quando envolve células idênticas e heterotípica quando as células aderentes são morfo ou fisiologicamente distintas. Por outro lado, a adesão é também descrita como sendo homotípica quando é formada por interações mantidas por proteínas de adesão idênticas, presentes na superfície das células participantes e heterotípica quando a(s) proteína(s) de adesão de uma célula se encontra ligada a uma proteína ou outro componente diferente, presente numa célula adjacente (TEDDER *et al* 1995).

Considerando o predominante papel desempenhado por proteínas de adesão na manutenção de estruturas epiteliais coesas, é possível que uma transformação gradual ocorra, até que um tecido normal se transforme num carcinoma invasivo e, esta transformação, envolve a descontinuidade ou desregulação dos mecanismos de síntese e/ou expressão de moléculas de adesão celular (JOTHY, *et al*, 1995).

De certo modo, isto constitui uma condição necessária para a migração de uma célula ou conjunto de células tumorais através da membrana basal, desde o sítio de origem de proliferação até seu estabelecimento num novo tecido, esteja este distante ou adjacente. Conseqüentemente, uma compreensão detalhada das alterações que ocorrem em moléculas de adesão, freqüentemente presentes na superfície de células carcinomatosas, se apresenta como passo determinante para que se possa descobrir como células tumorais invadem tecidos e progridem em seu processo de disseminação, culminando numa verdadeira cascata metastática.

TABELA 4. Famílias de Moléculas de Adesão Celular

---

**Família das Integrinas**

$\beta$ 1 integrinas: VLA-1, VLA-2, VLA-3, VLA-4, VLA-5, VLA-6.

$\beta$ 2 integrinas: LFA-1, Mac-1, p150, p95

$\beta$ 3 integrinas: gpIIbIIIa, receptor de vitronectina

$\beta$ 4- $\beta$ 9 integrinas

**Superfamília das imunoglobulinas**

CD2, CD4, CD8

ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, NCAM, L1, Po, CEA

**Selectinas**

selectina-L

selectina-E

selectina-P

**Família de receptores hialuronato**

CD44 e suas isoformas

**Família sialomucina**

GlyCAM-1, MAdCAM-1, PSGL

**Família das caderinas**

caderina-E

caderina-N

caderina-P

outras caderinas

---

Adaptada de MIYASAKA, 1995.

Não obstante, o contato entre células epiteliais envolve elementos morfológicamente distintos como: junções coesas, junções aderentes, desmossomas e "gaps" juncionais nos quais 02 tipos de receptores de adesão encontram-se particularmente envolvidos. O primeiro tipo consiste de caderinas, que podem ser divididas em sub-classes, mediando a adesão célula-célula em junções aderentes e caderinas desmossomais, presentes em desmossomas. Estas moléculas transmembrana possuem região extracelular ou ectodomínio formado por 05 regiões "caderin-like" definidas como EC-1-EC-5, todas  $Ca^{++}$  dependentes. O segundo tipo de receptores é encontrado em proteínas envolvidas nos "gaps" juncionais tais como conexinas, ocludinas e claudinas as quais são constituídas por 04 regiões transmembrana e 01 região carboxiterminal intracelular (TROYANOVSKY *et al*, 1999).

O grau de especificidade das interações intracelulares é constituído por diferentes receptores de adesão como integrinas e caderinas. A força adesiva pode ser modificada pelas ligações moleculares mantidas entre os receptores e o citoesqueleto cortical constituído por actina. A perda de componentes específicos da ECM, alterações em receptores ECM ou proteínas de adesão e crescimento celular diferenciado estão diretamente envolvidos na diferenciação de tipos celulares específicos. Deste modo, adesão célula-célula ou célula-ECM tem se apresentado como um fator importante que determina o bloqueio da morte celular programada (BISSEL & NELSON, 1999).

Tem sido relatado que a perda ou diminuição da adesão em células de carcinoma invasivo contribui para a progressão de células epiteliais em metástase. No entanto, dados recentes têm revelado que este fenômeno também está envolvido nos primeiros passos da formação tumoral (TLSTY 1998). Neste sentido, o papel de caderinas e integrinas tem se mostrado decisivo. As caderinas são capazes de interagir de modo homotípico, através de seu domínio extracelular, conectando-se às vias de transmissão de sinais intracelulares através de seus domínios citoplasmáticos. Estes domínios estão ligados ao citoesqueleto actina por meio de cateninas ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) que estão envolvidas em passos importantes que regulam as vias de sinalização.

Integrinas participam na regulação da adesão célula-substrato. Estas moléculas não somente mediam a adesão celular mas, também, participam na geração de sinais intracelulares que participam da regulação do ciclo celular (JULIANO & HASKILL, 1993). Alguns trabalhos têm demonstrado o papel destas proteínas na formação de metástase e iniciação de processos tumorais. Transfecção de cDNA de E-caderina, com conseqüente superexpressão desta proteína, bloqueia o potencial invasivo de

células de carcinoma mamário, ao mesmo tempo em que o uso de Mab anti E-caderina induz a dissociação e o aumento do potencial invasivo destas células (FRIXEN *et al*, 1991). Do mesmo modo, superexpressão de  $\alpha_5\beta_1$  integrinas reduz a tumorigenicidade e a mutabilidade de uma grande variedade de células (SAUDERS *et al*, 1998).

Caderinas, bem como moléculas que interagem com seus domínios citoplasmáticos e regulam suas funções, têm sido freqüentemente encontradas com elevados índices de mutação em carcinomas (TLSTY 1998). Estas mutações podem ocorrer em qualquer parte do complexo de adesão, sempre resultando em perda ou comprometimento da função (RISINGER *et al*, 1994; PIERCEALL *et al*, 1995). Em algumas células, entretanto, a reversão do fenótipo invasivo para não-invasivo pode ser modulada pela expressão de caderinas funcionais. No entanto, não está claro até o momento, se a perda da adesão celular mediada por caderinas é causa ou consequência da progressão tumoral *in vitro*. Contudo, a manipulação dos níveis de E-caderina em sistemas de progressão tumoral utilizando camundongos como modelos, tem demonstrado que enquanto a expressão de E-caderina retém o desenvolvimento tumoral num estágio adenomatoso, a expressão de cepas mutantes (dominante negativo) de E-caderina nas mesmas células é capaz de induzir as primeiras invasões e metástases, demonstrando que a perda de controle da adesão é um passo limitante na progressão tumoral em carcinogênese (PERL *et al*, 1998a).

### 1.4.3 - Integrinas

Constituem uma vasta família de moléculas heterodiméricas formadas por uma cadeia  $\beta$  comum, associada com uma grande variedade de cadeias  $\alpha$ , o que confere a especificidade ao ligante. A subfamília  $\beta_1$  contém 06 heterodímeros (VLA-1 a VLA-6) que se apresentam como receptores para componentes da matrix extracelular semelhantes a laminina (VLA-1, 2, 3 e 6), colágeno (VLA-1, 2, 3) e fibronectina (VLA-3, 4 e 5) (JOTHY *et al*, 1995). Um dos membros desta subfamília (VLA-4), também age como molécula de adesão célula-célula, sendo denominada de VCAM-1.

Expressão anormal de integrinas  $\beta_1$  tem sido descrita como estando relacionada ao aumento do potencial metastático de células tumorais. Por exemplo, o aumento da expressão de VLA-2 tem sido associado com o comportamento metastático de rhabdomiosarcoma (CHAN *et al*, 1991). Do mesmo modo, tem sido reportado que a

expressão de VLA-3 varia de acordo com o estágio de progressão do melanoma humano (ALBELDA *et al*, 1990).

VLA-4 expressa-se principalmente em células linfóides e mielóides, estando freqüentemente, envolvida em interações célula-célula e, também, é encontrada em células de melanoma, podendo agir como receptor para fibronectina (MOULD *et al*, 1990). Uma vez que a VLA-4 está relacionada ao tráfico normal de leucócitos, sua presença na superfície de células tumorais pode sugerir que estas células utilizem o receptor para favorecer sua disseminação hematogênica. Neste sentido, uma correlação positiva foi demonstrada entre a expressão de VLA-4 integrinas e o potencial metastático de células do carcinoma de mama (BAO *et al*, 1993). Em contraste, a expressão de VLA-5 tem sido apontada como tendo uma relação inversa com a motilidade e a tumorigenicidade em linhagens de células de murina transformadas por estimulação viral (PLATEFABER & HYNES, 1989).

$\beta_2$  integrinas são compostas por 03 membros LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) e p150,95 (CD11c/CD18). Pelo fato de serem expressas exclusivamente em leucócitos, as integrinas  $\beta_2$ , são denominadas integrinas leucocitárias. A perda de regulação de LFA-1 está diretamente implicada com o potencial metastático de linfoma humano (KANSAS & DAILEY, 1989) e mieloma humano (Van RIET & Van CAMP, 1993). A inibição de integrinas leucocitárias através da utilização de anticorpos monoclonais anti CD18 tem se mostrado capaz de bloquear a invasão e disseminação de células de linfoma inoculadas por via sub-cutânea (ZAHALKA *et al*, 1993).

Entretanto, análises imunohistológicas da expressão de integrinas em espécimes clínicos têm demonstrado que a função destas moléculas não se encontra exclusivamente relacionada com sua expressão. Deste modo, a adesividade de uma determinada integrina pode ser regulada rapidamente nas células nas quais esta é expressa sem que se faça necessária qualquer alteração no seu nível de expressão (Van KOOYK, *et al*, 1993).

#### 1.4.4 - Fucosiltransferases

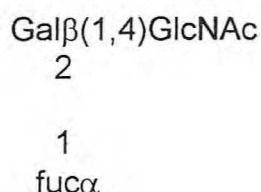
Fucosiltransferases são enzimas responsáveis pela transferência de resíduos L-fucose, provenientes do GDP-Fucose, em posição  $\alpha(1,2)$ ,  $\alpha(1,3)$ ,  $\alpha(1,4)$  ou  $\alpha(1,6)$  sobre diferentes aceptores oligossacarídicos. Algumas destas enzimas participam da

biossíntese de antígenos de grupos sanguíneos tais como: H, A, B, Lewis a( $Le^a$ ), Lewis b( $Le^b$ ), Lewis x( $Le^x$ ), Lewis y( $Le^y$ ), sialil Lewis x( $sLe^x$ ) e sialil Lewis a( $sLe^a$ ) (COSTACHE *et al*, 1997).

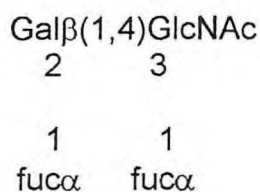
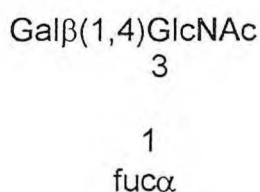
Até o momento, diferentes fucosiltransferases têm sido isoladas a partir de tecidos animais, incluindo o homem. De um modo geral, estas enzimas são codificadas por genes denominados FUT, contidos em cromossomos distintos e que apresentam, via de regra, capacidade de transcrever enzimas tipo  $\alpha(3)$ ,  $\alpha(3,4)$ ,  $\alpha(2)$  e  $\alpha(6)$ .

As  $\alpha(3)$ Fuc-T transferem a L-Fucose do GDP-Fucose em posição  $\alpha(1,3)$  para resíduos GlcNAc de aceptores glicosilados do tipo 1 e do tipo 2, sendo o tipo 1: Gal $\beta(1,3)$ GlcNAc e o tipo 2: Gal $\beta(1,4)$ GlcNAc (COSTACHE *et al*, 1997).

As isoformas, bem como as quantidades de  $\alpha(3)$ Fuc-T, diferem segundo o estágio de desenvolvimento embrionário e tecido adulto estudado. Deste modo, no início do estágio embrionário, somente uma  $\alpha(3)$ Fuc-T (de tipo mielóide – denominada FUT4) é geralmente encontrada. Progressivamente, e de acordo com a diferenciação tecidual, outras isoformas de  $\alpha(3)$ Fuc-T podem ou não ser encontradas. Via de regra, no coração e no cérebro a  $\alpha(3)$ Fuc-T permanece como sendo a do tipo mielóide, cujo gene está presente no cromossomo 11 (COSTACHE *et al*, 1997). Esta enzima é responsável, nestes tecidos, pela transferência de L-fucose para o antígeno H do tipo 2 (2'fucosil-N-acetilactosamina):



para formar os antígenos  $Le^x$  e  $Le^y$ :



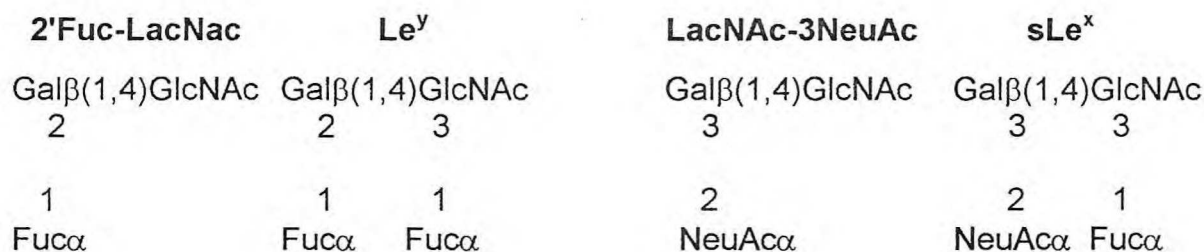
Em células mielóides, a enzima utiliza  $Mn^{++}$  como ativador, enquanto que em células cerebrais o ativador utilizado é o  $Co^{++}$ .

Em glóbulos brancos, a isoforma da  $\alpha(3)$ Fuc-T, que catalisa a reação, é descrita como sendo do tipo leucócito ou FUT7, cujo gene codificante também se encontra no

cromossomo 11 (COSTACHE *et al*, 1997). Esta enzima é responsável pela síntese do antígeno sLe<sup>x</sup> a partir do acceptor 2,3 sialil-N-acetilactosamina:



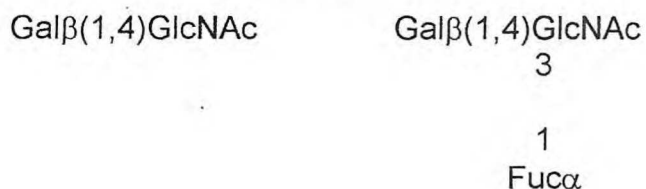
No plasma e no fígado a isoforma da enzima α(3)Fuc-T, que catalisa a reação, é chamada de tipo Plasmático ou FUT6, cujo gene é encontrado no cromossomo 19 (COSTACHE *et al*, 1997). Esta enzima pode participar da formação de Le<sup>y</sup> e sLe<sup>x</sup>, na medida em que utiliza como aceptores 3'sialil-N-acetilactosamina e 2'fucosil-N-acetilactosamina:



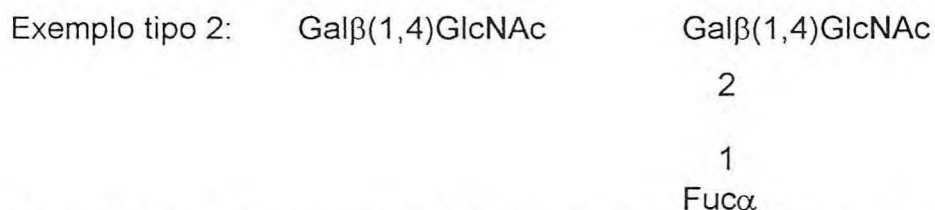
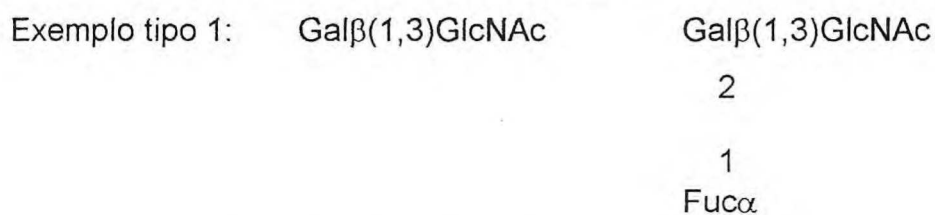
Várias fucosiltransferases tipo α(3,4) têm sido isoladas em tecido animal, dentre outros, e parecem estar presentes em maior quantidade na maioria dos tecidos onde são encontradas.

Fucosiltransferases tipo Lewis ou FUT3/FUT5 (cujos genes estão no cromossomo 19 e apresentam 85% de homologia) são encontradas na vesícula biliar, nos rins, no leite, intestino delgado e grosso (COSTACHE *et al*, 1997). A enzima utiliza aceptores do tipo 1 (2'fucosilacto-N-Biose e 3'sialilacto-N-Biose), sobre os quais ela transfere resíduos de L-fucose em posição α(1,4), bem como aceptores do tipo 2 (Sialil-N-acetilactosamina e fucosil-N-acetilactosamina) para os quais transfere resíduos L-fucose em posição α(1-3) permitindo, deste modo, a síntese de todos os antígenos Lewis, bem como sLe<sup>x</sup> e sLe<sup>a</sup>.

No caso específico da isoforma codificada pelo gene FUT5, a fucosilação do tipo  $\alpha(1-3)$  é realizada sobre acceptor LacNAc para formar o antígeno Le<sup>x</sup>:



As  $\alpha(2)$ Fuc-T, encontradas em glândulas submaxilares humanas, transferem resíduos de L-fucose para a posição  $\alpha(1,2)$  sobre um resíduo de galactose do motivo GalGlcNAc de tipos 1 e 2 (FUT1 e FUT2, respectivamente), permitindo a elaboração de antígeno H de tipos 1 e 2 (COSTACHE *et al*, 1997).



As  $\alpha(6)$ Fuc-T, denominadas FUT8 e comumente encontradas em fibroblastos, efetuam a fucosilação em posição  $\alpha(1,6)$  sobre resíduos GlcNAc (ligado a um resíduo de asparagina) do núcleo de N-glicoproteínas.

No homem, tem sido estabelecido que a fucosilação em posição 2 precede a fucosilação em posição 3. Este padrão de atividade pode ser verificado, por exemplo, quando da formação de Le<sup>y</sup>, resultante da fucosilação em posição 3 de um acceptor previamente fucosilado em posição 2 (COSTACHE *et al*, 1997).

Oligossacarídeos fucosilados presentes na superfície celular têm recebido uma grande atenção por causa do importante papel que desempenham na adesão celular, durante o processo inflamatório, bem como por se apresentarem modificados em células neoplásicas (OULMOUDEN *et al*, 1997). A biossíntese destes glicoconjugados requer a ação ordenada de varias glicosiltransferases, dentre as quais a fucosilação é, via de regra, o último passo (WATKINS, 1995).

Recentemente, os genes que codificam 05  $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferases humanas foram clonados e designados como: FUT3, que codifica a enzima Lewis

$\alpha(1,3/1,4)$ fucosiltransferase ou FUT-T3; FUT4, que codifica a  $\alpha(1,3)$ fucosiltransferase mieloide, ou FUT-T4; FUT5 que codifica uma  $\alpha(1,3)$ fucosiltransferase inespecífica denominada FUC-T5; FUT6 que codifica uma  $\alpha(1,3)$ fucosiltransferase plasmática ou FUC-T6 e FUT7 que codifica uma  $\alpha(1,3)$ fucosiltransferase de leucócitos ou FUC-T7 (NGUYEN *et al*, 1998).

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 – Geral**

Detectar estruturas glicanas presentes em membranas de células neoplásicas, possivelmente relacionadas com a capacidade de invasão.

### **2.2 – Específicos**

Identificar os tipos de estruturas glicanas predominantes na superfície dos diferentes tipos celulares estudados utilizando-se, para tanto, lectinas acopladas a cromóforos.

Quantificar as estruturas glicanas com base no reconhecimento destas estruturas pelas lectinas utilizadas.

Avaliar o tipo de interação lectina-célula neoplásica quanto à incorporação ou endocitose do complexo lectina-cromóforo e indução de apoptose.

Detectar as principais enzimas fucosiltransferases envolvidas na produção das estruturas glicanas associadas à membrana por meio da incorporação de monossacarídeos marcados radioativamente.

Isolar e caracterizar mRNAs de fucosiltransferases que codificam as estruturas glicanas predominantes.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - LECTINAS

Foram utilizadas 15 lectinas: 05 do gênero *Canavalia* (*Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia bonariensis*, *Canavalia grandiflora* e *Canavalia marítima*); 05 do gênero *Dioclea* (*Dioclea grandiflora*, *Dioclea guianensis*, *Dioclea virgata*, *Dioclea violacea* e *Dioclea rostrata*); 01 do gênero *Cratylia* (*Cratylia floribunda*); 01 do gênero *Vatairea* (*Vatairea macrocarpa*); 01 do gênero *Parkia* (*Parkia platycephala*); 01 do gênero *Ulex* (*Ulex europeus*) e 01 do gênero *Lotus* (*Lotus tetragonulobos*).

##### 3.1.1 - Isolamento e caracterização de lectinas

Todas as lectinas dos gêneros *Canavalia* e *Dioclea*, bem como as lectinas dos gêneros *Cratylia*, *Parkia* e *Vatairea* foram isoladas e purificadas no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, conforme metodologia descrita por CAVADA *et al* (1996).

As lectinas de sementes de *Ulex europeus* e *Lotus tetragonolobus* foram obtidas comercialmente (Sigma Co.).

##### 3.1.1.2 - Avaliação do grau de pureza das lectinas utilizadas

Foram realizados experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida, adaptado para placas de vidro, seguindo-se a metodologia descrita por LAEMMLI (1970).

O gel de separação, contendo uma concentração final de poliacrilamida de 15% (m/v), foi montado de acordo com o seguinte protocolo (para um volume final de 10 ml de gel):

Acrilamida : bisacrilamida (30 : 0,8%)	5,0 ml
Tris-HCl 3 M pH 8,8	1,25 ml
SDS 10% (m/ v)	100 $\mu$ l
Persulfato de amônio 1,5% (m/v)	500 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O milli Q	3,15 ml
TEMED	5 $\mu$ l

Após a polimerização, o gel de aplicação, contendo uma concentração final de poli-acrilamida de 3,5% (m/v), foi montado de acordo com o seguinte protocolo (para um volume final de 5 ml):

Acrilamida : bisacrilamida (30 : 0,8%)	625 $\mu$ l
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,25 ml
SDS 10% (m/ v)	50 $\mu$ l
Persulfato de amônio 1,5% (m/v)	250 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O milli Q	2,82 ml
TEMED	5 $\mu$ l

As lectinas analisadas (2 mg) foram dissolvidas em 1 ml de tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, contendo SDS 2% (m/v) e  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (v/v) e tratadas a 100° C por 10 minutos. Após resfriamento, as amostras foram acrescidas de 2  $\mu$ l de azul de bromofenol 0,1% (m/v) e 1 mg de cristais de sacarose.

A corrida eletroforética foi realizada em posição vertical com amperagem constante de 25 mA por 150 minutos, usando-se Tris 0,025 M pH 8,3 contendo glicina 0,192 M e SDS 0,1%.

As bandas protéicas foram visualizadas por coramento com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2% (m/v) em metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). O gel foi descorado em solução contendo metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).

### 3.2 - MARCAÇÃO DE LECTINAS COM FITC

Alíquotas contendo 1 mg de lectina, acrescida do monossacarídeo inibidor (1 M), foram dissolvidas em 2 ml de solução de conjugação (1,5 ml de tampão

carbonato/bicarbonato de sódio 0,2 M, pH 9,3, contendo 0,5 ml de etilenoglicol). Após rápida agitação em vortex, 500 µl de uma solução de FITC (0,05 mg, em etilenoglicol) foram adicionados e a mistura submetida à agitação por 5 h, a 4°C e ao abrigo da luz. Após incubação, a fração contendo lectina/FITC foi separada da FITC não conjugada por cromatografia de exclusão molecular em coluna PD 10 (Pharmacia LKB – 9,0 ml), previamente equilibrada com água Milli Q saturada com N-butanol 5%, a um fluxo contínuo mantido por força da gravidade. Imediatamente antes da cromatografia, 450 µl da solução de equilíbrio foi adicionado à amostra, sendo em seguida, aplicada à coluna. O pico I, correspondendo a fração lectina/FITC foi retirado com 3,5 ml de solução N-butanol 5%, enquanto que a FITC não conjugada foi eluída no Pico II com 10 ml da mesma solução.

### 3.3 - CÉLULAS

Foram utilizados 05 tipos celulares derivados de câncer de cólon humano, gentilmente cedidas pela Dra. Danuta Dus do Instituto de Cancerologia de Wroclaw – Polônia e preparadas conforme segue.

#### 3.3.1 - Seleção *in vitro* de células LS 180

A seleção das células de câncer de cólon humano da linhagem LS 180 foi realizada com base na sua afinidade aumentada por células endoteliais HPLNEC.B3A. Para tanto, uma suspensão de células de carcinoma de cólon ( $1 \times 10^5$  cels/100 µl) foi depositada na superfície superior de filtros nucleopore de 8 µm (Costar, França). Após 48-72 horas, as células que haviam migrado para a superfície inferior da membrana foram removidas usando-se uma solução contendo tripsina 0,25%, EDTA 0,05%, sendo posteriormente lavadas e propagadas *in vitro*. A pré-seleção foi repetida três vezes. Também foram utilizadas células endoteliais imobilizadas para uma seleção mais acurada. Com este intuito, células endoteliais HPLNEC.B3A foram previamente fixadas em solução de paraformaldeído 2%, por 10 minutos e a 4°C, seguido de neutralização com uréia 0,2 mM e lavagem com solução de PBS. Sobre a camada formada por células endoteliais foram adicionadas as células LS 180, previamente selecionadas, seguido de incubação por 20 minutos, a 4°C. Células não aderentes foram retiradas por

meio de lavagem com solução de PBS e as células aderidas foram recuperadas após rápida lavagem com solução contendo tripsina 0,25% e propagadas *in vitro*.

### 3.3.2 - Seleção *in vitro* de células EB3

Seguindo-se a metodologia descrita para a obtenção de células da linhagem LS 180, o uso de filtros e células endoteliais permitiu a obtenção de variantes com elevado poder invasivo, denominadas EB3. Estas células são caracterizadas por elevada adesividade a células endoteliais quando comparadas com a linhagem parental LS 180.

### 3.3.3 - Seleção *in vivo* de células 3LNLN, 5W e 8W

Para a seleção de variantes com elevado poder metastático, suspensões contendo LS 180 e EB3 foram inoculadas, usando-se diferentes vias, em camundongos atímicos (camundongos atímicos NCr, obtidos do Cancer National Institute, Frederic Cancer Research and Developmental Center – USA), como segue:

- Via intra-esplênica: camundongos foram inoculados com suspensão contendo  $2 \times 10^6$  cels/ 50  $\mu$ l de salina/animal. Animais com tumores visíveis foram sacrificados 4-12 semanas após a inoculação e autopsiados para avaliação de tumores primários e metástases.
- Via intravenosa: camundongos foram inoculados com suspensão contendo  $1 \times 10^6$  cels/ 50  $\mu$ l de salina/animal diretamente injetados na veia marginal da orelha.
- Transplante de parede intrainestinal: fragmentos de 1-2 mm<sup>2</sup>, derivado de tumor primário subcutâneo, foram fixados a parte serosa do cecum de camundongos sadios. Após 4-12 semanas os animais foram sacrificados e autopsiados para a avaliação de tumores primários e metástases.
- **3LNLN** – Foram células obtidas no início da seleção *in vivo* a partir de metástases presentes em linfonodos, oriundas de inoculação intravenosa.
- **5W** – Foram isoladas a partir de metástases hepáticas de animais inoculados por via esplênica.
- **8W** – Foram isoladas a partir de linfonodos sub-mandibulares após inoculação por via intravenosa.

### 3.4 - CULTURA DE CÉLULAS

Células da linhagem LS 180 e suas variantes: EB3, 3LNLN, 5 W e 8 W obtidas a partir de câncer de cólon humano e mantidas sob congelamento em N<sub>2</sub> líquido foram recuperadas e propagadas em cultura. Para cada um dos tipos celulares, uma alíquota contendo  $3 \times 10^6$  células foi descongelada em banho maria por 15 minutos, centrifugada a 1100 x RPM, por 5 minutos, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 500 µl de meio de cultura (OPTIMEN, contendo 5% de SBF e 0,001% de gentamicina), divididas em 02 alíquotas e adicionadas a frascos de cultura de 25 ml (contendo 5 ml de meio de cultura). As células foram mantidas em câmaras de cultura contendo atmosfera saturada por 5% de CO<sub>2</sub>, repassadas a cada 07 dias, sendo o meio de cultura substituído a cada 52 horas.

### 3.5 - PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA AS CÉLULAS

Os 05 tipos celulares utilizados neste trabalho foram mantidos e propagados usando-se meio de cultura OPTIMEM acrescido de soro bovino fetal 5% e gentamicina 0,001%, como segue:

OPTIMEN	500 ml
Soro bovino fetal	25 ml
Gentamicina	500 µl

### 3.6 - CITOMETRIA DE FLUXO

Os ensaios de detecção de glicoconjugados de membrana nas 05 linhagens celulares de câncer de cólon humano, utilizando-se lectina/FITC, foram realizados em citômetro FACScalibur Beckton & Dickson, como segue:

Amostras de células mantidas em cultura como descrito no item 3.5 foram recuperadas após 02 lavagens com PBS filtrado (membrana 0,2 µl), utilizando-se barras magnéticas para a recuperação das células aderidas aos frascos de cultura. Após a recuperação, as células foram ressuspensas em 10 ml de PBS, seguido da estimativa do total de células em câmara de Neubauer, sob microscopia ótica, e

centrifugação a 1.500 x RPM, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante, contendo lectina/FITC não conjugado foi desprezado e as células ressuspensas em solução PBS/BSA 0,1% em volume igual ao necessário para a obtenção de uma suspensão de  $10^7$  células/ml.

A cada 200µl de uma solução contendo lectina/FITC (20µg) em PBS/BSA 0,1% foi adicionado 200µl de uma suspensão de células ( $2 \times 10^5$  células). A mistura reagiu por 1 hora a 4°C e ao abrigo da luz, seguido de centrifugação a 1.500 x RPM por 15 minutos e a 4°C. O sobrenadante, contendo lectina/FITC não ligado foi desprezado por aspiração e o precipitado ressuspenso em 1 ml de PBS. A medida da intensidade de fluorescência foi realizada utilizando-se uma escala logarítmica previamente determinada, de acordo com o tipo celular estudado. Utilizou-se BSA/FITC como controle, bem como monossacarídeos específicos (na concentração 0,15 M) para a inibição da interação lectina/glicoconjugados de membrana.

### **3.7 - DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS NO LISADO CELULAR**

Proteínas do lisado celular foram obtidas a partir de amostras contendo  $10^7$  células dissolvidas em 50 µl de tampão de lise (Tampão HEPES 0,01 M, pH 7,2, contendo Triton X-100 0,1%). A suspensão permaneceu por 30 minutos, a 4°C, sendo rapidamente homogeneizada (usando-se agitador tipo vortex) a intervalos regulares de 5 minutos, seguido de centrifugação a 15.000 x g, por 10 minutos, a 4°C. O precipitado foi desprezado e ao sobrenadante dividido em alíquotas de 1, 5, 10, 15 e 20 µl, as quais foram utilizadas para cálculo de concentração de proteínas usando-se como padrão BSA.

### **3.8 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FUCOSILTRANSFERASES PRESENTES NO LISADO CELULAR**

Alíquotas de lisado celular, obtidas como descrito no item anterior, foram utilizadas na determinação de atividades de fucosiltransferases presentes nas 05 variantes de células de câncer de cólon humano estudadas. 10 µl de lisado celular foram adicionados a tubos eppendorffs acrescidos de 40 µl de meio reacional contendo doador [GDP  $^{14}\text{C}$ -FUC (0.025 µCi=0,084 nMol)/GDP-FUC (1,09 nMol)], 5 µl de  $\text{MnCl}_2$

50 mM, 2,5 µl AMP/UMP 70 mM, 2,5 µl de fuconolactona 100 mM, 5 µl de acceptor (LacNAc 30 mM, Lacto-N-Biose 30 mM, Lacto-N-Tetraose 30 mM, Lacto-N(neo)-Tetraose 30 mM ou Fenilgalactose 30 mM), 25 µl de Tampão HEPES 125 mM, pH 7,2, contendo Triton X 100 0,1% e polietilenoglicol 6000 4%. A mistura foi encubada a 37°C, por 3 h, em banho maria e a reação bloqueada por adição de 300 µl de água milli Q, seguido de congelamento a -20°C por 12 h. A purificação dos produtos fucosilados foi realizada utilizando-se suportes cromatográficos adequados à natureza orgânica dos aceptores como segue:

### 3.8.1 - Cromatografia em coluna de DOWEX (1W\*8, Cl-) para os aceptores LacNAc, Lacto-N-Biose, Lacto-N-Tetraose e Lacto-N(neo)-Tetraose

Após descongelamento à temperatura ambiente, as amostras foram aplicadas em colunas contendo 1 ml de gel, previamente equilibradas com 10 ml água Milli Q. A eleição dos produtos fucosilados foi feita com 2 ml de água. Do volume (2,35 ml) recuperado após a cromatografia, 0,35 ml foram utilizados para contagem de DPM em Contador de Radioatividade Beckman (Mod. LS 1800), após a adição de 4ml de líquido de cintilação aquasafe. O excedente foi liofilizado, ressuspenso em 100 µl de água e, deste total, uma alíquota de 30 µl foi utilizada para separação dos produtos por cromatografia em papel Whatman nº 3, sendo o restante congelado para utilização posterior.

### 3.8.2 - Cromatografia em colunas C18 para o acceptor fenilgalactose

Após descongelamento a temperatura ambiente, as amostras tiveram seus volumes elevados para 1 ml por adição de 650 µl de água Milli Q e, em seguida, foram aplicadas em colunas contendo 1 ml de gel, previamente ativadas com 10 ml de metanol e equilibradas com 20 ml de água. A amostra foi aplicada a coluna gota-a-gota, seguida de 2 ml de água. O volume eluído (3 ml, fase aquosa) foi repassado 2 vezes na mesma coluna. Em seguida, a coluna foi lavada com 20 ml de água e o precursor fenilgalactosídeo eventualmente fucosilado foi retirado da coluna utilizando-se 3 ml de metanol. A contagem de DPM foi realizada tomando-se 0,5 ml (tanto para a fase aquosa quanto para a fase metanólica). A fase metanólica restante (2,5 ml) foi

evaporada utilizando-se  $N_2$  e, em seguida, ressuspensa em 100  $\mu$ l de água, sendo utilizada para separação dos produtos por cromatografia em papel Whatman n° 3.

### 3.8.3 - Cromatografia em papel Whatman N° 3

O material eventualmente fucosilado obtido após as cromatografias em DOWEX e C18 foi submetido à cromatografia descendente em Papel Whatman N° 3 como segue: As amostras (30  $\mu$ l dos eluatos cromatográficos de DOWEX e 100  $\mu$ l dos eluatos de C18), bem como 15  $\mu$ l dos marcadores ( $Le^x$ ,  $Le^a$ , fucose e fenilgalactose) foram aplicados a 10cm do bordo da folha (47 x 30 cm) e a 5cm de distância entre si. A cromatografia foi realizada em cuba de vidro, por 12 horas e em presença de solvente acetato de etila/piridina/ácido acético/água (5/5/1/3 -v/v/v/v). Após o término, as folhas foram deixadas em capela para a completa evaporação do solvente, cortadas em colunas de 2,5 cm de espessura as quais foram posteriormente divididas em partes iguais de 1 cm cada, totalizando 46cm/coluna/amostra. Uma vez cortados, os pedaços do papel foram colocados dentro de tubos de contagem, contendo 500  $\mu$ l de água e por 12 horas, para a extração dos compostos. A contagem de DPM foi realizada após a adição de 4 ml de líquido de cintilação aquasafe, em contador de cintilação Beckman Mod. LS 1800. Os valores obtidos foram expressos nos gráficos em DPM/cm.

### 3.8.4 - Cromatografia em sistema DIONEX para os aceptores Lacto-N-Tetraose e Lacto-N(neo)-Tetraose

Atividade fucosiltransferásica das 05 linhagens celulares estudadas foi avaliada a partir da análise de glicanos fucosilados por HPAEC (High-pH Anion-Exchange Chromatography) acoplado a um sistema DIONEX, de acordo com a metodologia descrita por THURL *et al* (1996). Alíquotas de 20  $\mu$ l contendo aceptores eventualmente fucosilados, obtidos após a cromatografia em DOWEX foram separados em colunas Carbon-Pac PA-100 (Dionex 4 x 25 mm), com fluxo de 1 ml/mim e a temperatura ambiente em aparelho DX 300 Bio-LC-system (Dionex, Idstein, Germany), equipado com um detector de pulso eletroquímico (PED 2) e um registrador (AS 3500; Spectra Physics, Darmstadt, Germany). Eluatos foram obtidos utilizando-se um gradiente de NaOH/NaOAc variando em função do tempo: 0-20 mim (NaOH 30 mM); 20-34 mim

(NaOH 30-100 mM); 34-48 min (NaOH/100 mM; NaOAc/0-28 mM); 48-55 min (NaOH/100 mM; NaOAc/28-200 mM); 55-60 min (NaOH/100 mM; NaOAc/200 mM) e coletados a intervalos de 30 segundos cada, diretamente dentro de tubos de cintilação. Após a cromatografia, uma alíquota de 4 ml de líquido de cintilação foi adicionada a cada tubo e a contagem de DPM realizada como descrito no item 3.8.3.

### 3.8.5 - Cromatografia de camada delgada em placas de celulose

Glicanos fucosilados a partir de aceptores LacNAc e Lacto-N-Biose por fucosiltransferases obtidas das 05 linhagens de células de câncer estudadas foram analisados por cromatografia de camada delgada em placas (20 x 20 cm x 0,1 mm celulose - MERCK) como segue: Alíquotas contendo 30  $\mu$ l (correspondendo a aproximadamente 1.900 DPM) de cada amostra foram inicialmente liofilizadas e ressuspensas em 2  $\mu$ l de água. Após liofilização, as amostras foram aplicadas a 2 cm do bordo inferior da placa e a intervalos regulares de 2,0 cm. Como controle foram utilizados Le<sup>x</sup> e Le<sup>a</sup> (1  $\mu$ l, equivalente a aproximadamente 1800 DPM). A placa foi colocada em cuba de vidro, em posição vertical e em presença de solvente acetato de etila/piridina/ácido acético/água (12/17/3/8 -v/v/v/v), durante 07 horas. Após a cromatografia a placa foi colocada sob sistema de exaustão por 24 h até a completa evaporação do solvente e a posição dos produtos fucosilados determinada por autoradiografia.

TABELA 5. Aceptores exógenos utilizados na determinação da atividade fucosiltransferásica

<b>Aceptor</b>	<b>Estrutura Linear</b>
Lacto-N-biose	Gal $\beta$ (1,3)GlcNAc
N-acetilactosamina	Gal $\beta$ (1,4)GlcNAc
Lacto-N-tetraose	Gal $\beta$ (1,3)GlcNAc $\beta$ (1,3)Gal $\beta$ (1,4)Glc
Lacto-N(neo)-tetraose	Gal $\beta$ (1,4)GlcNAc $\beta$ (1,3)Gal $\beta$ (1,4)Glc
Fenilgalactose	Gal $\beta$ (1,3)Phe

### 3.8.6 - Autoradiografia

A detecção dos compostos radioativos foi obtida após exposição da placa de celulose a películas Kodak de dupla emulsão 18 x 24 cm (BIOMAX MS-Scientific Imaging Film) por sete dias e a  $-80^{\circ}$  C. A revelação foi realizada por imersão da película em líquido de revelação manual Kodak até o aparecimento das bandas, seguido de secagem rápida em sistema de exaustão.

### 3.8.7 - Microscopia confocal

Para análise da interação lectina-célula por microscópio confocal as amostras foram preparadas como segue. Alíquotas contendo 50.000 células (de cada uma das 05 linhagens estudadas) em 250  $\mu$ l PBS/BSA 0,1% foram adicionadas a 150  $\mu$ l de uma solução PBS contendo 10  $\mu$ g de lectina-FITC-conjugada, divididas em 02 alíquotas de 200 $\mu$ l cada e incubadas separadamente a  $4^{\circ}$ C e  $37^{\circ}$ C, dentro de tubos de vidro por 45 minutos e ao abrigo da luz. Após incubação, a suspensão foi centrifugada a 1500 x RPM por 5 minutos e a  $4^{\circ}$ C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 100  $\mu$ l de PBS contendo paraformaldeído na concentração de 1%. Uma vez ressuspenso, a mistura permaneceu por 45 minutos a temperatura ambiente seguido da preparação das lâminas. Após ser agitado em agitador tipo vortex uma alíquota de 10  $\mu$ l de cada amostra foi depositada sobre a lâmina, sendo logo após coberta por uma lamínula. Uma vez montadas, as lâminas permaneceram ao abrigo da luz e a análise da interação foi realizada a aproximadamente 4 horas após a montagem utilizando-se microscópio confocal ZEISS Axiovert S 100, contendo fonte Laser MRC 1024 ES, acoplado a microprocessador BIO-RAD. As análises foram realizadas utilizando-se objetiva de 40x (específica para análise de fluorescência) e sob objetiva de 10x.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - INTERAÇÃO DO COMPLEXO LECTINA/FITC COM VARIANTES DE CÉLULAS DE CÂNCER DE CÓLON HUMANO

Neste trabalho foram analisados os carboidratos de membrana de 05 variantes celulares derivadas de câncer de cólon humano (LS 180, EB3, 3LNLN, 5W e 8W; FIGURAS 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30). No intuito de discriminar os tipos de glicanos de superfície presentes nestas células, foram utilizadas 15 lectinas vegetais, de especificidades conhecidas, acopladas a FITC: Lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis* (Con A), *Canavalia brasiliensis* (Con Br), *Canavalia bonariensis* (Con Bo), *Canavalia grandiflora* (Con Gr) e *Canavalia marítima* (Con M); *Dioclea grandiflora* (DGL), *Dioclea guianensis* (Dgui), *Dioclea virgata* (Dvir), *Dioclea violacea* (Dvio) e *Dioclea rostrata* (Dros); *Cratylia floribunda* (CFL); *Parkia platycephala* (PPL); *Vatairea macrocarpa* (VML); *Lotus tetragonolobus* (LTA) e *Ulex europeus* (UEA-I).

A análise dos resultados obtidos por citometria de fluxo mostrou que todas as lectinas utilizadas neste estudo reconheceram, com maior ou menor intensidade, resíduos de carboidratos presentes nas membranas plasmáticas das células. Contudo, algumas das lectinas estudadas apresentaram maior capacidade de distinguir os tipos celulares na medida em que apresentaram maior afinidade por glicanos de superfície de uma dada linhagem celular de acordo com os valores diferentes de Unidades de Fluorescência (UF) detectados. Esta observação se torna mais interessante considerando o alto grau de homologia apresentado entre algumas das lectinas estudadas.

Dentre as lectinas utilizadas neste estudo, aquelas da sub-tribo Diocleinae se caracterizam por elevada homologia e por apresentarem estrutura tridimensional bastante conservada, semelhante a outras lectinas de leguminosas (ROUGE, *et al*, 1991). Lectinas da sub-tribo Diocleinae (que inclui todas as dos gêneros *Canavalia* e *Dioclea*, além do gênero *Cratylia*) exibem um equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH. Em pH fisiológico, estas lectinas se apresentam como uma mistura constituída de cerca de 60% de cadeia simples (237 resíduos de aminoácidos – cadeia  $\alpha$ ), e 40% (resíduos 1-118, cadeia  $\beta$ ; resíduos 119-237, cadeia  $\gamma$ ). Entretanto, somente a forma tetravalente é capaz de promover reação cruzada em receptores de membrana celular, desencadeando um processo de transdução de sinais (CALVETE *et al*, 1999). A razão entre as forma di- e tetravalentes, associadas a alterações na orientação relativa dos

sítios de ligação a carboidratos na estrutura quaternária de lectinas homólogas parecem contribuir para as diferentes atividades biológicas e variação do potencial de modulação de respostas desencadeado por estas lectinas.

Pelo fato dos resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação a monossacarídeos (Tyr<sup>12</sup>, Asn<sup>14</sup>, Leu<sup>99</sup>, Tyr<sup>100</sup>, Asp<sup>208</sup> e Arg<sup>228</sup>) serem conservados em todas as lectinas de Diocleinae, elas exibem uma especificidade de ligação a trimanosídeos de oligossacarídeos N-ligados, com diferentes afinidades por carboidratos complexos bi e tri-antenários (RAMOS *et al*, 1996).

Tomando como exemplo as 05 lectinas representantes do gênero *Canavalia*, cujo grau de homologia é superior a 90%, percebe-se o quanto diferenças sutis, a nível de estrutura destas proteínas, podem interferir no reconhecimento e interação por elas estabelecido com um determinado ligante.

TABELA 6. Seqüência N-terminal de lectinas da sub-tribo Diocleinae

Lectinas	Siglas	N-terminal
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHI
<i>Canavalia brasiliensis</i>	Con Br	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHI
<i>Canavalia bonariensis</i>	Con Bo	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPNYPHI
<i>Canavalia grandiflora</i>	Con Gr	SdTIVAVELDTYPNTDIGDPNYPHI
<i>Canavalia maritima</i>	Con M	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPH
<i>Dioclea grandiflora</i>	DGL	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPHI
<i>Dioclea guianensis</i>	Dgui	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHI
<i>Dioclea virgata</i>	Dvir	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHI
<i>Dioclea violacea</i>	Dvio	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPHI
<i>Dioclea rostrata</i>	Dros	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPHI
<i>Cratylia floribunda</i>	CFL	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPNYQHI

Adaptado de RAMOS *et al* 1996; CALVETE *et al* 1999.

Quando comparados os resultados referentes às lectinas do gênero *Canavalia*, frente aos 05 tipos celulares estudados, foi observado que a Con A apresenta maior afinidade pelos glicanos da superfície membranar, com valores absolutos variando entre 135,9 e 336,6 UF (para as variantes celulares 3LNLN e 8W, respectivamente) (TABELA 9A; FIGURA 2). De modo particular, Con Bo mostrou-se capaz de discriminar células da linhagem 8W, cuja interação mostrou valores da ordem de 237,1 UF, enquanto que para as demais linhagens os valores encontrados variaram entre 25,1 e 39,7 (TABELA 9A; FIGURA 4). Diferente do que foi observado com o uso de Con A, as demais lectinas deste gênero (Con Br, Con Gr e Con M) apresentaram baixa interação durante os ensaios realizados, com valores variando de 9,4 UF (Con M, variante 3LNLN) a 29,0 UF (Con Gr, variante 8W) (TABELA 9A; FIGURAS 3, 5 e 6). Tal variação foi observada não apenas para os experimentos realizados com lectinas deste gênero. De fato, todas as lectinas utilizadas neste estudo apresentam comportamento semelhante, que se caracterizava por uma variação de UF repetitiva, nas quais as linhagens celulares EB3 e 8W geralmente estavam relacionadas a valores mais elevados de UF, enquanto que LS 180, 3LNLN e 5W se relacionavam a valores menores, muito embora houvesse diferença nos valores absolutos.

Esta discrepância constante de valores de UF observada quando uma mesma lectina, na mesma concentração e condições experimentais, foi avaliada com as diferentes variantes celulares pode ser explicada em parte com base nas características morfológicas das células, pois estas apresentam volume variado (FIGURAS 24,25,26,27,28), tendo a variante 8W, por exemplo, um volume bem maior em relação as demais.

Dentre as 05 lectinas do gênero *Dioclea* analisadas no presente estudo, Dvio apresentou valores de UF mais elevados, variando de 107,2 a 273,3 UF (para as variantes celulares 3LNLN e 8W, respectivamente) (TABELA 9B; FIGURA 10). As demais lectinas deste gênero, Dgui, Dvir e Dros, apresentaram valores de UF bastante similares, sendo os mais elevados sempre relacionados à linhagem 8W (TABELA 9B; FIGURAS 8, 9 e 11) enquanto que a DGL se caracterizou por apresentar baixa afinidade pelos glicanos de superfície, com valor máximo de ordem de 23,0 UF para células da linhagem 8W (TABELA 9B; FIGURA 7).

CFL, outra lectina da sub-tribo *Diocleinae*, mostrou comportamento semelhante ao que foi observado para a Con A, com valores de UF variando de 111,6 a 275,2 (para as variantes celulares 3LNLN e 8W) (TABELA 9C; FIGURA 12).

PPL, uma lectina que reconhece glicanos ricos em manose, recentemente relatada por RAMOS *et al* (1999) como tendo especificidade exacerbada para estruturas do tipo "high" manose, reconheceu de modo diferenciado estruturas glicanas da superfície celular. Especificamente, esta lectina discriminou a linhagem EB3, por se ligar debilmente a sua superfície (24,1 UF) enquanto que para as demais linhagens os valores encontrados foram de 153,6 UF, 154,6 UF, 175,7 UF e 290,3 UF (linhagens 3LNLN, 5W, LS 180 e 8W, respectivamente) (TABELA 9C; FIGURA 14). Provavelmente, os baixos valores de UF observados para as células da linhagem EB3 decorram do fato destas células apresentarem uma menor concentração de glicanos tipo "high" manose ou destes glicanos, embora presentes, se encontrarem mascarados por outras estruturas extra-membranares.

VML (uma lectina específica por resíduos de galactose) revelou baixa capacidade de reconhecer glicanos de superfície celular (TABELA 9C; FIGURA 13), com valores de UF semelhantes àqueles observados para DGL. O fato de VML/FITC apresentar baixos valores de UF para todas as células, indistintamente, sugere fortemente que glicanos ricos em galactose terminal não se fazem presentes na superfície das células estudadas ou, por outro lado, que tais estruturas não ocupam posições que favoreçam seu reconhecimento pela lectina. Mesmo estruturas relacionadas como GalNAc parecem não estar presentes nas superfícies das variantes celulares analisadas, uma vez que os valores de UF encontrados utilizando-se a isolectina IV de sementes de *Vicia villosa* (VVL-IV/FITC) se encontraram semelhantes àqueles observados para os do controle negativo (dados não apresentados). Este resultado aponta, ainda, para uma diferenciação dos epítomos carboidratos presentes em variantes de células de câncer de cólon em relação aos encontrados em carcinoma de colo uterino e de mama. Nestas células, OSINAGA *et al* (2000) demonstraram que estruturas antigênicas tipo Tn são expressas de forma abundante, sendo também encontradas no soro de portadores destes tipos de câncer, o que possibilita sua despistagem em testes sorológicos.

Neste estudo, os resultados mais expressivos de quantificação de glicanos de superfície celular foram obtidos usando-se as lectinas fucose específicas (LTA e UEA-I, respectivamente). Os valores de UF encontrados para os experimentos utilizando estas lectinas variaram de 161,9 (UEA-I/FITC – 3LNLN) a 691,2 (LTA/FITC – 8W) (TABELA 9C, FIGURAS 15 e 16). Estes resultados evidenciam uma elevada concentração de glicanos ricos em fucose, sugerindo a presença de estruturas antigênicas tumor-relacionadas na superfície celular das variantes estudadas.

## 4.2 - INTERAÇÃO DO COMPLEXO LECTINA/FITC COM VARIANTES DE CÉLULAS DE CÂNCER DE CÓLON HUMANO NA PRESENÇA DO AÇÚCAR INIBIDOR

Nos estudos de inibição por haptenos foram utilizados monossacarídeos que sabidamente, são capazes de bloquear ou reverter, pelo menos em parte, a ligação de lectinas, sendo estes aplicados na concentração 0,15 M. A escolha desta concentração se deu após estudo de inibição utilizando-se monossacarídeos em concentrações variadas, partindo-se de 0,02 M até 0,5 M. Após estes ensaios, a concentração 0,15 M foi escolhida e utilizada para todos os ensaios, independente do tipo de açúcar inibidor.

O reconhecimento de glicanos de superfície celular por lectinas, na presença de monossacarídeos inibidores, aparentemente nos fornece a idéia de que alterações sutis são encontradas entre as estruturas glicanas das diferentes variantes celulares estudadas. Isto porque, embora mantidas as condições experimentais, os valores de inibição observados para algumas das lectinas apresentaram uma variação (média de 03 experimentos) estatisticamente significativa. Para a Con A, foram encontrados valores de Percentual de Inibição (PI) variando de 79,5% a 93,8% (Linhagem celular LS 180 e EB3, respectivamente). Para as demais lectinas do gênero *Canavalia*, os resultados obtidos revelaram que a inibição da interação de Con Br e Con M com glicanos de superfície foi completamente bloqueada por glicose (com valores de PI variando de 97,3% a 99,5%). Con Gr apresentou PIs semelhantes àqueles observados para Con A. Por outro lado, Con Bo mostrou comportamento distinto, discriminando mais uma vez a linhagem celular 8W (com PI de 81,6%) enquanto que para as demais linhagens celulares os PIs foram 17,0%, 54,7%, 13,7% e 12,0% (LS 180, EB3, 3LNLN e 5W, respectivamente).

Dentre as lectinas do gênero *Dioclea*, a utilização de glicose como açúcar inibidor revelou que DGL e Dvio se mostraram fortemente inibidas, com PIs variando de 75,4% a 94,4% (LS 180 e EB3, respectivamente). Dgui e Dvir apresentaram elevados valores de PI em relação a linhagem 8W (90,1% e 90,9%, respectivamente), enquanto que para as demais linhagens celulares os valores de PI foram menores, variando de 24,7% a 89,0% (Dvir – 3LNLN e Dvio – EB3, respectivamente). Os resultados de inibição obtidos usando-se Dros são discrepantes de todas as demais lectinas deste gênero. Dros foi a única a apresentar PI menor que 90,0% frente a linhagem 8W. Além disto, a presença de glicose praticamente não interferiu no reconhecimento dos glicanos de superfície de células das linhagens LS 180, 3LNLN e 5W (com PIs de 5,7%, 4,0% e 1,6%, respectivamente).

A ligação de CFL aos glicanos de superfície não se mostrou eficientemente inibida na presença de glicose. Contudo, foram observadas variações de PIs para os diferentes tipos celulares, sendo o valor mais elevado encontrado para EB3 (37,5%) e o menor para 3LNLN (6,7%) (TABELA 9C; FIGURA 12).

O reconhecimento e a ligação específica de glicanos complexos como aqueles encontrados na superfície celular parece ser crucial para a compreensão do grau variado de ligação destas lectinas a glicanos presentes na superfície das células estudadas. De fato, em estudos anteriores, foi observado que lectinas homólogas podem desencadear respostas distintas num determinado sistema celular, quer variando a potência de uma determinada ação ou até mesmo exercendo efeitos antagônicos (CALVETE *et al*, 1999).

Dentre as canavalias, a baixa afinidade das lectinas Con Br, Con Bo, Con Gr e Con M frente às linhagens celulares, quando comparadas a Con A, reflete a variação de especificidade fina destas lectinas. Quando estas lectinas são avaliadas em outros sistemas celulares suas ações têm se mostrado bastante variada. BARRAL-NETTO *et al* (1992) demonstraram que dentre as lectinas do gênero *Canavalia*, Con A foi a menos eficaz em induzir a produção de IFN- $\gamma$  por monócitos humanos. Neste experimento, também foi relatada a eficiência de Con Br como indutor de mitose em linfócitos humanos.

Em relação às lectinas do gênero *Dioclea*, observa-se que Dvio foi a lectina que reconheceu, com maior intensidade, glicanos da superfície de células neoplásicas, enquanto que as demais apresentaram interação moderada sobre estes mesmos tipos celulares. Utilizando este mesmo grupo de lectinas, BARRAL-NETTO *et al* (1992) destacaram Dvir como sendo a mais eficaz em induzir mitose em linfócitos humanos, ao passo que Dros apresentou maior capacidade de indução de produção de IFN- $\gamma$ .

Em outros modelos biológicos a ação destas lectinas também vem sendo investigada e a resposta tem se mostrado distinta.

A capacidade de lectinas em induzir a liberação de histamina por mastócitos peritoneais de ratos foi relatada por GOMES *et al* (1994). Neste modelo Con Br, Dros e Dvir desencadearam degranulação exacerbada de mastócitos em níveis mais elevados que os obtidos com Con A, enquanto Con M, Dvio e Dgui induziram uma degranulação moderada e DGL, Con Bo e CFL, mesmo em doses elevadas, não foram capazes de induzir a degranulação mastocitária.

A ativação linfocitária, bem como a indução de apoptose mediada por Con Br, DGL e Dvio em linfonodos de camundongo foi recentemente investigada por

BARBOSA *et al* (2001). Os resultados revelaram que estas lectinas possuem elevada capacidade de estimulação de linfócitos, com aumento da expressão de CD25, um receptor de IL-2. Esta estimulação foi acompanhada pela ocorrência de apoptose, inflamação e, em alguns casos, necrose de células endoteliais, cuja intensidade foi aumentada em modelos utilizando-se Dvio.

Dvio e Dgui também foram capazes de prevenir a cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida como demonstrado por ASSREUY *et al* (1999). Neste modelo foi demonstrado que as lectinas parecem promover seu efeito por bloqueio da resposta inflamatória, na medida em que também foram capazes de reduzir o edema de pata e a permeabilidade vascular nos animais submetidos ao ensaio.

Uma outra ação importante de Con Br foi relatada por BARRAL-NETTO *et al* (1996). Neste experimento foi evidenciado que a estimulação linfocitária induzida pela lectina confere um efeito protetor sobre camundongos susceptíveis infectados por *Leishmania amazonensis*.

ALENCAR *et al* (1999) demonstraram que a lectina Dvir foi capaz de inibir o recrutamento de neutrófilos para a cavidade abdominal de ratos induzido por carragenina, além de inibir o edema de pata nestes animais. Um dado relevante deste trabalho é que os autores demonstraram que VML (uma lectina galactose específica) não afeta a migração de leucócitos quando administrada por via endovenosa. Por outro lado, quando administrada por via intra peritoneal, VML apresenta atividade pró-inflamatória, aumentando o número de neutrófilos na cavidade peritoneal. Estes dados, em conjunto com os que são demonstrados no referente trabalho, apontam para distintas aplicabilidades das lectinas como ferramentas biológicas, revelando a importância dos receptores reconhecidos por estas moléculas, com relação a estrutura e localização em determinados grupos celulares, o que pode contribuir para um largo leque de aplicação destas proteínas.

Através de um elegante estudo, ANDRADE *et al* (1999) correlacionaram a produção de óxido nítrico (NO), *in vivo* e *in vitro*, induzida por Con A, Con Br e DGL em células peritoneais de murina, com o efeito anti-parasitário destas lectinas e descreveram que este efeito foi dependente da participação de macrófagos residentes.

De modo interessante, DAM *et al* (1998) conseguiram provar que a liberação de histamina mediada por lectinas da sub-tribo Diocleinae era diretamente proporcional a afinidade da lectina pelo núcleo trimanosídeo de oligossacarídeos ligados a asparagina. Esta foi a primeira vez que se correlacionou uma atividade biológica deste

grupo de lectinas (conhecido como lectinas "Con A like") à sua afinidade pelo respectivo ligante.

Para PPL, somente a ligação a glicanos de superfície de células da linhagem EB3 foi parcialmente bloqueada por manose (com PI de 45,6%). A ligação desta lectina à superfície das demais células avaliadas não se mostrou bloqueada de forma eficaz, sendo os PI inferiores a 10,9%, (TABELA 9C; FIGURA 14).

A utilização de galactose foi eficiente em abolir a fraca interação de VML com células de todas as variantes, indistintamente, sendo os PIs superiores a 98,8%.

Resultados similares foram obtidos utilizando-se fucose nos experimentos envolvendo as lectinas LTA e UEA-I. Em todos os ensaios usando-se essas lectinas na presença do açúcar inibidor foram observados PIs superiores a 92,1%. (tabela 9).

#### 4.3 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FUCOSILTRANSFERÁSICA

A utilização de fucose  $^{14}\text{C}$  permitiu realizar uma avaliação qualitativa dos glicanos fucosilados sintetizados pelas variantes celulares estudadas. Os resultados revelaram a presença acentuada de antígenos Lewis, sendo elevada a concentração de Lewis x ( $\text{Le}^x$ ) e Lewis a ( $\text{Le}^a$ ), bem evidenciados no ensaio autoradiográfico (FIGURA 23) e nas cromatografias em sistema DIONEX (FIGURAS 17 e 18), enquanto que Lewis b ( $\text{Le}^b$ ) se fazia presente em baixa quantidade e Lewis y ( $\text{Le}^y$ ) não foi detectado (FIGURA 18). Entretanto, embora estas estruturas pudessem ser sintetizadas em todas as células estudadas, seu transporte e distribuição ao longo da membrana são possíveis de variação de um tipo celular para outro, o que poderia explicar a variação dos teores destes antígenos presentes na superfície membranar nas células das diferentes linhagens avaliadas. Por outro lado, não se exclui a presença das formas sialiladas de estruturas antigênicas do tipo Lewis, uma vez que não foram realizados testes visando a detecção destas estruturas. Além disto não sabemos quais enzimas fucosiltransferases normalmente encontradas em tecidos humanos (TABELA 7) são expressas nestas células.

Provavelmente, mais de uma enzima fucosiltransferase (ou isoformas de uma determinada enzima) podem estar envolvida na adição de resíduos de fucose para formar o antígeno  $\text{Le}^a$ , sendo observadas quantidades distintas deste antígeno alterando o acceptor. Usando-se o acceptor Lacto-N-biose (FIGURA 20) foi observado que células da variante 8W apresentaram menores quantidades de  $\text{Le}^a$ , quando

comparado com os dados obtidos usando-se Lacto-N-tetraose (FIGURA 17). Um resultado oposto foi observado em células da variante 3LNLN onde, ao contrário do que ocorreu com células 8W, a produção de Le<sup>a</sup> foi nitidamente maior usando-se o acceptor Lacto-N-biose (FIGURA 20).

TABELA 7. Classificação de fucosiltransferases presentes tecidos humanos.

$\alpha(1,2)$ fucosiltransferase		
Gene	Nome	Seqüência codificante
FUT1	H	1098
FUT2	Se*	999
Sec1	Pseudogene	976
$\alpha(1,3/1,4)$ fucosiltransferase		
Gene	Nome	Seqüência codificante
FUT3	Fuc-TIII	1086
FUT5	Fuc-IV	1025
$\alpha(1,3)$ fucosiltransferase		
Gene	Nome	Seqüência codificante
FUT4	Fuc-IV	1218
FUT6	Fuc-VI	1080
FUT7	Fuc-VII	1029
$\alpha(1,6)$ fucosiltransferase		
Gene	Nome	Seqüência codificante
FUT8	$\alpha$ -6-Fuc-T	1728
FUT8	$\alpha$ -6-Fuc-T retina	512

\* enzima secretória

Adaptado de COSTACHE *et al*, 1997.

Aparentemente, a(s) isoforma(s) responsável(eis) pela síntese de Le<sup>x</sup> apresentam maior especificidade pelo acceptor N-acetilactosamina. Quando comparados os dados de incorporação de <sup>14</sup>C-fucose, foi observado que a eficiência enzimática se mostrava 2 vezes maior usando-se N-acetilactosamina em vez de Lacto-N(neo)-Tetraose (FIGURAS 21 e 18, respectivamente).

A elevada atividade fucosiltransferásica que resulta na formação de estruturas antigênicas dos tipos Le<sup>a</sup> e Le<sup>b</sup>, pode ser melhor compreendida observando-se os dados obtidos com a utilização dos aceptores Lacto-N-Tetraose e Lacto-N-(neo)-Tetraose. Isto porque, apesar da ação de fucosiltransferases sobre estes aceptores permitir a formação de glicanos denominados antígeno H (quer do tipo I – Lacto-N-Tetraose, quer do tipo II – Lacto-N(neo)-Tetraose), a quantidade destes glicanos encontrados foi extremamente baixa, independente da variante celular analisada (FIGURAS 17 e 18).

Aparentemente, a atividade  $\alpha$ -1,2-fucosiltransferásica, medida a partir da utilização do acceptor fenilgalactose, é baixa nas células de todas as linhagens, sendo caracterizada pelos menores valores de incorporação de <sup>14</sup>C-fuc, em média 80% menor quando comparado aos valores de incorporação obtidos com os demais aceptores (FIGURA 22).

Também foi observada a formação de estruturas glicanas a partir de aceptores endógenos (FIGURA 19). Estes resultados foram confirmados repetindo-se os experimentos na ausência de acceptor exógeno. Interessante notar que os valores de incorporação de <sup>14</sup>C-Fuc, encontrados no experimento realizado sem a presença de aceptores exógenos, foram similares àqueles observados utilizando-se os aceptores, o que denota a baixa concentração do acceptor endógeno no meio celular bem como a ausência de competição entre as diferentes fucosiltransferases responsáveis pela formação destas estruturas.

TABELA 8. Estruturas fucosiladas por enzimas de 05 variantes de células de câncer de cólon usando-se aceptores exógenos N-acetilactosamina, Lacto-N-biose, Lacto-N-Tetraose e Lacto-N(neo)-Tetraose

Nome	Estrutura
Le <sup>x</sup>	Galβ(1,4)(fuc-α1,3)GlcNAc
Le <sup>a</sup>	Galβ(1,3)(fuc-α1,4)GlcNAc
Le <sup>b</sup>	Fucα(1,2)Galβ(1,3)(fuc-α1,4)GlcNAc
H1	Fucα(1,2)Galβ(1,3)GlcNAc
H2	Fucα(1,2)Galβ(1,4)GlcNAc

A presença de glicanos fucosilados de estrutura semelhante àqueles presentes na superfície das 05 variantes de células de câncer de cólon humano avaliadas neste estudo tem sido apontada como associada à condição metastática. Estudos têm revelado que estruturas do tipo Lewis estão envolvidas na formação de metástase hepática a partir de células provenientes do cólon e do pâncreas SATO *et al* (1997). A expressão de sialosil Le<sup>x</sup> foi também encontrada na superfície de várias células de adenocarcinomas como os de pulmão, estômago (ITZKOWITZ, 1992; NAKOMORI *et al*, 1993). IZUMI *et al* (1995) relataram que variantes HK12HX de células de carcinoma de cólon são caracterizadas por elevadas concentrações de sialosil (dimérico) Le<sup>x</sup>, com maior poder metastático para o fígado após administração intra-esplênica e exibindo alta adesividade ao endotélio. Em contraste, MATSUSHITA *et al* (1991) obtiveram resultados diferentes usando variantes celulares da linhagem HT-29. Neste experimento, também foi demonstrado que o potencial metastático destas células estava inversamente relacionado com a expressão de estruturas antigênicas do tipo Lewis na superfície celular. Entretanto, existia uma correlação positiva entre a expressão de sialosil (dimérico) Le<sup>x</sup> e o potencial invasivo destas células nos testes *in vitro*. Utilizando anticorpos monoclonais, HOFF *et al* (1989) demonstraram que estruturas antigênicas do tipo Lewis são expressas em grande quantidade em metástase quando comparado aos tumores primários correspondentes. De acordo com TAKADA *et al* (1993) o antígeno sialosil Le<sup>a</sup> é a maior estrutura glicana envolvida na formação de metástase em câncer gastrintestinal. Além disto, foi relatado por KISHIMOTO *et al* (1996) e SATO *et al* (1997) que células de câncer de cólon e de pâncreas em humanos apresentam expressão abundante de sialosil Le<sup>a</sup> e que a

utilização de anticorpos monoclonais contra estas estruturas é capaz de conter a proliferação metastática.

#### 4.4 – DETECÇÃO DE GLICANOS DE SUPERFÍCIE MEMBRANAR POR MEIO DE TÉCNICA DE MICROSCOPIA CONFOCAL

A presença exacerbada de glicanos fucosilados, indicada pelos experimentos de citometria de fluxo e confirmada pela elevada atividade fucosiltransferásica, detectada nas variantes celulares estudadas, foi investigada com o uso de microscopia confocal.

Nos experimentos foram adotadas variáveis de temperatura (4° C e 37° C) a fim de verificar diferenças na capacidade bioadesiva das lectinas/FITC conjugadas. Esta abordagem se explica pelo fato de que a ligação de lectina à membrana celular é determinada predominantemente a 4° C, onde a fluidez da membrana celular é reduzida e a energia consumida nos processos de transporte é represada. A 37° C a forte interação de lectinas com o glicocálix geralmente induz a sua internalização e compartimentalização em vacúolos acídicos semelhantes a lisossomos (FLORENCE *et al*, 1995).

A capacidade de ligação das lectinas observada por citometria de fluxo foi reiterada por análise confocal a 4° C, não sendo encontrada nenhuma diferença na afinidade. As interações mais fortes foram apresentadas pela lectinas UEA-I e LTA (FIGURAS 29 e 30) frente a todos os tipos celulares avaliados, ao passo que Diocleas e Canavalias parecem diferir quanto à sua capacidade de interação dependendo do tipo celular em análise.

Todavia, quando a capacidade bioadesiva foi avaliada a 37° C algumas particularidades foram observadas. De modo geral, a internalização se mostrou mais eficaz em células das linhagens EB3 e 5W, sendo que este fenômeno foi bastante caracterizado usando-se Con Bo e Dros (FIGURAS 4 e 11). Estes resultados merecem interpretação acurada, pois Con Bo foi uma das lectinas que apresentou menor capacidade de reconhecimento de glicanos de superfície (TABELA 9A, FIGURA 4). Aparentemente, a lectina parece potencializar sua internalização favorecendo a captação quase que total das moléculas capazes de manter interação adesiva com a membrana celular.

Os dados de incorporação de Dv10, embora elevados, se justificam na medida em que o complexo lectina/FITC se liga fortemente à superfície celular, em especial às células da variante 8W (TABELA 9B; FIGURA 10).

Trabalhos publicados recentemente têm procurado explicar a eficiência dos processos de transporte a partir da cooperação observada entre membrana celular e ligante, relatando que o grau de eficiência parece ser diretamente proporcional à força de ligação estabelecida entre ligante e receptor de superfície (WIRTH *et al*, 1998b). Neste sentido os resultados observados para Con Bo parecem estar de acordo com as afirmações de WIRTH, visto que dentre as lectinas utilizadas neste estudo Con Bo apresentou elevada afinidade pelos glicanos de superfície celular sendo pouco inibida por seu monossacarídeo inibidor.

## 5 – CONCLUSÃO

Os resultados aqui expostos revelam o elevado potencial de aplicabilidade de lectinas vegetais como ferramentas na caracterização de receptores de superfície de células de câncer. Isto nos dá a possibilidade de criar, a partir da determinação fidedigna da especificidade fina destas moléculas (trabalho esse já em andamento), um modelo eficiente de caracterização de células neoplásicas, capaz de ser aplicado também no estabelecimento prévio de rotas de disseminação metastática a partir da análise de um determinado tumor primário.

Também chama atenção a elevada taxa de captação de Dros e Con Bo por parte das células estudadas o que sugere que estas lectinas contribuam fortemente para sua endocitose, podendo vir a serem utilizadas com moléculas carreadores de fármacos anti câncer uma vez excluída esta atividade sobre células normais.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBELDA, S. M., METTE, S. A., ELDER, D. E. (1990). Integrin distribution in malignant melanoma: Association of the  $\beta_3$  sub-unit with tumor progression. **Cancer Res.** **50**: 6757-6764.
- ALENCAR, N. M. N., TEISEIRA, E. H., ASSREUY, A. M. S., CAVADA, B.S., FLORES, C. A., RIBEIRO, R. A. (1999). Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, **8**: 107-113.
- APLIN, A. E., HOWE, A., ALAHARI, J. K., JULIANO, R. L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacol. Rev** **50**:197-263.
- ANDRADE, J. L., ARRUDA, S., BARBOSA, T., PAIM, L., RAMOS, M. V., CAVADA, B. S., BARRAL-NETTO, M. (1999). Lectin-induced nitric oxide production. **Cellular Immunology** **194**: 98-102.
- ARENBERG, D. A., POLVERINI, P. J., KUNKEL, S. L., SHANAFELT, A., HESSELGESSER, J., HORUK, R., STRIETER, R. M. (1997). The role of CXC chemokines in the regulation of the angiogenesis in non-small cell lung cancer. **J. Leukocyte Biol.** **62**: 554-562.
- ASSREUY, A. M. S., MARTINS, G. J., MOREIRA, M. E. F., BRITO, G. A. C., CAVADA, B. S., RIBEIRO, R. A., FLORES, C. A. (1999). Prevention of ciclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **The Journal of Urology**, **161**: 1988-1993.
- BAO, L., PIGOTT, R., MATSUMARA, Y., BABAN, D., TARIN, D. (1993). Correlation of VLA-4 integrin expression with metastatic potential in various human tumor cell lines. **Differentiation** **52**: 239-246.

- BARBOSA, T., ARRUDA, S., CAVADA, B. S., GRANGEIRO, T. B., FREITAS, L. A. R., BARRAL-NETTO, M. (2001). In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **96(5)**: 673-678.
- BARRAL-NETTO, M., SANTOS, S. B., BARRAL, A., MOREIRA, L. I. M., SANTOS, C. F., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B. S. (1992). Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Dioclea* tribe. **Immunological Investigations**, **21(4)**: 297-303.
- BARRAL-NETTO, M., Von SOHSTEN, R. L., TEIXEIRA, M., CONRADO DOS SANTOS, W. L., POMPEU, M. L., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B. S., FALCOFF, E., BARRAL, A. (1996). In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, **60**: 237-250.
- BELL C. W., PATHAK S., FROST P. (1989). Unknown primary tumors: establishment of cell lines, identification of chromosomal abnormalities, and implications for a second type of tumor progression. **Cancer Res** **49(15)**: 4311-4315.
- BISSELL, M. J., NELSON, W. J. (1999). Cell-to-cell contact and extracellular matrix integration of form and function: the central role of adhesion molecules. **Current Opinion in Cell Biology**, **11**: 537-539.
- BODMER, W. (1997). The somatic evolution of cancer. The Harveian Oration of 1996. **J.R. Coll. Physicians Lond.** **31**: 82-89.
- BOON, T., OLD, L. J. (1997). Cancer tumor antigens. **Current Opinion in Immunology** **9**: 681-683.
- BOYD, W. C., SHAPLEIGH, E. (1954). **Blood** **9**:419. Citado por SHARON & LIS, (1989).

- CALVETE, J. J., THOLE, H. H., RAIDA, M., URBANKE, C., ROMERO, A., GRANGEIRO, T. B., RAMOS, M. V., ALMEIDA DA ROCHA, I. M., GUIMARÃES, F. N., CAVADA, B. S. (1999). Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta** **1430**: 367-375.
- CAVADA, B. S., MOREIRA-SILVA, L. I. M., GRANGEIRO, T. B., SANTOS, C. F., PINTO, V. P. T., BARRAL-NETTO, M., ROQUE-BARREIRA, M. C., GOMES, J. C., MARTINS, J. L., OLIVEIRA, J. T. A., MOREIRA, R. A. (1996). Purifications and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. Seeds. (Van Driessche, E.; Fisher, J.; Beeckmans, S. and Bog-Hansen, T. C.; eds). Pp. 74-80, Textop, Demark.
- CHAN, B. M. C., MATSUURA, N., TAKADA, Y., ZETTER, B. R., HEMLER, M. E. (1991). *In vitro* and *in vivo* consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. **Science** **251**: 1600-1602.
- CHING, C. K., RHODES, J. M. (1988). Identification and partial characterization of a new pancreatic cancer related serum glycoprotein by sodium dodecyl sulfate electrophoresis and lectin blotting. **Gastroenterology** **95**: 137-142.
- CHRISTOFORI, G., SEMB, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. **Trends Biochem. Sci.** **24**:73-76.
- COSTACHE, M. CAILLEAU, A., APOIL, P. A., ELMGREN, A., LARSON, G., HENRY, S., BLANCHER, A., IORDACHESCU, D., ORIOL, R., MALLICONE, R. (1997). Evolution of Fucosyltransferase genes in vertebrates. **J. Biol. Chem.** **272(47)**: 29721-29728.
- DAM, T. K., CAVADA, B. S., GRANGEIRO, T. B., SANTOS, C. F., SOUSA, F. A. M., OSCARSON, S., BREWER, F. (1998). *Diocleinae* lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **J. Biol. Chem.** **273(20)**: 12082-12088.

- EVAS, C.W. (1991). **The Metastatic Cell: Behaviour and biochemistry**,. CHAPMAN AND HALL Eds., 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN.
- FLORENCE, A. T., HILLERY, A. M., HUSSAIN, N., JANI, P. U. (1995). Factors affecting the oral uptake of polystyrene nanoparticles: histological and analytical evidence. **J. Drug Targeting** **3**: 65-70.
- FOGAR, P., BASSO, D., PASQUALI, C., DE PAOLI, C., SPERTI, C., ROVERONI, G., PEDRAZZOLI, G., PLEBANI, M. (1997). Neural cell-adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. **Anticancer Res.** **17**:1227-1230.
- FRENETTE, P. S., WAGNER, D. D. (1996). Adhesion molecules – Part II: Blood vessels and blood cells. **New Eng. J. Med.**, **335**: 43-45.
- FRIXEN, U.H., BEHRENS, J., SACHS, M., EBERLE, G., VOSS, B., WARDA, A., LOCHNER, D., BIRCHMEIER, W. (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. **J. Cell Biol.** **113**: 173-185.
- GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R. C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., SHARON, N. (1980). What should be called a lectin? **Nature** **285**: 66.
- GOLDSTEIN, I. J., PORETZ, R. D. (1986). In **The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**; LIENER, I.E., SHARON, N. and GOLDSTEIN, I.J.; Eds. Academic Press, Inc. p 35.
- GOMES, J. C., FERREIRA, R. R., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A. (1994). Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with Concanavalin A. **Agents Actions** **41**: 132-135.
- GOTTSCHALK, A. (1966). Historical Introduction. In: **Glycoproteins** (A. GOTTSCHALK ed.) Elsevier Publishing, New York, pp. 1-19.

- GRANGEIRO, T. B., SANZ-APARICIO, J., HERMOSO, J., CALVETE, J. J., CAVADA, B. S. (1997). The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Conavalin A. **FEBS Letters** **405**: 114-118.
- HAKOMORI, S. I. (1989). Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. **Advances in Cancer Research** **52**: 257-331.
- HOFF, S., MATSUSHITA, Y., OTA, D. M., CLEARY, K. R., YAMORI, T., HAKOMORI, S., IRIMURA, T. (1989). Increase expression of sialil-dimeric Lewis x antigen in advanced primary colorectal carcinoma and liver metastasis. **Cancer Res.** **49**: 6883-6888.
- HOMANS S. W., RUTHERFORD, T. (1993). Oligosaccharides and recognition--a 'shape' problem probed by n.m.r. and molecular modelling. **Biochem Soc Trans** **1993;21(2)**: 449-452
- HOMANS S. W., FIELD, R. A., MILTON, M. J., PROBERT, M., RICHARDSON, J. M. (1998). Probing carbohydrate-protein interactions by high-resolution NMR spectroscopy. **Adv Exp Med Biol**; **435**:29-38
- ITZKOWITZ, S. (1992). Carbohydrates changes in colon carcinoma. **APMIS Suppl.** **27**, **100**, 173-180.
- IZUMI, Y., TANIUCH, Y., TSUJI, T., SMITH, C. W., NAKAMORI, S. (1995). Characterization of human colon carcinoma variant cells selected for sialil Lewis x carbohydrate antigen: live colonization and adhesion to vascular endothelial cells. **Exp. Cell Res.** **216**: 215-221.
- JOHNSON, J. P. (1991). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin super-gene family and the role in malignant transformation and progression to metastatic disease. **Cancer Metastasis Rev.** **10**: 11-22.

- JOTHY, S., MUNRO, S. B., LeDUY, L., McCLURE, D., BLASCHUK, O. W. (1995). Adhesion or anti-adhesion in cancer: what matters more? **Cancer and Metastasis Reviews** **14**: 363-376.
- JULIANO, R. L., HASKILL, S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. **J. Cell. Biol.** **120**: 577-585.
- KAISER, V., AVERBACH, B., OLDENBURG, M. (1996). The neural cell adhesion NCAM in multiple myeloma. **Luek. Lymphoma** **20**:389-395.
- KANSAS, G. S., DAILEY, M. O. (1989). Expression of adhesion structures during B cell development in man. **J. Immunol.** **142**: 3058-3062.
- KAUR, K. J., KHURANA, S., SALUNKE, D. M. (1997). Topological analysis of the functional mimicry between a peptide and a carbohydrate moiety. **J Biol Chem.**; **272(9)**:5539-5543.
- KENT, P. W. (1989). Some landmarks in carbohydrate biochemistry. **Bull. Biochem. Soc.** **10**: 4-10.
- KISHIMOTO T., ISHIKURA H., KIMURA C., TAKAHASHI T., KATO H., YOSHIKI T. (1996). Phenotypes correlating to metastatic properties of pancreas adenocarcinoma in vivo: the importance of surface sialyl lewis antigen, **Int. Journal of Cancer**, **69 (4)**: 290-294.
- KOCOUREK, J., HOREJSI, V. (1981). A note of the recent discussion of definition of the term "lectin". In: Bog-Hansen, T.C. and Spengler, G.A. eds. **Lectins, Biology, Biochemistry Clinical Biochemistry**. Proceedings of the 5<sup>o</sup> lectin Meeting, vol 3 pp. 3-6. Berlin, 1983.
- KUUKASJARVI T., KARHU R., TANNER M., KAHKONEN M., SCHAFFER A., NUPPONEN N., PENNANEN S., KALLIONIEMI A., KALLIONIEMI O. P., ISOLA J. (1997). Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. **Cancer Res** **57(8)**:1597-1604.

- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t<sub>4</sub>. **Nature**, v.227, p.680-685.
- LANDSTEINER, K. (1901). *Wein. Klin. Wochenschr.* 14: 1132-1134.
- LANGAUER, C., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. **Nature** 396: 643-649.
- LIS, H., SHARON, N. (1984). In *Biology of carbohydrates*; GINSBURG, V., ROBBINS, P.W. Eds.; John Wiley and Sons: New York Vol 2.
- LIS, H., SHARON, N. (1998). Lectins: Carbohydrate-Specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev.** 98: 637-674.
- LUAN, J., SHATTUCK-BRANDT, R., HAGHNEGAHDAR, H., OWEN, J. D., STRIETER, R., BURDICK, M. NIRODI, C., BEAUCHAMP, D., JOHNSON, K. N., RICHMOND, A. (1997). Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. **J. Leukocytes Biol.** 62: 588-597.
- LUKASHEV, M. E., WERB, Z. (1998). ECM signaling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. **Trends Cell Biol.** 8:437-441.
- MAGNANI, J. L., STEPLEWSKI, Z., MITCHELL, K., HERLYN, M., FUHNER, P. (1983). Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin. **Cancer Res.** 43: 5489-5492.
- MAKELA, O. (1957). Studies in hemagglutinins of *Leguminosae* seeds. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.**, 35 supp. 11: 1-156.
- MATSUSHITA, Y., HOFF, S. D., NUDELMAN, E. D., OTAKA, M., HAKOMORI, S. (1991). Metastatic behavior and cell surface properties of HT-29 human colon cancer variant cells selected for their differential expression of sialyl-dimeric Lewis x antigen. **Clin. Exp. Metastasis** 9: 283-299.

- MASAYUKI, T., RUI, T., ELLEN, S., ARTHUR, L. B., HERBERT, L. (1995). Effects of nitric oxide on human and canine prostates, **Urology**, **45(3)**: 440-446.
- MIN, W., JONES, D.H. (1994). In vitro splicing of concanavalin A is catalyzed by asparaginyl endopeptidase. **Nat Struct Biol** **1(8)**:502-504.
- MIYASAKA M. (1995). Cancer metastasis and adhesion molecules. **Clin Orthop** , **312**: 10-18.
- MOULD, A. P., WHELDON, L. A., KOMORIYA, A. (1990). Affinit chromatographic isolation of the melanoma adhesion receptors for the III CS region of fibronectin and its identification as the integrin  $\alpha_4\beta_1$ . **J. Biol. Chem.** **265**: 4020-4024.
- NAKOMORI, S., KAMEYAMA, M., IMOAKA, S., FURUKAWA, H., ISHIOKAWA, O., SASAKI, Y., KABUTO, T., IWANAGA, T., MATSUSHITA, Y., IRIMURA T. (1993). Increase expression of sialyl Lewis x antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma:clinicopathological and immunohistochemical study. **Cancer Res.** **53**: 3632-3637.
- NGUYEN, A. T., HOLMES, E. H., WHITAKER, J. M., HO, S., SHETTERLY, S., MACHER, B. A. (1998). Human  $\alpha$ 1,3/1,4-Fucosyltransferases: Identification of amino acids involved in acceptor substrate binding by site-direted mutagenesis. **J. Biol. Chem.** **273(39)**: 25244-25249.
- OLDENBURG, K. R., LOGANATHAN, D., GOLDSTEIN, I. J., SCHULTZ, P. G., GALLOP, M. A. (1992). Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptidelibrary. **Proc Natl Acad Sci** **89(12)**:5393-5397.
- OSINAGA, E., BAY, S., TELLO, D., BABINO, A., PRITSCH, O., ASSEMAT, K., CANTACUZENE, D., NAKADA, H., ALZARI, P. (2000). Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy. **FEBS Letters** **469**: 24-28.

OULMOUDEN, A., WIERINCKX, A., PETIT, J.-M., COSTACHE, M., PALCIC, M. M., MOLLICONE, R., ORIOL, R., JULIEN, R. (1997). Molecular cloning and expression of a bovine  $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase gene homologous to a putative ancestor gene of the human FUT3-FUT5-FUT6 cluster. **J Biol Chem** **272(13)**: 8764-8773.

PANDIS, N., TEIXEIRA, M.R., ADEYINKA, A., RIZOU, H., BARDI, G., MERTENS, F., ANDERSEN, J. A., BONDESON, L., SFIKAS, K., QVIST, H., APOSTOLIKAS N., MITELMAN F., HEIM S. (1998). Cytogenetic comparison of primary tumors and lymph node metastases in breast cancer patients. **Genes Chromosomes Cancer** **22(2)**:122-129.

PERL, A. K., WILGENBUS, P., DAHL, V., SEMB, H., CHRISTOFORI, G. (1998A) casual role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. **Nature** **392**: 190-193.

PERL, A. K., DAHL, V., WILGENBUS, P., CREMER, H., SEMB, H., CHRISTOFORI, G. (1999). Reduced expression of neural cell adhesion molecules induces metastatic dissemination of pancreatic  $\beta$  tumor cells. **Nat. Med.** **5**:286-291.

PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. L. (1995). Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, **109**: 347-352.

PIERCEALL, W. E., WOODARD, A. S., MORROW, J. S., RIMM, D., FEARON, E. R. (1995). Frequent alterations in E-cadherin and alpha-and-beta-catenin expression in human breast cancers cell lines. **Oncogene** **11**: 1319-1326.

PLATEFABER, L. C., HYNES, R. O. (1989). Changes in integrins receptors on oncogenically transformed cells. **Cell** **56**: 895-898.

RAMOS, M. V., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B. S., ROUGE, P. (1996). The carbohydrate-binding specificity and molecular modelling of *Canavalia maritima* and *Dioclea grandiflora* lectins. **Men. Inst. Oswaldo Cruz** **91(6)**: 761-766.

- RAMOS, M. V., CAVADA, B. S., BOMFIM, L. R., DEBRAY, H., MAZARD, <sup>a</sup> M., CALVETE, J. J. GRANGEIRO, T. B., ROUGE, P. (1999). Interaction of the seed lectin from *Parkia platycephala* (*Mimosoideae*) with carbohydrates and complex glycans. **Protein and Peptide Letters**, **6(4)**: 215-222.
- RINI, J. M. (1995). Lectin structure. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**; **24**: 551-577.
- RINSINGER, J. I., BERCHUCK, A. KOHLER, M. F., BOYD, J. (1994). Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. **Nat. Genet.** **7**: 98-102.
- ROUGE, P., CABBILLAU, C., BOURNE, Y. (1991). The tri-dimensional structure of legume lectins, p 143-159. In **DC Kilpatrick, E Van Driessch, TC Bog-Hansen (eds) Lectins Reviews Vol. 1**, Sigma Chemicals Co., Saint-Louis, Mo, USA.
- SATO, M., NARITA, T., KIMURA, N., ZENITA, K., HASHIMOTO T. (1997). The association of sialyl Lewis a antigen with the metastatic potential of human colon cancer cells. **Anticancer Res.** **17**: 3505-3512.
- SAUDERS, R. J., MAINIERO, F., GIANCOTTI, F. G. (1998). The role of integrins in tumorigenesis and metastasis. **Cancer Investigation** **16**: 329-344.
- SHARON, N., LIS, H. (1982). Glycoproteins. In: **The Proteins, Vol. 5 (H. Neurath and R.L. Hill eds.)**. Academic Press, New York, pp. 1-144.
- SHARON, N., LIS, H. (1989). **Lectins**; Chapman and Hall: London, 127 pp.
- SHARON, N., LIS, H. (1990). Legume lectins: a large family of homologous proteins. **FASEB. J.** **4(14)**:3198-208
- SUMNER, J. B. (1919). **J. Biol. Chem.** **37**: 137-142.
- SUMNER, J. B., HOWELL, S. F. (1936). **J. Bacteriol.** **32**: 227-237.

- TAKADA, A., OHMORI, K., YONEDA, T., TSUYUOKA, K., HASEGAWA, A. (1993). Contribution of carbohydrate antigen sialyl Lewis a and sialil Lewis x to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. **Cancer Res.** **53**: 354-361.
- TEIXEIRA, M. R., PANDIS, N., BARDI, G., ANDERSEN, J. A., HEIM, S. (1996). Karyotypic comparisons of multiple tumorous and macroscopically normal surrounding tissue samples from patients with breast cancer. **Cancer Res.** **56**: 855-859.
- TEDDER, T. F., STEEBER, D. A., CHEN, A., ENGEL, P. (1995). The selectins: vascular adhesion molecules. **FASEB Journal**, **9**: 866-873.
- THURL, S., MULLER-WERNER, B., SAWATZKI, G. (1996). Quantification of individual oligosaccharide compounds from human milk using High-pH Anion-Exchange Chromatography. **Analytical Biochemistry** **235**: 202-206.
- TLSTY, T. D. (1998). Cell-adhesion-dependent influences on genomic instability and carcinogenesis. **Current Opinion in Cell Biology** **10**: 647-653.
- TROYANOVSKY, S. M. (1999). Mechanism of cell-cell adhesion complex assembly. **Current Opinion in Cell Biology** **11**: 561-566.
- Van KOOYK, Y., VIEL-VAN, K. E., WEDER, P., HUJIBENS, R. J., FIGDOR, C. G. (1993). Lymphocyte function-associated antigen 1 dominantes very late antigen 4 in binding of activated T cells to endothelium. **J. Exp. Med.** **177**: 185-190.
- Van RIET, I., Van CAMP, B. (1993). The involvement of adhesion molecules in the biology of multiple mieloma. **Leuk. Linphoma** **9**: 441-452.
- VARNER, J. A., CHERESH, D. A. (1996). Integrins and cancer. **Curr. Opin. Cell Biol.** **8**: 724-730.
- YAMASHITA, K., OHKURA, H., TACHIBANA, Y., TAKASAKI, S., KOBATA, A. (1984). **J. Biol. Chem.** **259**: 10834-10840.

- YOUNG, S. K., JAMES, G. Jr., INKA B. (1996). Mucin glycoproteins in neoplasia. **Glycoconjugate Journal 13**: 693-707.
- YOUNGS, S. J., ALI, S. A., TAUB, D. D., REES, R. C. (1997). Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines. **Int. J. Cancer 71**: 257-266.
- WATKINS, W. W. (1995). In **Glycoproteins** (MONTREUIL, J., SCHACHTER, H. and VLIGENHART J.F.G. eds) pp 313-390, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.
- WESCHE, W. A., WILIMAS, J., KHARE, V., PARHAM, D. M. (1998). Renal medullary carcinoma: a potential sickle cell nephropathy of children and adolescents. **Pediatr. Pathol. Lab. Med. 18(1)**: 97-113.
- WIRTH, M., FUCHS, A., WOLF, M. ERTL, B., GABOR, F. (1998b). Lectin-mediated drug-targeding: characteristics and antiproliferative activity of wheat germ agglutinin conjugated doxorubicin on caco-2 cells. **Pharm. Res. 15**: 1031-1037.
- ZAHALKA, M. OKON, E., NAOK, D. (1993). Blocking lymphoma invasiveness with a monoclonal antibody directed against the  $\beta$  chain of the leukocyte adhesion molecule (CD18). **J. Immunol. 150**: 4466-4477.

TABELA 09A - Determinação da interação dos complexos lectina/FITC (expressos em Unidade de Fluorescência -UF) com células cancer de cólon na presença e ausência do monossacarídeo inibidor.

LECTINA (20µg)	AÇÚCAR (0,15M)	TIPO-CELULAR														
		LS 180			EB3			3LNLN			5W			8W		
		T/UF	I/UF	P.I.	T/UF	I/UF	P.I.	T/UF	I/UF	P.I.	T/UF	I/UF	P.I.	T/UF	I/UF	P.I.
Con A	Glc/Man	179.9	36.8	79.5%	230.5	14.1	93.8%	135.9	24.3	82.0%	177.1	32.3	81.7%	336.6	26.9	92.0%
Con Br	Glc/Man	18.4	0.4	97.7%	21.1	0.0	99.5%	15.0	0.3	97.8%	9.2	0.2	97.7%	12.4	0.2	97.9%
Con Bo	Glc/Man	27.9	23.2	17.0%	39.7	18.0	54.7%	25.1	21.7	13.7%	27.5	24.2	12.0%	237.1	43.6	81.6%
Con Gr	Glc/Man	19.7	3.6	81.3%	22.8	0.7	96.7%	13.0	1.8	85.7%	13.7	2.2	83.3%	29.0	2.1	92.6%
Con M	Glc/Man	12.1	0.3	97.3%	12.4	0.0	99.6%	9.4	0.2	97.6%	11.5	0.2	97.6%	15.3	0.2	98.5%

T/UF – Valor total de Unidades de Fluorescência

I/UF – Valor de Unidades de Fluorescência na presença do açúcar inibidor

P.I. – Percentual de inibição

TABELA 09B - Determinação da interação dos complexos lectina/FITC (expressos em Unidade de Fluorescência -UF) com células cancer de cólon na presença e ausência do monossacarídeo inibidor.

LECTINA (20µg)	AÇÚCAR (0,15M)	TIPO CELULAR														
		LS 180			EB3			3LNLN			5W			8W		
		T/UF	I/UF	P.I.	T/UF	I/UF	P.I.	T/UF	I/UF	P.I.	T/UF	I/UF	P.I.	T/UF	I/UF	P.I.
DGL	Glc/Man	14.5	2.4	83.1%	13.2	0.7	94.4%	10.4	1.8	82.3%	12.2	2.1	82.6%	23.0	1.7	92.2%
Dgui	Glc/Man	28.9	19.3	33.2%	31.4	14.7	53.0%	24.1	17.8	26.2%	26.2	20.9	20.1%	184.2	18.2	90.1%
Dvir	Glc/Man	29.0	15.9	45.0%	31.1	7.7	75.0%	18.8	14.2	24.7%	23.4	16.9	27.5%	151.5	13.7	90.9%
Dvio	Glc/Man	138.6	34.0	75.4%	184.8	20.3	89.0%	107.2	25.0	76.6%	118.6	28.7	75.7%	273.3	27.0	90.0%
Dros	Glc/Man	23.2	21.8	5.7%	29.0	17.9	38.4%	15.9	15.2	4.0%	19.8	19.5	1.6%	155.4	27.8	82.0%

T/UF – Valor total de Unidades de Fluorescência

I/UF – Valor de Unidades de Fluorescência na presença do açúcar inibidor

P.I. – Percentual de inibição

TABELA 09C - Determinação da interação dos complexos lectina/FITC (expressos em Unidade de Fluorescência -UF) com células cancer de cólon na presença e ausência do monossacarídeo inibidor.

LECTINA (20µg)	AÇÚCAR (0,15M)	TIPO CELULAR														
		LS 180			EB3			3LNLN			5W			8W		
		T/UF	I/UF	P.I.	T/UF	I/UF	P.I.	T/UF	I/UF	P.I.	T/UF	I/UF	P.I.	T/UF	I/UF	P.I.
CFL	Glc/Man	149.1	123.8	17.0%	174.6	109.0	37.5%	111.6	104.0	6.7%	129.6	109.9	15.1%	275.2	212.2	22.8%
PPL	Man	175.7	169.5	3.5%	24.1	13.1	45.6%	153.6	139.1	9.4%	154.6	134.3	13.1%	290.3	258.4	10.9%
VML	Gal	22.5	0.2	98.8%	29.6	0.0	99.7%	27.7	0.2	99.2%	7.1	0.0	99.4%	18.4	0.2	98.9%
LTA	Fuc	384.2	2.5	99.3%	401.5	2.1	99.4%	431.1	2.0	99.5%	389.9	1.9	99.5%	691.2	3.5	98.8%
UEA-I	Fuc	207.4	13.5	93.4%	178.7	11.5	93.5%	161.9	8.6	94.6%	166.9	12.5	92.4%	312.8	24.6	92.1%

T/UF – Valor total de Unidades de Fluorescência

I/UF – Valor de Unidades de Fluorescência na presença do açúcar inibidor

P.I. – Percentual de inibição

FIGURA 2 - Interação da lectina Con A/FITC frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M.

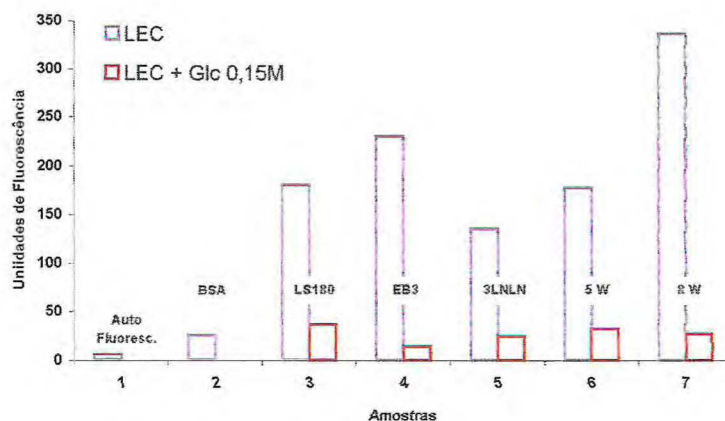


FIGURA 3 - Interação da lectina Con Br/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M.

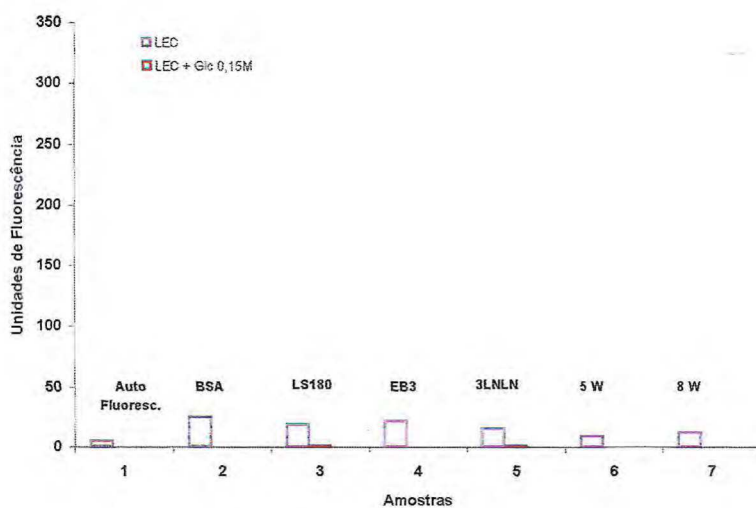


FIGURA 4 - Interação da lectina Con Bo/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M.

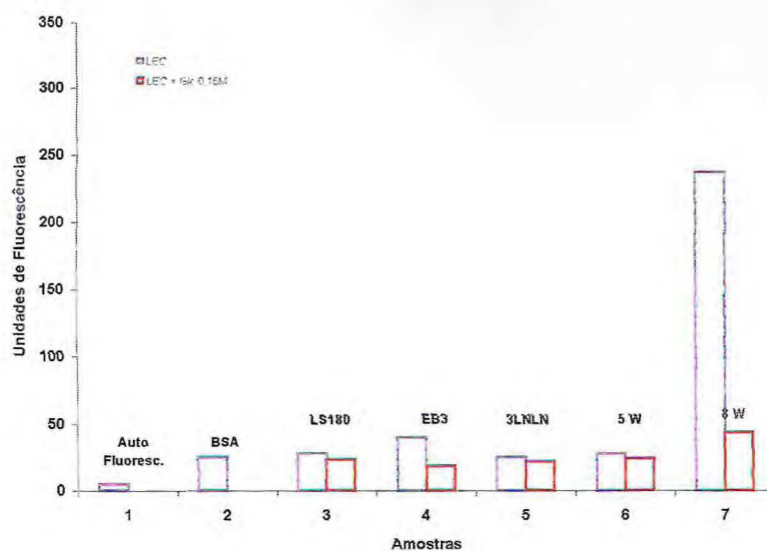


FIGURA 5 - Interação da lectina Con Gr/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M.

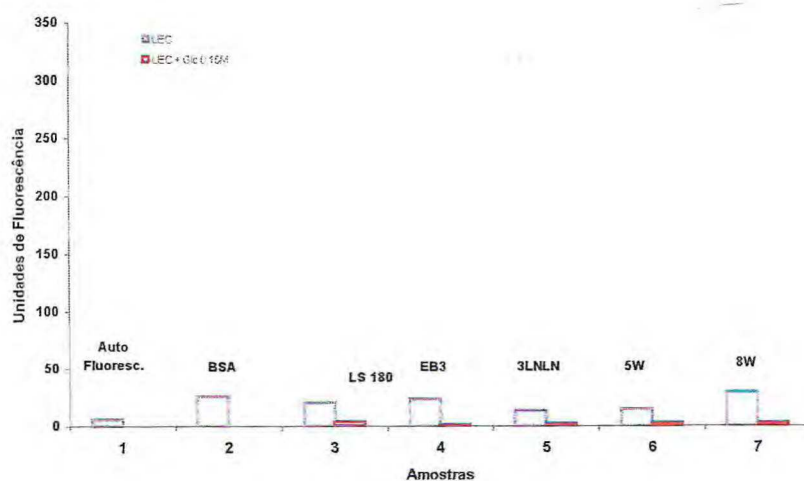


FIGURA 6 - Interação da lectina Con M/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M.

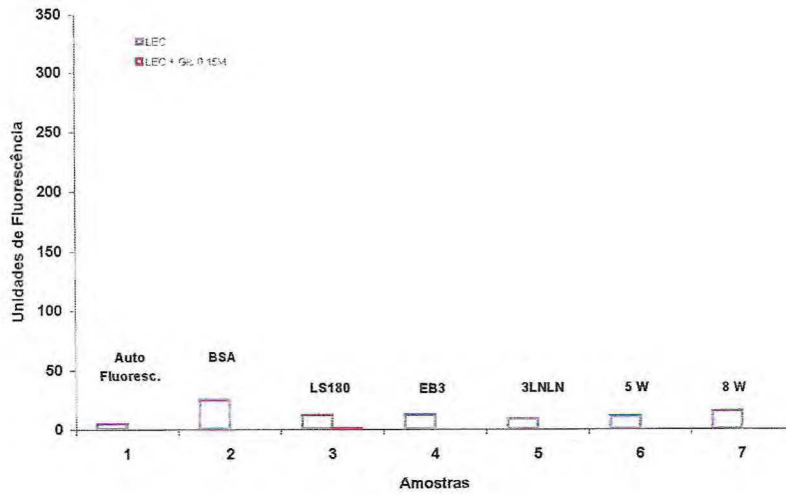


FIGURA 7 - Interação da lectina DGL/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M.

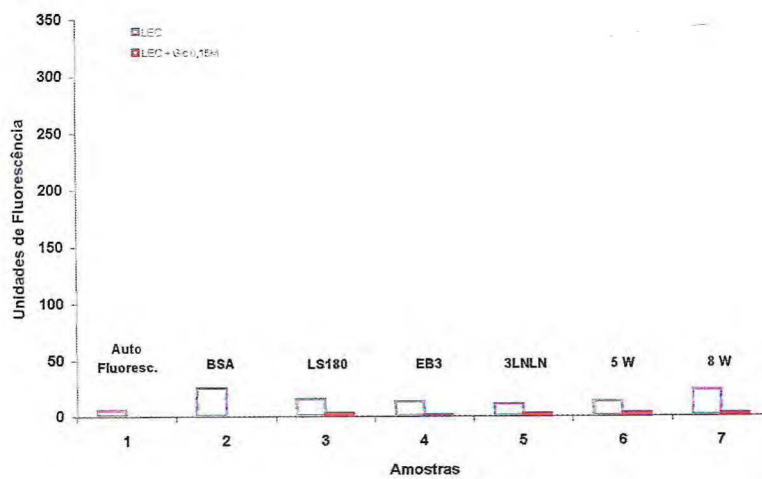


FIGURA 8 - Interação da lectina DGui/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M.

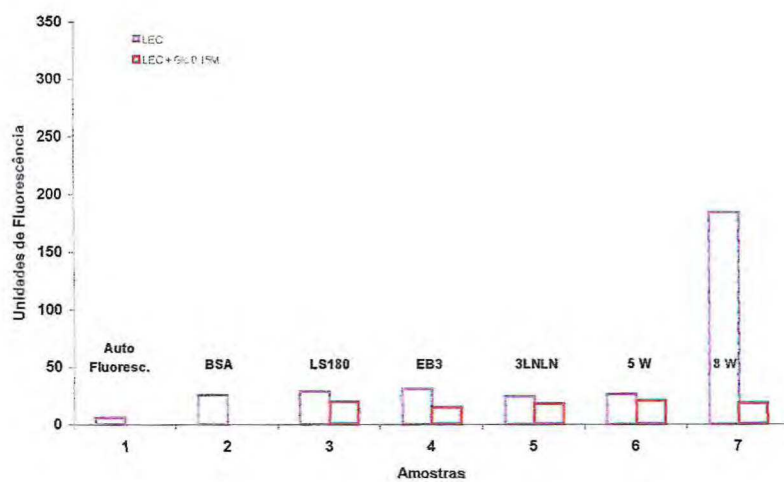


FIGURA 9 - Interação da lectina Dvir/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M.

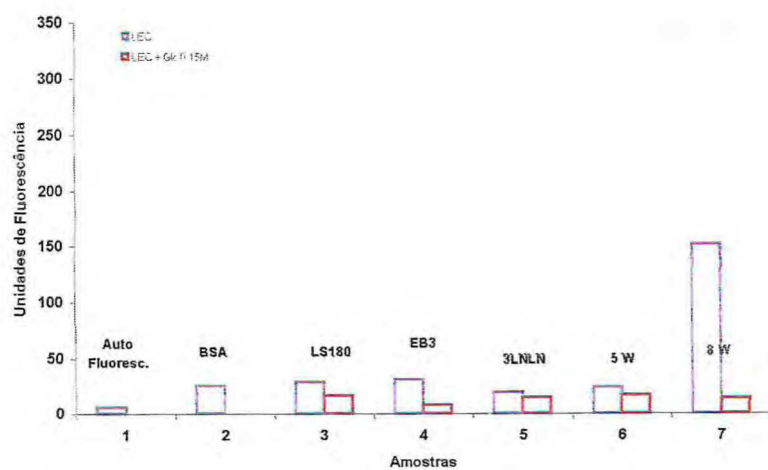


FIGURA 10 - Interação da lectina Dvivo/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M.

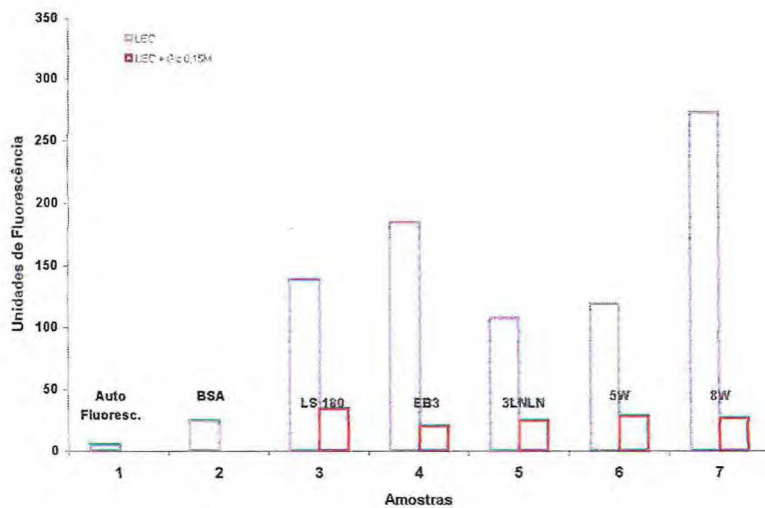


FIGURA 11 - Interação da lectina Dros/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M.

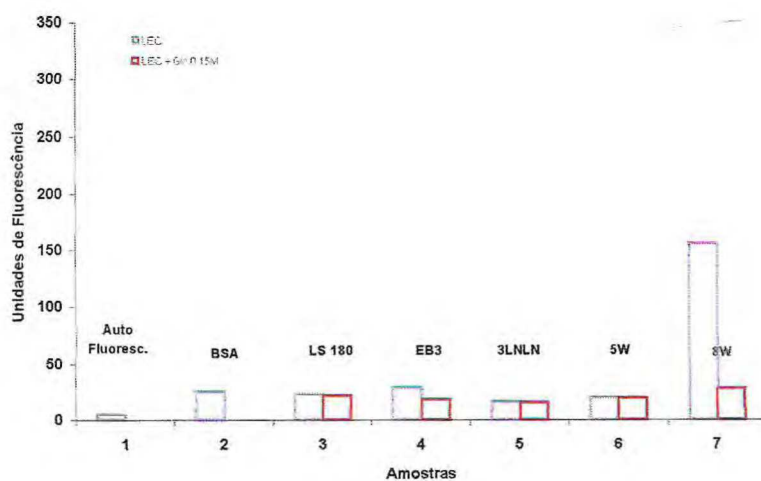


FIGURA 12- Interação da lectina CFL/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de glicose 0,15 M.

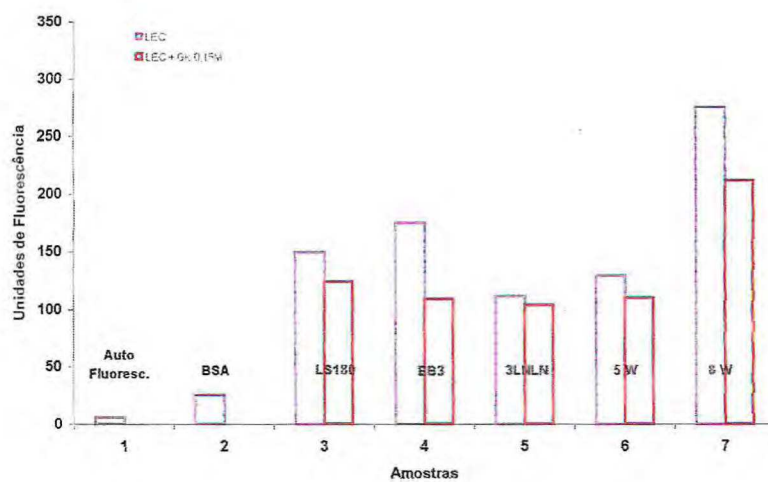


FIGURA 13 - Interação da lectina VML/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de galactose 0,15 M.

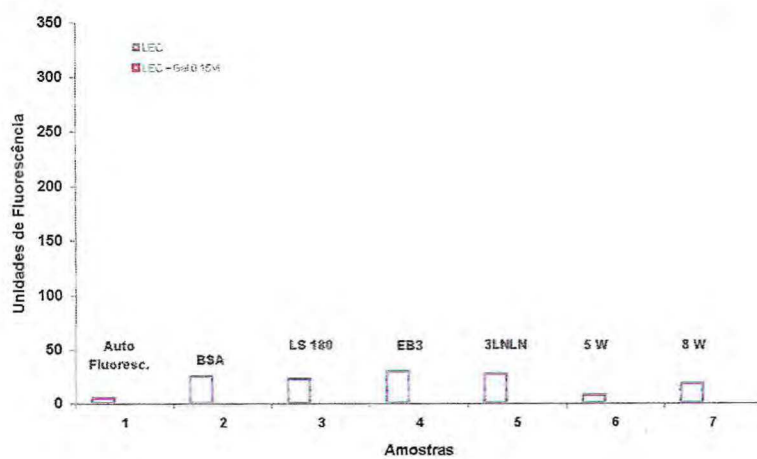


FIGURA 14 - Interação da lectina PPL/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de manose 0,15 M.

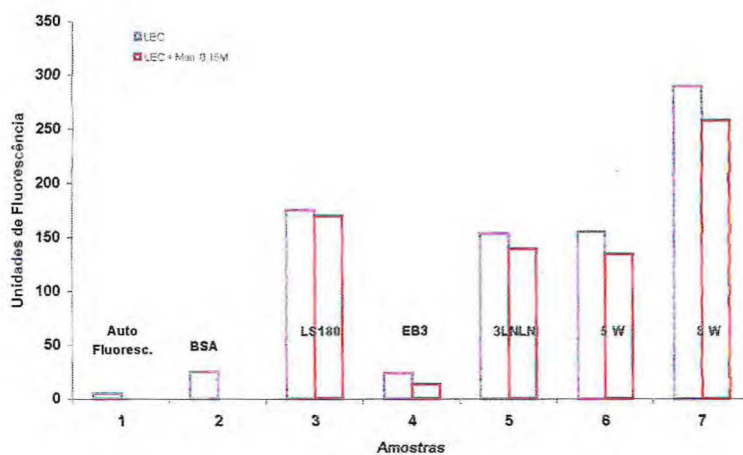


FIGURA 15 - Interação da lectina LTA/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de fucose 0,15 M.

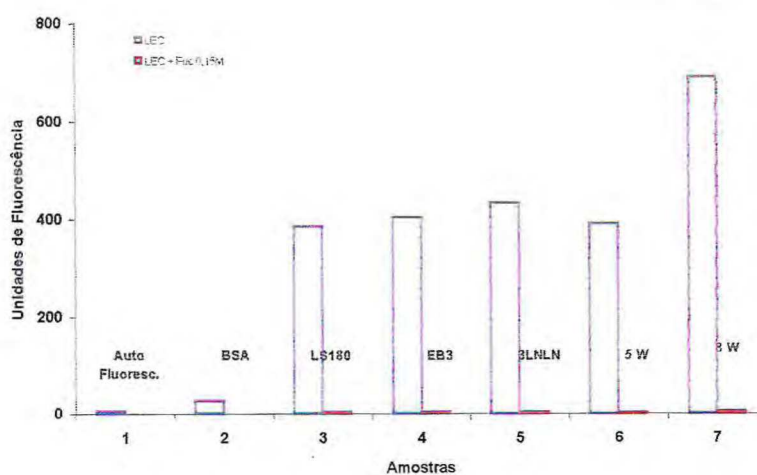


FIGURA 16 - Interação da lectina UEA-I/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença e ausência de fucose 0,15 M.

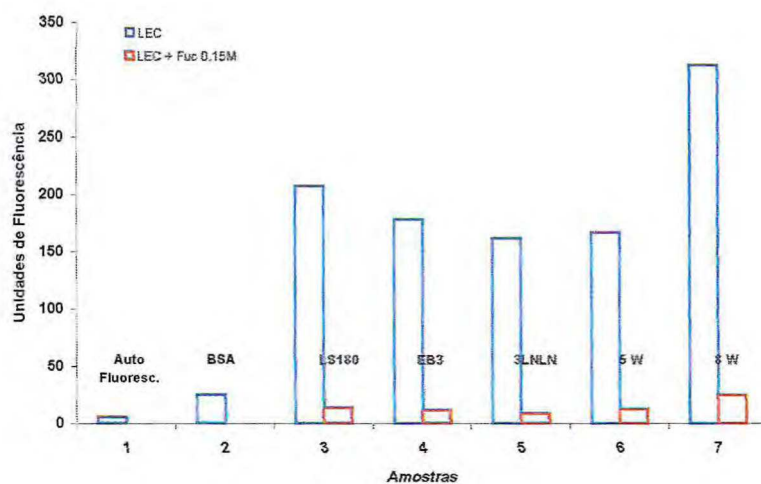


FIGURA 17 - Cromatografia em sistema DIONEX PA - 100 dos glicanos fucosilados por fucosiltransferases de variantes de células de câncer de cólon usando-se acceptor Lacto-N-Tetraose.

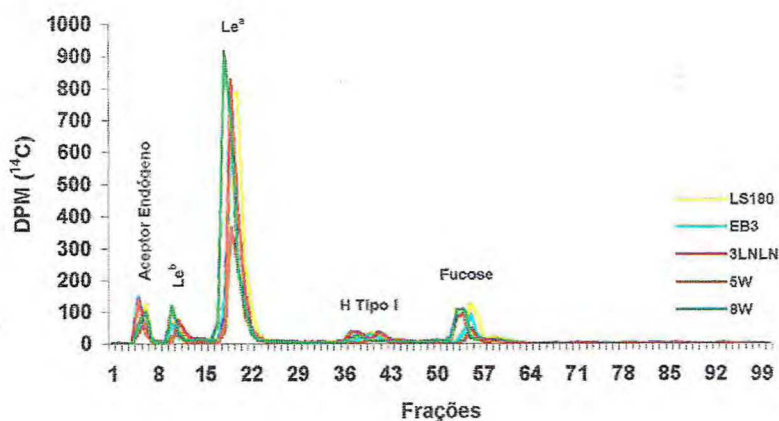


FIGURA 18 - Cromatografia em sistema DIONEX PA - 100 dos glicanos fucosilados por fucosiltransferases de variantes de células de câncer de cólon usando-se aceptor Lacto-N(neo)-Tetraose.

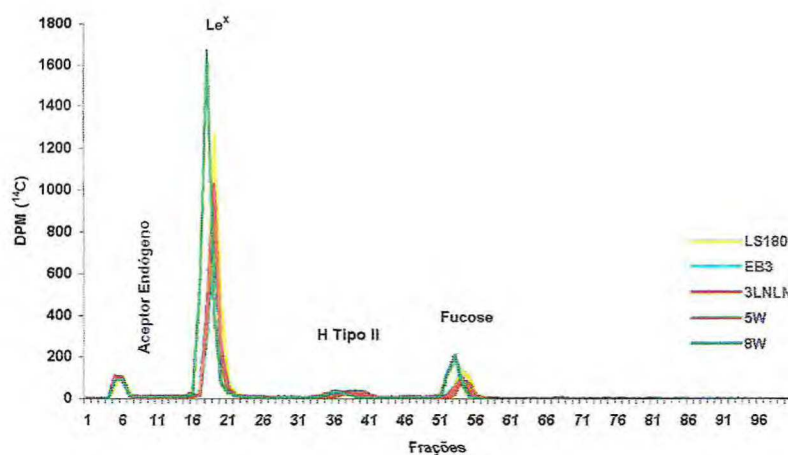


FIGURA 19 - Cromatografia em sistema DIONEX PA - 100 dos glicanos fucosilados por fucosiltransferases de variantes de células de câncer de cólon sem a utilização de aceptor.

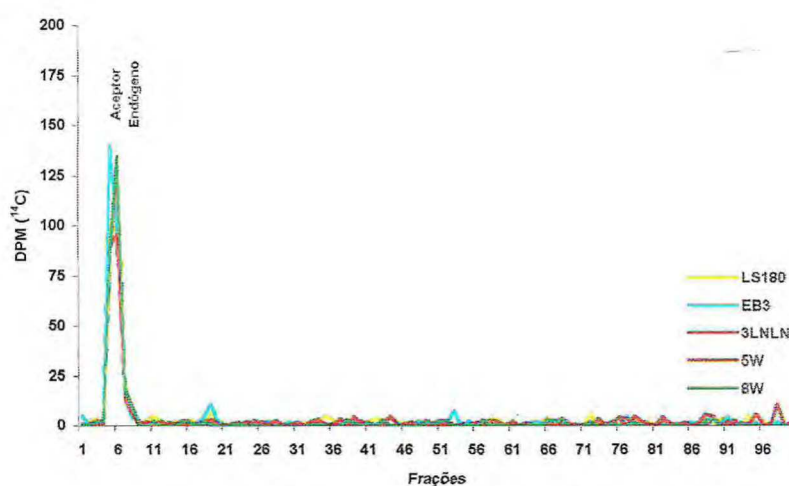


FIGURA 20 - Cromatografia em papel Whatman 3 dos glicanos fucosilados por fucosiltransferases de variantes de células de câncer de cólon usando-se aceitador Lacto-N-Biose.

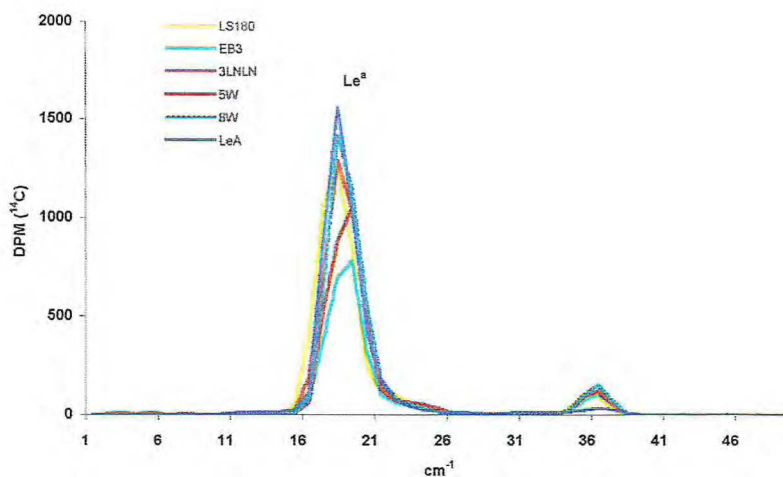


FIGURA 21 - Cromatografia em papel Whatman 3 dos glicanos fucosilados por fucosiltransferases de variantes de células de câncer de cólon usando-se aceitador N-acetilactosamina.

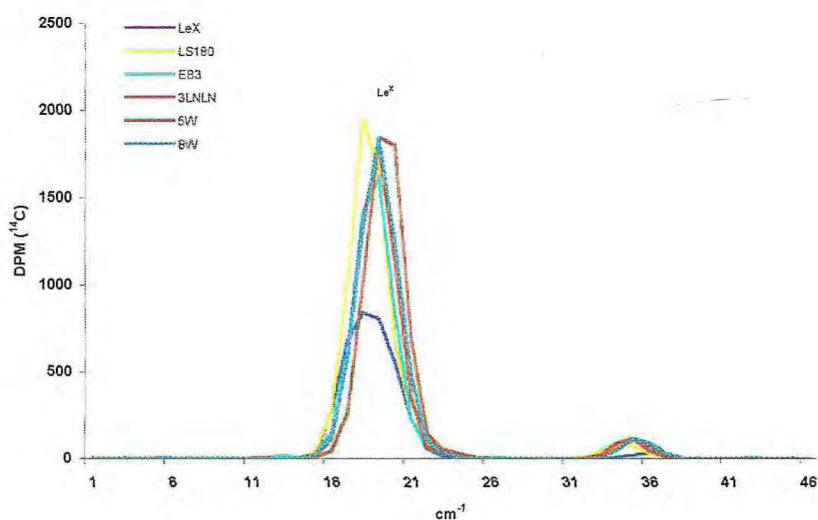


FIGURA 22 - Cromatografia em papel Whatman 3 dos glicanos fucosilados por fucosiltransferases de variantes de células de câncer de cólon usando-se aceitador fenilgalactose.

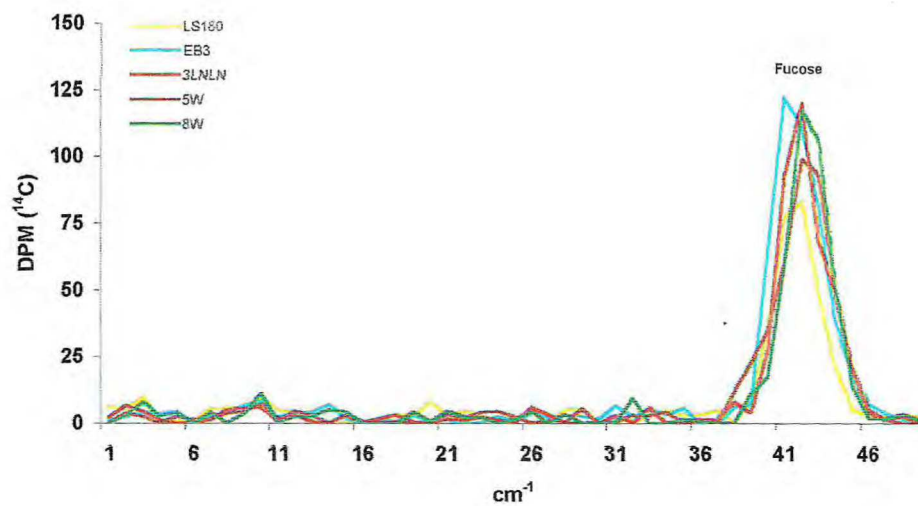


FIGURA 23 - Autoradiografia de produtos fucosilados por fucosiltransferases de variantes celulares de câncer de cólon humano usando-se Lacto-N-Biose e N-acetilactosamina como aceptores.

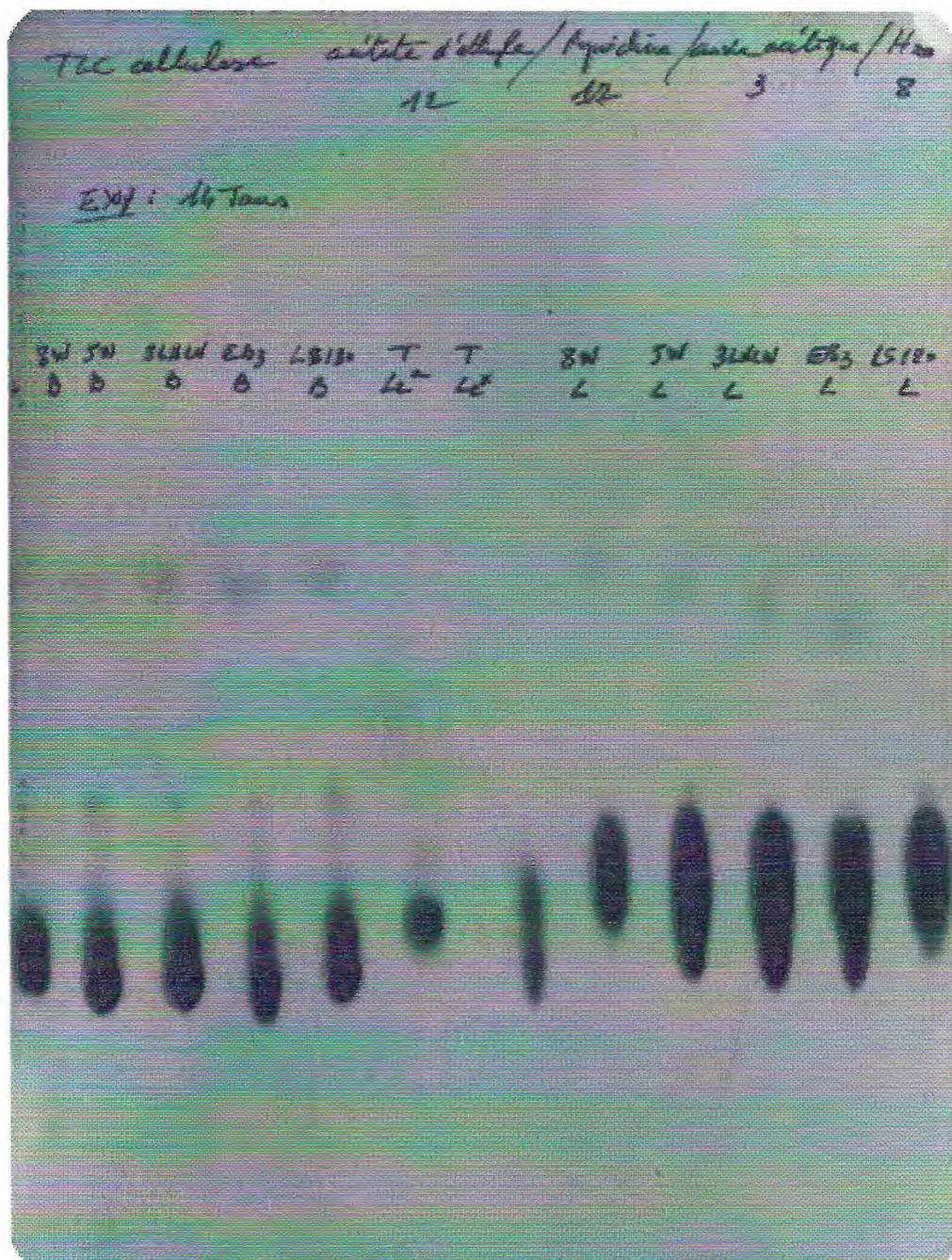


FIGURA 24 - Célula da linhagem LS 180

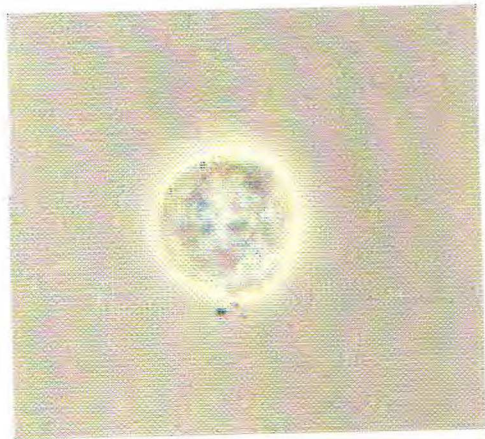


FIGURA 25 - Célula da linhagem EB3

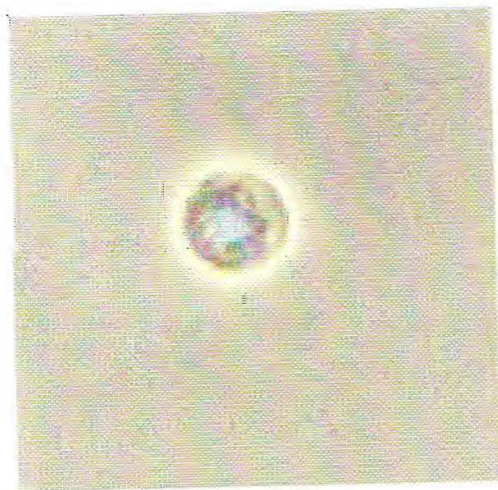


FIGURA 26 – Célula da linhagem 3LNLN

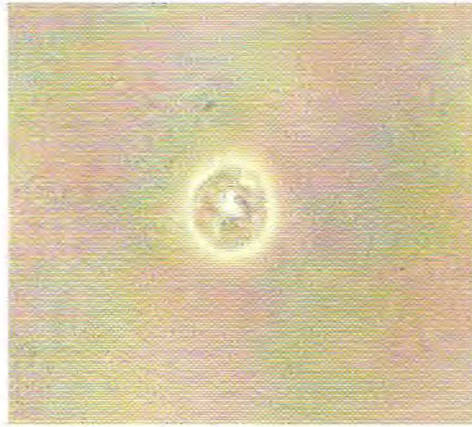


FIGURA 27 – Célula da linhagem 5W

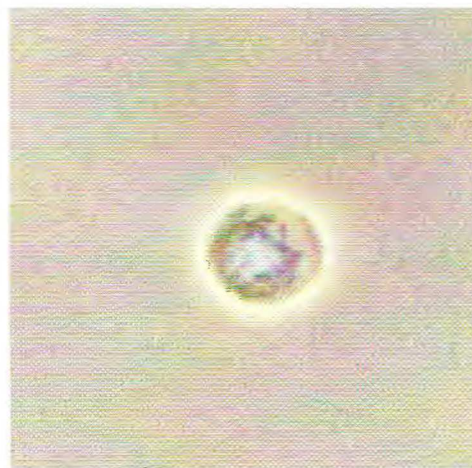


FIGURA 28 - Célula da linhagem 8W

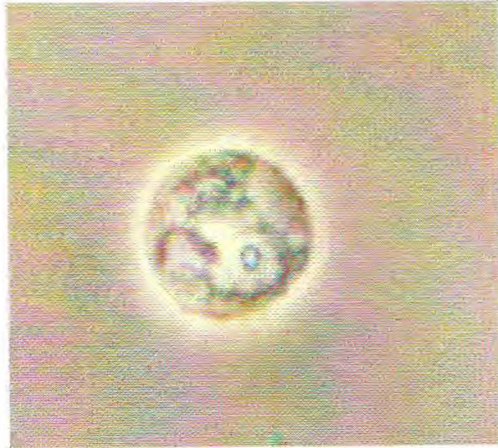


FIGURA 29 – Microscopia confocal de células da variante 3LNLN marcadas com UEA-I/FITC.

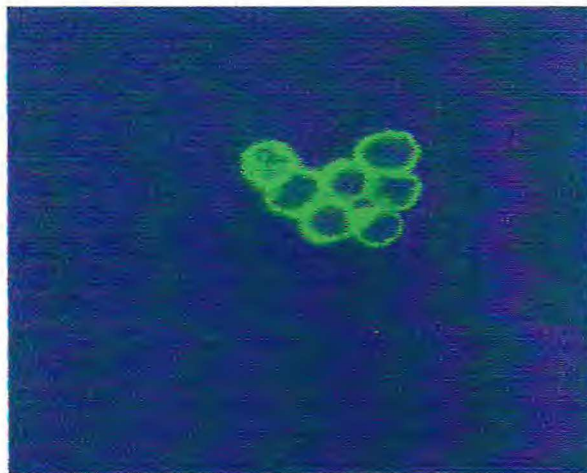


FIGURA 30 – Microscopia confocal de células da variante EB3 marcadas com LTA/FITC.

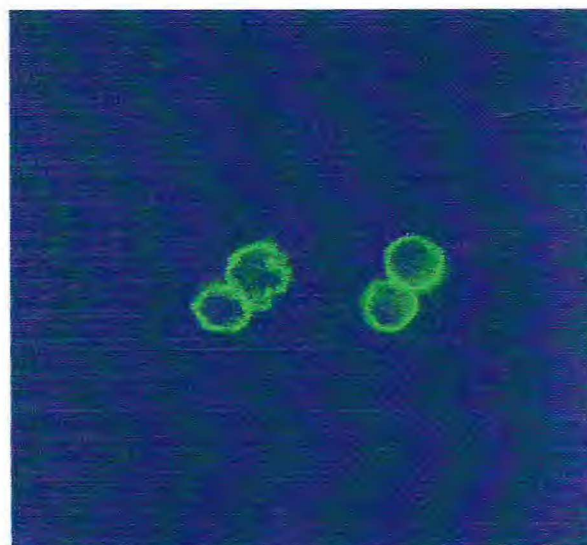


FIGURA 31 – Microscopia confocal de células da variante EB3 marcadas com Con Bo/FITC.

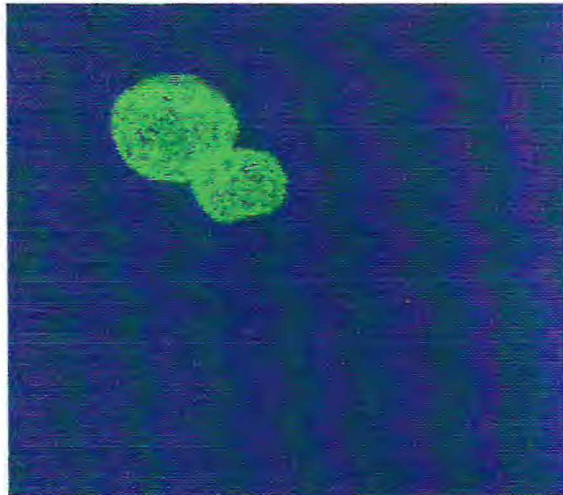
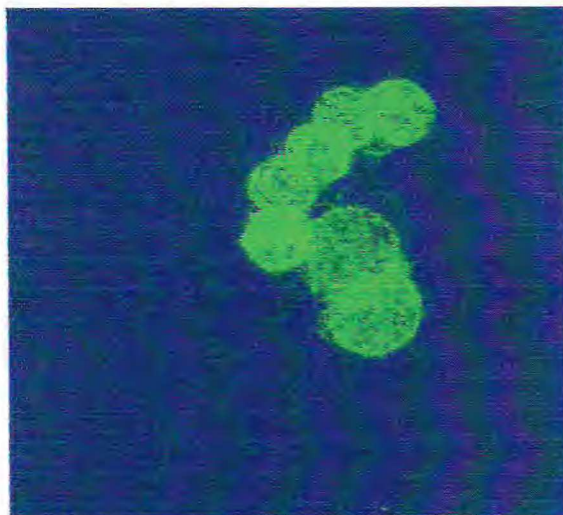


FIGURA 32 – Microscopia confocal de células da variante 5W marcadas com Dros/FITC.



## APÉNDICE

FIGURA 2(a) - Interação da lectina Con A/FITC frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo.

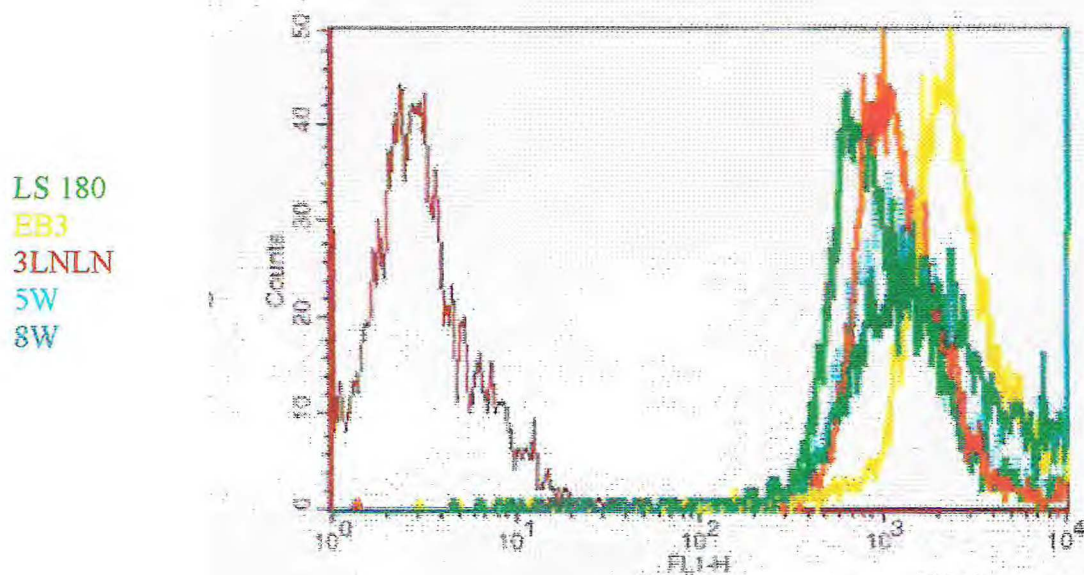


FIGURA 2(b) - Interação da lectina Con A/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença de glicose 0,15M.

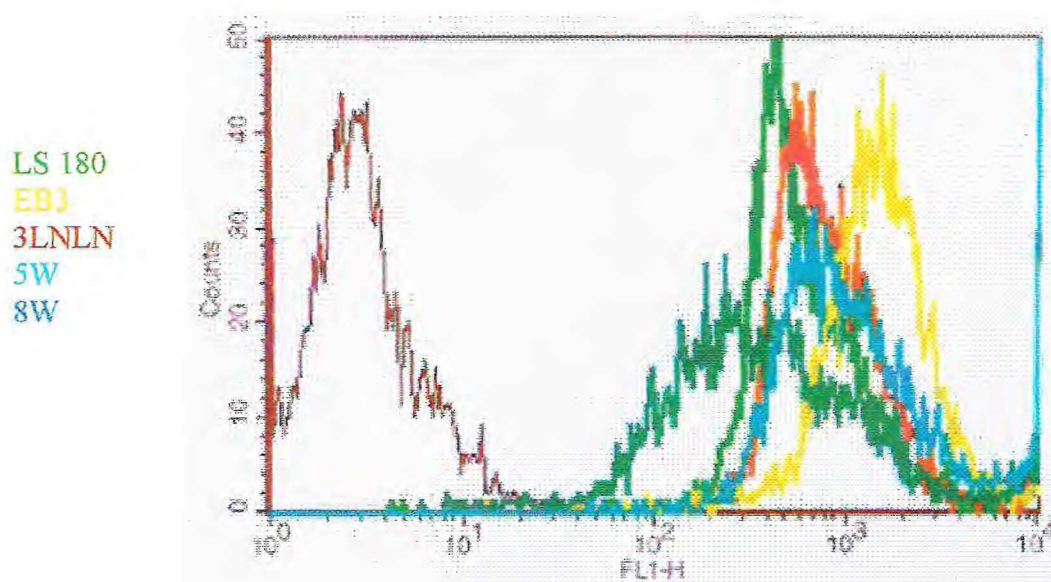


FIGURA 3(a) - Interação da lectina Con Br/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo.

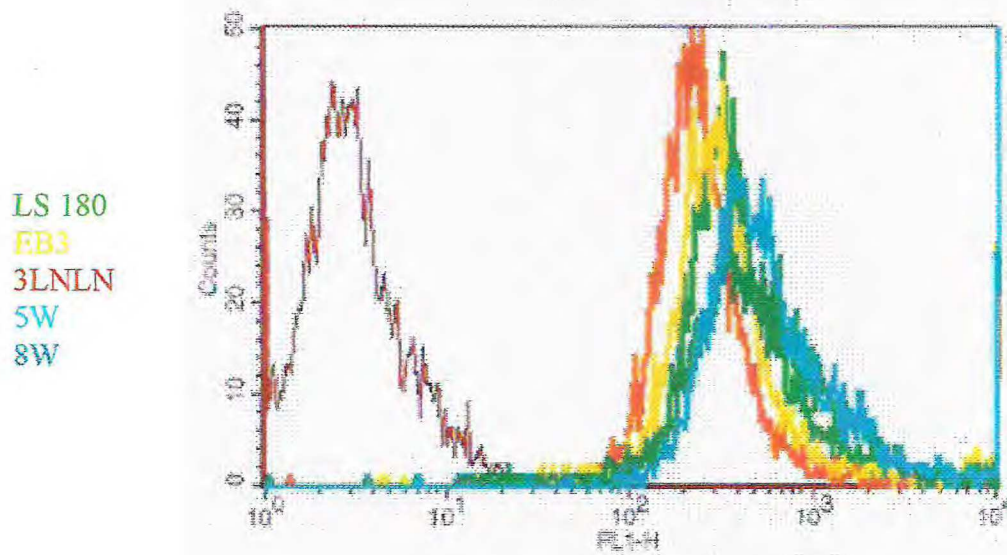


FIGURA 3(b) - Interação da lectina Con Br/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença de glicose 0,15M.

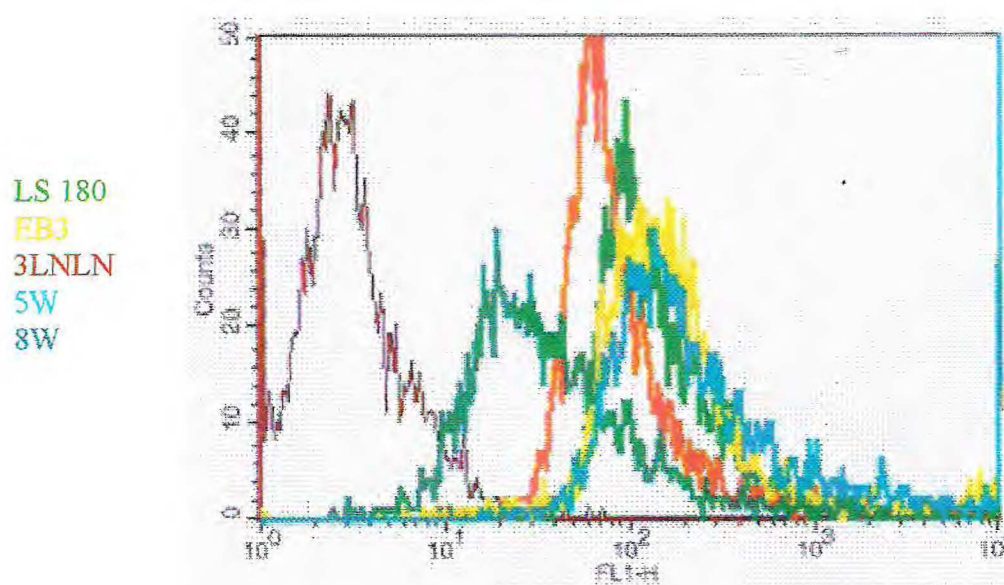


FIGURA 4(a) - Interação da lectina Con Bo/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo.

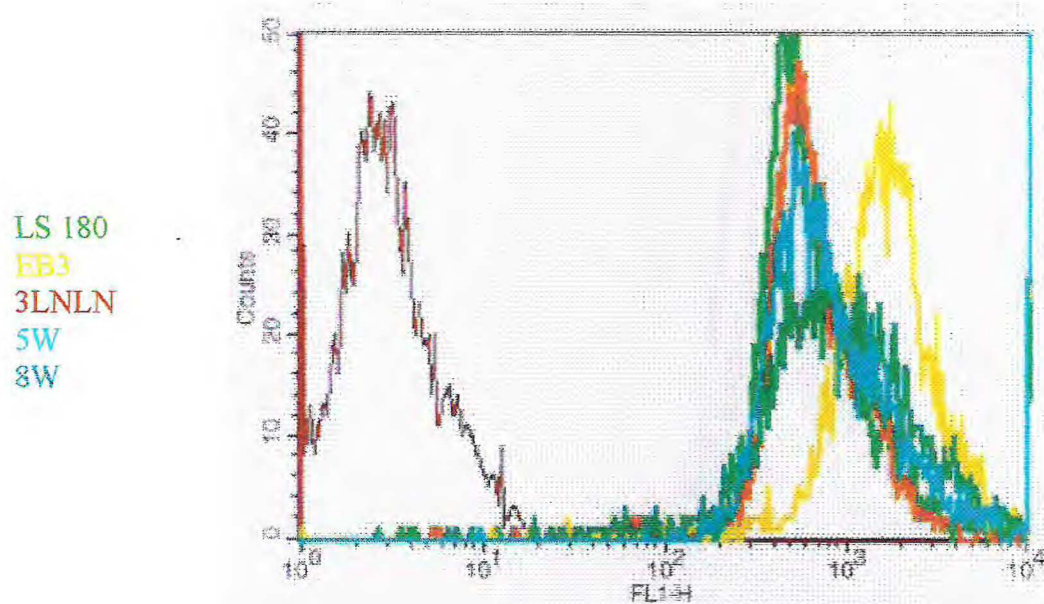


FIGURA 4(b) - Interação da lectina Con Bo/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença de glicose 0,15M

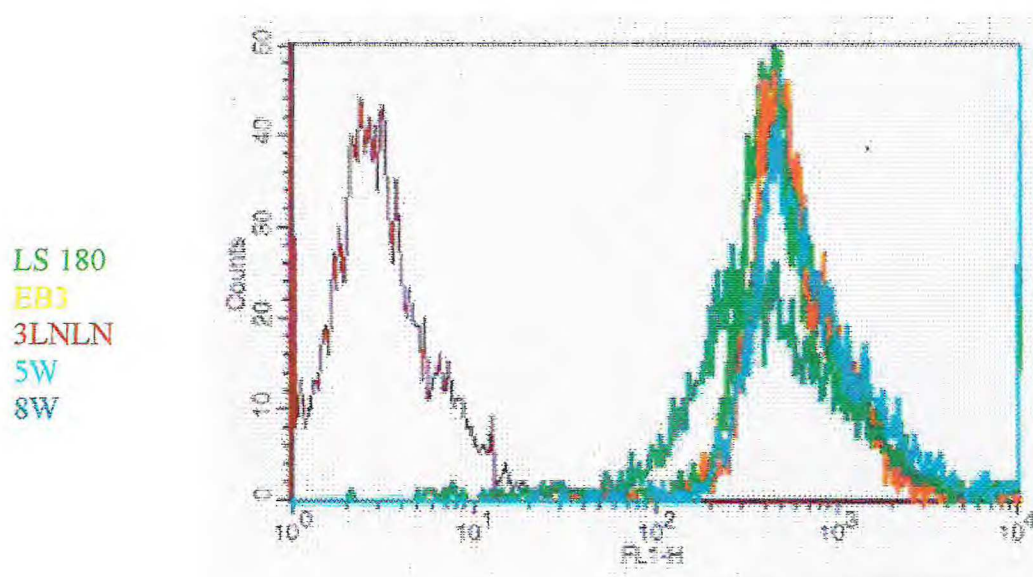


FIGURA 5(a) - Interação da lectina Con Gr/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo.

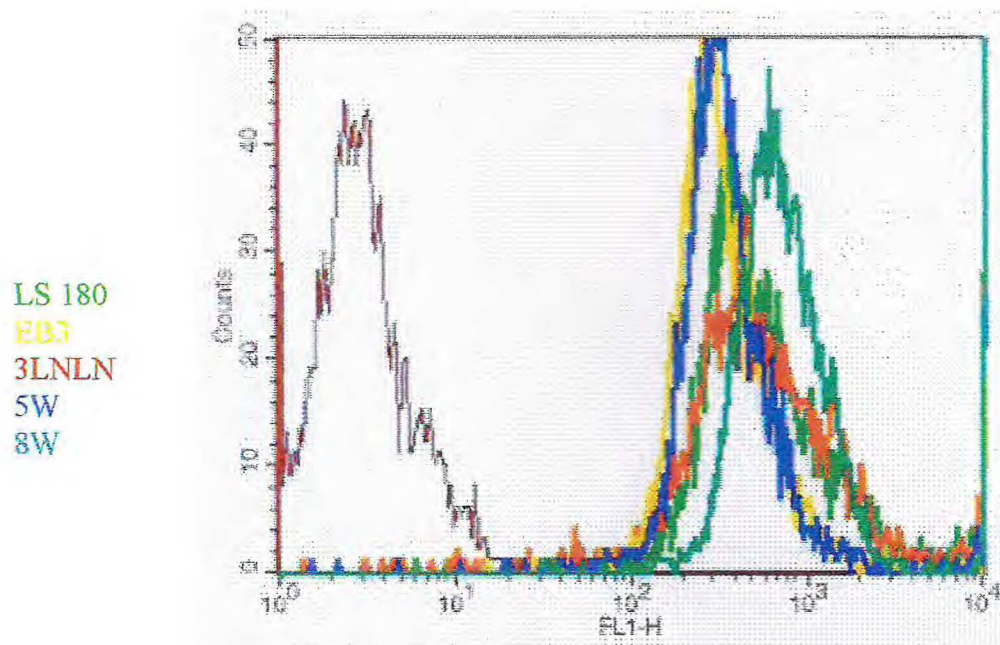


FIGURA 5(b) - Interação da lectina Con Gr/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença de glicose 0,15M.

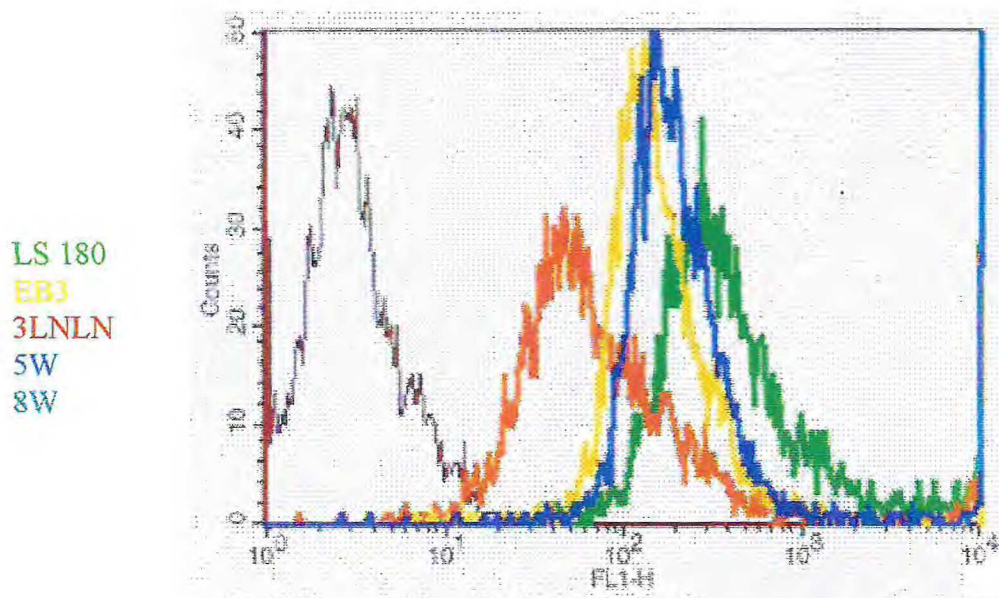


FIGURA 6(a) - Interação da lectina Con M/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo.

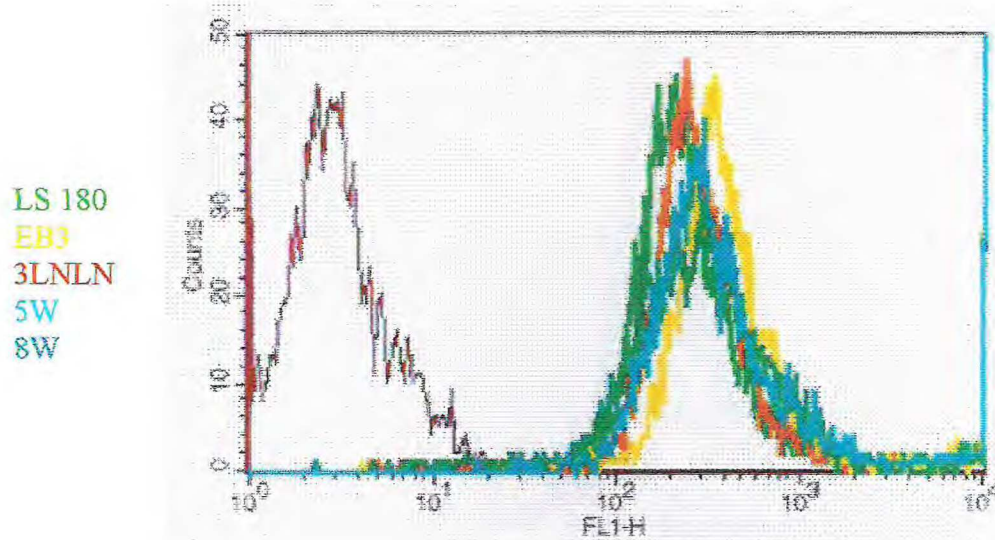


FIGURA 6(b) - Interação da lectina Con M/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença de glicose 0,15M.

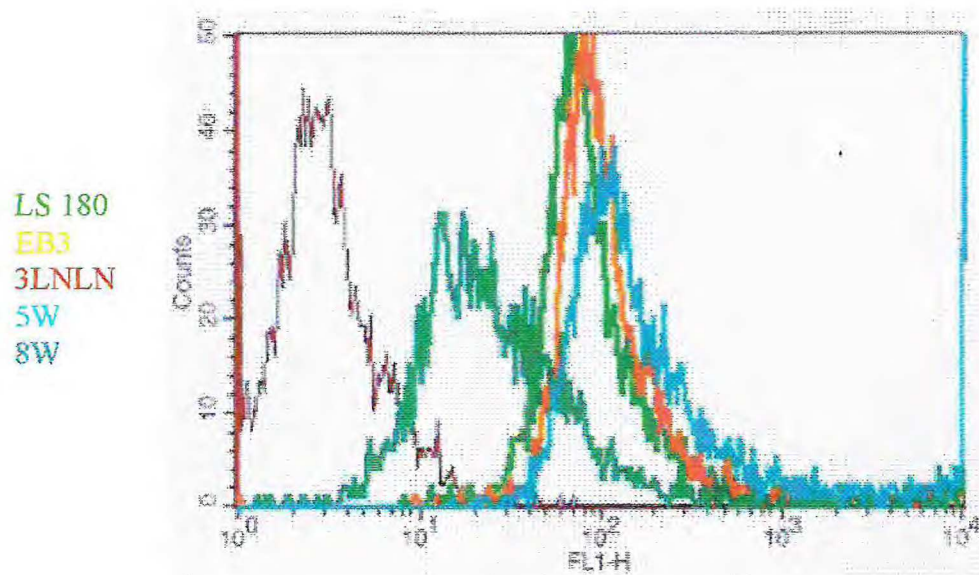


FIGURA 7(a) - Interação da lectina DGL/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo.

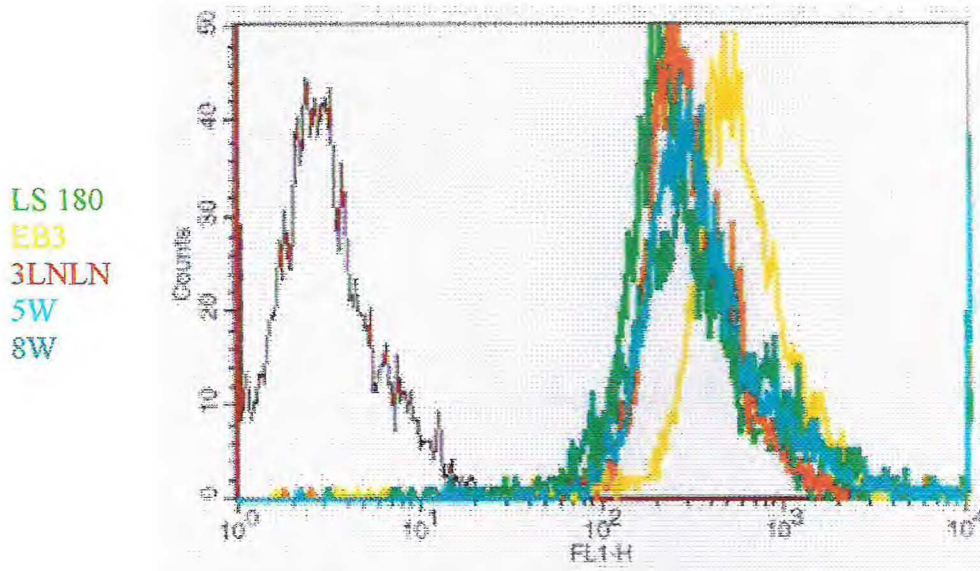


FIGURA 7(b) - Interação da lectina DGL/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença de glicose 0,15M.

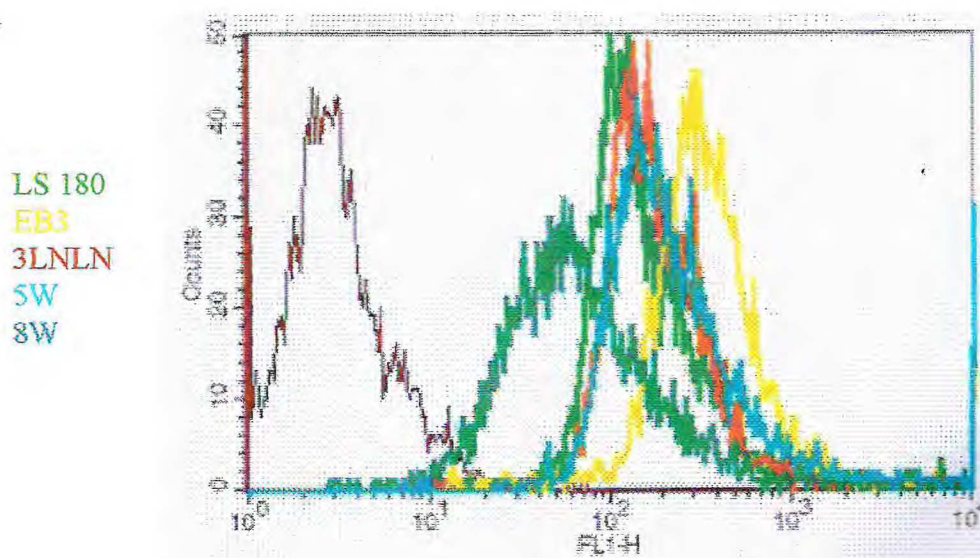


FIGURA 8(a) - Interação da lectina Dgui/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo.

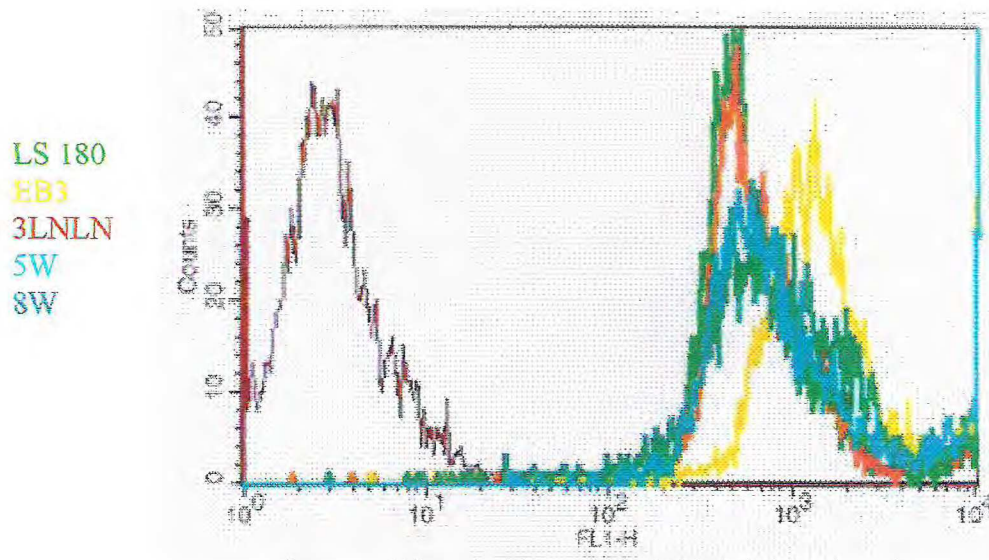


FIGURA 8(b) - Interação da lectina Dgui/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença de glicose 0,15M.

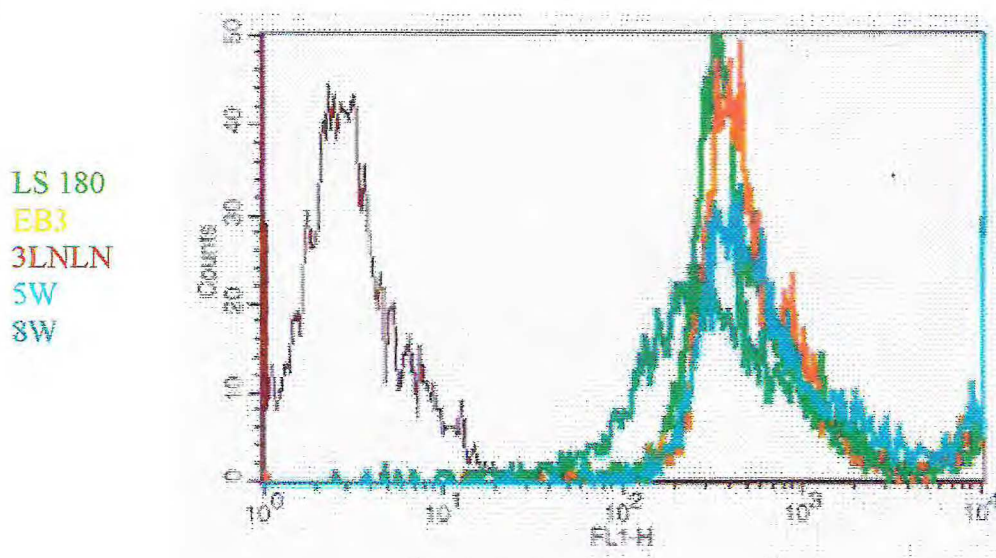


FIGURA 9(a) - Interação da lectina Dvir/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo.

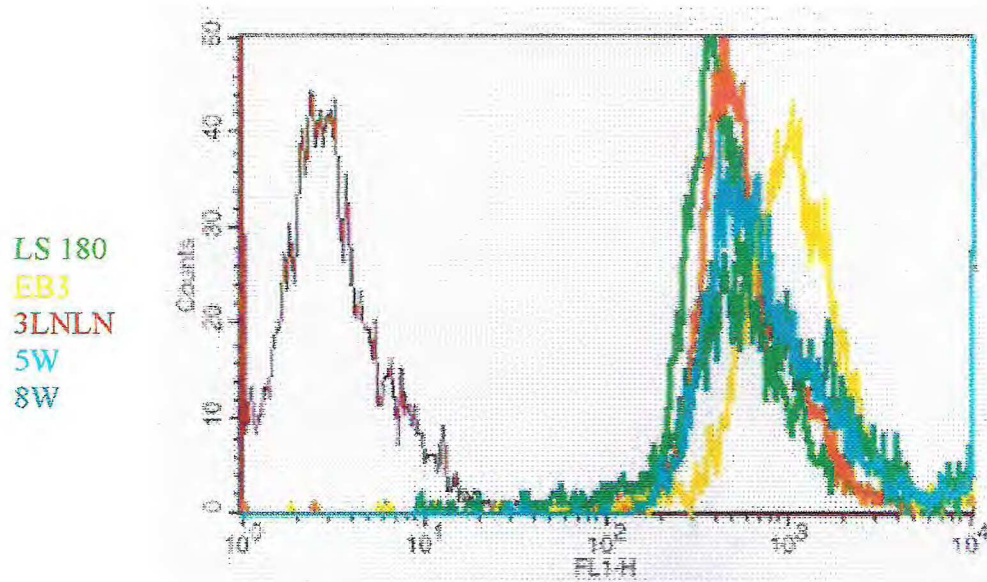


FIGURA 9(b) - Interação da lectina Dvir/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença de glicose 0,15M.

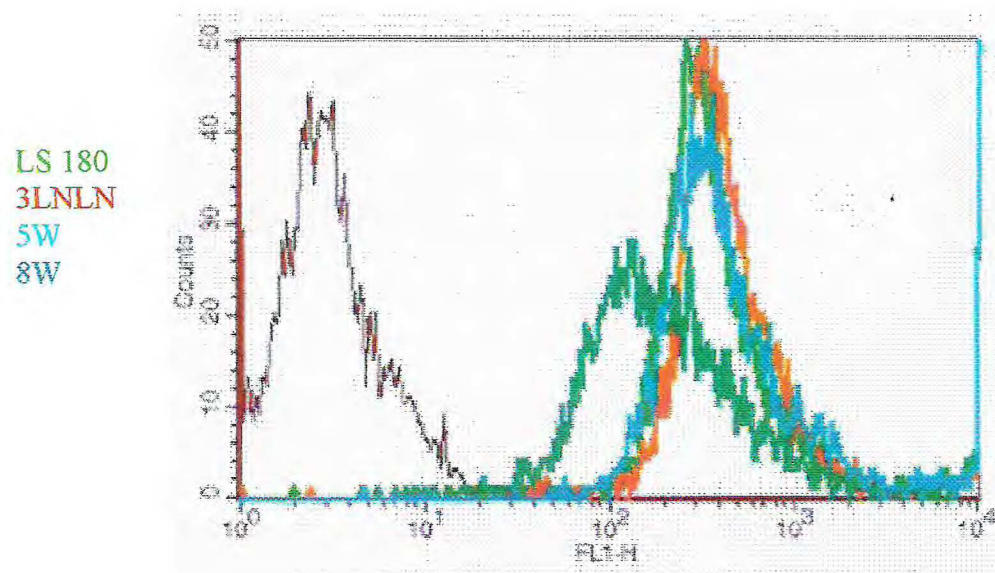


FIGURA 10(a) - Interação da lectina Dvioleta/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo.

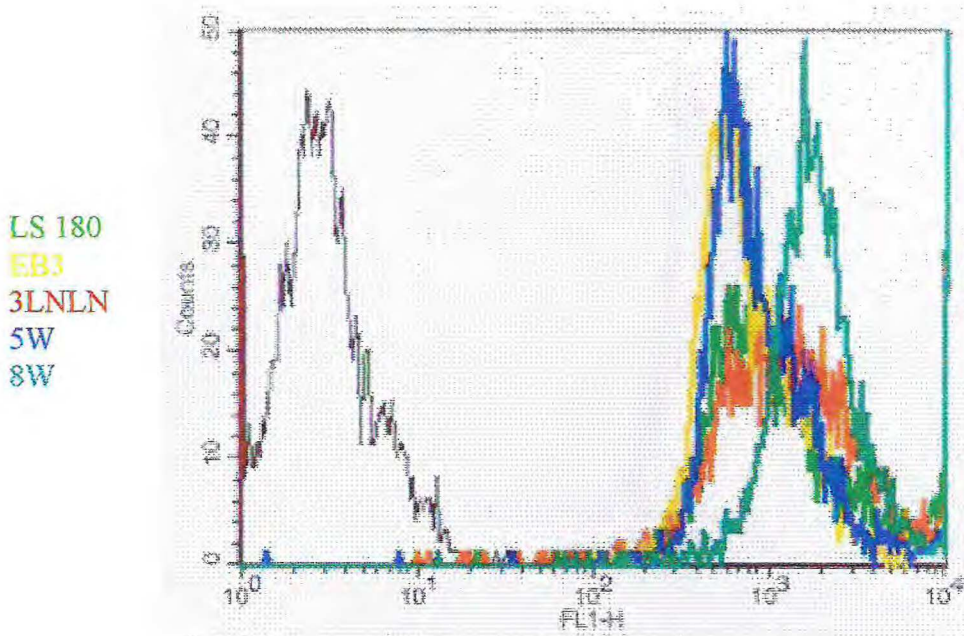


FIGURA 10(b) - Interação da lectina Dvioleta/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença de glicose 0,15M.

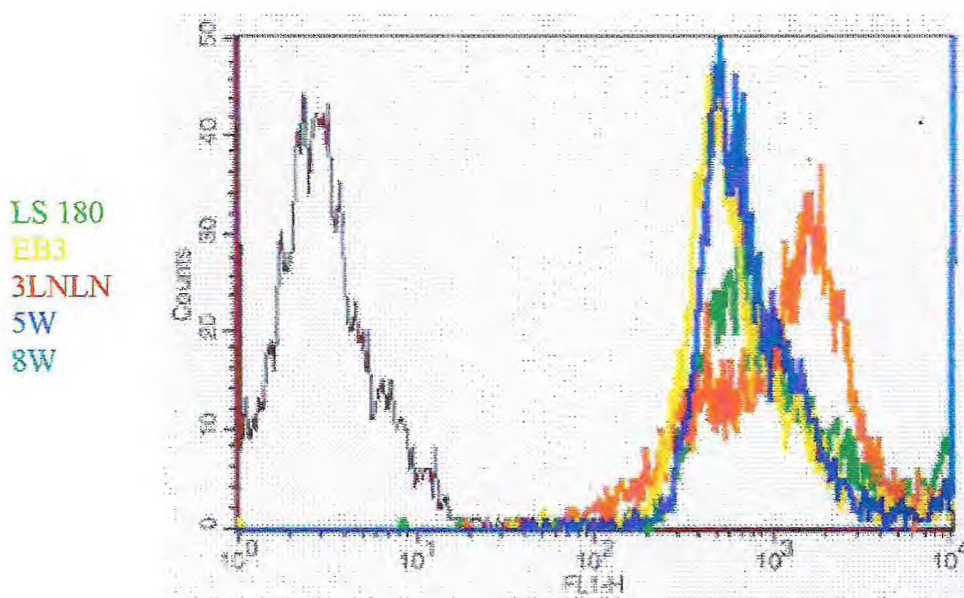


FIGURA 11(a) - Interação da lectina Dros/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo.

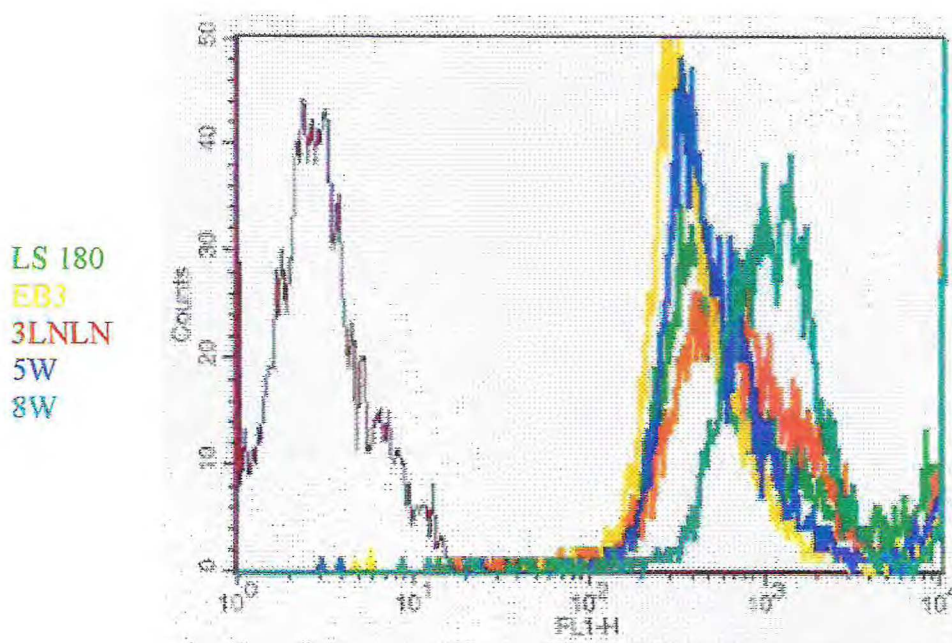


FIGURA 11(b) - Interação da lectina Dros/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença de glicose 0,15M.

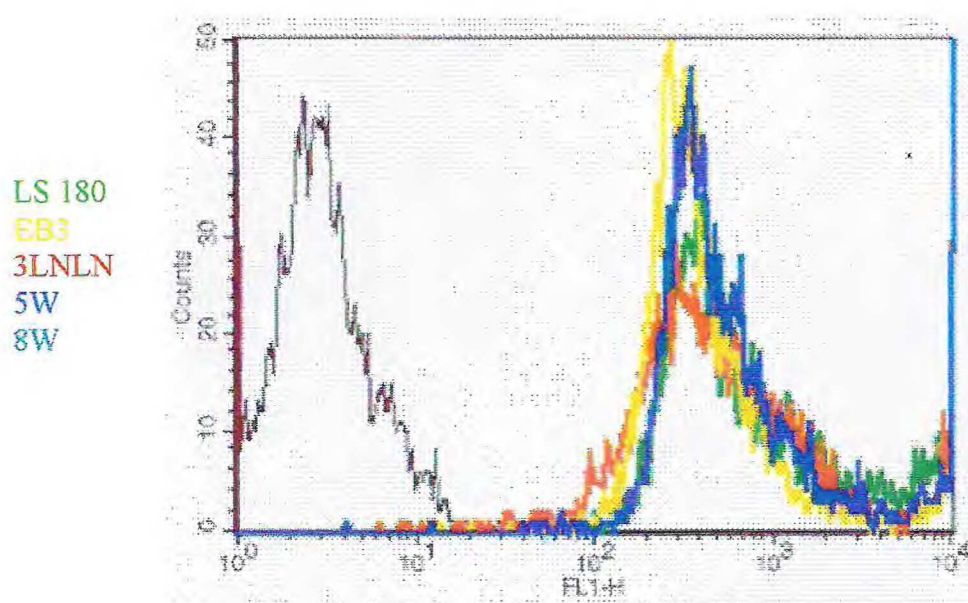


FIGURA 12(a) - Interação da lectina CFL/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo.

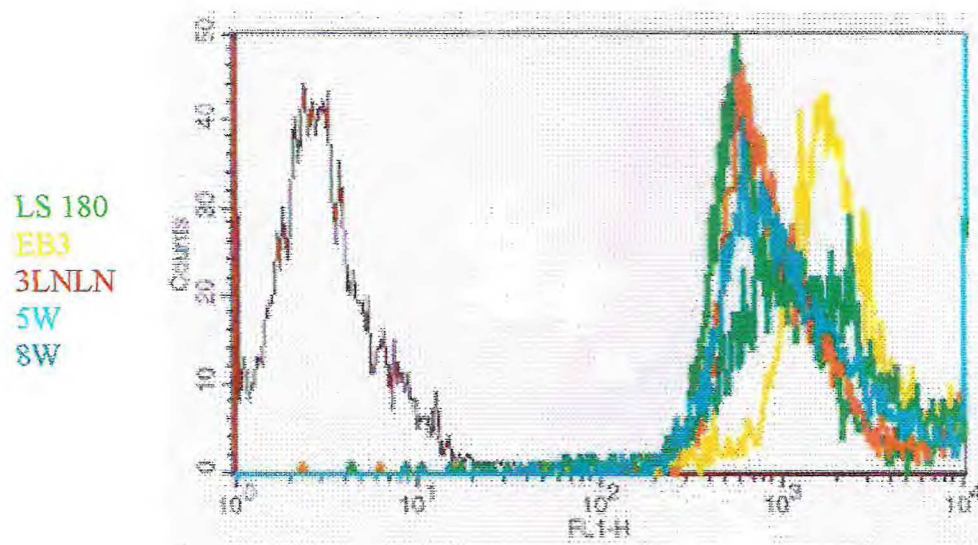


FIGURA 12(b) - Interação da lectina CFL/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença de glicose 0,15M.

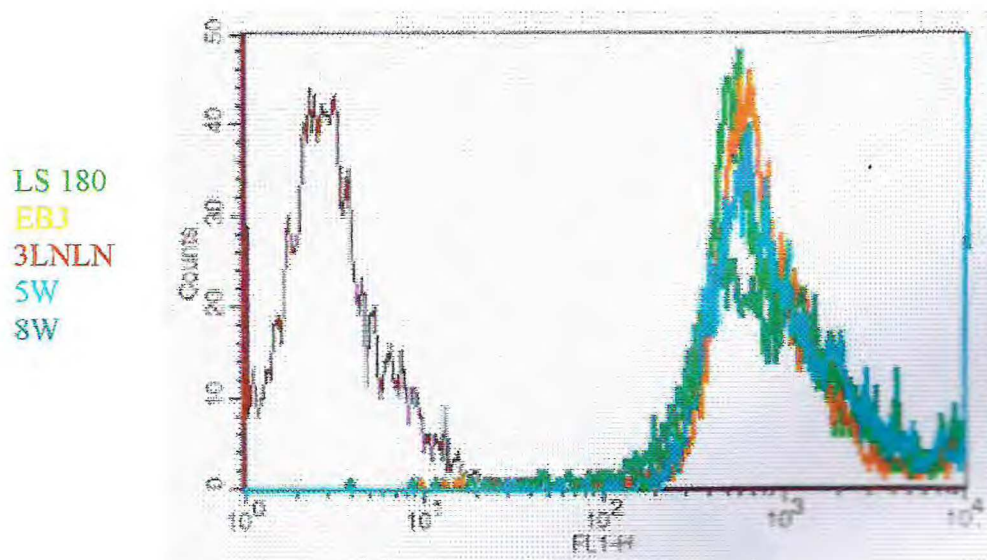


FIGURA 13(a) - Interação da lectina VML/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo.

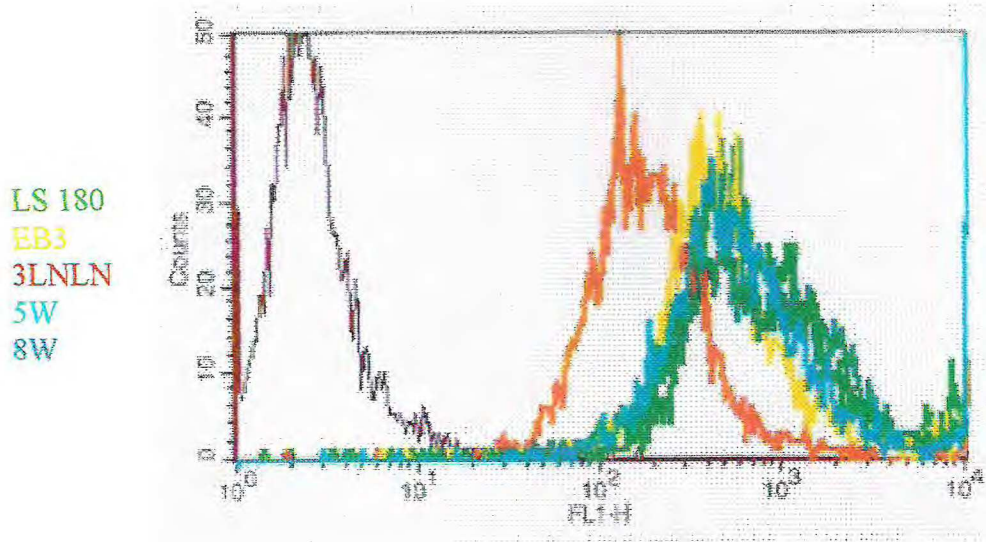


FIGURA 13(b) - Interação da lectina VML/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença de galactose 0,15M.

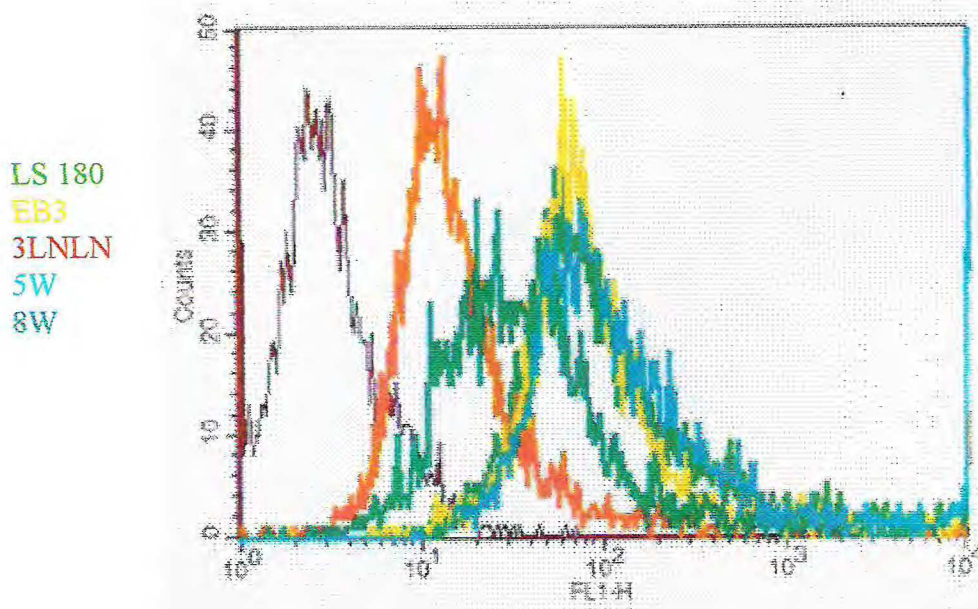


FIGURA 14(a) - Interação da lectina PPL/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo.

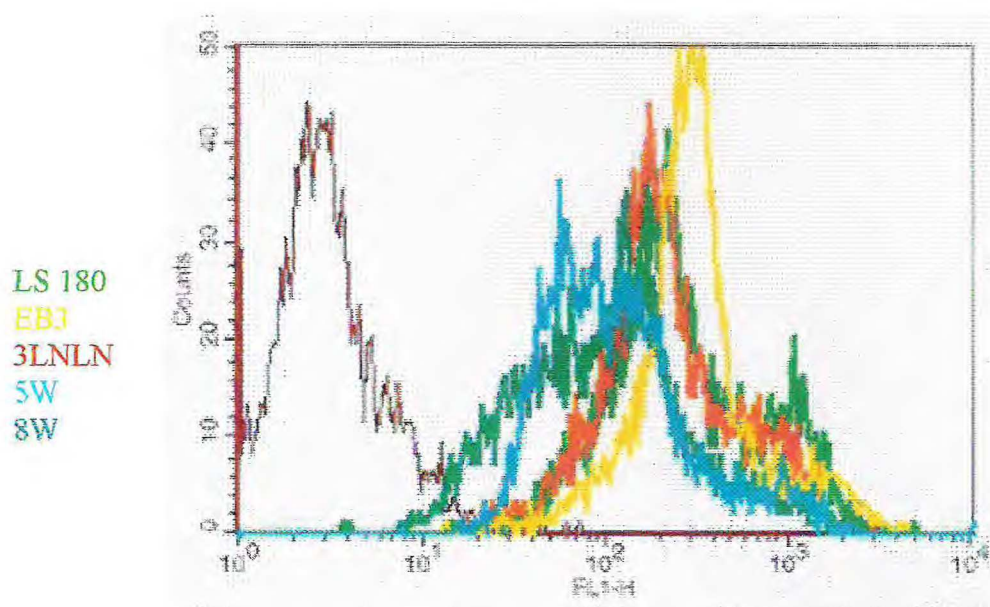


FIGURA 14(b) - Interação da lectina PPL/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença de manose 0,15M.

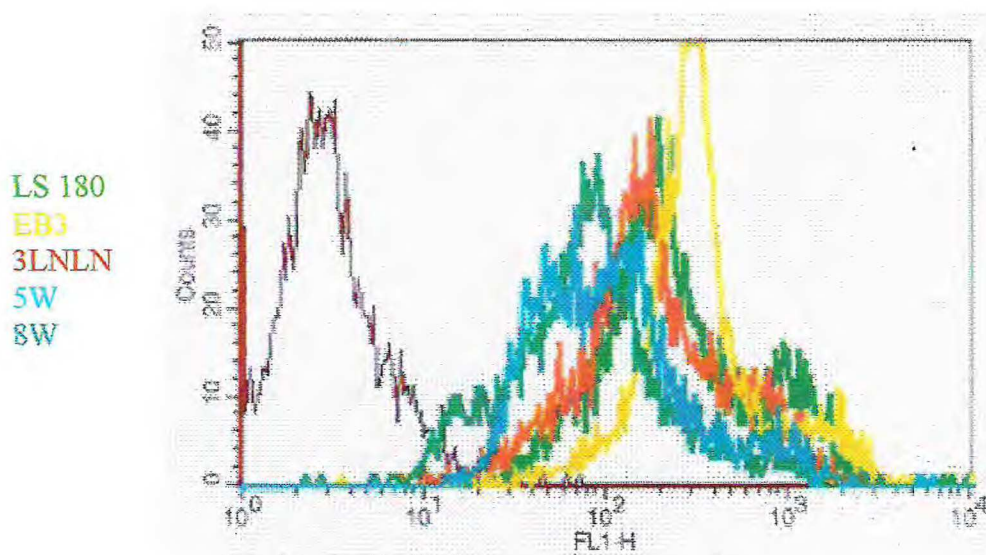


FIGURA 15(a) - Interação da lectina LTA/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo.

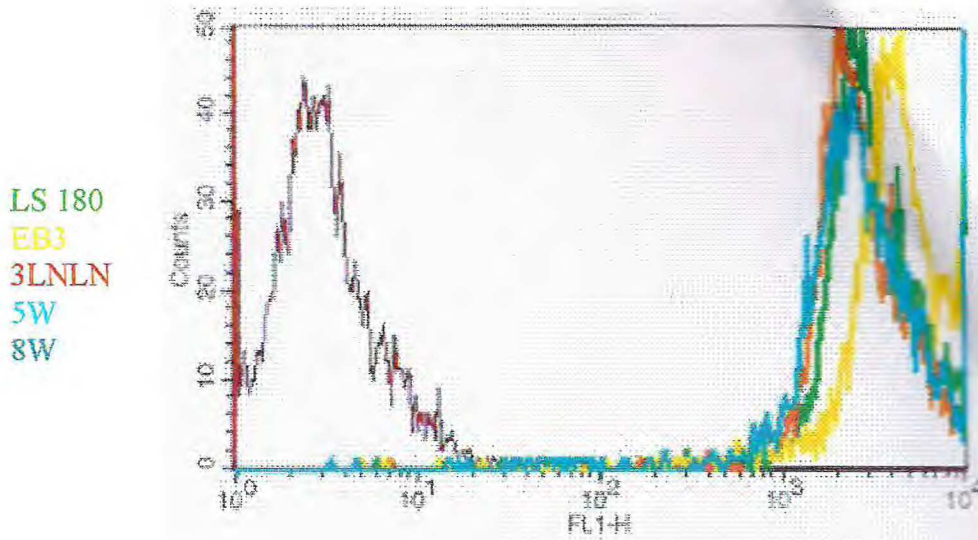


FIGURA 15(b) - Interação da lectina LTA/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença de fucose 0,15M.

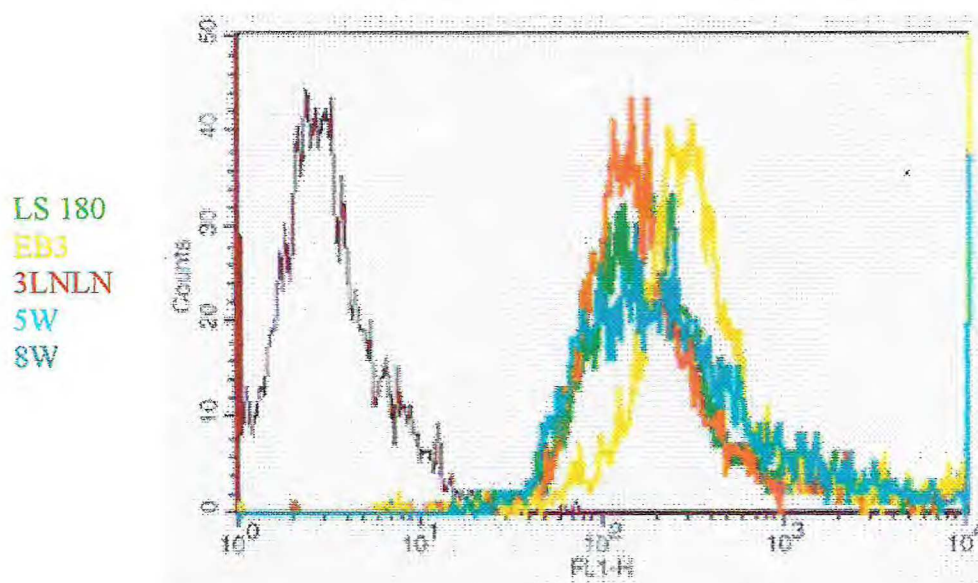


FIGURA 16(a) - Interação da lectina UEA-I/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo.

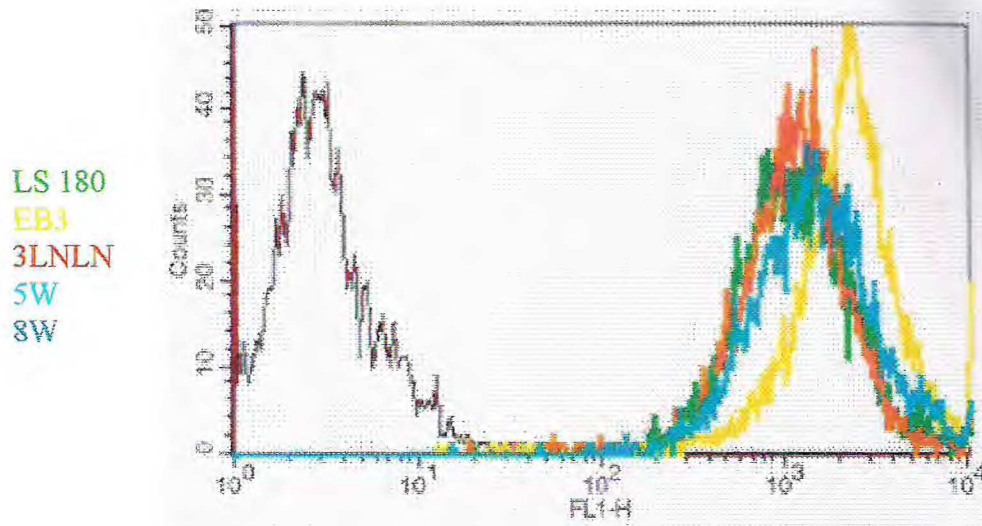


FIGURA 16(b) - Interação da lectina UEA-I/FITC, frente a variantes de células de câncer de cólon humano avaliada por citometria de fluxo na presença de fucose 0,15M

