

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

JULIANA MENDES BRANDÃO

**CRIPTATO DE LANTANÍDEO COMO NOVA Sonda
LUMINESCENTE PARA HISTOQUÍMICA COM LECTINAS EM
TECIDOS MAMÁRIOS HUMANOS TRANSFORMADOS**

**Recife
2012**

JULIANA MENDES BRANDÃO

**CRIPTATO DE LANTANÍDEO COMO NOVA Sonda
LUMINESCENTE PARA HISTOQUÍMICA COM LECTINAS EM
TECIDOS MAMÁRIOS HUMANOS TRANSFORMADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título de
Mestre em Inovação Terapêutica.

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
(DBioq/UFPE)**

Co-orientador: Prof. Dr. Severino Alves Júnior (DQF/UFPE)

**Recife
2012**

Brandão, Juliana Mendes

Criptato de lantanídeo como nova sonda luminescente para histoquímica com lectinas em tecidos mamários humanos transformados / Juliana Mendes Brandão. – Recife: O Autor, 2012.

102 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Coorientador: Severino Alves Júnior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2012.

Inclui bibliografia e apêndices

- 1. Mamas- câncer 2. Histoquímica 3. Lectinas I. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro II. Alves Júnior, Severino III. Título.**

616.99449

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-115

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dra. Ângela Maria Isidro de Farias

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dra. Silvia Regina Arruda de Moraes

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof^a Dra. Suely Lins Galdino

VICE- COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. Cesar Augusto Souza de Andrade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BRANDÃO, Juliana Mendes

Título: Criptato de lantanídeo como nova sonda luminescente para histoquímica com lectinas em tecidos mamários humanos transformados

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 26/01/2012

Banca Examinadora

Membros Titulares

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica

Assinatura: _____

Prof. Dr. Severino Alves Júnior

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Química Fundamental

Assinatura: _____

Profa. Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica

Assinatura: _____

Membros Suplentes

Profa. Dra. Suely Lins Galdino

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Antibióticos

Assinatura: _____

Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Jorge (in memoriam) e Lúcia, à minha irmã Annamélia, ao meu esposo Fred e ao meu filho Caio, que sempre me apoiaram em todos os sentidos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão (UFPE) pela orientação, ensinamentos, atenção, dedicação e compreensão durante todo o curso deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Severino Alves Júnior (UFPE) pela co-orientação, ensinamentos e amizade;

Ao Prof. Dr. Oscar Manoel Loureiro Malta (UFPE) por acreditar no meu empenho em realizar pesquisa científica, além de ensinamentos dados e a amizade brotada;

Ao Prof. Dr. Hermi Felinto de Brito (USP) por ter disponibilizado o Laboratório dos Elementos do Bloco-f para realização dos experimentos, além das acolhidas juntamente com sua esposa Cláudia Felinto;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, por todos os ensinamentos recebidos e amizade que contribuíram para minha formação profissional;

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Paulo Germano Brito, pela maneira atenciosa, ágil e eficiente de atender os alunos.

Aos amigos do curso que contribuíram durante as aulas por meio de discussões sobre temas diversos;

Aos amigos que fazem ou que fizeram parte do Grupo Biomarcadores no Câncer (BmC), pelos momentos de convivência e amizade, em especial a Ana Rosa, Juliana Lúcia e Carmelita, que estiveram diretamente envolvidas no desenvolvimento da minha dissertação;

Aos funcionários do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) pela atenção e amizade;

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Nanotecnologia para Marcadores Integrados (INCT-INAMI) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo e auxílio financeiro para realização deste trabalho;

Ao meu marido pelo companheirismo, paciência, amizade e à minha sogra, Valmira, pelo carinho e apoio;

Ao meu querido e muito amado filho Caio pela compreensão nos momentos de ausência, pelo amor constante e por me fazer dar boas risadas em momentos de distração;

À minha irmã Annamélia pelo seu incentivo, por ser exemplo de mulher guerreira em quem me espelho e por exalar carinho por onde passa;

Ao meu pai Jorge por ter deixado lembranças de incentivo, persistência, confiança e amor;

À minha mãe Lúcia, peça fundamental na minha vida, pelo amor incondicional, dedicação, confiança, incentivo e por todos os ensinamentos recebidos durante o curso da vida.

*“A gente só cria quando aquilo que se
tem não corresponde ao sonho.
Todo ato de criação tem por objetivo
realizar um sonho. E quando o
sonho se realiza, vem a experiência
da alegria.”*

Rubem Alves

RESUMO

BRANDÃO, J. M. Criptato de lantanídeo como nova sonda luminescente para histoquímica com lectina em tecidos mamários humanos transformados. 2012. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Introdução: Estudos histoquímicos têm mostrado que alterações quantitativas e qualitativas são observadas em glicoconjugados da superfície celular durante o processo neoplásico. A histoquímica com lectinas é uma ferramenta que pode auxiliar no diagnóstico do câncer ao analisar o conteúdo sacarídico do tecido envolvido. A dificuldade em encontrar um método preciso para o diagnóstico do câncer de mama tem conduzido pesquisas em busca deste objetivo. Criptatos de európio são complexos com propriedades luminescentes que absorvem radiação ultravioleta e emitem no comprimento de onda na faixa do visível. Biomoléculas conjugadas aos criptatos podem funcionar como sondas luminescentes. **Objetivos:** Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de novos macrociclos de lantanídeos conjugados a lectinas como sondas luminescentes para o diagnóstico e/ou prognóstico de tumores de mama empregando a histoquímica com lectinas. **Metodologia:** As lectinas UEA-I (*Ulex europeus* agglutinin) e Con A (Concanavalina A), ambas a 200 µg/mL e específicas para L-fucose e D-glicose/D-manose, respectivamente, foram conjugadas ao criptato de Eu^{3+} (0,13 e 0,88 mg) por ligação direta utilizando como solvente o tampão fosfato de sódio 10mM pH 7,2, contendo NaCl 150mM (PBS). A caracterização dos conjugados foi realizada por meio da atividade hemaglutinante (AH), dicroísmo circular e ensaios de luminescência. Vinte e quatro biópsias de tecidos mamários (fibroadenoma - FIB, tumor benigno, n=10); carcinoma ductal invasivo (CDI, tumor maligno, n=10) e tecido normal (controle, n=4) foram incubadas por 2 h com os conjugados na histoquímica com lectinas. Lectinas conjugadas com FITC também foram utilizadas. Por fim, os tecidos foram analisados em espectrofluorímetro e a intensidade de emissão usada para comparação entre as amostras. **Resultados:** As análises para caracterizar os conjugados mostraram que o reconhecimento a carboidratos pelas lectinas e as propriedades luminescentes do criptato de Eu^{3+} foram mantidas após a conjugação. Quanto à marcação em tecido, não foi registrada emissão em amostras controles. FIB e CDI exibiram marcação apenas quando marcadas com Con A-cript(Eu^{3+}) (emissão média de 12×10^6 u.a em FIB e $9,5 \times 10^6$ u.a. em CDI). Todos os tecidos foram positivos quando tratados com lectinas conjugadas ao FITC, sendo o tecido normal marcado com maior intensidade pela UEA-I e o CDI, pela lectina Con A. **Conclusão:** A intensidade de luminescência das sondas mostrou padrões diferentes, refletindo a expressão de carboidratos nos tecidos estudados. O conjugado Con A-cript(Eu^{3+}) se destaca como sonda luminescente potencial para a histoquímica com lectinas, uma vez que apresentou marcações equivalentes aquelas resultantes do uso do FITC tornando-se útil como ferramenta auxiliar para o diagnóstico.

Palavras-chave: Criptato de európio (III). Lectina. Câncer de mama.

ABSTRACT

BRANDÃO, J. M. Lanthanide cryptate as a new luminescent probe for lectin histochemistry in transformed human breast tissues. 2012. Dissertation (Master's degree). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Background: Histochemical studies have shown that quantitative and qualitative changes are observed in cell surface glycoconjugates during neoplastic process. Lectin histochemistry is a tool that can assist diagnosis of cancer by analyzing saccharide content of the tissue involved. The difficulty in finding an accurate method for diagnosis of breast cancer has conducted research in pursuit of this goal. Europium cryptates are complexes with luminescent properties that absorb ultraviolet radiation and emit at a wavelength in the visible range. Biomolecules conjugated to cryptates can function as luminescent probes. **Objectives:** This study aimed to evaluate the potential of new lanthanide macrocycles conjugated lectins as luminescent probes for prognosis and/or diagnosis of breast tumours using lectin histochemistry. **Methodology:** UEA-I (*Ulex europeus* agglutinin) and Con A (Concanavalin A), both at 200 mg/mL and specific for L-fucose and D-glucose/D-mannose, respectively, were incubated with Eu^{3+} cryptate (0.13 and 0.88 mg) by direct bond in 10mM phosphate buffer solution, pH 7.2, containing 150mM NaCl (PBS). The characterization of the conjugates was performed via hemagglutinating activity assay (HAA), circular dichroism and luminescence assays. Twenty-four biopsies of breast tissues (fibroadenoma - FIB, benign tumour, n=10), invasive ductal carcinoma (IDC, malignant tumour, n=10) and normal tissue (control, n=4) were incubated for 2h with conjugates using lectin histochemistry protocol. FITC-labeled lectins have also been used. Finally, the tissues were analyzed by spectrofluorometer and the emission intensity was used for comparison between samples. **Results:** The analysis to characterize the conjugates showed that the recognition of carbohydrates by lectins and the luminescent properties of the Eu^{3+} cryptate were maintained after conjugation. Control samples submitted to histochemistry reported no ion emission. FIB and IDC exhibited emission only when labeled with Con A-cryp (Eu^{3+}) (average emission of 12×10^6 a.u. in FIB and 9.5×10^6 a.u. in IDC). All tissues were positive when treated with lectin conjugated to FITC, being normal tissue stained with greater intensity by UEA-I and IDC by Con A lectin. **Conclusion:** The luminescence intensity of the probes showed different patterns, reflecting the expression of carbohydrates in the tissues studied. The conjugate Con A-cryp(Eu^{3+}) stands out as luminescent probe potential for lectin histochemistry, since made equivalent staining to those resulting from the use of FITC, making it useful as an auxiliary tool for the diagnosis.

Keywords: Europium (III) cryptate. Lectin. Breast cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Morfologia da mama normal.	24
Figura 2	– Etapas de formação do câncer em tecido epitelial, partindo de uma célula cancerígena até a invasão.	26
Figura 3	– Estrutura nuclear de células normais e cancerígenas.	27
Figura 4	– Ilustração diferencia tumores benignos de malignos.	30
Figura 5	– Estrutura da lectina UEA-I.	36
Figura 6	– Estrutura da Con A sem ligante.	37
Figura 7	– Mecanismo de Luminescencia	40
Figura 8	– Efeito antena para sensibilização de lantanídeos.	41
Figura 9	– Mecanismo de transferência de energia de um sensibilizador para um centro ativador.	42
Figura 10	– Estrutura do criptato de lantanídeo.	43
Figura 11	– Sequência primária de aminoácidos de um monômero da lectina UEA-I.	45
Figura 12	– Sequência de aminoácidos de um monômero da lectina Con A.	46

Figura 13	–	Teste da atividade hemaglutinante da lectina Con A com eritrócitos de coelho.	50
Figura 14	–	Atividade hemaglutinante da lectina UEA-I com eritrócitos de coelho e eritrócitos humanos.	51
Figura 15	–	Espectro do dicroísmo circular comparando a amostra da lectina UEA-I pura e do conjugado UEA-I-Crip(Eu^{3+}) na concentração de 0,1mg/mL.	52
Figura 16	–	Espectro do dicroísmo circular apresentando a absorção das amostras da lectina Con A e do conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}) na concentração de 0,1mg/mL.	52
Figura 17	–	Espectro de emissão do conjugado UEA-I-Crip(Eu^{3+}) em diferentes proporções.	54
Figura 18	–	Espectros de emissão resolvida no tempo do conjugado UEA-I-Crip(Eu^{3+}) com diferentes atrasos (delays).	55
Figura 19	–	Espectros de emissão resolvida no tempo do conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}) com diferentes atrasos (delays).	56
Figura 20	–	Luminescência do conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}) em tecidos mamários humanos com diagnóstico de fibroadenoma, sem coloração H.E.	58
Figura 21	–	Luminescência do conjugado UEA-I-Crip(Eu^{3+}) em tecidos mamários humanos diagnosticados com fibroadenoma, sem coloração H.E.	58

- Figura 22 – Espectros de luminescência de tecidos mamários humanos normal, com diagnóstico de CDI e FIB, ambos sem corantes ou lectinas. 59
- Figura 23 – Intensidade máxima de luminescência encontrada em amostras dos tecidos analisados marcados pelos conjugados. 60
- Figura 24 – Espectro de emissão da amostra de fibroadenoma marcada com o conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}). 60
- Figura 25 – Comparação entre as diferentes marcações realizadas com o conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}) nos diversos diagnósticos. 61
- Figura 26 – Espectro apresenta ausência de emissão do íon Eu^{3+} em tecidos com diagnóstico de FIB e CDI marcados com UEA-I-Crip(Eu^{3+}). 61
- Figura 27 – Comparação entre diferentes tecidos marcados com os conjugados UEA-I-FITC e Con A-FITC. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Componentes estruturais da mama.	23
Tabela 2	– Número de casos novos estimados para população brasileira em 2012 e 2013 dos tipos de câncer mais incidentes, com exceção de pele não melanoma.	28
Tabela 3	– Especificidade de lectinas na ligação aos carboidratos.	34
Tabela 4	– Quantidade de criptato de Eu^{3+} usada para conjugação com as lectinas UEA-I e Con A nas proporções 1:1 e 1:2.	46
Tabela 5	– Descrição das soluções analisadas nos ensaios de luminescência.	53
Tabela 6	– Resultados das medidas de excitação e emissão das amostras testadas.	54

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AH:	Atividade hemaglutinante
CD:	(<i>Circular Dichroism</i>) dicroísmo circular
CDI:	Carcinoma ductal invasivo
Con A:	Lectina concanavalina A
CRD:	Domínio de reconhecimento a carboidrato
Crip(Eu ³⁺):	criptato de európio(III)
DAB:	Diaminobenzidina
DBA:	Lectina <i>Dolichos biflorus</i>
Eu ³⁺ :	íon európio trivalente
FIB:	Fibroadenoma
FITC :	Isotiocianato de fluoresceína
GalNAc:	<i>N</i> -acetil-galactosamina
GlcNAc:	<i>N</i> -acetil-glicosamina
H.E.:	hematoxilina e eosina
HqL:	Histoquímica com lectinas
La:	Lantânio
Ln (III):	íon lantanídeo trivalente
Lu:	Lutécio
MEC:	Matrix extracelular
msec:	milissegundo
NaCl:	Cloreto de sódio
PBS:	(<i>Phosphate Buffered Saline</i>) Tampão fosfato salino
PDB:	(<i>Protein Data Bank</i>) Banco de dados de proteínas
PNA :	(<i>Peanut Agglutinin</i>) lectina de amendoim
Sc:	Escândio
Tb ³⁺ :	íon térbio trivalente
UEA-I :	Lectina <i>Ulex europaeus</i> I
UV:	Ultravioleta
WGA :	(<i>Wheat Germ Agglutinin</i>) lectina de gérmen de trigo
Y:	Ítrio
λ_{em} :	Comprimento de onda de emissão

λ_{exc} :

Comprimento de onda de excitação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 JUSTIFICATIVA	21
3 OBJETIVOS	22
3.1 Geral	22
3.2 Específicos	22
4 REVISÃO DE LITERATURA	23
4.1 Considerações sobre a estrutura do tecido mamário	23
4.2 O câncer e o câncer de mama	25
4.2.1 O Câncer	25
4.2.2 Tumores mamários: lesões benignas e o câncer de mama	27
4.2.3 Diagnóstico de tumores mamários	30
4.3 Biomarcadores	31
4.3.1 Carboidratos	32
4.3.2 Lectinas	32
4.3.2.1 <i>Ulex europaeus</i> I (UEA I)	35
4.3.2.2 Concanavalina A (Con A)	36
4.3.3 Histoquímica com lectinas	37
4.4 Marcadores Luminescentes	39
4.4.1 Criptatos de Lantanídeos	41
5 MATERIAIS E MÉTODOS	44
5.1 Seleção de Casos	44
5.2 Conjugação das Lectinas aos Criptatos de Eu^{3+}	44
5.3 Caracterização dos conjugados lectinas-criptato de Eu^{3+}	47

5.3.1 Atividade Hemaglutinante	47
5.3.2 Dicroísmo Circular (CD)	47
5.3.3 Ensaio de Luminescência	48
5.4 Histoquímica em tecidos mamários humanos usando os conjugados lectinas-criptato de Eu^{3+}	49
5.4.1 Análise Espectroscópica	49
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
6.1 Caracterização dos Conjugados Lectinas-Crip Eu^{3+}	50
6.1.1 Atividade Hemaglutinante (A.H.)	50
6.1.2 Dicroísmo circular (CD)	51
6.1.3 Ensaio de Luminescência	53
6.2 Histoquímica com Lectinas-Crip(Eu^{3+})	56
6.2.1 Análise Espectroscópica de Tecidos Mamários Humanos Submetidos a Histoquímica com Lectinas Conjugadas ao Criptato de Eu^{3+}	57
7 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
APÊNDICES	73
APÊNDICE A. Espectro de excitação da lectina UEA-I, em solução, monitorada em 490 nm.	73
APÊNDICE B. Espectros de emissão da lectina UEA-I, em solução, com excitação em 293,8 nm e 379,2 nm.	74
APÊNDICE C. Espectros de excitação e emissão da lectina Con A em solução.	75
APÊNDICE D. Espectros de excitação e emissão do conjugado UEA-I-crip(Eu^{3+}) em solução.	76
APÊNDICE E. Espectros de excitação e emissão do conjugado	77

Con A-crip(Eu^{3+}) em solução.

APÊNDICE F. Artigos resultantes deste trabalho.

78

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um grupo de doenças que surge a partir de células anormais com potencial replicativo ilimitado. Na mama, esta neoplasia é a segunda mais freqüente no mundo e a mais comum entre as mulheres (INCA, 2011; WHO, 2008). Embora o câncer de mama seja considerado um câncer com prognóstico relativamente bom, quando diagnosticado precocemente, continua levando a óbito um número elevado de mulheres no Brasil devido ao diagnóstico em estágios avançados (INCA, 2011).

Para superar essa dificuldade e acompanhar a evolução da doença, estudos de biomarcadores no câncer vêm sendo desenvolvidos (LEVENSON, 2007; MISEK; KIM, 2011). Macromoléculas como os carboidratos são inseridos nessa categoria por se entender seu importante papel na codificação de informações biológicas, seja em processos fisiológicos ou patológicos. Variações no tipo ou no número de açúcares em glicoconjugados das membranas celulares são importantes para compreensão do desenvolvimento de várias doenças, inclusive o câncer (GUIMARÃES *et al.*, 2008; MISLOVICOVÁ, *et al.*, 2009). Estudos em diversos tipos de câncer já demonstraram o envolvimento estreito entre a glicosilação alterada e o processo carcinogênico (LIMA *et al.*, 2010; MELO-JÚNIOR *et al.*, 2006; RÊGO, 2009; SOBRAL *et al.*, 2010).

Uma técnica usada para avaliar esse nível de alteração é a histoquímica com lectinas. Essas últimas são (glico) proteínas com capacidade de reconhecer especificamente carboidratos e oligossacarídeos, livres ou em glicoconjugados (IRKRATSCH *et al.*, 2009; SOBRAL *et al.*, 2010). Com esse método observa-se o padrão de glicosilação de glicoconjugados em diferentes estágios fisiológicos e patológicos (LEATHEN; ATKINS, 1983; RÊGO, 2009). Para que a lectina seja visualizada no local de marcação no tecido, elas são conjugadas a moléculas com propriedades enzimáticas, fluorescentes ou quimioluminescentes, como por exemplo, peroxidase, isotiocianato de fluoresceína (FITC), éster de acridina, entre outros (CAMPOS *et al.*, 2006; LIMA, *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010).

Complexos com íons lantanídeos são excelentes dispositivos para aplicação em bioensaios devido às propriedades fotofísicas (MARTINS *et al.*, 2010; SOTOMAYOR *et al.*, 2008). Entre estes destaca-se o criptato de európio (III), supramolécula com propriedades luminescentes, que apresenta alta estabilidade

cinética e fotoquímica. O mesmo absorve radiação ultravioleta e emite na região do visível (VILA NOVA, 2003). Portanto, diante dessas vantagens, o criptato de Eu (III) vem sendo testado, pelo nosso grupo, como marcador luminescente em histoquímica com lectinas.

Este trabalho propôs uma investigação em tecidos tumorais mamários benignos e malignos utilizando histoquímica com lectinas conjugadas a criptatos de lantanídeos a fim de caracterizar tecidos mamários humanos e assim disponibilizar uma ferramenta auxiliar que possa contribuir para o diagnóstico destas patologias.

Neste trabalho serão abordados tópicos sobre o câncer de mama assim como biomarcadores utilizados para o auxílio do seu diagnóstico, sendo destacado o uso de marcadores luminescentes como dispositivos que indicam a detecção da marcação. A divisão dos tópicos encontra-se disposta como relacionada abaixo:

- Estrutura do tecido mamário: É apresentada a histologia e morfologia do tecido mamário humano, chamando atenção para as propriedades da células-tronco mamárias.
- O câncer e o câncer de mama: Nesta seção é abordada a diferença entre os tumores mamários, benignos e malignos, assim como os principais métodos de diagnóstico dos tumores da mama.
- Biomarcadores: São inseridos nesta categoria os carboidratos, bem como as sondas utilizadas para identificá-los, ou seja, as lectinas e suas aplicações através de histoquímica com lectinas.
- Marcadores Luminescentes: Neste tópico encontram-se informações sobre as propriedades, características e aplicações dos criptatos de lantanídeos.

2 JUSTIFICATIVA

Doenças da mama agrupam um número considerável de modificações celulares do tecido mamário humano feminino com uma incidência elevada nesta população. Muitas destas patologias são consideradas benignas, não acarretando grandes mudanças no comportamento social das mulheres ou mesmo limitações para as mesmas. No entanto, estudar biomarcadores específicos para alterações benignas da mama é de grande relevância uma vez que esta ferramenta pode fornecer informações biológicas importantes na diferenciação entre estas patologias e outras malignas. Assim a aplicação de lectinas conjugadas aos criptatos de lantanídeos permitirá a investigação de carboidratos como biomarcadores por meio de métodos histoquímicos auxiliando na caracterização e diferenciação de tecidos mamários humanos (normais e transformados) e contribuindo clínico-patologicamente com o prognóstico e/ou diagnóstico destas patologias.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o potencial de novos macrociclos de lantanídeos conjugados as lectinas como sondas luminescentes para o diagnóstico e/ou prognóstico de tumores de mama empregando Histoquímica com Lectinas.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Conjugar o criptato de Eu^{3+} às lectinas comerciais (UEA-I e Con A);
- ✓ Caracterizar o conjugado lectina-criptato de Eu^{3+} utilizando análise de luminescência, atividade hemaglutinante e dicroísmo circular;
- ✓ Avaliar o glicocódigo de gliconjugados da superfície celular de tecidos mamários humanos (Normal - controle, Fibroadenoma - FIB e Carcinoma Ductal Invasivo - CDI) empregando histoquímica com lectinas conjugadas ao criptato de Eu^{3+} ;
- ✓ Comparar o perfil sacarídico dos tecidos sob estudo através do uso dos conjugados lectinas-Crip(Eu^{3+}) e lectinas-FITC.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Estrutura do tecido mamário

As glândulas mamárias, que tem como principal função a secreção o leite, estão situadas na parede anterior do tórax e são compostas por várias estruturas conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 – Componentes estruturais da mama.

Ácino	Menor parte da glândula e responsável pela produção do leite durante a lactação.
Lóbulo mamário	Conjunto de ácinos.
Lobo mamário	Conjunto de lóbulos mamários que se liga ao mamilo através de um ducto
Ductos mamários	Conduzem a secreção (leite) até o mamilo.
Tecido glandular	Conjunto de lóbulos e ductos.
Mamilo	Protuberância elástica onde desembocam os ductos mamários.
Aréola	Estrutura central da mama onde se projeta o mamilo.
Tecido adiposo	Todo o restante da mama é preenchido por tecido adiposo.

Fonte: SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ, 2011.

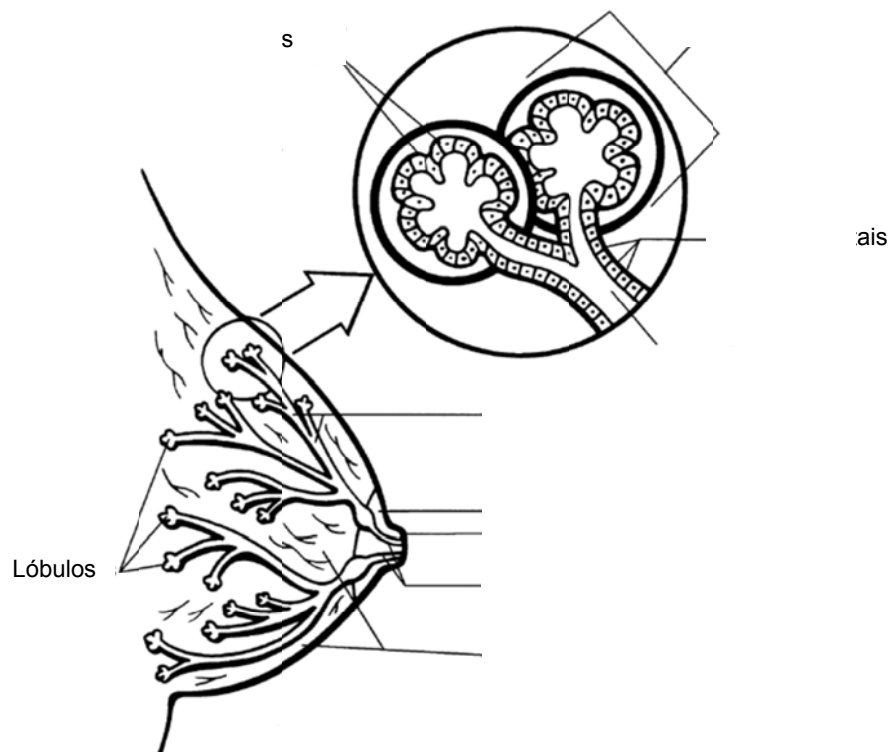
O tecido mamário é uma estrutura complexa que apresenta heterogeneidade celular, controlada pela ação hormonal e por vários fatores locais (COURTILLOT *et al.*, 2005).

A glândula mamária é um órgão único que sofre remodelação extensa e diferenciação, mesmo em adultos. Alterações hormonais em cada ciclo menstrual induzem ondas de proliferação no epitélio mamário, enquanto que a gravidez leva a ramificação distal externa e alveologênese (formação de novos alvéolos) (POLYAK, 2007).

A glândula normal compreende um sistema de ramificação ductal-lobular revestida por uma camada interna de células epiteliais luminiais e uma camada externa de células mioepiteliais separada do estroma intersticial pela membrana basal intacta (TOILLON *et al.*, 2007).

O tecido glandular da mama é do tipo túbulo-alveolar, constituído por 12-20 lobos, formados por lóbulos e estes por ácinos. Cada lobo é drenado por um canal excretor próprio, o canal lactífero. O tecido de suporte da mama inclui tecido adiposo e tecido conectivo fibroso que dão a mama sua forma e tamanho, revestindo a glândula completamente (AMERICAN CANCER SOCIETY (b), 2011; BERNARDES, 2011). A figura 1 ilustra a estrutura de uma mama normal.

Figura 1 – Morfologia da mama normal.



Fonte: AMERICAN CANCER SOCIETY (a), 2011.

Uma classe de células que pode estar envolvida com o desenvolvimento do câncer de mama são as células-tronco epiteliais mamárias. As células-tronco são definidas como células com capacidade de dar origem a vários tipos de células diferenciadas e de auto-renovação, características estas semelhantes às encontradas nas células malignas (POLYAK, 2007). Já foi demonstrado que células com propriedades semelhantes às células-tronco são necessárias para o desenvolvimento da glândula mamária normal, sugerindo que essas dão origem as células epiteliais luminiais e mioepiteliais (POLYAK, 2007).

4.2 O câncer e o câncer de mama

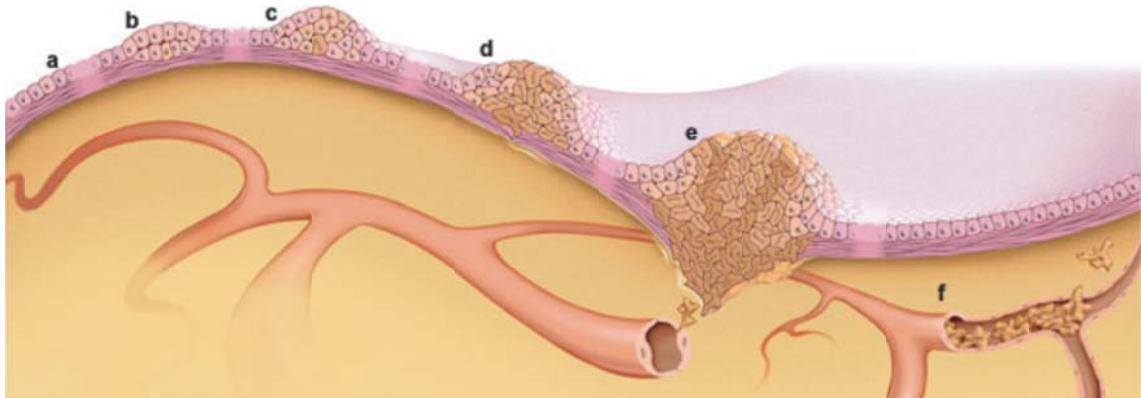
4.2.1 O câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, invadindo tecidos e órgãos (INCA, 2011). Modificações que levam ao câncer incluem alterações genéticas, em que há mudança na sequência de DNA. Outra forma de alterar o programa das células é através de modificações epigenéticas que envolvem alteração no padrão de expressão gênica mediada por modificações no DNA e/ou histonas, sem haver alteração direta da sequência de nucleotídeo dos genes (MARTINKOVA *et al.*, 2009). Essas duas formas de alteração estão presentes em cânceres humanos e induzem mudanças na expressão de genes que serão herdados pelas gerações subsequentes (WHO, 2008).

As células normais completam o ciclo celular seguindo uma sequência ordenada de fases que as permitem replicar sem dar origem a células anormais. No ciclo celular existem pontos de controle nos quais são verificados a qualidade do DNA replicado, anormalidades na divisão dos cromossomos, entre outras atividades. Caso seja percebida anormalidade, a divisão celular para, permitindo o reparo adequado do material danificado (WARD, 2002). Nas células cancerígenas o DNA danificado não é reparado desencadeando uma série de erros (AMERICAN CANCER SOCIETY (a), 2011).

Como consequência, surgem os tumores que são tecidos complexos formados por tipos celulares variados que interagem de maneira heterogênea uns com os outros. Para entender a biologia do câncer algumas características e habilidades permitem as células cancerígenas sobreviver, proliferar e disseminar. Essas propriedades, chamadas de *hallmarks* do câncer incluem sinalização proliferativa sustentada, inabilidade em responder aos supressores de crescimento, potencial replicativo ilimitado, indução da angiogênese, resistência a morte celular (apoptose) e invasão e metástase. Recentemente, inflamação e fuga da destruição imunológica foram propostas como marcos adicionais envolvidos na patogênese de alguns e, talvez, de todos os cânceres (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 2 – Etapas de formação do câncer em tecido epitelial, partindo de uma célula cancerígena até a invasão.



(a) Células normais; (b) aumento do número de células (hiperplasia); (c) surgimento de célula transformada; (d) células transformadas reproduzem-se de maneira desordenada e invadem tecidos adjacentes; (e) células cancerígenas invadem a corrente sanguínea; (f) na corrente sanguínea podem atingir outros órgãos (metástase).

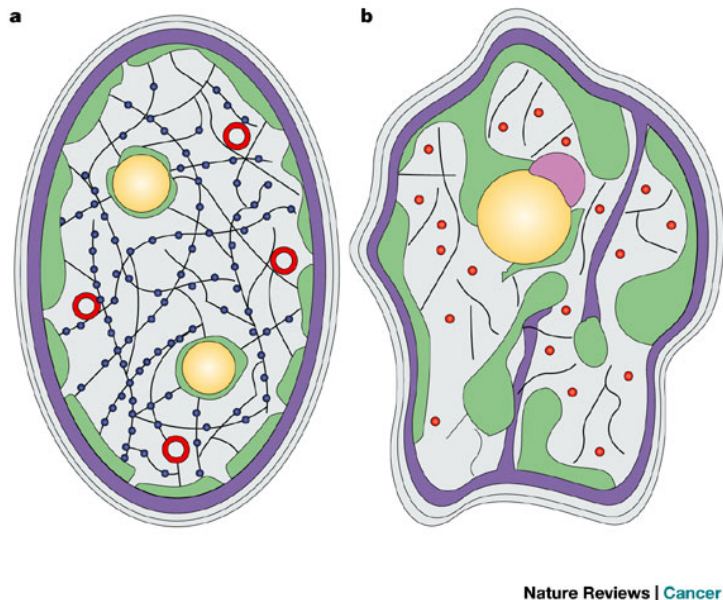
Fonte: WHO-IARC, 2008.

A figura 2 ilustra o processo de progressão tumoral a partir de uma célula cancerígena até a invasão. As células tumorais podem entrar na corrente sanguínea de forma direta, atravessando os vasos sanguíneos, ou indiretamente, atravessando vaso linfático e desembocando na corrente sanguínea (ALBERTS *et al.*, 2002).

Durante a transformação maligna as células passam por várias mudanças conforme já citado acima. Algumas das alterações observadas nessas células são o tamanho e o formato dos núcleos das células que se tornam irregular, podendo ocorrer até a falta das proteínas da matriz nuclear (figura 3). No núcleo de células normais é possível observar a lâmina nuclear (púrpura). Esta lâmina se conecta ao envelope nuclear bimembranar pela face citoplasmática. A lâmina se liga a cromatina na sua face interna e, na maioria dos tipos celulares, a lâmina associada ao domínio da cromatina corresponde a heterocromatina (verde). A superfície dos nucléolos também é local de formação de heterocromatina (amarelo). A matriz nuclear, composta por proteínas da matriz nuclear (NMP), representadas por círculos azuis, forma o esqueleto nuclear não-cromatina que participa da organização espacial da cromatina e outras moléculas. Além disso, o núcleo da maioria das células normais tem forma regular e elipsoide. Já no núcleo de células tumorais são observados formato irregular e dobramentos, provocando agregados de heterocromatina. Os nucléolos podem ser aumentados e as NMP's específicas podem estar ausentes. Embora todos esses eventos possam ocorrer, nem todas as mudanças são observadas simultaneamente nos núcleos das células cancerígenas,

bem como diferentes anormalidades se relacionam a tipos diferentes de câncer (ZINK, FISCHER AND NICKERSON, 2004).

Figura 3 – Estrutura nuclear de células normais e cancerígenas.



(a) núcleo de célula normal; (b) núcleo de célula tumoral.

Fonte: ZINK, FISCHER AND NICKERSON, 2004

4.2.2 Tumores mamários: lesões benignas e o câncer de mama

Doenças na mama são comuns em mulheres, tendo destaque os tumores que são classificados em benignos e malignos de acordo com o potencial de invasividade e de desenvolver metástase. Tumores benignos crescem como massas expansivas coesas que permanecem localizadas no local de origem e não têm capacidade de infiltração, invasão ou de metástase para locais distantes como os tumores malignos (MEISNER *et al.*, 2008).

Os fibroadenomas, inseridos nessa categoria, são considerados um grupo de lóbulos hiperplásicos da mama de desenvolvimento anormal (WAKEEL; UMPLEBY, 2003) ou como o resultado de processos hiperplásicos do tecido conectivo das unidades lobulares (GALLEGOS *et al.*, 2010). Representam uma lesão freqüente da mama (GURAY; SAHIN, 2006), uma vez que 80% dos tumores mamários detectados em exames clínicos evidenciam essa alteração (NAZARO; REGO; OLIVEIRA, 2007). Ela ocorre em cerca de 25% das mulheres de forma assintomática

e a faixa etária de maior incidência é de 15 a 35 anos de idade (GURAY; SAHIN, 2006).

O fibroadenoma parece surgir no estroma intralobular especializado sendo constituído por tecido fibroso e glandular. Cresce como um nódulo esférico e móvel com tamanhos variando de 1 cm até formas gigantes de 10-15 cm. O padrão histológico é um estroma fibroblástico, celular e delicado, parecido com o estroma intralobular (COTRAN *et al.*, 1996).

O câncer em contrapartida é um tumor maligno que pode atingir qualquer parte do corpo, tendo como principal característica sua rápida capacidade de criar células anormais as quais crescem além de seus limites e podem invadir partes adjacentes e espalhar por outros órgãos (MEISNER *et al.*, 2008).

O câncer tornou-se, nas últimas décadas, um evidente problema de saúde pública internacional afetando países de todos os níveis econômicos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem a expectativa de 27 milhões de casos incidentes de câncer para o ano de 2030. No Brasil, as estimativas para 2012 e 2013 apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de neoplasias. Dentre estes, o câncer de mama, que já é o segundo tipo mais freqüente no mundo, é o mais comum entre as mulheres (WHO, 2008; INCA, 2011). A cada ano, 23% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama, chegando a quase 53 mil em 2012 e 2013 (ver tabela 2).

Tabela 2. Número de casos novos estimados para população brasileira em 2012 e 2013 dos tipos de câncer mais incidentes, com exceção de pele não melanoma.

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%		Homens	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

Fonte: INCA, 2011

No Nordeste, esta neoplasia é responsável por 8.970 casos novos de cânceres em mulheres, sendo considerada a principal causa de morte entre as mulheres com câncer. Dentre os estados do Nordeste destaca-se Pernambuco, o estado com maior incidência (2.190 casos novos) (INCA, 2011).

Existem vários tipos de fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama. Alguns desses não podem ser alterados como idade ou raça; outros, são relacionados à escolha pessoal como a prática de fumar, beber ou hábitos alimentares. O risco também é aumentado para pessoas que tem história pessoal ou familiar de câncer e mutações nos genes de susceptibilidade ao câncer de mama, BRCA1 e BRCA2, embora essas mutações sejam responsáveis somente por 5-10% de todos os cânceres de mama. Alguns fatores podem influenciar mais que outros e o risco de cada pessoa pode ser alterado ao longo do tempo, de acordo com a idade e o estilo de vida. (AMERICAN CANCER SOCIETY (a), 2011).

O desenvolvimento do câncer de mama envolve estágios patológicos iniciando com hiperplasia epitelial atípica, progredindo para carcinomas *in situ*, seguindo para carcinomas invasivos e, culminando em doença metastática. O carcinoma ductal invasivo (CDI) é o tipo mais comum de câncer mamário, responsável por 70 – 85% de todos os cânceres de mama (CHEN *et al.*, 2011). Neste as células mioepiteliais e a membrana basal estão ausentes e as células tumorais estão dispersas no estroma (TOILLON *et al.*, 2007).

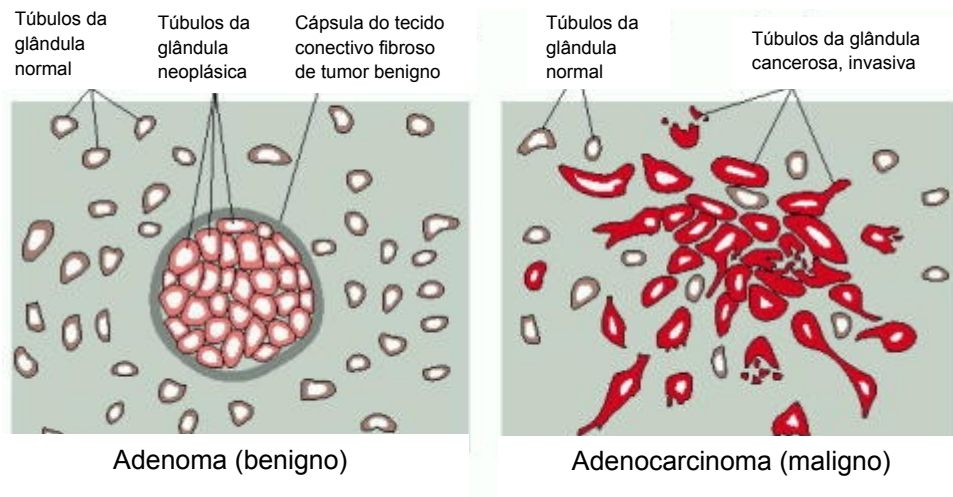
O CDI consiste em células de revestimento ductal malignas dispostas em cordões, ninhos celulares sólidos, túbulos, glândulas, massas anastomosantes e uma mistura destas características. Nestas lesões fica evidente a invasão do estroma de tecido conjuntivo pelas células malignas (COTRAN *et al.*, 1996).

Tumores benignos apresentam aspectos distintos dos tumores malignos (cânceres, propriamente ditos). A figura 4 ilustra a diferença entre um tumor glandular benigno (um adenoma) e um tumor glandular maligno (um adenocarcinoma). É possível perceber que as células tumorais benignas são circundadas pela membrana basal, diferentemente das células cancerígenas que são distribuídas sem delimitação.

O estudo de tumores benignos como o fibroadenoma tem sido retomado após a publicação do trabalho de Dupont e colaboradores (1994) ao demonstrarem um aumento no risco relativo de 3,1 para o desenvolvimento do câncer de mama onde havia previamente um fibroadenoma com alterações intralesionais. Em 2009, Hodges e colaboradores ao procurarem por evidências sobre a transformação de fibroadenomas da mama em tumores filóides malignos encontraram que, em ambos os casos, ocorre uma perda alélica nos genes D22S264 e TP53, sugerindo que

esses genes supressores tumorais possam ter papel importante na progressão do fibroadenoma até o tumor filóide.

Figura 4 – Ilustração diferencia tumores benignos de malignos.



À esquerda, tumor benigno (adenoma); à direita, tumor maligno (adenocarcinoma).
Fonte: ALBERTS *et al.*, 2002

4.2.3 Diagnóstico de tumores mamários

Para avaliar lesões da mama é realizado o teste triplo, que inclui citologia aspirativa por agulhamento fino, a biópsia de fragmento (core biopsy) e técnicas de radio e imagem como ultrassonografia e mamografia. O primeiro teste é muito útil para orientar o médico quanto à decisão a ser tomada com relação aos procedimentos seguintes. Entretanto, o diagnóstico muitas vezes não dimensiona a proporção real do problema, pelo fato do patologista apenas coletar amostras circundantes da área lesionada (RAO *et al.*, 2010). Por este motivo, a biópsia de excisão é essencial para afastar a possibilidade de malignidade a ser tratada com intervenção cirúrgica (KUMAR, 2010).

O ultrassom é utilizado para diagnosticar fibroadenomas e adequações no equipamento possibilitam a visualização de várias alterações morfológicas, desde hiperplasia ductal atípica até um carcinoma em um fibroadenoma. No entanto, esta última alteração não é fácil de ser detectada uma vez que sinais característicos não podem ser evidenciados até que ocorra a violação na falsa cápsula (RAO *et al.*, 2010).

Outro método diagnóstico para essas neoplasias é a mamografia que apresenta sensibilidade entre 85-95%. Entretanto, devido à especificidade dessa técnica ser pequena, procedimentos diagnósticos adicionais geralmente são necessários (CALADO, ABREU E LIMA, 2004).

4.3 Biomarcadores

Em 2001, o termo biomarcadores foi definido pelo grupo de trabalho do Instituto Nacional de Saúde como “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador do processo biológico normal, patogênico ou resposta biológica a uma intervenção terapêutica” (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2001 *apud* ASADULLAH; KRAMER, 2011).

Em outras palavras, são moléculas quantificáveis, incluindo DNA, RNA, proteínas e metabólitos, que são encontrados em fluidos corporais ou tecidos, em níveis anormais que sinalize uma condição patológica como o câncer (WHO, 2008). Uma molécula secretada por uma neoplasia ou uma resposta específica do corpo diante da presença do câncer, são exemplos de biomarcadores (WHO, 2008).

Existem várias categorias de biomarcadores, dando destaque aqueles que indicam o estado e a severidade da doença e, aqueles de estratificação que auxiliam na seleção de pacientes com maior possibilidade de se beneficiar do tratamento (ASADULLAH; KRAMER, 2011).

Os biomarcadores já são bem estabelecidos em oncologia, e é provável que mudem a situação clínica dramaticamente nos próximos anos (ASADULLAH; KRAMER, 2011). Mudanças na expressão de genes e de proteínas ou modificação destes podem ser usados para detectar cânceres, determinar prognóstico e monitorar o progresso da doença e resposta terapêutica (WHO, 2008).

No câncer, biomarcadores são responsáveis por inferir características do tumor que o distingue do tecido normal correspondente, podendo definir riscos e estágios do desenvolvimento tumoral além de estratificar pacientes para o melhor tratamento assim como ajudar na vigilância da recorrência da doença (LEVENSON, 2007).

4.3.1 Carboidratos

Os primeiros indícios da presença de açúcar na superfície das células e a visão destes açúcares como potenciais marcadores foram observados por Watkin e Morgan (1952 *apud* SHARON; LIS, 2004).

Glicanos são conjuntos covalentes de açúcares (oligossacarídeos e polissacarídeos) que existem nas formas livre ou em complexos covalentes com proteínas ou lipídios, formando os glicoconjugados (FUSTER; ESKO, 2005).

A superfície das células é composta por muitas porções de carboidratos, principalmente oligossacarídeos associados a lipídios e proteínas de membrana ou peptidoglicanos. Esse ambiente extracelular é conhecido como matrix extracelular (MEC) ou glicocálix (MAURYA *et al.*, 2010). Essa localização permite o desempenho de funções como sinalização, adesão e reconhecimento, atuando em reações imunológicas, e funcionando como receptores e transdutores em processos regulatórios como crescimento celular e apoptose (FUSTER; ESKO, 2005; GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011; MAURYA *et al.*, 2010).

Pelo fato de carboidratos possuírem a habilidade de codificar informações biológicas, esse potencial os tornam moléculas de reconhecimento em diversos processos fisiológicos e patológicos. Alterações no número e/ou tipos e/ou local de açúcares em glicoconjugados das membranas celulares são cruciais no desenvolvimento e evolução de várias doenças, incluindo o diabetes, imunodeficiência, neurodegeneração, doenças hereditárias e câncer (GUIMARÃES *et al.*, 2008; MISLOVICOVÁ *et al.*, 2009). Vários glicanos já foram identificados como mediadores-chaves de eventos fisiopatológicos durante as diferentes etapas da progressão tumoral (FUSTER; ESKO, 2005; POTAPENKO *et al.*, 2010).

4.3.2 Lectinas

O primeiro relato sobre lectinas ocorreu em 1888 quando Peter Hermann Stillmark publicou sua tese de doutorado a respeito da toxicidade de extratos de *Ricinus communis* (mamona). Ele observou que extrato de sementes da mamona era capaz de aglutinar eritrócitos, devido à presença de uma proteína, a *ricina* (MORENO, 2008). Pouco tempo depois, Hellin demonstrou a presença de outra hemaglutinina em extratos de *Abrus precatorius* (Jequiriti), a qual foi chamada de

abrina (SHARON; LIS, 2004). Entretanto, estudos sobre estas proteínas só começaram a ganhar mais espaço anos mais tarde, abrindo uma vasta área de aplicação para as lectinas.

Por definição, lectina é o nome dado a todas as proteínas, de origem não imunológica, que possuem a capacidade de aglutinar células e reconhecer especificamente carboidratos em oligossacarídeos e glicoconjugados (ISKRATSCH *et al.*, 2009; SOBRAL *et al.*, 2010). Essas macromoléculas têm percorrido um longo caminho desde sua primeira detecção em plantas, como hemaglutininas, até seu status atual, como molécula de reconhecimento ubíqua com uma diversidade de funções e aplicações (GEMEINER *et al.*, 2009).

Em 1936, Sumner e Howell revelaram que a lectina Concanavalina A (Con A), presente em extratos de sementes de *Canavalia ensiformis*, era capaz de aglutinar moléculas de glicogênio e, que na presença de sacarose a aglutinação era inibida. A partir desses fatos foi possível compreender como ocorria a interação entre lectinas e carboidratos.

A maioria das lectinas é multimérica, consistindo em subunidades associadas de forma não covalente, com subunidades homólogas, idênticas, ou heterólogas, diferentes. É essa estrutura que possibilita às lectinas a aglutinação de células ou formação de agregados com glicoconjugados de maneira tão similar quanto ao complexo antígeno-anticorpo (LEI; CHANG, 2009).

As lectinas se ligam aos carboidratos através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas altamente específicas e reversíveis (WU *et al.*, 2009). Estudos estruturais realizados em lectinas de animais sugeriram que a atividade de ligação a carboidratos da maioria das lectinas foi gerada por resíduos de aminoácidos designados como “domínio de reconhecimento a carboidrato” (CRD). O CRD reconhece o terminal não reduzido de resíduos de carboidratos em glicoproteínas e glicolipídios da membrana celular (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Alguns resíduos de aminoácidos presentes no sítio de ligação ao carboidrato são altamente conservados e responsáveis por fornecer a base para a interação lectinas-carboidratos. Já a especificidade da ligação ocorre como consequência da variabilidade de aminoácidos nas outras regiões do sítio de ligação ao carboidrato (AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005).

A princípio acreditava-se que lectinas eram somente provenientes de plantas, mas ao longo dos estudos descobriu-se que estão presentes também em animais e microrganismos desempenhando funções cruciais. Nos diferentes organismos, as lectinas podem cumprir várias funções, como por exemplo, em microrganismos, vírus, bactérias e parasitas, essas proteínas tem papel na infecção. Foi demonstrado em 1950 que a hemaglutinina do vírus influenza é responsável pela aderência do vírus às células hospedeiras como um pré-requisito para a infecção (SHARON; LIS, 2004). Já nas plantas, atuam na defesa e em simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. Nos animais, as lectinas têm papel na imunidade inata, atuam na regulação do ciclo celular, na modulação das interações célula-célula e célula-substrato, etc (SHARON; LIS, 2004).

Devido ao fato das ligações lectina-carboidrato serem específicas, as lectinas tem sido usadas para compreensão de vários processos biológicos (WU *et al.*, 2009). Controle da migração de linfócitos para órgãos linfóides específicos ou para locais de inflamação, controle da biossíntese de glicoproteínas e de seu trajeto no interior das células, participação da sinalização celular e coordenação de interações celulares do sistema imune, são exemplos de alguns eventos biológicos com o envolvimento de lectinas (SHARON, 2008).

Por serem moléculas versáteis, as lectinas têm sido utilizadas para: a) identificação e separação de células; b) detecção, isolamento e estudos estruturais de glicoproteínas; c) sondas histoquímicas e citoquímicas; d) mapeamento de vias neuronais; e) estimulação mitogênica de linfócitos, dentre outras (SHARON; LIS, 2004).

Tabela 3 – Especificidade de lectinas na ligação aos carboidratos.

Lectina	Abreviação	Resíduo de Açúcar Específico
<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin	DBA	α -D-N- acetil-galactosamina
Peanut agglutinin	PNA	D-Galactose ($\beta 1 \rightarrow 3$)-D-N-acetil-galactosamina
<i>Canavalia ensiformis</i> agglutinin	Con A	α -D-manose > α -D-glicose
Wheat germ agglutinin	WGA	(D-N-acetil-glicosamina) _n > Ácido neuramínico
<i>Ulex europaeus</i> agglutinin I	UEA-I	α -L-fucose

Fonte: AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005; DOMENEGHINI *et al.*, 2005.

Alguns exemplos de lectinas são apresentados da tabela 3. Dentre as lectinas citadas, destacam-se a concanavalina A, que possui estrutura e propriedades bem conhecidas, e a *Ulex europaeus* I, que reconhece L-fucose, o único carboidrato que possui L-configuração no homem.

O interesse pelas lectinas é crescente e chama a atenção pelo fato de serem consideradas ferramentas vantajosas para histo- e citoquímica, sendo aplicadas na análise das alterações de glicoconjugados de superfície celular durante processos fisiológicos e patológicos, desde a diferenciação celular ao câncer (BLOMME, *et al.*, 2009; GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011; SHARON; LIS, 2004).

4.3.2.1 *Ulex europaeus* I (UEA-I)

A UEA-I é uma metaloglicoproteína hemodimérica, tendo cada subunidade aproximadamente 27 KDa (AUDETTE; VANDONSELAAR; DELBAERE, 2000).

A primeira lectina de *Ulex europaeus*, identificada como carqueja, ficou conhecida por aglutinar eritrócitos tipo O. Essas células (eritrócitos tipo O), desprovidas de atividade A ou B, foram originalmente designadas como tendo atividade zero (O). Na verdade, o terminal da unidade trissacarídica na superfície de células do tipo O provou ser o precursor dos determinantes dos grupos sanguíneos A e B (AUDETTE; VANDONSELAAR; DELBAERE, 2000). Este terminal da unidade trissacarídica é o determinante H tipo 2, sendo a α -fucose definida como único determinante do grupo sanguíneo e reconhecida pela lectina UEA-I (AUDETTE; VANDONSELAAR; DELBAERE, 2000; MISLOVICOVÁ *et al.*, 2009).

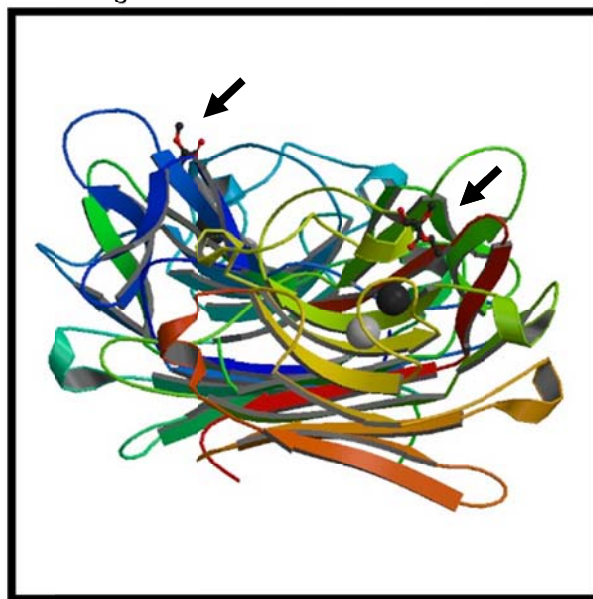
Embora lectinas de leguminosas apresentem sequências e estruturas similares, suas ligações específicas a carboidratos diferem grandemente. Para a lectina UEA-I o sítio de ligação a carboidrato é considerado como sendo uma depressão formada pelos resíduos de aminoácidos Glu44, Thr86, Asp87, Gly104-Gly105, Ile130, Val134, Asn135, Trp137, Tyr220 e Arg223 (AUDETTE; VANDONSELAAR; DELBAERE, 2000).

Em lectinas leguminosas íons metálicos positivamente carregados são componentes estruturais dessas proteínas. Eles estão adjacentes ao sítio de ligação sendo muito freqüente a ocorrência dos íons cálcio e manganês. A presença desses íons é considerada como uma ajuda para bloquear a estrutura terciária da lectina e,

assim, manter a conformação mais favorável (estável) para ligação ao carboidrato. Na lectina UEA-I tanto o íon cálcio quanto o manganês estão presentes em cada subunidade (AUDETTE; VANDONSELAAR; DELBAERE, 2000).

A figura 5 exibe a estrutura da lectina *Ulex europaeus* I mostrando os sítios de ligação a carboidratos.

Figura 5 – Estrutura da lectina UEA-I.



Em cinza claro, o íon manganês; em cinza escuro, o íon cálcio.
Fonte: AUDETTE *et al.* (2002 *apud* PDB, 2011).

4.3.2.2 Concanavalina A (Con A)

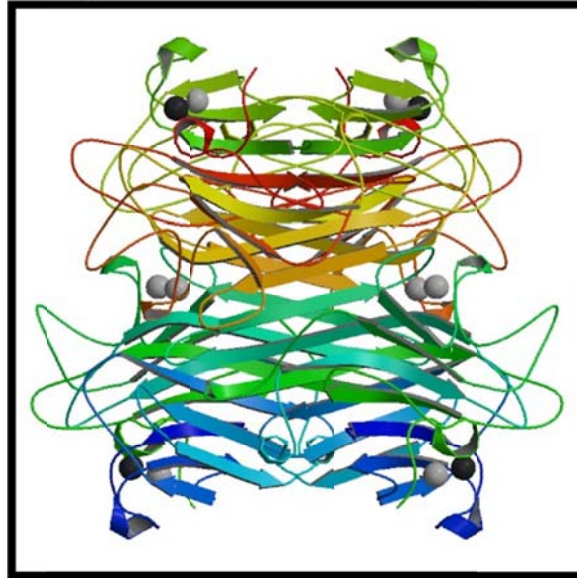
Proteína ligadora de carboidrato e extraída do feijão, *Canavalia ensiformis* é o membro mais bem estudado dentro da família de lectinas leguminosas (PDB, 2011; SHARON, 2008). Caracteriza-se por ser uma proteína tetramérica, com 237 aminoácidos, constituída por monômeros quase idênticos. Sua estrutura tridimensional foi determinada nos anos 70, sendo uma das primeiras lectinas a ter essa estrutura conhecida (LIGHT –WAHL; WINGER; SMITH, 1993).

A composição de um monômero de Con A é dominado por um extenso arranjo de β -folha, que associa-se como um dímero de dímeros formando um tetrâmero de 100 kDa (DEACON *et al.*, 1997).

Assim como a lectina UEA-I, a Con A também é uma metaloproteína já que possui íons metálicos na sua composição, cálcio e manganês, os quais são necessários para a ligação com o sacarídeo (DEACON *et al.*, 1997).

A figura 6 ilustra a estrutura da Concanavalina A livre, sendo observados os íons cálcio de manganês.

Figura 6. Estrutura da Con A sem ligante.



Em cinza claro, o íon manganês e em cinza escuro, o íon cálcio.
Fonte: HARDMAN; AINSWORTH (1972, *apud* PDB, 2011).

Apresenta especificidade para os açúcares D-glicose e D-manose, sendo o glicano ancorado à proteína por meio de várias pontes de hidrogênio e interações de van der Waals (SHARON, 2007). As interações estão centradas no núcleo trimanosídeo, encontrado em todos os glicanos *N*-ligados. A coloração em histoquímica utiliza as especificidades destas interações como ferramenta básica para o uso da Con A (NAISMITH; FIELD, 1996).

4.3.3 Histoquímica com lectinas

A técnica de histoquímica convencional utiliza como ferramenta de avaliação a morfologia das células e dos tecidos, auxiliada por corantes. Os corantes mais utilizados nos procedimentos histológicos são a hematoxilina e a eosina (TIMM, 2005). No entanto, diagnósticos morfológicos são subjetivos, uma vez que aspectos morfológicos de um tumor podem mascarar o seu verdadeiro comportamento biológico (TEPPO, 2003).

Estudos histoquímicos têm mostrado que alterações quantitativas e qualitativas são observadas em glicoconjugados de superfície celular durante

processos oncogênicos (CAMPOS *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2010; SOBRAL *et al.*, 2010).

Já se sabe que a glicosilação alterada constitui uma via universal para transformação e progressão tumoral (PINTO *et al.*, 2010). A glicosilação é um processo no qual resíduos de carboidratos são adicionados a glicoproteínas ou glicolipídeos da membrana celular, a qual tem importância para o desempenho normal das funções fisiológicas e sua alteração leva a estados patológicos, como câncer. Além disso, a glicosilação aberrante está relacionada com a maior habilidade de células tumorais invadirem tecidos vizinhos, metastizar e fugir do mecanismo de reparo (YUAN *et al.*, 2008).

Dentro deste contexto, a técnica de Histoquímica com Lectinas vem sendo utilizada em adição a imunohistoquímica como ferramenta auxiliar para diferenciar tecidos normais e transformados. Através de secções de parafina, lectinas são tradicionalmente estudadas via coloração direta ou indireta. Essa técnica é composta por diversas etapas. A desparafinização é realizada inicialmente para remoção da parafina na qual o tecido é embebido. A segunda etapa corresponde ao tratamento enzimático, que possibilita o reconhecimento por lectinas de carboidratos inacessíveis. E, por fim, a etapa de incubação com as lectinas que torna possível o reconhecimento a carboidratos específicos. O grupo de pesquisa Biomarcadores no Câncer utiliza lectinas através da histoquímica como ferramentas auxiliares no diagnóstico e prognóstico de neoplasias benignas e malignas humanas através da caracterização do perfil sacarídico de glicoconjugados celulares. Um grande número de lectinas tem sido empregadas como ferramenta histoquímica no diagnóstico histopatológico em tecidos humanos da cavidade oral (SOBRAL *et al.*, 2010), do cérebro (BELTRÃO *et al.*, 2003), da mama (BELTRÃO *et al.*, 2001, 1998; CAMPOS *et al.*, 2006; CAZET *et al.*, 2010, SANTOS *et al.*, 2006), de próstata (LIMA *et al.*, 2010), dentre outros.

Em 2003, Beltrão *et al.* avaliaram o uso da lectina de *Parkia pendula* como marcador histoquímico para meningioma meningotelial. Esta lectina mostrou-se como ferramenta muito útil para caracterizar o tumor assim como para diagnóstico clínico e histopatológico. No estudo de Sobral e colaboradores (2010), a histoquímica com lectinas foi utilizada para distinguir a biologia celular e o grau de histológico em carcinoma mucoepidermóide da glândula parótida. Outro estudo recente utilizou lectinas presentes em sementes de *Cratylia mollis* como sondas

histoquímicas no estudo de tecidos prostáticos humanos: normal, com hiperplasia e com carcinoma prostático (LIMA *et al.*, 2010).

Desta forma, a prática do uso de histoquímica com lectinas é avaliada como um instrumento importante e quando aplicada na investigação de estudos de tecidos transformados pode auxiliar no diagnóstico de diversas patologias.

4.4 Marcadores Luminescentes

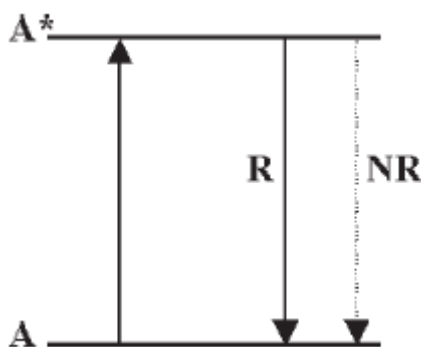
O termo luminescência foi introduzido em 1988 pelo físico alemão Eilhardt Wiedemann para os fenômenos de emissão de luz que não sofressem aumento de temperatura (KUPLICH, 2007), podendo ser obtida por processos mecânicos, químicos, elétricos ou pela ação direta da luz (WEISZFLOG, 2007).

A luminescência molecular é a emissão de radiação eletromagnética (geralmente na região do visível), proveniente de moléculas que foram excitadas, quando estas retornam ao estado fundamental. Esse fenômeno é denominado fotoluminescência quando a absorção de fótons é responsável pela excitação da molécula, ou seja, pela elevação dos elétrons de valência de um orbital menos energético para um orbital de maior energia (KUPLICH, 2007).

A luminescência pode ser induzida de várias formas: a fotoluminescência é obtida a partir da absorção de radiação eletromagnética (geralmente UV); a eletroluminescência, a partir de uma voltagem elétrica; luminescência de raios X, a partir de raios X; quimioluminescência, a partir de energia de uma reação química, etc (VILA NOVA, 2003).

A figura 7 ilustra um dos mecanismos de luminescência existentes. O ativador (A) absorve radiação e o elétron passa para o nível excitado (A^*), ao retornar ao estado fundamental por processos radioativos $\otimes$ poderá apresentar luminescência, como também poderá ceder calor ao sistema caso o retorno ocorra por processos não radioativos (NR) (MARTINS; ISOLANI, 2005).

Figura 7. Mecanismo de Luminescência.



(A) Ativador; (A^*) elétron excitado; (R) processo radioativo (NR) processo não radioativo.

Fonte: MARTINS; ISOLANI, 2005

Marcadores luminescentes são ferramentas comuns usadas em ensaios biológicos tanto em sistemas *in vivo* como *in vitro*, tendo grande aplicabilidade em imunologia para o diagnóstico clínico (SANTOS *et al.*, 2006).

Diversas características apresentadas por marcadores fluorescentes resultam em diferentes propriedades como fotoestabilidade, intensidade de luz, solubilidade e resistência a mudança de pH (MAHMOUDI *et al.*, 2011).

Dentre os marcadores fluorescentes o FITC é um marcador tradicional e versátil que emite no comprimento de onda do verde. Contudo, ao utilizar este marcador encontram-se limitações como a baixa fotoestabilidade e intensidade de luz (MAHMOUDI *et al.*, 2011).

Na verdade, a fotodegradação é um fator limitante que ocorre com a maioria dos compostos luminescentes. A fotodegradação é a destruição fotoquímica de um fluoróforo devido a geração de espécies de oxigênio reativas como um subproduto da excitação fluorescente. Assim como a autofluorescência biológica em células e tecidos de mamíferos pode ser um problema na detecção de sondas fluorescentes. Nessas estruturas estão presentes coenzimas flavinas e nucleotídeos piridina reduzidos que apresentam comprimento de excitação e emissão em 450 nm – 515 nm e 340 nm – 460 nm, respectivamente (ROBINSON; STURGIS; KUMAR, 2009).

Estudos com diferentes tipos de marcadores luminescentes como quantum dots, éster de acridina e criptato de európio (III) já foram desenvolvidos para aplicação na forma de bioconjugados na tentativa de contornar estas dificuldades (CAMPOS *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006; VILA NOVA, 2003). Utilizando essas moléculas para este fim obtém-se um método seguro e de baixo custo, além de

adquirir alta especificidade e sensibilidade nos resultados (MARTINS; ISOLANI, 2005).

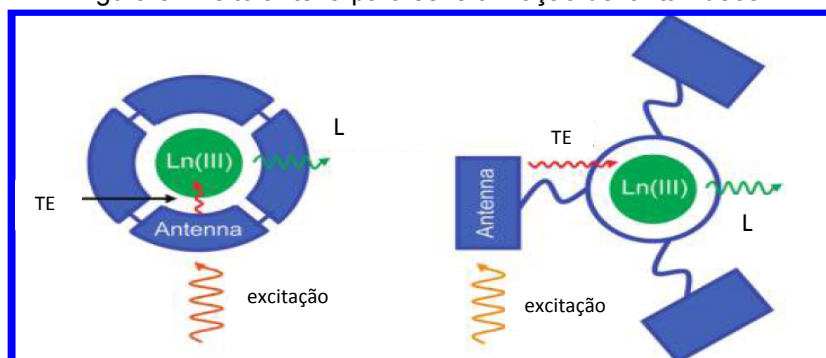
4.4.1 Criptatos de Lantanídeos

Os lantanídeos encontram-se no 6º período entre os blocos s e d na tabela periódica e também são conhecidos como elementos terras raras (ANTUNES; WARDELF; PIMENTEL, 2008). Segundo recomendações da IUPAC, usam-se os termos lantanídeos para designar a série de elementos da tabela periódica desde o lantânio (La) até o lutécio (Lu), e o termo terras raras, quando aos lantanídeos são incluídos o escândio (Sc) e o ítrio (Y) (MARTINS; ISOLANI, 2005).

Complexos de íons lantanídeos têm recebido atenção devido as suas propriedades fotofísicas e seu uso como candidatos para uma variedade de aplicações (MARTINS *et al.*, 2010; SOTOMAYOR *et al.* 2008). Algumas de suas propriedades luminescentes podem ser citadas como seu tempo de vida longo, bandas de emissão estreitas além da possibilidade de formar complexos com várias classes de ligantes. Dentre os íons lantanídeos trivalentes, o európio (Eu) e o térbio (Tb) são os dois mais estudados em solução (MARTINS; ISOLANI, 2005).

Embora os íons lantanídeos apresentem características desejáveis, a luminescência por excitação direta do íon é pouco eficiente, já que eles não possuem uma alta absorção molecular. Assim, é necessário utilizar um ligante cujo papel é absorver a luz e transferir a energia para o íon lantanídeo. Com isso, o íon é capaz de apresentar luminescência de forma eficiente. Esse processo conhecido como efeito antenna pode ser visualizado na figura 8 (MARTINS; ISOLANI, 2005).

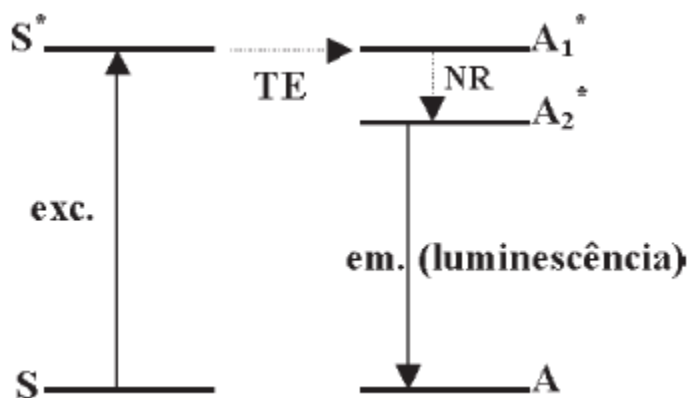
Figura 8. Efeito antenna para sensibilização de lantanídeos.



(L) Luminescência; (TE) transferência de energia.
Fonte: MOORE; SAMUEL; RAYMOND, 2009.

O mesmo efeito pode ser representado através do diagrama de mecanismo de transferência de energia (Figura 9).

Figura 9. Mecanismo de transferência de energia de um sensibilizador para um centro ativador.



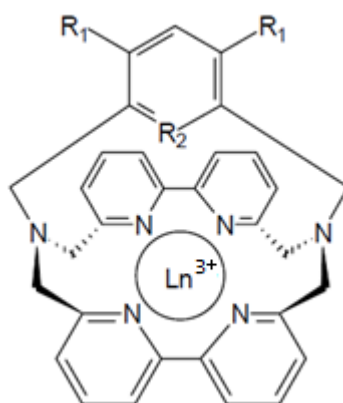
(S) sensibilizador no estado fundamental; (S*) sensibilizador no estado excitado; (TE) transferência de energia; (NR) processo não radioativo; (A1* e A2*) estados excitados do ativador A; (A) ativador no estado fundamental.

Fonte: MARTINS; ISOLANI, 2005

Algumas características fazem desses complexos excelentes reveladores tais como alta estabilidade cinética e termodinâmica, eficiência na transferência de energia do quelato para o íon Ln, tempo de vida longo, alta sensibilidade de detecção e facilidade para se ligarem a biomoléculas, como as proteínas (MARTINS *et al.*, 2010; MARTINS; ISOLANI, 2005; SÁ *et al.*, 2000). Vários grupos tem se dedicado ao design de novos e eficientes complexos de lantanídeos com ligantes orgânicos tais como: ácidos carboxílicos aromáticos, β -dicetonas, criptandos, dentre outros (YAN; XU, 2005).

Os criptandos são macrociclos com uma cavidade tridimensional sendo capazes de encapsular metais (BANDEIRA *et al.*, 2009). Complexos de íons lantanídeos, como os criptatos de Eu^{3+} , apresentam várias vantagens quando comparados aos compostos luminescentes já comercializados, como o FITC. Apresentam boa solubilidade em água, elevada estabilidade cinética e fotoquímica, demonstrando grande potencial para aplicação em sistemas biológicos (VILA NOVA, 2003). A figura 10 apresenta a estrutura de um criptato de lantanídeo.

Figura 10 – Estrutura do criptato de lantanídeo.



Fonte: VILA NOVA, 2003.

Criptatos de lantanídeos (Eu^{3+} e Tb^{3+}) conjugados a lectinas já foram utilizados como ferramenta auxiliar em histoquímica para marcação de tumor de mama diagnosticado com carcinoma ductal invasivo (VILA NOVA, 2003; MENEZES, 2007). Desta forma, medidas de intensidade luminescente permitem a determinação quantitativa seletiva e sensível de uma variedade de tumores, revelando, de acordo com as alterações do perfil de carboidratos a possibilidade de uma lesão benigna evoluir para um quadro maligno.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Seleção de Casos

Neste trabalho foram selecionadas 24 biópsias de tecidos mamários humanos sendo 10 com fibroadenoma (FIB), um tipo de tumor benigno, 10 com carcinoma ductal invasivo (CDI), um tumor maligno, e 4 oriundas de mastoplastia redutora bilateral, utilizada como controle normal. As biópsias utilizadas constavam no arquivo do Setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas – UFPE e do arquivo do Setor de Patologia do LIKA-UFPE, doadas pelo Hospital do Câncer de Pernambuco e pelo LACEN (Laboratório Central de Saúde Pública). Esses casos obtiveram seus diagnósticos mediante o uso da técnica de coloração hematoxilina e eosina (H.E.) por patologistas das respectivas instituições. As biópsias foram utilizadas sob aprovação do Comitê de Bioética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (SISNEP FR – 272931, CEP/CCS/UFPE Nº 195/09).

5.2 Conjugação das Lectinas aos Criptatos de Eu^{3+}

Por meio do banco de dados Pubmed foi feito um levantamento da sequência primária de aminoácidos de cada lectina, UEA-I e Con A, a fim de conhecer os grupamentos terminais de suas cadeias laterais.

A lectina UEA-I, cuja identidade no PDB (Protein Data Bank) é 1FX5, caracteriza-se por ser uma metaloglicoproteína que se liga ao grupo sanguíneo humano determinante H do tipo 2, sendo específica para o açúcar L-fucose (AUDETTE; VANDONSELAAR; DELBAERE, 2000; SOBRAL *et al.*, 2010). Distingue-se como uma proteína dimérica de peso molecular de 68.000 daltons composta de 484 resíduos de aminoácidos. Destes, 84 resíduos apresentam cadeias laterais terminadas em grupamentos aminas ou amidas e 48 resíduos apresentam cadeias laterais terminadas em grupamentos carboxílicos. A figura 11 ilustra a sequência primária de aminoácidos de um monômero da UEA-I, na qual os aminoácidos que apresentam cadeias laterais terminadas em grupamentos aminas ou amidas estão corados em azul e os que apresentam cadeias laterais terminadas em grupamentos carboxílicos estão corados em vermelho.

Figura 11 – Sequência primária de aminoácidos de um monômero da lectina UEA- I.

S	D	D	L	S	F	K	F	K	N	10	F	S	Q	N	G	K	D	L	S	F	Q	G	N	A	S	V	I	E	T	G	30	
V	L	Q	L	N	K	V	G	N	N	40	L	P	D	E	T	G	G	I	A	R	50	Y	I	A	P	I	H	I	W	N	C	60
N	T	G	E	L	A	S	F	I	T	70	S	F	S	F	F	M	E	T	S	A	80	N	P	K	A	A	T	D	G	L	T	90
F	F	L	A	P	P	D	S	P	L	100	R	R	A	G	G	Y	F	G	L	F	110	N	D	T	K	C	D	S	S	Y	Q	120
T	V	A	V	E	F	D	T	I	G	130	S	P	V	N	F	W	D	P	G	F	140	P	H	I	G	I	D	V	N	C	V	150
K	S	I	N	A	E	R	W	N	K	160	R	Y	G	L	N	N	V	A	N	V	170	E	I	I	Y	E	A	S	S	K	T	180
L	T	A	S	L	T	Y	P	S	D	190	Q	T	S	I	S	V	T	S	I	V	200	D	L	K	E	I	L	P	E	W	V	210
S	V	G	F	S	G	S	T	Y	I	220	G	R	Q	A	T	H	E	V	L	N	230	W	Y	F	T	S	T	F	I	N	T	240
N	S	242																														

Fonte: Adaptado do PDB (www.rcsb.org).

A Con A (PDB: 1JBC) é uma lectina específica para os açúcares α -D-manose e α -D-glicose (SOBRAL *et al.*, 2010). Caracteriza-se por ser uma proteína tetramérica de peso molecular de 102.332 daltons, composta 948 resíduos de aminoácidos. Destes, 148 resíduos apresentam cadeias laterais terminadas em grupamentos amins ou amidas e 100 resíduos apresentam cadeias laterais terminadas em grupamentos carboxílicos. A figura 12 ilustra a sequência primária de aminoácidos de um monômero da lectina Con A, na qual os aminoácidos que apresentam cadeias laterais terminadas em grupamentos amins ou amidas estão corados em azul e os que apresentam cadeias laterais terminadas em grupamentos carboxílicos estão corados em vermelho.

Figura 12 – Sequência de aminoácidos de um monômero da lectina Con A.

A	D	T	I	V	A	V	E	L	D	T	Y	P	N	T	D	I	G	D	P	S	Y	P	H	I	G	I	D	I	K	10	20	30
S	V	R	S	K	K	T	A	K	W	N	M	Q	N	G	K	V	G	T	A	H	I	I	Y	N	S	V	D	K	R	40	50	60
L	S	A	V	V	S	Y	P	N	A	D	S	A	T	V	S	Y	D	V	D	L	D	N	V	L	P	E	W	V	R	70	80	90
V	G	L	S	A	S	T	G	L	Y	K	E	T	N	T	I	L	S	W	S	F	T	S	K	L	K	S	N	S	T	100	110	120
H	E	T	N	A	L	H	F	M	F	N	Q	F	S	K	D	Q	K	D	L	I	L	Q	G	D	A	T	T	G	T	130	140	150
D	G	N	L	E	L	T	R	V	S	S	N	G	S	P	Q	G	S	S	V	G	R	A	L	F	Y	A	P	V	H	160	170	180
I	W	E	S	S	A	V	V	A	S	F	E	A	T	F	T	F	L	I	K	S	P	D	S	H	P	A	D	G	I	190	200	210
A	F	F	I	S	N	I	D	S	S	I	P	S	G	S	T	G	R	L	L	G	L	F	P	D	A	N				220	230	

Fonte: Adaptado do PDB (www.rcsb.org).

Os criptatos de Eu^{3+} utilizados neste trabalho foram sintetizados no Laboratório de Terras Raras (BSTR) do Departamento de Química Fundamental – UFPE.

Com base no número de resíduos de aminoácidos de cada lectina foi calculada a quantidade de criptato a ser utilizada para a conjugação nas proporções de 1:1 e 1:2 (resíduos de aminoácido: criptato) conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Quantidade de criptato de Eu^{3+} usada para conjugação com as lectinas UEA-I e Con A nas proporções de 1:1 e 1:2.

Lectina	Proporção	Nº de mol	Massa (mg)
UEA-I	1:1	$1,41 \times 10^{-7}$ mols	0,16
UEA-I	1:2	$2,82 \times 10^{-7}$ mols	0,32
Con A	1:1	$7,8 \times 10^{-7}$ mols	0,44
Con A	1:2	$15,6 \times 10^{-7}$ mols	0,88

Como os criptatos utilizados estavam funcionalizados com o etilenodiamina, a conjugação foi realizada somente através da ligação direta aos grupamentos carboxílicos da sequência de aminoácidos (48 resíduos para a lectina UEA-I e 100 resíduos para a lectina Con A). Portanto, se os resíduos de aminoácidos estivessem

estericamente desimpedidos, a conjugação ocorreria na proporção de 1 mol da lectina UEA-I para 48 mols de criptato de Eu^{3+} , assim como 1 mol da lectina Con A para 100 mols de criptato de Eu^{3+} .

Com base na Tabela 4, uma solução de criptato de Eu^{3+} foi incubada com uma solução da lectina (200 $\mu\text{g/mL}$), em tampão fosfato (PBS) 100 mM pH 7,2, por 2h a 25°C. Após a conjugação, a solução de lectina-criptato foi submetida à diálise (Dialysis Tubing Cellulose – AldrichSigma Ltda) contra PBS, à 4° C por 16 horas, sob agitação.

5.3 Caracterização dos conjugados lectinas-criptato de Eu^{3+}

Foram realizados ensaios de atividade hemaglutinante e de dicroísmo circular para verificar a preservação da atividade biológica da lectina e da sua estrutura após a conjugação com o criptato. Assim como, ensaios de luminescência também foram feitos a fim de conferir a emissão do íon Eu^{3+} após a conjugação com as lectinas.

5.3.1 Atividade Hemaglutinante

A atividade biológica das lectinas (reconhecimento a carboidratos) foi analisada com ensaios de hemaglutinação em placas de microtitulação. Em cada poço da placa foram adicionados 50 μL da solução de NaCl 0,15 M. A partir do segundo poço foram adicionados 50 μL da amostra (lectinas nativas ou lectinas conjugadas ao criptato) realizando uma diluição seriada. Por fim, foram adicionados 50 μL de eritrócitos de coelho ou eritrócitos humanos tratados com glutaraldeído, de acordo com Beltrão *et al.* (1998). A determinação do título da AH foi realizada após 45 minutos, a 25°C.

5.3.2 Dicroísmo Circular (CD)

A técnica de Dicroísmo circular (CD) é baseada no desvio da luz circularmente polarizada que incide sobre compostos assimétricos. Através desta técnica pode-se estudar a estrutura secundária das proteínas avaliando-se o carbono alfa dos aminoácidos.

As medidas de dicroísmo circular foram obtidas a partir de um espectropolarímetro (Jasco J-815 CD Spectrometer), no Laboratório Multiusuário de Nanotecnologia do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). Foram analisadas amostras de criptatos, lectinas não conjugadas e conjugadas ao criptato de Eu^{3+} . Todas as amostras foram solubilizadas em tampão PBS 0,01 M, pH 7,2. Diferentes concentrações de amostras foram testadas (0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,01 mg/mL).

5.3.3 Ensaios de Luminescência

As medidas de luminescência estática e dinâmica são baseadas na emissão da radiação eletromagnética. A luminescência com medida resolvida no tempo tem como finalidade acrescentar informações àquelas obtidas pelas medidas estacionárias. Com esta técnica pode-se obter o tempo que a molécula permanece no estado excitado, ou seja, o seu tempo de vida. Com isto é possível verificar se uma amostra contém vários fluoróforos distintos, ou mesmo, indicar a presença de um único fluoróforo (NAKAEMA; SANCHES, 1999).

Os espectros de luminescência das amostras foram registrados em um espectrofluorímetro SPEX-FLUOROG 2 com monocromadores duplos SPEX 1680, no Laboratório dos Elementos do Bloco-f, Instituto de Química, USP-SP. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C} = 298\text{ K}$) utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Como fonte de luz foi utilizada uma lâmpada de xenônio de 450 W, quando utilizada de modo contínuo, e outra de 150 W, no modo pulsado. Desta forma o fluorímetro operou tanto como um fluorímetro em estado estacionário como resolvido no tempo para a medição e análise de espectros de excitação e emissão de fluorescência. Todos os dados espectrais foram coletados em um ângulo de $22,5^\circ$ (frontal face). Todas as medidas foram registradas com fendas (entre 1,0 e 3,0 mm) nos monocromadores de excitação e emissão, bem como filtros na região do ultravioleta (370 e 399 nm) para eliminar a emissão de 2ª ordem da lâmpada. O espectro de excitação das proteínas foi obtido entre 200 e 400nm e a emissão foi monitorada entre 400 e 700nm. Os espectros de excitação e emissão dos criptatos e dos conjugados lectinas-criptatos de Eu^{3+} foram obtidos seguindo os mesmos parâmetros utilizados para as proteínas.

5.4 Histoquímica em tecidos mamários humanos usando os conjugados lectinas-criptato de Eu^{3+}

Foram utilizados cortes de 4 μm de espessura de tecidos mamários humanos (normais, FIB e CDI) e fixados em lâminas de vidro. Os tecidos foram desparafinizados em xilol, hidratados em álcool etílico e tratados com solução de tripsina 0,1%, por 2 min a 37°C. Após esta etapa, os tecidos foram incubados com os conjugados lectinas-criptato de Eu^{3+} por 2h a 4°C, seguindo para coloração somente com hematoxilina ou hematoxilina e eosina. Tecidos sem corantes também foram experimentados. Ao final, foram testados como meio de montagem das lâminas dois materiais: o PBS e a glicerina. A histoquímica sem a lectina também foi realizada sendo a incubação da amostra apenas com o criptato de Eu^{3+} .

5.4.1 Análise Espectroscópica

A marcação dos tecidos foi avaliada através da excitação por radiação UV e emissão na região do visível por meio do espectrofluorímetro, o mesmo utilizado para caracterização dos conjugados em solução. Todas as medidas foram registradas numa área de 3,0 mm x 8,00 mm, sendo cada amostra de tecido analisada em três áreas diferentes. Filtros (370 e 399nm) foram usados quando necessário. A emissão foi monitorada entre 400 e 700 nm e a intensidade da emissão foi empregada como critério de comparação de marcação entre as amostras.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

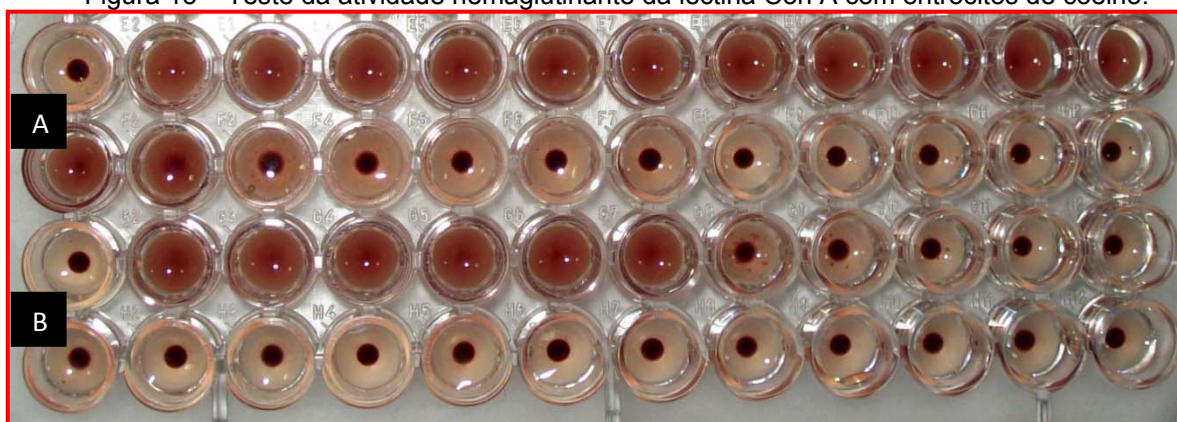
A conjugação das lectinas aos criptatos de Eu^{3+} foi realizada através dos grupamentos carboxílicos, uma vez que o $\text{crip}(\text{Eu}^{3+})$ está funcionalizado com etilenodiamina. Os conjugados obtidos foram submetidos à diálise e, posteriormente, foi feita a caracterização destes a fim de verificar a preservação da estrutura e da função biológica. Por fim, as sondas luminescentes estabelecidas foram usadas para marcação de tecidos mamários humanos através da histoquímica com lectinas.

6.1 Caracterização dos Conjugados Lectinas-Crip(Eu^{3+})

6.1.1 Atividade Hemaglutinante (A.H.)

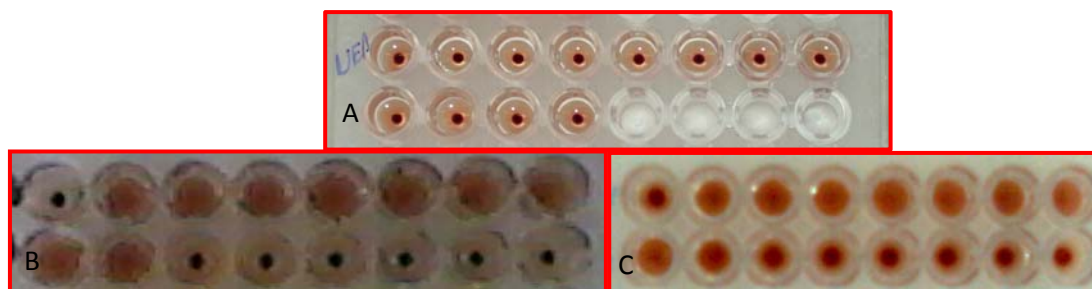
Através deste teste foi avaliada a preservação da atividade biológica das lectinas após sua ligação aos criptatos de Eu^{3+} . Como descrito na metodologia, esse ensaio foi realizado com eritrócito glutarizado de coelho para Con A que apresentou atividade biológica tanto na sua forma pura quanto conjugada aos criptatos de Eu^{3+} (Figura 13). A atividade hemaglutinante da UEA-I foi realizada utilizando eritrócitos humanos dos tipos A, AB e O. O tipo sanguíneo humano O foi o escolhido para comparar a atividade biológica da lectina UEA-I, uma vez que essa tipagem apresentou maior AH para a referida lectina (Figura 14).

Figura 13 – Teste da atividade hemaglutinante da lectina Con A com eritrócitos de coelho.



Teste positivo tanto para a lectina pura (A) quanto para a lectina conjugada (B).

Figura 14 – Atividade hemaglutinante da lectina UEA-I com eritrócitos de coelho e eritrócitos humanos.



(A) Teste negativo realizado com eritrócitos de coelho. Testes positivos realizados com eritrócitos humanos: (B) lectina pura; (C) lectina conjugada ao cript(Eu³⁺).

A ocorrência da maior atividade hemaglutinante pelos eritrócitos humanos tipo O se deve ao fato destes tipos celulares serem conhecidos por não possuírem atividade A ou B, portanto expondo a α -fucose, a qual é reconhecida pela UEA-I (AUDETTE; VANDONSELAAR; DELBAERE, 2000).

6.1.2 Dicroísmo circular (CD)

O dicroísmo circular (CD) fornece informações acerca das alterações nas estruturas das proteínas, as quais são imprescindíveis para a função dessas biomoléculas. O CD é o resultado da absorção diferencial da luz circularmente polarizada que incide sobre compostos assimétricos (quirais) (KELLY; JESS; PRICE, 2005). Assim, a luz ao incidir sobre a amostra sofrerá uma modificação na sua direção (para direita ou para esquerda) o que resultará em um sinal do CD. Um sinal de CD pode ser observado devido a: o cromóforo é intrinsecamente quiral devido a sua estrutura, ou é covalentemente ligado a um centro quiral na molécula ou é localizado em um ambiente assimétrico em virtude da estrutura tridimensional assumida pela molécula (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

Em proteínas, os cromóforos de interesse incluem a ligação peptídica, a cadeia lateral dos aminoácidos aromáticos e as ligações dissulfeto (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

Para realização do CD várias concentrações foram testadas, no entanto, a que obteve melhor resultado foi de 0,1mg/mL por apresentar um espectro com menor ruído. A figura 15 apresenta o comparativo entre o espectro do dicroísmo circular da UEA-I pura e conjugada aos criptatos de Eu³⁺. Pode-se observar que o máximo positivo e o mínimo negativo foram praticamente mantidos, significando que

a estrutura secundária da lectina não foi desestabilizada pela conjugação. Esse resultado corrobora o fato da manutenção da AH após a conjugação.

Figura 15 – Espectro do dicroísmo circular comparando a amostra da lectina UEA-I pura e do conjugado, UEA-I-Crip(Eu^{3+}), na concentração de 0,1 mg/mL.

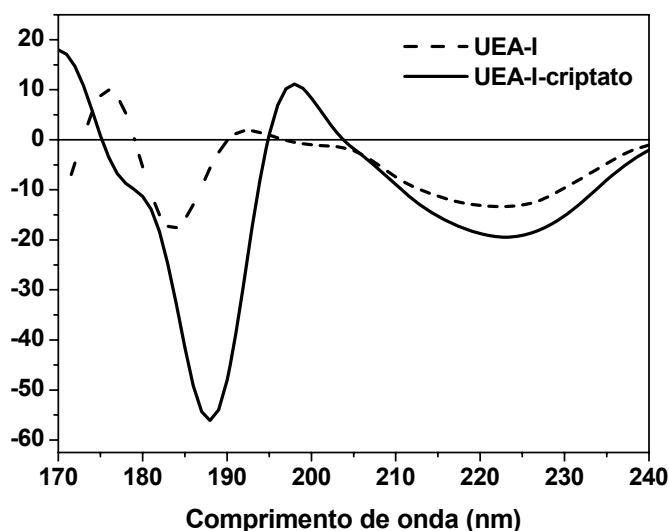
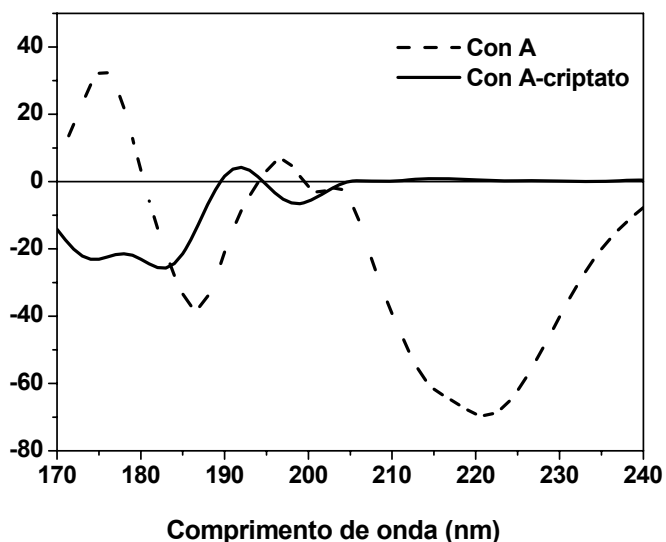


Figura 16 – Espectro do dicroísmo circular apresentando a absorção das amostras da lectina Con A e do conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}), na concentração de 0,1 mg/mL..



O espectro de dicroísmo circular da Con A pode ser visto na figura 16.

Foram observadas alterações quando os espectros da lectina pura e conjugada são comparados. Esse resultado pode justificar a diminuição considerável da atividade hemaglutinante da lectina Con A após a conjugação. No entanto, estes

resultados não impedem o uso desta lectina para sua aplicação final, uma vez que ela apresenta atividade biológica.

6.1.3 Ensaios de Luminescência

Análises espectroscópicas foram realizadas em duas situações distintas. Primeiro, os conjugados Con A-crip(Eu^{3+}) e UEA-I-crip(Eu^{3+}) foram analisados em solução. No segundo momento, os conjugados foram usados em ensaios histoquímicos, conforme descrito em seção adiante.

Os ensaios de luminescência das soluções foram realizados conforme descrito na tabela 5.

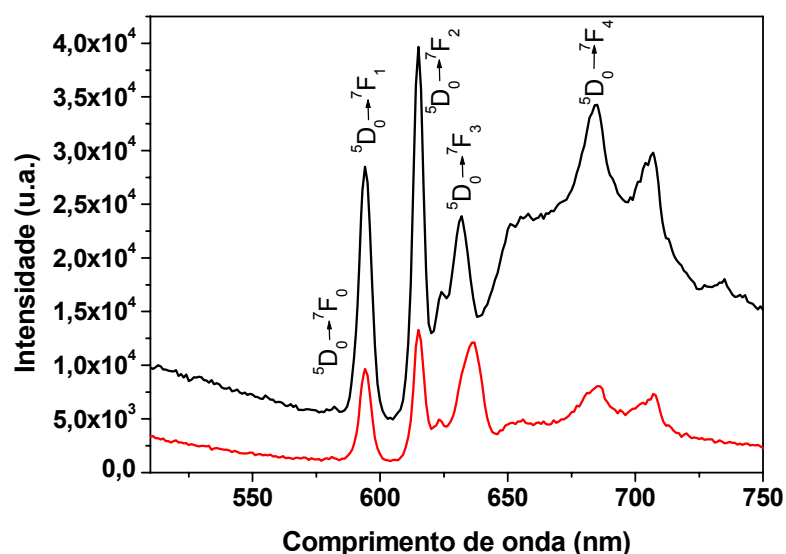
Tabela 5 – Descrição das soluções analisadas nos ensaios de luminescência.

Amostra	Concentração
Criptatos de Eu^{3+}	4,028mg/mL
PBS	0,1M
UEA-I	200 $\mu\text{g/mL}$
Con A	200 $\mu\text{g/mL}$
UEA-I-Crip(Eu^{3+})	200 $\mu\text{g/mL}$
Con A-Crip(Eu^{3+})	200 $\mu\text{g/mL}$

As conjugações nas proporções 1:1 e 1:2 foram testadas como mostra a figura 17. Devido à menor intensidade da emissão apresentada no conjugado com proporção 1:1 e da possibilidade em se utilizar o conjugado com proporção 1:2, os conjugados analisados foram preparados conforme a segunda opção.

Nos espectros de luminescência das lectinas puras o comprimento de onda de excitação foi 293,8 nm e 379,2nm para UEA-I e de 377 para Con A. Ao passo que o máximo de emissão ocorreu em 405,6nm e 438,2nm para a UEA-I e 473,4nm para a Con A (ver Tabela 6).

Figura 17 – Espectro de emissão do conjugado UEA-I-Crip(Eu^{3+}) em diferentes proporções.



Lectina-criptato 1:1 (vermelho); lectina-criptato 1:2 (preto).

Tabela 6 – Resultados das medidas de excitação e emissão das amostras testadas.

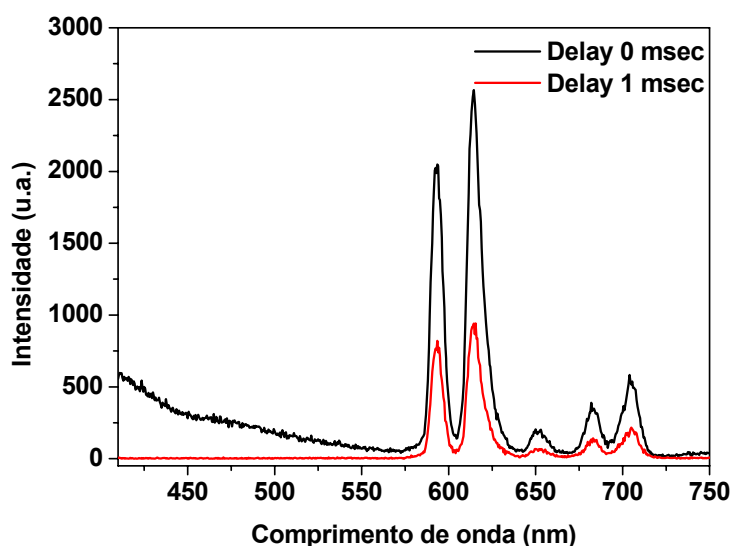
Amostra	$\lambda_{\text{exc.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em. máximo}}$ (nm)	Intensidade Máx. (u.a.)
		${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$	${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$	${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_4$		
UEA-I	293,8	-	-	-	405,6	259.780
	379,2	-	-	-	438,2	45.726
UEA-I-crip	307,4	595,2	616,4	708,6	616,4	3.367.277
	320,0	595,2	616,4	798,2	616,4	3.411.765
Con A	377	-	-	-	473,4	289.569
Con A-crip	321	595,2	616,4	708,4	616,4	23.885.720

Em ambos, a intensidade ultrapassou 250.000 u.a. (unidade arbitrária), com exceção da amostra da UEA-I quando excitada em 379,2nm. Seguindo os mesmos parâmetros, amostras das lectinas conjugadas aos criptatos de Eu^{3+} apresentaram o espectro característico do íon. Nestes espectros foi evidenciada a presença das transições ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_J$ ($J = 0,1,2,3,4$) do íon Eu^{3+} encapsulado no criptato, com o máximo de emissão em 616,4 nm referente a transição ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ hipersensível. Em todas as análises dos conjugados pôde-se obter alta intensidade de emissão, superando 20.000.000 u.a. (Con A-Crip(Eu^{3+})). A tabela 3 apresenta os valores

obtidos durante as análises das amostras. Transições fracas como, $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ e $^5D_0 \rightarrow ^7F_3$ foram omitidas da tabela devido à baixa intensidade.

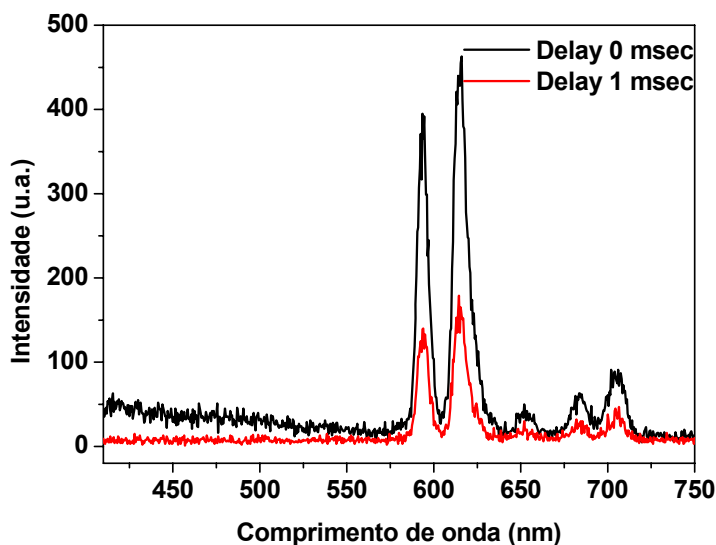
Medidas de emissão resolvidas no tempo também foram realizadas para eliminar qualquer interferência da emissão da lectina que pudesse resultar em falso positivo. Na Figura 18 estão representados espectros de emissão resolvida no tempo do conjugado UEA-I-Crip(Eu^{3+}) com atraso (delay) de 0 e 1 msec (milissegundo). A emissão obtida com delay em 0 msec foi registrada no momento em que a fonte de luz incidiu sobre a amostra. Já a emissão com delay de 1 msec foi gerada com atraso, ou seja, a fonte de luz incidiu sobre a amostra e após passado 1 milissegundo, a emissão foi registrada.

Figura 18 – Espectros de emissão resolvida no tempo do conjugado UEA-I-Crip(Eu^{3+}) com diferentes atrasos (delays).



Na Figura 19, o mesmo teste foi feito com o conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}). Ambas as conjugações apresentaram o espectro característico do íon Eu^{3+} . A análise dos conjugados resolvida no tempo teve a finalidade de suprimir a emissão das lectinas. Portanto, pode-se notar que ao analisar os conjugados com atraso de 1 msec houve ausência da emissão característica das lectinas, cuja banda encontra-se na região entre 410 e 570 nm.

Figura 19 – Espectros de emissão resolvida no tempo do conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}) com diferentes atrasos (delays).



Logo, devido a preservação da função biológica de reconhecimento a carboidratos pelo conjugado lectina-crip(Eu^{3+}) e após medidas espectroscópicas resolvidas no tempo terem suprimido a emissão das lectinas, é possível empregar os conjugados como sondas luminescentes em ensaios histoquímicos viabilizando assim uma análise quantitativa.

6.2 Histoquímica com Lectinas-Crip(Eu^{3+})

A histoquímica é um método utilizado para o diagnóstico de patologias que consiste na coleta e fixação do tecido, cortes de bloco em parafina e montagem da lâmina histológica (TIMM, 2005). Ao final das diversas etapas para montagem da lâmina é utilizado um produto em cima do tecido que o conserva sendo ainda coberto por uma lamínula.

Um produto muito utilizado para este fim é o entelan®. No entanto, sabe-se que seu uso suprime a luminescência do íon Eu^{3+} . A fim de encontrar um possível substituto do entelan®, foram testados como meios de montagem o PBS, a glicerina e a aplicação de entelan® nas bordas das lâminas. Lâminas contendo entelan® cobrindo toda a lâmina também foram preparadas para comparação.

As lâminas nas quais foi usado o PBS e que foi aplicado entelan® nas bordas apresentaram um aspecto ressecado, com coloração enegrecida das estruturas. As

lâminas nas quais foi usada a glicerina, assim como, nas que continham o entelan® por toda sua extensão, mantiveram o aspecto normal do tecido, sendo possível a observação da morfologia celular. No entanto, foi observada maior nitidez em tecidos cobertos com o entelan®. Esse resultado pode ter ocorrido devido ao excesso de glicerina utilizado ao final do processo, uma vez que, por possuir natureza viscosa, a quantidade de glicerina extravasada acabava por comprometer a imagem, sendo necessário um cuidado maior na aplicação desta substância e análise imediata.

Os espectros de emissão dos conjugados lectinas-Crip(Eu^{3+}) quando comparados com o criptato de Eu^{3+} puro, corroboram para a não interferência dos materiais empregados (PBS/glicerina) na montagem das lâminas. Assim o material escolhido foi o PBS, embora resulte no ressecamento do tecido, permite uma análise por um período mais duradouro.

6.2.1 Análise Espectroscópica de Tecidos Mamários Humanos Submetidos a Histoquímica com Lectinas Conjugadas ao Criptato de Eu^{3+}

Tecidos marcados com os conjugados lectinas-criptatos e corados com hematoxilina e eosina (H.E.) não apresentaram a emissão do íon Eu^{3+} . Além disso, observou-se uma banda em aproximadamente 547 nm, sugerindo a emissão dos corantes H.E., uma vez que a fluoresceína faz parte da sua composição (GILL, 2010). O isotiocianato de fluoresceína (FITC), um dos primeiros reveladores fluorescentes utilizados, apresenta emissão de fluorescência verde quando excitado por comprimento de onda na região de 490 nm (MENDONÇA; DOLCI, 2005). O criptato de Eu^{3+} também apresenta sua luminescência na região do visível, vermelho, quando excitado no comprimento de onda na região de 320 nm, sendo considerado um emissor forte (BRUNET; JUANES; RODRIGUEZ-UBIS, 2007).

A análise da luminescência do criptato de Eu^{3+} em microscópio de fluorescência foi impossibilitada devido a falta de filtros específicos para o complexo. O comprimento de onda de excitação do crip(Eu^{3+}) é em 320nm sendo a emissão somente em 616nm. Os filtros disponibilizados no mercado são para compostos com comprimento de excitação e emissão próximos, sendo os filtros com multibandas importantes componentes de marcação inespecífica.

Na análise dos tecidos sem H.E., marcados com os conjugados Con A-Crip(Eu^{3+}) e UEA-I-Crip(Eu^{3+}), figuras 20 e 21, respectivamente, observou-se a emissão na região entre 540 nm e 640 nm. Neste espectro evidenciamos a presença das transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_J$ ($J = 0,1,2,3,4$) do íon Eu^{3+} encapsulado no criptato.

Figura 20 – Luminescência do conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}) em tecidos mamários humanos com diagnóstico de fibroadenoma, sem coloração H.E.

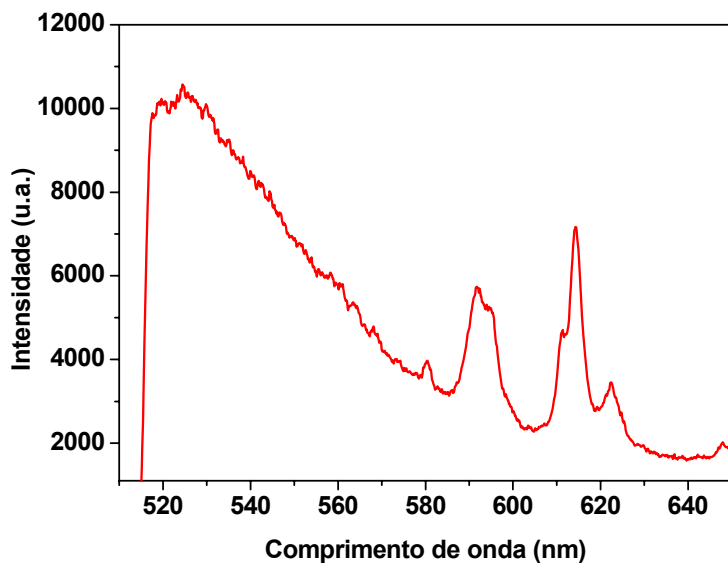
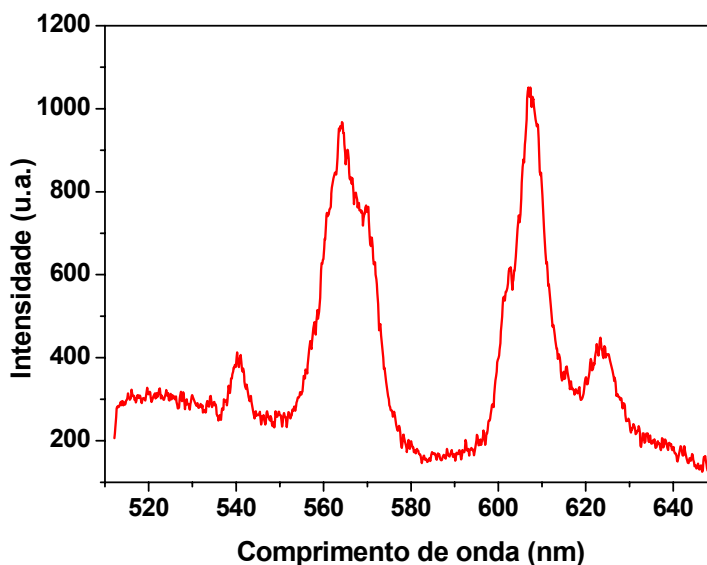


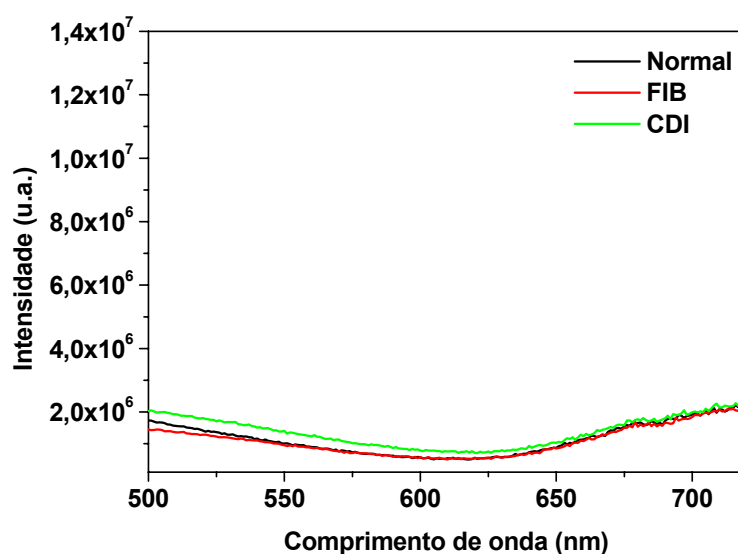
Figura 21 – Luminescência do conjugado UEA-I-Crip(Eu^{3+}) em tecidos mamários humanos diagnosticados com fibroadenoma, sem coloração H.E.



Após estabelecimento das condições ótimas para o protocolo de histoquímica com lectinas conjugadas ao criptato de Eu^{3+} foi realizada a calibração do equipamento para análise espectroscópica dos tecidos mamários humanos sem corantes e sem conjugados. Desta forma, seria possível verificar se o tecido apresenta autofluorescência. Conforme descrito na metodologia os parâmetros foram mantidos para todas as análises, além disso a escala de intensidade foi fixada, no mínimo, em $1,4 \times 10^7$ u.a. Para comparar a marcação entre as amostras foi quantificada a intensidade da luminescência no comprimento de onda de máxima emissão do íon Eu^{3+} (616 nm).

Conforme se observa na figura 22, nenhum dos tecidos analisados (normal, FIB e Con A) apresentou luminescência própria no comprimento de onda analisado.

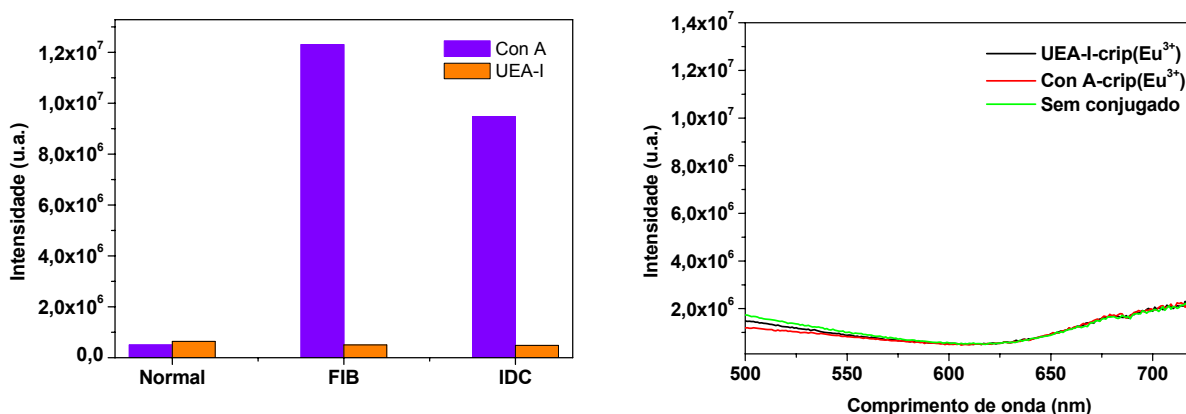
Figura 22 – Espectros de luminescência de tecidos mamários humanos normal, com diagnóstico de CDI e FIB, ambos sem corante ou lectinas.



Os conjugados Con A-crip(Eu^{3+}) e UEA-I-crip(Eu^{3+}) apresentaram diferentes resultados nos tecidos testados (Figura 23). Em tecidos normais, tratados com ambos os conjugados, não foram observadas as transições do íon Eu^{3+} (Figura 23).

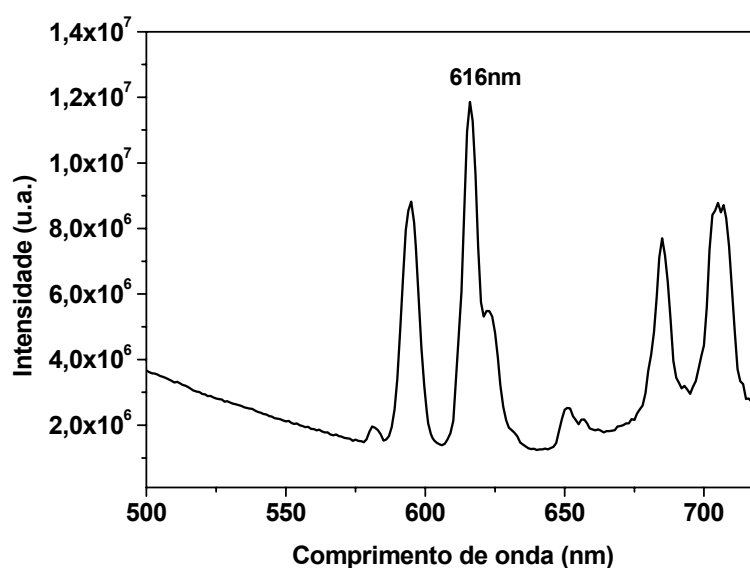
Amostras de fibroadenoma tratadas com Con A-crip(Eu^{3+}) mostraram luminescência na região entre 580 nm e 707 nm (Figura 24). Portanto, foi detectada nessas amostras a presença das transições do íon, com máximo de emissão em 616 nm ($^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$). Tecidos de FIB que receberam o conjugado UEA-I-crip(Eu^{3+}) não mostraram luminescência.

Figura 23. Intensidade máxima de luminescência encontrada em amostras dos tecidos analisados marcados pelos conjugados.



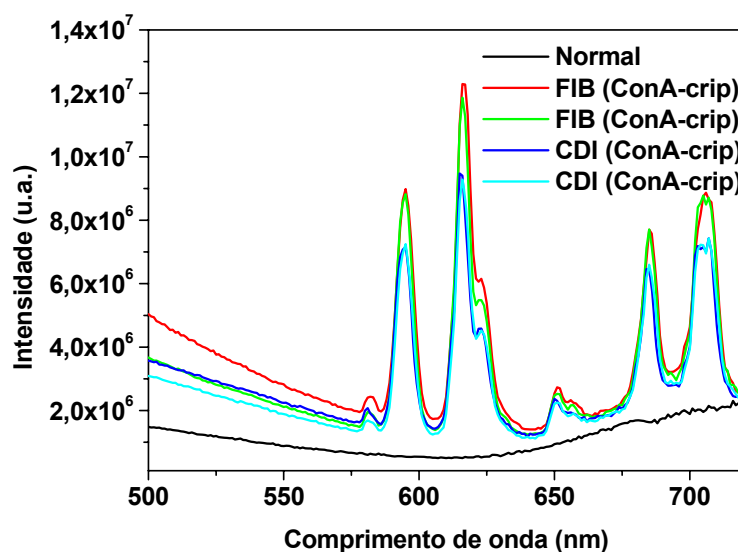
À esquerda, intensidade máxima encontrada em tecidos marcados com UEA-Crip(Eu^{3+}) e Con A-Crip(Eu^{3+}). À direita, espectros mostrando ausência de luminescência em tecidos controle tratados com os mesmos conjugados.

Figura 24 - Espectro de emissão da amostra de fibroadenoma marcada com o conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}).



Secções histológicas com carcinoma ductal invasivo exibiram emissão do íon Eu^{3+} somente para o conjugado Con A-crip(Eu^{3+}). A intensidade da emissão nessas amostras foi reduzida quando comparada com as obtidas por amostras de FIB (Figura 25). No entanto, devido ao reduzido número de amostras analisadas não foi possível realizar estudo estatístico para precisar o valor da significância dessa diferença.

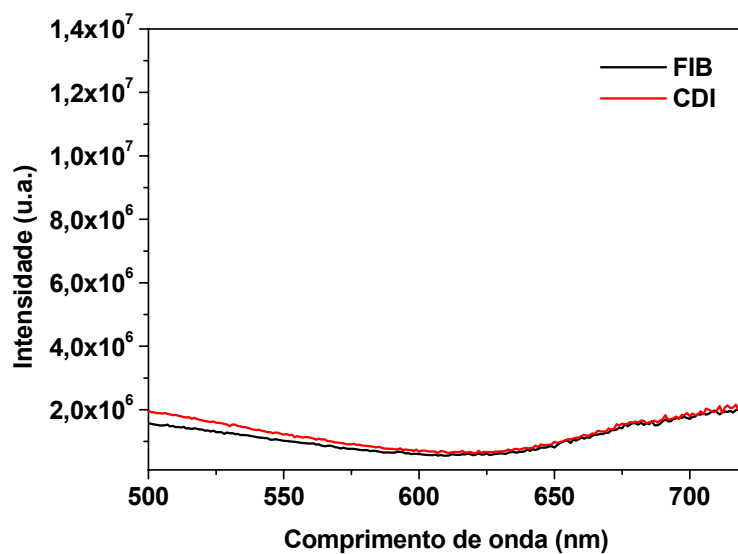
Figura 25 – Comparação entre as diferentes marcações realizadas com o conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}) nos diversos diagnósticos.



A cor das linhas designa o tecido ao qual foi empregado o conjugado: linha preta – tecido controle (normal); linhas vermelha e verde – diferentes amostras de FIB e; linhas azul escuro e azul claro – diferentes amostras de CDI.

A figura 26 mostra ausência da marcação pelo conjugado UEA-I-crip(Eu^{3+}) em tecidos de FIB e CDI.

Figura 26 – Espectro apresenta ausência de emissão do íon Eu^{3+} em tecidos com diagnóstico de FIB e CDI marcados com UEA-I-crip(Eu^{3+})

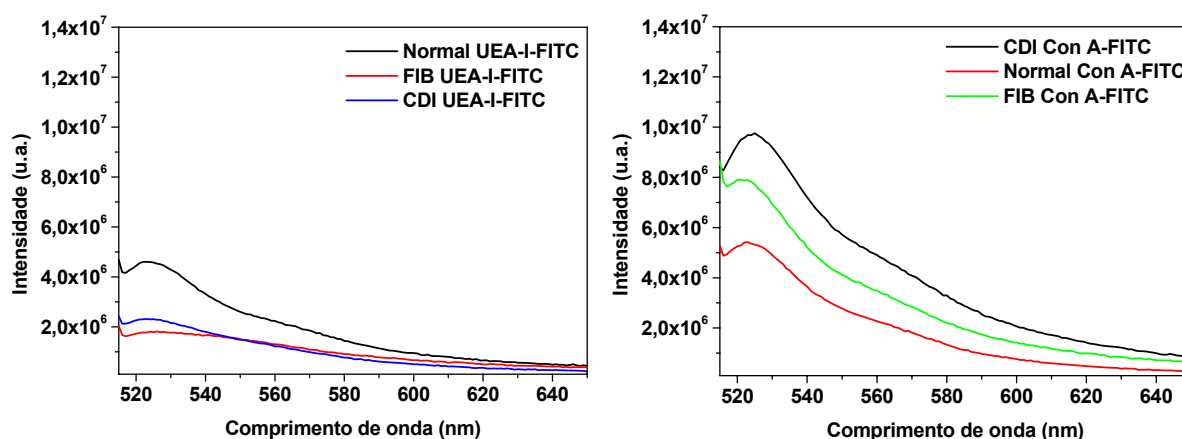


Para comparar as marcações também foram realizadas análises das amostras com as mesmas lectinas conjugadas ao isotiocianato de fluoresceína

(FITC), composto luminescente frequentemente utilizado para marcações fluorescentes. Esse composto possui comprimento de excitação em 490nm e emissão em 521nm (MENDONÇA; DOLCI, 2005).

Os resultados dessas medidas mostraram que houve marcação nos diferentes tipos de amostras com ambos os conjugados. O conjugado UEA-I-FITC marcou com maior intensidade tecido normal, seguido de CDI e FIB, respectivamente (ver figura 27).

Figura 27 – Comparação entre diferentes tecidos marcados com os conjugados UEA-I-FITC e Con A-FITC.



À esquerda, tecidos tratados com UEA-I-FITC; à direita, com Con A-FITC.

Já o conjugado Con A-FITC marcou com maior intensidade CDI, seguido de FIB e tecido normal, nessa ordem (figura 27).

Analisando a marcação da lectina Con A percebe-se que houve marcação acentuada em tecidos transformados, quando comparados com o controle, utilizando tanto os conjugados com FITC quanto com criptato. Diante desses resultados, sugere-se que nos tecidos diagnosticados com fibroadenoma e carcinoma ductal invasivo existe a disponibilidade ou o acesso aos carboidratos identificados pela lectina Con A, D-glicose e D-manose.

Nessa pesquisa, a lectina UEA-I somente marcou tecidos quando conjugados ao FITC, sendo mais acentuada a marcação em tecido normal. UEA-I conjugada ao crip(Eu³⁺), não foi capaz de identificar o açúcar L-fucose nos tecidos estudados.

Carboidratos tais como a glicose e a manose, que são identificados em maiores quantidades em tecidos transformados, são relatados na literatura como sendo resultado da alteração na glicosilação (CAZET *et al.*, 2010).

A glicosilação é um processo essencial para o desempenho das funções normais da célula. Durante o processo oncogênico, assim como em muitos tipos de doenças, ocorrem mudanças no padrão de glicosilação de carboidratos da superfície celular, os quais aumentam em consequência da atividade alterada de glicosiltransferases e glicosidases (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Em 1998, Beltrão e colaboradores estudaram lesões mamárias em mulheres (fibroadenoma, alteração fibrocística e CDI) usando as lectinas Con A e a isoforma 1 de Cramol (específicas para resíduos de manose e glicose). Eles relataram que células de fibroadenoma mostraram um padrão de marcação maior que o observado em células normais. Outro estudo correlacionou a abundância de manose em soro com a progressão do câncer. Foi encontrado que a intensidade de manose é elevada em soro de pacientes e de ratos com câncer de mama, da mesma forma que a intensidade desse açúcar é diminuída após a remoção do tumor (LEOZ *et al.*, 2011).

Entretanto, já é bem documentado o aumento da fucosilação em câncer de mama, o que não foi observado neste estudo usando o criptato de európio (III) como composto luminescente. Investigação de Patel e colaboradores (1990) mostrou a incorporação aumentada de fucose em glicoproteínas de soro de pacientes com câncer de mama. Também Yuan e colegas (2008) estudando várias linhagens celulares de câncer de mama em humanos mostraram que todas as linhagens estudadas apresentaram virtualmente L-fucose na superfície das células. O fato deste estudo não ter identificado L-fucose nos tecidos abordados pode ser relacionado a dificuldade de acesso aos carboidratos, requerendo estudos adicionais para melhor compreensão.

7 CONCLUSÕES

Nesta pesquisa foi realizada a conjugação entre as lectinas, UEA-I e Con A, e o revelador luminescente de marcação, o criptato de Eu^{3+} . Os conjugados obtidos, ou sondas luminescentes, foram caracterizados e analisados através da atividade hemaglutinante, do dicróismo circular e de ensaios de luminescência. A partir do que se concluiu que:

- o CD e AH indicaram que a estrutura secundária e a função biológica da UEA-I e da Con A foram mantidas após a conjugação;
- a luminescência do criptato de Eu^{3+} não sofreu alteração com a conjugação;
- para a conjugação, a proporção de 1 mol de lectina para 2 mols de criptato foi a escolhida para o estudo devido a maior intensidade de luminescência, sem que houvesse interferência na função das lectinas;
- na histoquímica com lectinas (HqL) utilizando o criptato de Eu^{3+} como revelador luminescente da marcação, observou-se uma diferença de marcação entre os tecidos avaliados e as lectinas utilizadas, refletindo uma variação no conteúdo sacarídico específico para a UEA-I e a Con A - presença de resíduos de D-glicose e D-manose em tecidos transformados (fibroadenoma e carcinoma ductal invasivo).;
- utilizando o FITC para comparar as marcações obteve-se que todos os tecidos analisados tiveram marcação positiva, sendo identificados glicose/ manose (via Con A) em maior quantidade em biópsias de CDI e L-fucose (via UEA-I) em tecidos normais;
- usar o criptato de Eu^{3+} como revelador da marcação em HqL torna esta metodologia mais rápida e segura devido a eliminação de etapas como incubação com metanol e revelação com diaminobenzidina (DAB), este último conhecido por seus efeitos neurotóxicos;
- o conjugado Con A-crip(Eu^{3+}) se destaca como sonda luminescente potencial para a histoquímica com lectinas, uma vez que apresentou marcações equivalentes aquelas resultantes do uso do FITC (disponível comercialmente), e ter a vantagem de ser fotoestável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Biology of the Cell. In: _____. **Cancer as a Microevolutionary Process**. 4 ed. New York: Garland science, 2002.

AMBROSI, M.; CAMERON, N. R.; DAVIS, B. G. Lectins: Tools for molecular understanding of the glycode. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 3, n. 9, p. 1593-1698, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY (a). **Cancer Facts & Figures 2011-2012**. Atlanta: American Cancer Society, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: Dez. 2011.

AMERICAN CANCER SOCIETY (b). **Non-cancerous Breast Conditions**. Atlanta: American Cancer Society, 2011. Disponível em: <<http://www.cancer.org/Healthy/FindCancerEarly/WomensHealth/Non-CancerousBreastConditions/non-cancerous-breast-conditions-toc>>. Acesso em: Dez. 2011.

ANTUNES, O. A. C.; WARDELF, J. L.; PIMENTEL, L. C. F. A importância de complexos com lantanídeos para o diagnóstico por ressonância magnética nuclear. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 2, p. 117-120, 2008.

ASADULLAH, K.; KRAMER, F. Biomarkers for intensive care medicine patients: the (stony) path into a bright future? **Biomarkers**, v. 16, S1, p. S1-S4, 2011.

AUDETTE, G. F.; OLSON, D. J. H.; ROSS, A. R. S.; QUAIL, J. W.; DELBAERE, L. T. J. Examination of the structural basis for O (H) blood group specificity by *Ulex europaeus* Lectin I. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 80, n. 8, p. 1010-1021, 2002.

AUDETTE, G. F.; VANDONSELAAR, M.; DELBAERE, L. T. J. The 2.2 Å resolution structure of the O(H) blood-group-specific lectin I from *Ulex europaeus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 304, n. 3, p.423-433, 2000.

BANDEIRA, A. R. G.; BELTRÃO, E. I. C.; PINTO, A. P. A.; COSTA FILHO, A. J.; JÚNIOR, S. A. *et al.* Criptato de Eu(III) conjugado a PNA: Caracterização via dicróismo circular (CD) e estudo fotofísico visando aplicação em histoquímica. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza. **Anais da 32ª Reunião Anual da SBQ (Sociedade Brasileira de Química)**, 2009.

BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 125-134, 1998.

BELTRÃO, E. I. C.; CABRAL, T. A.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B.; CARVALHO JUNIOR, L. B. de. Infiltrating ductal mammary carcinoma: a lectin

histochemistry study. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 46, n. 1, p. 32-35, 2001.

BELTRÃO, E. I. C.; MEDEIROS, P. L.; FIGUEREDO-SILVA, J.; VALENÇA, M. M.; COELHO, L. C. B. B.; CARVALHO JUNIOR, L. B. de. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. **European Journal of Histochemistry**, v. 47, n. 2, p. 139-142, 2003.

BERNARDES, A. Anatomia da mama feminina. In: OLIVEIRA, C. F. **Manual de Ginecologia**, v. 2. Lisboa: Permanyer Portugal, 2011.

BLOMME, B.; STEENKISTE, C. V.; CALLEWAERT, N.; VLIERBERGHE, H. V. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 50, n. 3, p. 592-603, 2009.

BRUNET, E.; JUANES, O.; RODRIGUEZ-UBIS, J. C. Supramolecularly Organized Lanthanide Complexes for Efficient Metal Excitation and Luminescence as Sensors in Organic and Biological Applications. **Current Chemical Biology**, v. 1, n. 1, p. 11-39, 2007.

CALADO, S. S.; ABREU E LIMA, M. C. C. Estudo morfológico dos fibroadenomas da mama: uma análise comparativa entre grupos etários. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 6, p. 411-419, 2004.

CAMPOS, L. M.; CAVALCANTI, C. L. B.; LIMA-FILHO, J. L.; CARVALHO, L. B.; BELTRÃO, E. I. C. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. **Biomarkers**, v. 11, n. 5, p. 480-484, 2006.

CAZET, A.; JULIEN, S.; BOBOWSKI, M.; BURCHELL, J.; DELANNOY, P. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 3, p. 204, 2010.

CHEN, D.; MITTLER, M.; LETKOWITZ, M. A.; EISENBERG, M. B.; BLACK, K. S.; WOLDENBERG, R. W.; FARMER, P.; YI LI, J. Breast Carcinoma Metastasizes to Brain-Three Unique Cases. **The Internet Journal of Pathology**, v. 12, n. 1, 2011.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L.; SCHOEN, F. J. **Patologia estrutural e funcional** – Robbins. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 1996.

COURTILLOT, C.; PLU-BUREAU, G.; BINART, N.; BALLEYGUIER, C.; SIGAL-ZAFRANI, B.; GOFFIN, V.; KUTTENN, F.; KELLY, P. A.; TOURAINE, P. Benign breast diseases. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 10, n. 4, p. 325-335, 2005.

DEACON, A.; GLEICHMANN, T.; KALB (GILBOA), A. J.; PRICE, H.; RAFTERY, J.; BRADROOK, G.; YARIV, J.; HELLIWELL, J. R. The structure of concanavalin A and its bound solvent determined with small-molecule accuracy at 0.94 Å resolution. **Journal of Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 93, n. 24, p. 4305-4312, 1997.

DOMENEGHINI, C.; ARRIGHI, S.; RADAELLI, G.; BOSI, G.; VEGGETTI, A. Histochemical analysis of glycoconjugate secretion in the alimentary canal of *Anguilla anguilla* L. **Acta Histochemica**, v. 106, n. 6, p. 477-487, 2005.

DUPONT, W. D.; PAGE, D. L.; PARL, F. F.; VNENCAK-JONES, C. L.; PLUMMER, W. D.; RADOS, M. S.; SCHUYLER, P. A. Long-term risk of breast cancer in women with fibroadenoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 1, p. 10-15, 1994.

FUSTER, M. M.; ESKO, J. D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 7, p. 526-542, 2005.

GALLEGOS, B.; PÉREZ-CAMPOS, E.; MARTINEZ, R.; LEYVA, P.; MARTINEZ, M.; HERNÁNDEZ, R.; PINA, S.; HERNÁNDEZ, C.; ZENTENO, E.; HERNÁNDEZ, P. O-Glycosylation expression in fibroadenoma. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 40, n.1, p. 1-12, 2010.

GEMEINER, P.; MISLOVICOVÁ, D.; TKÁC, J.; SVITEL, J.; PÄTOPRSTÝ, V.; HRABÁROYÁ, E.; KOGAN, G.; KOZÁR, T. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 1-15, 2009.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 3, p.236-247, 2011.

GILL, G. W. H & E Staining: oversight and insights. In: KUMAR, G. L.; KIERNAN, J. A. **Special Stain and H & E Second Edition**. Dako: p. 119-130, 2010. Disponível em: < http://www.dako.com/08066_guide_to_special_stains.pdf>. Acesso em: Jan. 2012.

GUIMARÃES, M. T.; MELO-JÚNIOR, M. R.; COSTA SILVA, R. B.; CAVALCANTI, C. B. L.; BELTRÃO, E. I. C. Estudo comparativo da expressão de carboidratos no sistema ovo-granuloma hepático na esquistossomose humana e experimental. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 1, p. 59-63, 2008.

GURAY, M.; SAHIN, A. Benign breast disease: classification, diagnosis and management. **The Oncologist**, v. 11, n. 5, p. 435-449, 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 149, p. 646-674, 2011.

HODGES, K. B.; ABDUL-KARIN, F. W.; WANG, M.; LOPEZ-BELTRAN, A.; MONTIRONI, R.; EASLEY, S.; ZHANG, S.; WANG, N.; MACLENNAN, G. T.; CHENG, L. Evidence for transformation of fibroadenoma of the breast to malignant phyllodes tumor. **Applied Immunohistochemistry Molecular Morphology**, v. 17, n. 4, p. 345-350, 2009.

INCA. Estimativa 2012: **Incidência de câncer no Brasil**, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, 2011.

ISKRATSCH, T.; BRAUN, A.; PASCHINGER, K.; WILSON, I. B. H. Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. **Analytical Biochemistry**, v. 386, n. 2, p. 133-146, 2009.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.

KUMAR, R. A clinicopathologic study of breast lumps in Bhairahwa, Nepal. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 11, n. 4, p. 855-858, 2010.

KUPLICH, M. D. **Síntese de novos heterociclos benzazólicos fluorescentes e sua incorporação em matrizes de celulose**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. Dissertação (Mestrado em Química).

LEATHEM, A.; ATKINS, N. Lectin binding to formalin-fixed paraffin sections. **Journal of Clinical Pathology**, v. 36, n. 7, p. 747-750, 1983.

LEI, H. Y.; CHANG, C. P. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. **Journal of Biomedical Science**, v. 16, n. 10, p. 1-12, 2009.

LEOZ, M. L. A.; YOUNG, L. J. T.; AN, H. J.; KRONEWITTER, S. R.; KIM, J.; MIYAMOTO, S.; BOROWSKY, A. D.; CHEW, H. K.; LEBRILLA, C. B. High-mannose glycans are elevated during breast cancer progression. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 10, doi:10.1074/mcp.M110.002717.

LEVENSON, V. V. Biomarkers for early detection of breast cancer: What, when and where? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 6, p. 847-856, 2007.

LIGHT-WAHL, K. J.; WINGER, B. E.; SMITH, R. D. Observation of the multimeric forms of Concanavalin A by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 13, p. 5869-5870, 1993.

LIMA, A. L. R.; CAVALCANTI, C. L. B.; SILVA, M. C. C.; PAIVA, P. V. G.; COELHO, L. C. B. B.; BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Article ID 179817: 6 pages, 2010.

MAHMOUDI, A.R.; SHABAN, E.; GHODS, R.; JEDDI-TEHRANI, M.; EMAMI, S.; RABBANI, H.; ZARNANI, A. H.; MAHMOUDIAN, J. Comparison of photostability and photobleaching properties of FITC- and Dylight488- conjugated Herceptin. **International Journal of Green Nanotechnology**, v. 3, n. 4, p. 264-270, 2011.

MARTINKOVA, J.; GADHER, S. J.; HAJDUCH, M.; KAVAROVA, H. Challenges in cancer research and multifaceted approaches for cancer biomarker quest. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 583, n. 11, p. 1772-1784, 2009.

MARTINS, R. F.; NERI, C. R.; SOUSA FILHO, P. C.; SERRA, O. A. Estudos fotoluminescentes em compostos de íons terras raras coordenados por um derivado carbazólico. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2118-2123, 2010.

MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C. Terras raras: aplicações industriais e biológicas. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 11-117, 2005.

MAURYA, S. D.; AGGARWAL, S.; DHAKAR, R. C.; TILAK, V. K.; PRAJAPATI, S. K. Targeted delivery of drug to the colon with lectins and neoglycoconjugates: a review. **International Journal of Pharmaceutical Science and Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 178-194, 2010.

MEISNER, A. L. W.; FEKRAZAD, M. H.; ROYCE, M. E. Breast disease: benign and malignant. **Medical Clinics of North America**, v. 92, n. 5, p. 1115-1141, 2008.

MELO-JÚNIOR, M. R.; ARAÚJO-FILHO, J. L.; PATU, V. J. R.; MACHADO, M. C. F.; MELLO, L. A. Langerhans cells in cutaneous tumours: immunohistochemistry study using a computer image analysis system. **Journal of Molecular Histology**, v. 37, n. 8-9, p. 321-325, 2006.

MENDONÇA, J. C.; DOLCI, J. E. L. Imunofluorescência para neuropeptídeos na mucosa nasal humana: avaliação de técnica para peptídeo intestinal vasoativo (VIP). **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 71, n. 2, p. 123-131, 2005.

MENEZES, E. H. S. C. **Criptatos de Ln(III) conjugados à Concanavalina A: marcadores ópticos de tecidos mamários humanos**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2007. Dissertação (Mestrado em Química).

MISEK, D. E.; KIM, E. H. Protein Biomarkers for early detection of breast cancer. **International Journal of Proteomics**, v. 2011, Article ID 343582, 9 pages, 2011. doi:10.1155/2011/343582

MISLOVICOVÁ, D.; GEMEINER, P.; KOZAROVA, A.; KOZÁR, T. Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. **Biologia**, v. 64, n. 1, p. 1-19, 2009.

MOORE, E. G.; SAMUEL, A. P. S.; RAYMOND, K. N. From antenna to assay: lessons learned in lanthanide luminescence. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 4, p. 542-552, 2009.

MORENO, F. B. M. B. **Estudos estruturais de uma lectina presente em sementes de *Lotus tetragonolobus***. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista, 2008. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular).

NAISMITH, J. H.; FIELD, R. A. Structural Basis of Trimannoside Recognition by Concanavalin A. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 2, p. 972-976, 1996.

NAKAEMA, M. K. K.; SANCHES, R. Fluorometria no domínio da frequência. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 412-416, 1999.

NAZARO, A. C. P.; REGO, M. F.; OLIVEIRA, V. M. Nódulos benignos da mama: uma revisão dos diagnósticos diferenciais e conduta. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 4, p. 211-219, 2007.

PATEL, P. S.; BAXI, B. R.; ADHVARYU, S. G.; BALAR, D. B. Evaluation of serum sialic acid, heat stable alkaline phosphatase and fucose as markers of breast cancer. **Anticancer Research**, v. 10, n. 4, p. 1071-1074, 1990.

PINTO, V. P. T.; TEIXEIRA, E. H.; TEIXEIRA, A. H.; CARNEIRO, V. A.; CRISTINO-FILHO, G.; DUS, D.; DEBRAY, H.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. Lectins isolated from Brazilian beans as markers of membrane glycoconjugates of human colon cancer cells. **Journal of Cancer Research and Experimental Oncology**, v. 2, n. 5, p. 54-59, 2010.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 11, p. 3155-3163, 2007.

POTAPENKO, I. O.; HAAKENSEN, V. D.; LÜDERS, T.; HELLAND, A.; BUKHOLM, I.; SORLIE, T.; KRISTENSEN, V. N.; LINGJAERDE, O. C.; BORRESEN-DALE, A. C. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. **Molecular Oncology**, v. 4, n. 2, p. 98-118, 2010.

Protein Data Bank (PDB). Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em: Dez. 2011.

RAO, S.; LATHA, P. S.; RAVI, A.; THANKA, J. Ductal carcinoma in a multiple fibroadenoma: diagnostic inaccuracies. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 6, n. 3, p. 385-387, 2010.

RÊGO, M. J. B. M. Avaliação do glicocódigo do carcinoma ductal invasivo mamário e sua correlação com dados clínicos e histopatológicos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 12, p. 626-626, 2009.

ROBINSON, J. P.; STURGIS, J.; KUMAR, G. L. Immunofluorescence. In: KUMAR, G. L.; RUDBECK, L. **Immunohistochemical staining methods fifth edition**, California: Dako North America, 2009.

SÁ, G. F.; MALTA, O. L.; MELLO DONEGÁ, C.; SIMAS, A. M.; LONGO, R. L.; SANTA-CRUZ, P. A.; SILVA JR, E. F. Spectroscopic properties and design of highly luminescent lanthanide coordination complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 196, n. 1, p. 165-195, 2000.

SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; MENEZES, F. D.; FERREIRA, R. C.; JÚNIOR, S. A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; CARVALHO, L. B.; BELTRÃO, E. I. C. CdS-Cd(OH)₂ core shell quantum dots functionalized with concanavalin A lectin for recognition of mammary tumor. **Physica Status Solidi, (c)**, v. 3, n. 11, p. 4017-4022, 2006.

SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ. Disponível em: <www.saude.pr.gov.br>. Acesso em: Dez. 2011.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 5, p. 2753-2764, 2007.

SHARON, N. Lectins: past, present and future. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 6, p. 1457-1460, 2008.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53-62, 2004.

SOBRAL, A. P. V.; RÊGO, M. J. B. M.; CAVALCANTI, C. L. B.; CARVALHO JÚNIOR, L. B.; BELTRÃO, E. I. C. Con A and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. **Journal of Oral Science**, v. 52, n. 1, p. 49-54, 2010.

SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DIAS, I. L. T.; LANZA, M. R.; MOREIRA, A. B.; KUBOTA, L. T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1755-1774, 2008.

SUMNER, J.; HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 2, p. 227-237, 1936.

TEPPO, L. Problems and possibilities in the use of cancer data by GIS experience in Finland. In: GATRELL, A.; LÖYTÖNEN, M. **GIS and Health**. London and Philadelphia: Taylor and Francis e-Library, 2003.

TIMM, L. L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI**, v. 2, n. 1, p. 231-239, 2005.

TOILLON, R. A.; LAGADEC, C.; PAGE, A.; CHOPIN, V.; SAUTIERE, P. E.; RICORT, J. M.; LEMOINE, J.; ZHANG, M.; HONDERMARCK, H.; BOURHIS, X. E. Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth Factor-binding protein-3 and Maspin. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 6, n. 7, p. 1239-1247, 2007.

VILA NOVA, S. P. **Novos macrociclos de lantanídeos: marcadores fotônicos projetados para aplicações biotecnológicas**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003. Tese (Doutorado em Química).

WAKEEL, H. E.; UMPLEBY, H. C. Systematic review of fibroadenoma as a risk factor for breast cancer. **The Breast**, v. 12, n. 5, p. 302-307, 2003.

WANG, Y.; GILDERSLEEVE, J. C.; BASU, A.; ZIMMT, M. B. Photo- and biophysical studies of lectin-conjugated fluorescent nanoparticles: reduced sensitivity in high density assays. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 45, p. 14487-14494, 2010.

WARD, L. S. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, vol 46, n. 4, p. 351-360, 2002.

WEISZFLOG, W. **Moderno dicionário da língua portuguesa**. São Paulo: Editora Melhoramentos LTDA, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Cancer Report 2008. **International Agency for Research on Cancer**, 2008. Disponível em:

<<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/index.php>>. Acesso em: Set. 2011.

WU, A. M.; LISOWSKA, E.; DUK, M.; YANG, Z. Lectins as tools in glycoconjugate. **Glycoconjugate Journal**, v. 26, n. 8, p. 899-913, 2009. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/m7kn11917mp21141/>>. Acesso em: Abr. 2011.

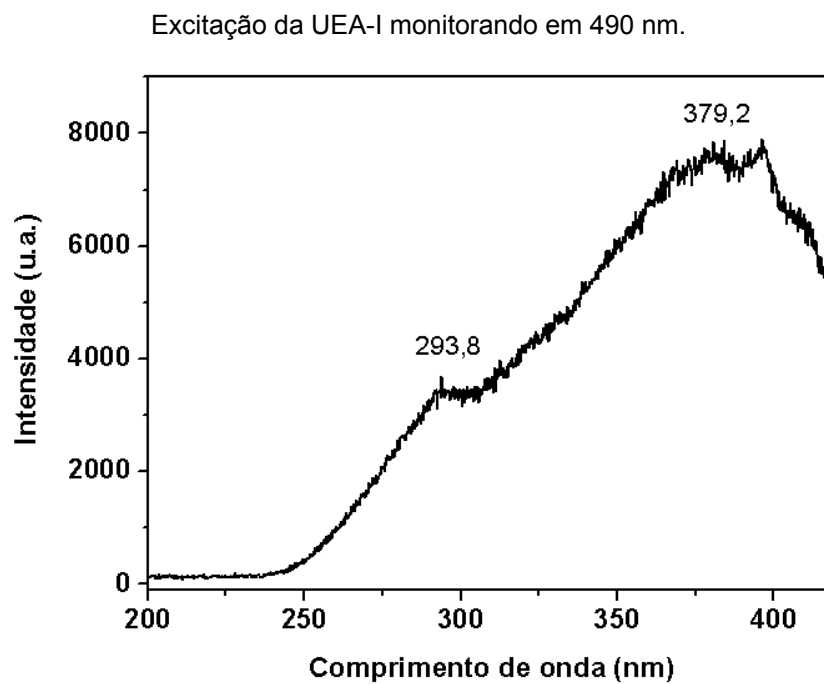
YAN, B.; XU, B. Spectroscopic study on the photophysical properties of lanthanide complexes with long chain mono-docosyl phthalate. **Journal of Fluorescence**, v. 15, n. 4, p. 619-626, 2005.

YUAN, K.; LISTINSKY, C. M.; SINGH, R. K.; LISTINSKY, J. J.; SIEGAL, G. P. Cell surface associated alpha-L-fucose moieties modulate human breast cancer neoplastic progression. **Pathology and Oncology Research**, v. 14, n. 2, p. 145-156, 2008.

ZINK, D.; FISCHER, A.; NICKERSON, J. A. Nuclear structure in cancer cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 9, p. 677-687, 2004.

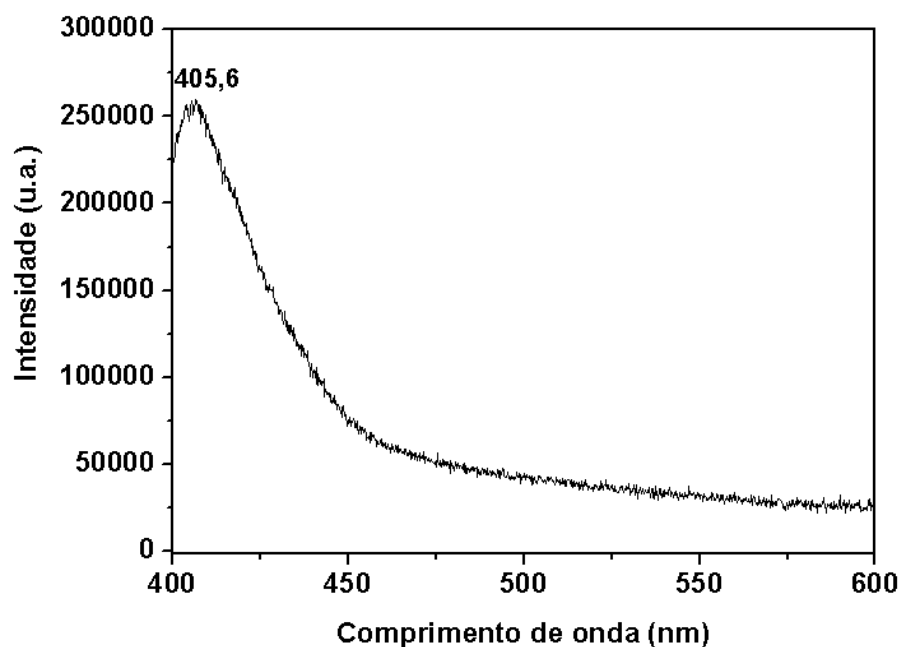
APÊNDICES

APÊNDICE A. Espectro de excitação da lectina UEA-I em solução monitorada em 490nm.

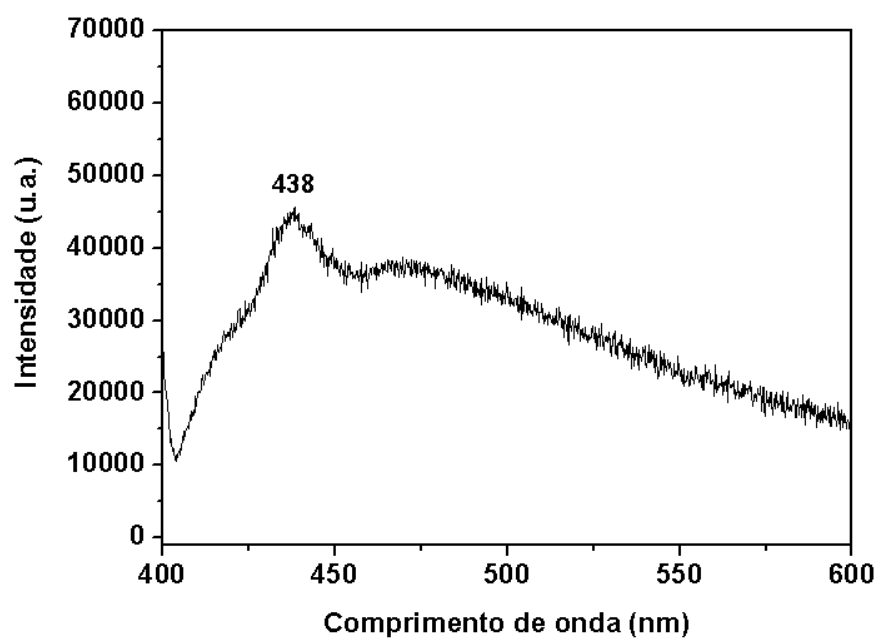


APÊNDICE B. Espectros de emissão da lectina UEA-I, em solução, com excitação em 293,8 nm e 379,2 nm.

Emissão da lectina UEA-I, excitando em 293,8 nm.

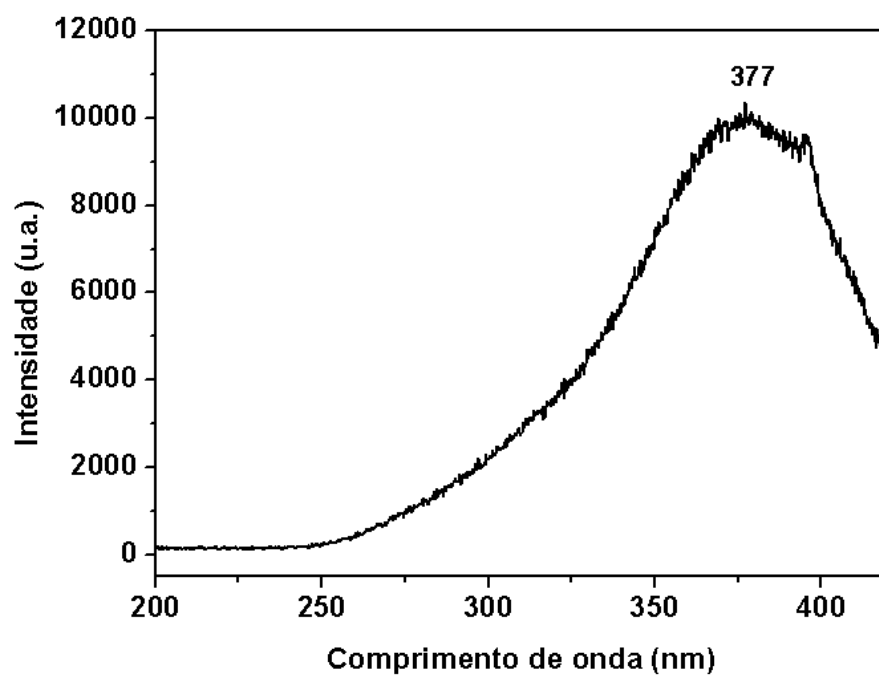


Emissão da lectina UEA-I, excitando em 379,2 nm.

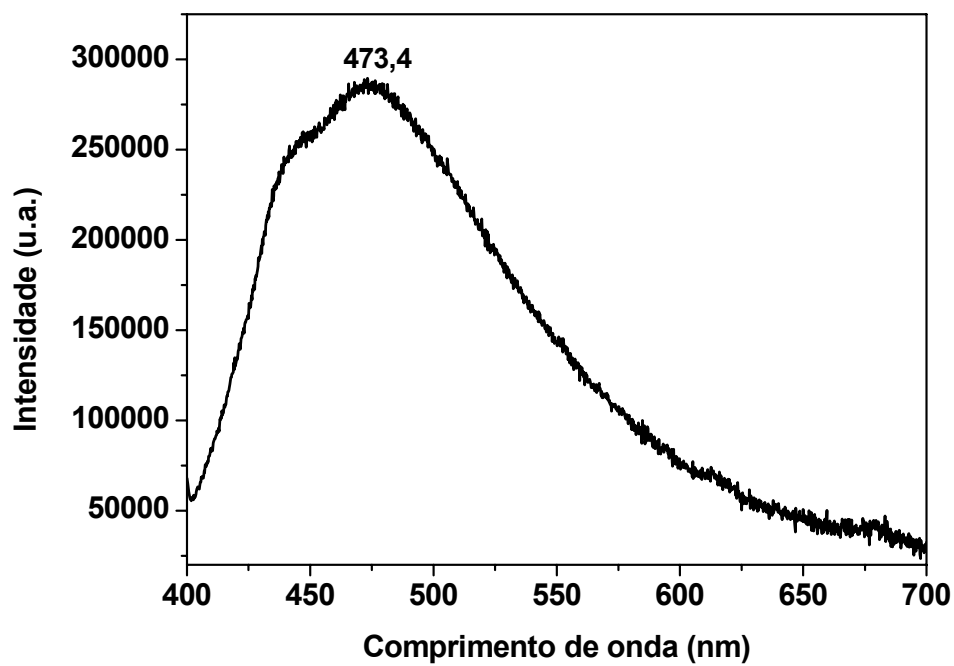


APÊNDICE C. Espectros de excitação e emissão da lectina Con A em solução.

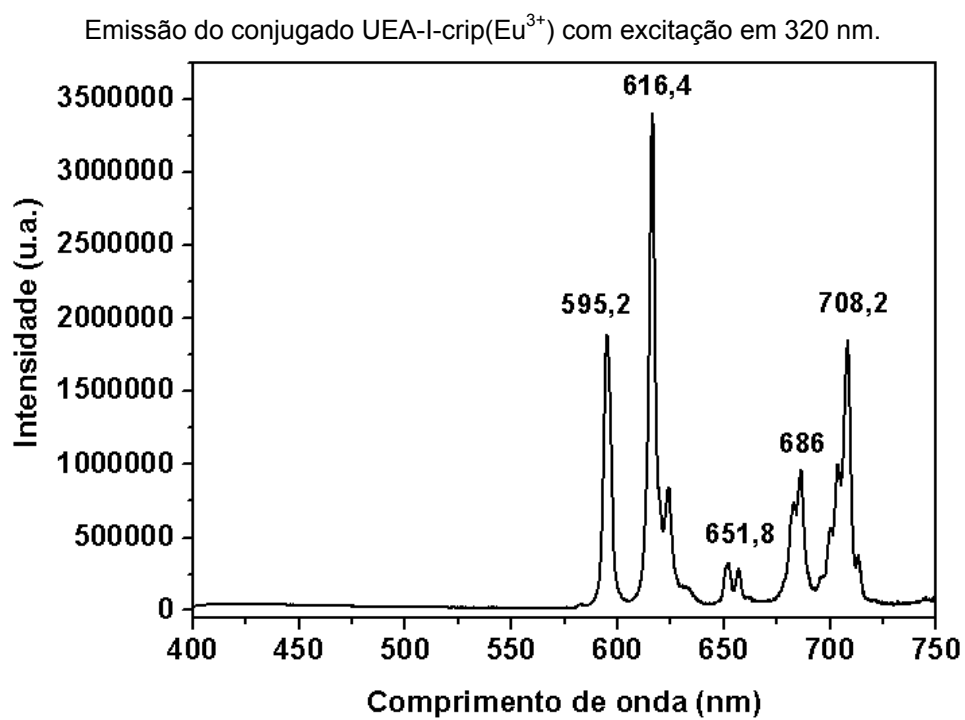
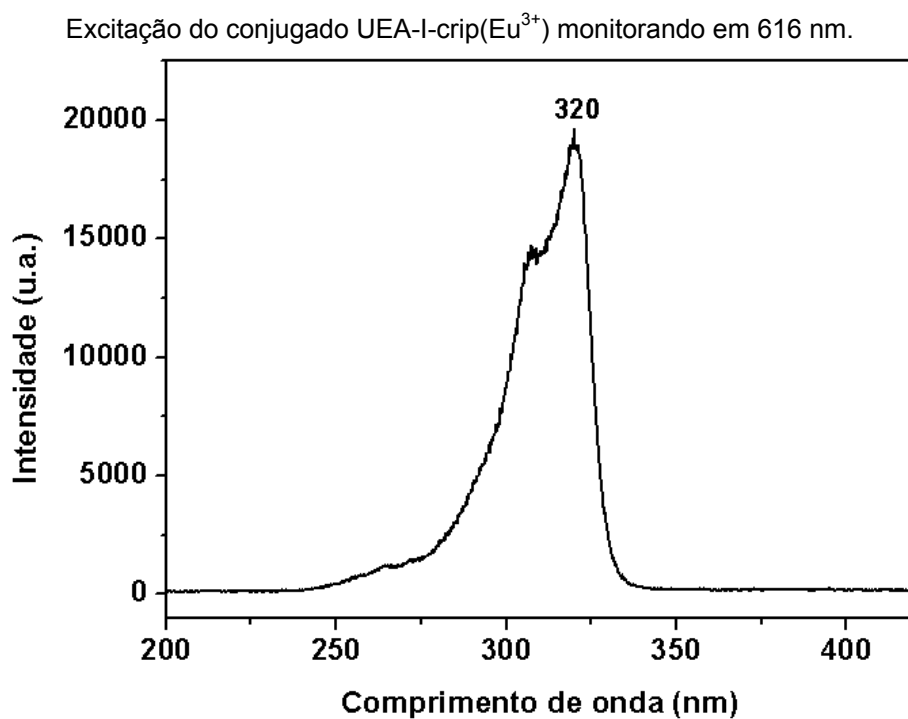
Excitação da Con A monitorando em 490nm.



Emissão da Con A com excitação em 377 nm.

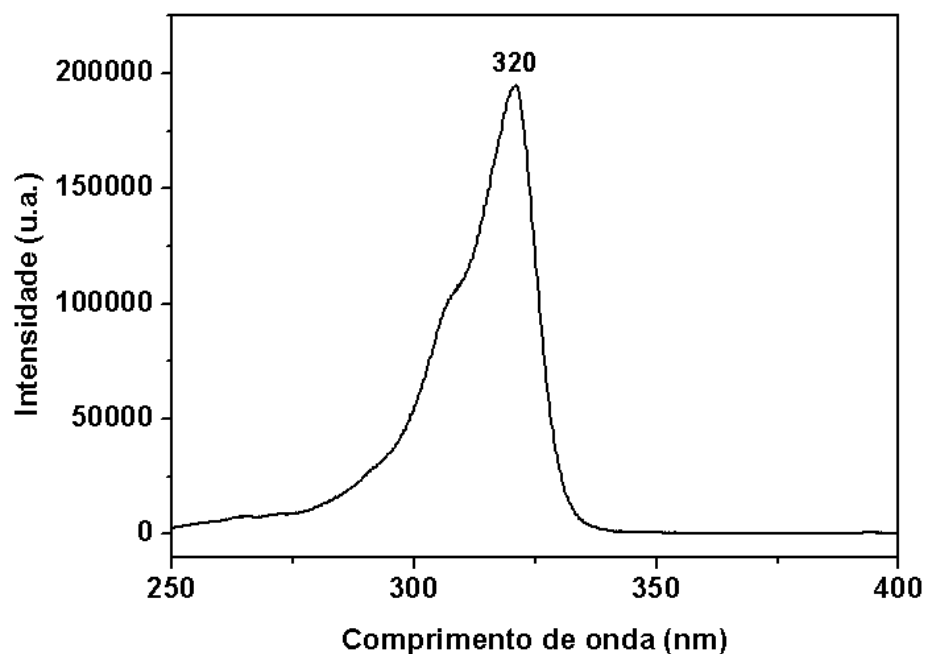


APÊNDICE D. Espectros de excitação e emissão do conjugado UEA-I-crip(Eu³⁺) em solução

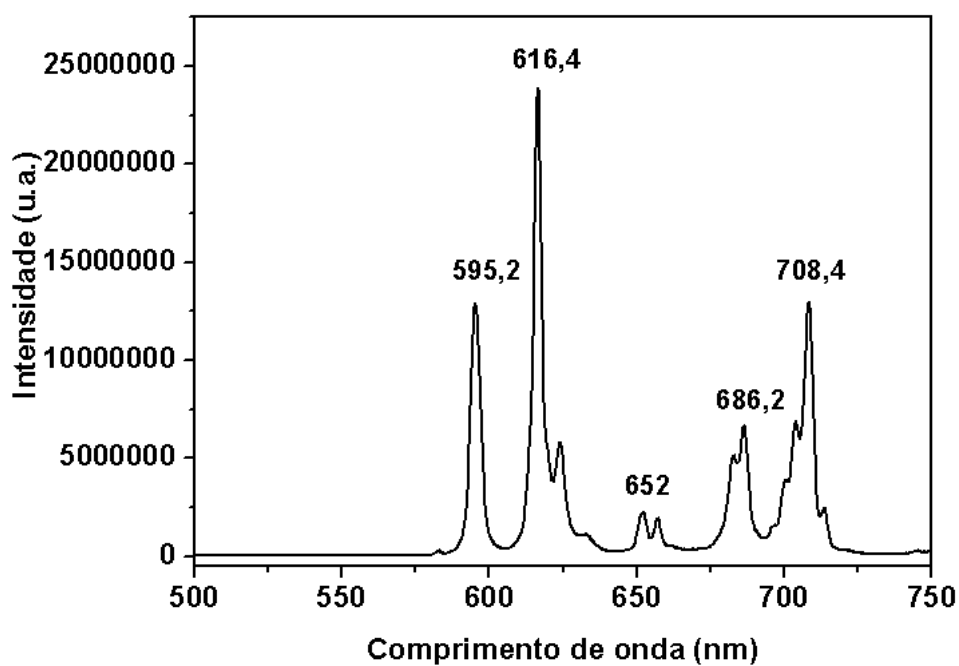


APÊNDICE E. Espectros de excitação e emissão do conjugado Con A-crip(Eu^{3+}) em solução

Excitação do conjugado Con A-crip(Eu^{3+}) monitorando em 616 nm.



Emissão do conjugado Con A-crip(Eu^{3+}) com excitação em 320 nm.



APÊNDICE F. Artigos resultantes deste trabalho.

Artigo aceito para publicação pela **Revista Saúde.com**

**AVALIAÇÃO DE LECTINAS CONJUGADAS A CRIPTATOS DE
EURÓPIO (III) EM TECIDOS MAMÁRIOS HUMANOS EMPREGADAS
EM HISTOQUÍMICA**

**EVALUATION OF LECTINS CONJUGATED TO CRYPTATES OF
EUROPIUM (III) IN HUMAN BREAST TISSUES IN HISTOCHEMISTRY.**

***Avaliação de lectinas conjugadas a criptatos de európio (iii) em
tecidos mamários humanos em histoquímica.***

Ana Rosa Galdino Bandeira^{1,2}

Juliana Mendes Brandão²

Juliana Lúcia de Albuquerque Vasconcelos²

Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti²

Severino Alves Júnior¹

Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{2,3}

Resumo

Lectinas são (glico)proteínas que reconhecem açúcares de modo específico e reversível. Essas moléculas têm sido utilizadas como sondas auxiliares no diagnóstico de diversas doenças, inclusive neoplasias, conjugadas a diferentes marcadores, dentre eles, os criptatos de lantanídeos. Na histoquímica tradicional utilizam-se corantes para visualização da morfologia dos tecidos, porém esse método é subjetivo. Neste artigo foi proposta uma otimização da técnica histoquímica com lectinas utilizando as lectinas (Con A, UEA-I, PNA e WGA) conjugadas ao criptato de európio (III) como sondas histoquímicas luminescentes auxiliares. Foram utilizadas biópsias de fibroadenoma, um tumor benigno muito incidente em mulheres jovens. Os resultados obtidos indicaram que a glicerina pode ser utilizada como material de fixação para lamínulas sem interferir na emissão do íon európio (III), além disso, apresentou melhor preservação do tecido em análise. Dentre os quatro conjugados utilizados, apenas os conjugados Con A-criptato e UEA-I-criptato apresentaram marcação nos tecidos com fibroadenoma sem corantes, sugerindo que isso ocorra devido à expressão de carboidratos presentes nos tecidos usados para o experimento.

Palavras-chave: lectinas, criptato de európio (III), histoquímica, hematoxilina, eosina, fibroadenoma.

Abstract

Lectins are glycoproteins that bind sugars specifically and reversibly. These molecules have been used as probes to aid in the diagnosis of several diseases, including neoplasia. They are usually combined with different substances with luminescent properties, among them the lanthanide cryptates. In traditional histochemical stains are used to visualize the morphology of tissues, but this method is subjective. This paper proposed an optimization technique lectin histochemistry using lectins (Con A, UEA-I, PNA and WGA) conjugated with europium (III) cryptate in order obtain luminescent histochemical probes to allow the pathologist assistants safer diagnosis of pathologies. Histochemistry was used in biopsies of fibroadenoma, a benign tumor very incident in young women. The results indicate that glycerine can be used as material of attachment to coverslips without interfering with the emission of Eu^{3+} ions, furthermore showed better preservation of tissue analyzed. The conjugates Con A- Eu^{3+} cryptate and UEA-I- Eu^{3+} cryptate recognized glucose/mannose and L-fucose residues in fibroadenoma suggesting that this is due to the carbohydrates expression in tissues used for the experiment.

Keywords: lectins, cryptate of europium (III), histochemistry, haematoxylin, eosin, fibroadenoma.

Introdução

Lectina denomina um grupo de (glico)proteínas com habilidade de se ligar reversível e especificamente a estruturas mono ou oligossacarídicas, encontrada em diferentes plantas, invertebrados e animais¹. As lectinas podem ser empregadas como instrumento de estudos de glicoconjugados na superfície celular onde os carboidratos tem papel importante durante o crescimento e a diferenciação celular, interação entre células e com o meio ao redor, além de processos patológicos.²

Estudos demonstram que carboidratos da superfície celular podem funcionar como carreadores de informação biológica³, uma vez que o padrão de glicosilação de proteínas celulares é influenciado por várias alterações fisiológicas ou vice-versa. Um exemplo dessas evidências é a glicosilação anormal detectada no diagnóstico do câncer.⁴ Devido ao fato da interação lectina-carboidrato ocorrer no citoplasma e/ou na superfície das células, ou mesmo em fluidos fisiológicos², o uso de lectinas para identificação de modificações nos padrões de expressão de carboidratos de glicoproteínas de superfície celular pode contribuir no diagnóstico e prognóstico de processos neoplásicos.⁵ Um grande número de lectinas tem sido empregado como ferramenta histoquímica no diagnóstico histopatológico em tecidos humanos da cavidade oral⁶, do cérebro⁷, da mama^{8,9,10,11}, de próstata¹², dentre outros.

Essas lectinas na maioria das vezes são utilizadas conjugadas a moléculas com propriedades enzimáticas, luminescentes ou quimioluminescentes como, por exemplo, peroxidase, isotiocianato de fluoresceína, ésteres de acridinas, entre outros^{6,10,12,13}.

Os criptatos de lantanídeos são complexos com propriedades luminescentes que absorvem radiação no ultravioleta e emitem no visível. Devido a essa capacidade vêm sendo usados como sondas espectroscópicas no estudo de biomoléculas e de suas funções¹⁴. Criptatos de európio (III) – criptato de Eu^{3+} – conjugados a lectinas já foram utilizados como marcadores moleculares para aplicação em ensaios histoquímicos¹³.

A técnica de histoquímica convencional utiliza como ferramenta de avaliação a morfologia das células e dos tecidos, auxiliada por corantes. Os corantes mais utilizados nos procedimentos histológicos são a hematoxilina e a eosina (HE)¹⁵. No

entanto, diagnósticos morfológicos são subjetivos, uma vez que aspectos morfológicos de um tumor podem mascarar o seu verdadeiro comportamento biológico¹⁶.

Doenças benignas da mama representam um grupo heterogêneo de lesões que incluem desenvolvimento anormal, lesões inflamatórias, proliferação epitelial e neoplasma, sendo o fibroadenoma a lesão mais comum da mama¹⁷.

Este trabalho objetivou otimizar o protocolo de histoquímica com lectinas, já descrito por Beltrão e colaboradores (2001), para utilização de um novo marcador, o criptato de Eu^{3+} , conjugado a diferentes lectinas, a fim de fornecer uma nova ferramenta auxiliar no diagnóstico de patologias.

Materiais e Métodos

Materiais

As lectinas *Canavalia ensiformis* (Con A), *Ulex europaeus I* agglutinin (UEA-I), *Triticum vulgaris* agglutinin (WGA) e *Arachis hypogea* agglutinin (PNA), específicas para D-glicose/D-manose, L-fucose, N-acetilglicosamina e D-galactose^{18,19}, respectivamente, foram adquiridas comercialmente (Sigma, USA). Os criptatos de európio foram sintetizados no Laboratório de Terras Raras (BSTR) do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Biópsias (n=15) de fibroadenoma, fixadas em formalina e embebidas em parafina, foram obtidas do Setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas – UFPE e utilizadas sob aprovação do Comitê de Bioética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (SISNEP FR – 272931, CEP/CCS/UFPE N° 195/09).

Conjugação lectinas-criptatos

A conjugação das lectinas com os criptatos de Eu^{3+} foi realizada utilizando-se os grupamentos carboxílicos dos resíduos de aminoácidos disponíveis na estrutura das lectinas e o grupamento etilenodiamina disponível na estrutura dos criptatos de Eu^{3+} . Cada solução de lectina (200µg/mL) foi incubada com uma solução de criptato de Eu^{3+} (0,13 – 0,88mg) em tampão fosfato de sódio 10mM (PBS), contendo 0,15M

de NaCl, pH 7,2, por 2h a 25°C. Posteriormente a solução de conjugados foi submetida à diálise por 16h, sob agitação, a 4°C.

Atividade Hemaglutinante (AH)

A atividade biológica das lectinas (reconhecimento a carboidratos) foi analisada com ensaios de hemaglutinação em placas de microtitulação. Em cada poço da placa foi adicionado 50µL da solução de NaCl 0,15 M. A partir do segundo poço foi adicionado 50µL da amostra (lectina e/ou lectinas conjugadas ao criptato) realizando uma diluição seriada. Por fim, foi adicionado 50 µL de eritrócitos de coelho e/ou eritrócitos humanos glutarizados em todos os poços da placa. Após 45 minutos a 25°C foi realizada a determinação do título da AH²⁰.

Histoquímica com Lectinas (HqL) e com Hematoxilina e Eosina (H.E.)

Cortes de 4µm de fibroadenoma foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100-70%), sendo tratados com uma solução de tripsina 0,1% (p/v) a 37°C por 2 minutos e depois incubados com os conjugados lectinas-criptatos (Con A, UEA-I, PNA e WGA -200 µg/mL) por 2 horas a 4°C. Todas as soluções foram preparadas em PBS e após cada etapa do protocolo os cortes foram lavados por imersão em PBS (2 x 5 minutos cada). PBS e glicerina foram avaliados como material para preservação dos tecidos e influência na visualização do tecido após a HqL.

Análise Espectroscópica

As análises de marcação dos tecidos foram realizadas num protótipo fluorimétrico desenvolvido no Laboratório de Laser e Aplicações, no Instituto de Física da Universidade de São Paulo em São Carlos-SP, composto por uma fonte de excitação e um sistema de filtros ópticos capazes de selecionar a energia requerida para a excitação. O sistema de detecção é composto por uma fotomultiplicadora acoplada a um sistema de contagem de fótons e outro sistema de filtros intercambiáveis, cuja seleção depende do íon lantanídeo utilizado na conjugação a lectina. As mesmas amostras de tecidos utilizadas na HqL foram utilizadas para H.E.

Resultados e Discussão

A eficiência do método de conjugação das lectinas ao criptato de európio(III) foi confirmada, uma vez que as linhas espectrais características do íon Eu^{3+} aparecem nos espectros de todos os conjugados avaliados. A atividade hemaglutinante para todos os conjugados foi mantida indicando que o método de conjugação não impediu a capacidade de reconhecimento de carboidratos específicos pelas lectinas utilizadas.

Não houve interferência na emissão do íon Eu^{3+} quanto ao uso do PBS e da glicerina como material fixador da lamínula. No entanto, observou-se que o tecido é mais bem preservado quando a glicerina é o material de escolha.

Em todos os tecidos marcados com os conjugados lectina-criptato avaliados e corados com hematoxilina e eosina (H.E.), a emissão do íon európio (III) não foi observada. Além disso, observou-se uma banda em aproximadamente 547 nm, sugerindo a emissão dos corantes H.E. Essa ausência da fluorescência do íon Eu^{3+} pode ser devido à influência da fluorescência dos componentes dos corantes, principalmente, a eosina, uma vez que a fluoresceína faz parte da sua composição²¹. O isotiocianato de fluoresceína (FITC), um dos primeiros reveladores fluorescentes utilizados, apresenta emissão de fluorescência verde clara quando excitado por comprimento de onda na região de 490nm²². O íon Eu^{3+} também apresenta sua luminescência na região do visível, vermelho, sendo considerado um emissor forte²³. Sugere-se que a proximidade na faixa de emissão do corante fluoresceína e do criptato de Eu^{3+} (580nm-640nm)¹³ justifique a supressão deste último.

Na análise dos tecidos sem H.E., marcados com os conjugados Con A-criptato de Eu^{3+} e UEA-I-criptato de Eu^{3+} , (figura 1 e 2, respectivamente), observou-se a emissão na região entre 580 nm e 640 nm, evidenciando a presença do íon Eu^{3+} , com o máximo de excitação em torno de 612 nm, característico do criptato de Eu^{3+} utilizado na conjugação. O mesmo não ocorreu quando os tecidos foram marcados com os conjugados PNA-criptato de Eu^{3+} e WGA-criptato de Eu^{3+} .

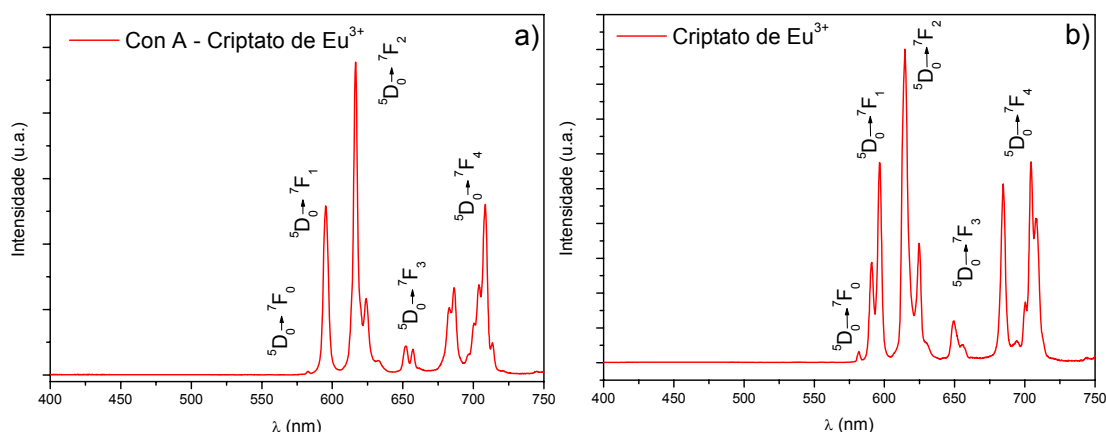


Fig. 1. a) Espectro de emissão do conjugado Con A-criptato de Eu^{3+} . b) Espectro de emissão do criptato de Eu^{3+} não conjugado.

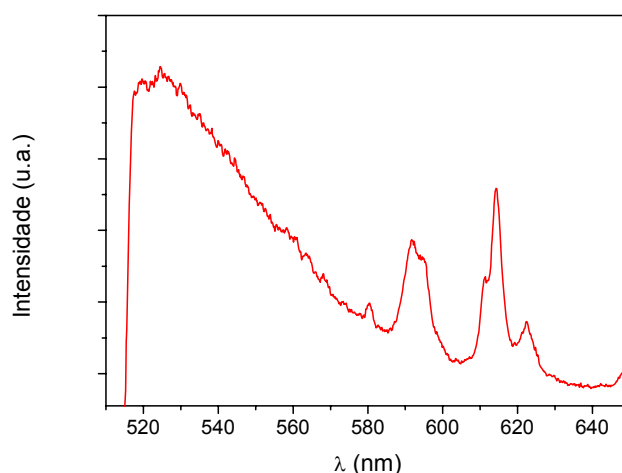


Fig. 2. Emissão do conjugado Con A-criptato de európio (III) em tecidos de fibroadenoma sem coloração H.E.

O processo de glicosilação leva a arranjos de oligossacarídeos ligados a glicoproteínas ou glicolípídeos o qual tem importância em funções fisiológicas e sua alteração leva a processos patológicos²⁴. Os resultados mostraram que tecidos mamários diagnosticados com fibroadenoma apresentaram uma maior expressão dos glicosídeos manose, glicose e fucose e uma ausente e/ou não acessível expressão de galactose e *N*-acetil-glicosamina (GlcNAc).

Neste processo de glicosilação glicanos *N*-ligados são importantes por serem utilizados em âncoras para a síntese sequencial de estruturas precursoras as quais,

quando na forma finalizada, são transferidas para uma proteína na face externa das membranas celulares. O processo de glicosilação tem a participação de uma família de enzimas, denominadas glicosiltransferases, responsáveis pela construção da estrutura sacarídica de glicoconjugados²⁵. Potapenko e colaboradores (2010) indicaram que níveis elevados de transcrição encontrados nesses genes (perfil genotípico) em carcinoma de mama, quando comparados ao tecido normal, resultam no surgimento ou exacerbação desses açúcares (perfil fenotípico) na superfície de células neoplásicas²⁵. Nossos resultados indicam que no fibroadenoma, para glicose, manose e L-fucose, seu perfil fenotípico sacarídico, em glicoconjugados de superfície celular, estão modificados.

De acordo com Yuan e colaboradores (2008), a α -L-fucose, um componente monossacarídico de glicosilação, tem sido encontrada com expressão aumentada durante a tumorigênese e a progressão de neoplasias, tais como em carcinoma ovariano, carcinoma de tireóide, adenocarcinoma coloretal, dentre outros. Também foi observado um aumento de α -L-fucose em glicoproteínas do soro de pacientes com câncer de mama²⁴. Algumas moléculas de adesão da superfície celular contendo α -L-fucose apresentam sua expressão elevada em células cancerígenas. CD44, uma família de moléculas deste tipo, pode sofrer diversas modificações pós-translacionais como adição de glicosaminoglicanos e glicosilação, o que resulta em células tumorais ricas em α -L-fucose nas suas superfícies. Outra molécula rica em α -L-fucose é CD15, a qual desempenha papel importante na adesão da célula tumoral ao endotélio vascular e apresenta um aumento na sua expressão em células cancerígenas da mama²⁴. Portanto, várias alterações ocorrem em células transformadas e algumas dessas favorecem o aumento ou o surgimento de carboidratos, como α -L-fucose, em tumores de mama. Nosso estudo indica que variações no conteúdo e/ou disponibilidade/acessibilidade de L-fucose são observadas no fibroadenoma, uma transformação benigna da mama.

O ácido siálico tem papel fundamental na finalização da síntese de glicanos por bloquear a adição de outros açúcares. Sabe-se que tecidos de câncer de mama contêm mais ácido siálico e maior atividade da sialiltransferases quando comparados com tecidos normais²⁶. Na histoquímica com lectinas uma forma de acessar os carboidratos truncados pela sialização é a utilização da enzima

neuraminidase, que remove os ácidos neuramínicos (ou siálicos). Estudo utilizando a enzima neuraminidase mostrou que a lectina PNA reconheceu resíduos de *N*-acetil-galactosamina (GalNAc) somente após o tratamento com esta enzima²⁷.

A ausência de marcação pela PNA sugere que este carboidrato tem uma baixa expressão ou acessibilidade quando na metodologia utilizada o tratamento enzimático é feito com tripsina. Resultados diferentes podem ser observados se a enzima for neuroaminidase. Estudos estão sendo realizados com este intuito.

Trabalhos já relataram aumento da expressão de GlcNAc e tumores de tecidos mamários humanos obtiveram marcação pela lectina WGA²⁹, diferentemente dos resultados encontrados neste trabalho.

Nossos resultados indicam que a marcação do tecido com o conjugado Con A-criptato de Eu^{3+} e UEA-I-criptato de Eu^{3+} ocorra com maior intensidade que os tecidos marcados com os conjugados PNA-criptato de Eu^{3+} e WGA-criptato de Eu^{3+} . Este fato pode auxiliar no diagnóstico precoce uma vez que modificações no padrão de glicosilação de glicoproteínas da superfície antecede alterações na morfologia da célula, utilizada como parâmetro para o diagnóstico.

Os complexos de lantanídeos do tipo criptatos de európio (III), vem sendo empregados em fluoroimunoensaios, como marcadores luminescentes de ensaios homogêneos, método TRACE, ligados a ácidos nucleicos³⁰. Na histoquímica é comum encontrarmos marcadores de lectinas conjugadas a FITC. Neste trabalho propomos a utilização de um novo marcador luminescente, onde teremos um criptato de Eu^{3+} conjugado a diferentes lectinas. Esse tipo de marcação tem a vantagem de ser quantitativa, visto que a emissão do Eu^{3+} pode ser medida e comparada entre os vários diagnósticos, o que pode desta forma, ser utilizada como uma ferramenta auxiliar ao médico patologista no diagnóstico de patologias mamárias.

Conclusões

Os resultados iniciais mostraram que o uso da histoquímica com lectinas conjugadas a criptato de európio (III) pode ser utilizado como método auxiliar no diagnóstico de patologias.

Agradecimentos

Os autores agradecem as agências de fomento à pesquisa CNPq e FACEPE, e ao Instituto de Ciência e Tecnologia INCT-INAMI.

Referências

- 1 - Iskratsch T, Braun A, Paschinger K, Wilson IBH. Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. *Anal. Biochem.* 2009; 386(2): 133-146.
- 2 - Sharon N. Lectins: carbohydrates-specific reagents and biological recognition molecules. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(5): 2753-2764.
- 3 - Guimarães MT, Melo-Júnior MR, Costa Silva RB, Cavalcante CBL, Beltrão EIC. Estudo comparativo da expressão de carboidratos no sistema ovo-granuloma hepático na esquistossomose humana e experimental. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 2008; 67(1): 59-63.
- 4 – Ambrosi M, Cameron NR, Davis BG. Lectins: Tools for molecular understanding of the glycode. *Organ. Biomol. Chem.* 2005; 3(9): 1593-1698.
- 5 - Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 2004; 14(11): 53-62.
- 6 - Sobral APV, Rêgo MJB, Cavalcanti CLB, Carvalho Júnior LB, Beltrão EIC. ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. *J. Oral Science.* 2010; 52(1): 49-54.

- 7 - Beltrão EIC, Medeiros PL, Figueredo-Silva J, Valença MM, Coelho LCBB, Carvalho Júnior LB. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningotheelial tumour. Eur. J. Histochem. 2003; 47(2): 139-142.
- 8 - Beltrão EIC, Correia MTS, Figueredo-Silva J, Coelho LCBB. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. Appl. Biochem. Biotech. 1998; 74(3): 125-134.
- 9 - Beltrão EIC, Cabral TA, Figueredo-Silva J, Coelho LCBB, Carvalho Júnior LB. Infiltrating ductal mammary carcinoma: a lectin histochemistry study. Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco. 2001; 46(1): p. 32-35.
- 10 - Campos LM, Cavalcanti CLB, Lima-Filho JL, Carvalho LB, Beltrão EIC. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. Biomarkers. 2006; 11(5): 480-484.
- 11 - Santos BS, Farias PMA, Menezes FD, Ferreira RC, Júnior AS, Figueiredo RCBQ, et al. CdS-Cd(OH)₂ core shell quantum dots functionalized with concanavalin A lectin for recognition of mammary tumor. *Phys. Status Solidi*, (c). 2006; 3(11): 4017-4022.
- 12 - Lima ALR, Cavalcanti CCB, Silva MCC, Paiva PVG, Coelho LCBB, Beltrão EIC, et al. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. J. Biomed. Biotech. 2010; Article ID 179817: 6 pages.
- 13 - Vila Nova SP, Pereira GA, Sá GF, Júnior AS, Bazin H, Autiero H, et al. Síntese, caracterização e propriedades espectroscópicas de criptatos de lantanídeos do tipo [Ln (bipy)₂py(CO₂Et)₂³⁺]. Quím. Nova. 2004; 27(5): 709-714.
- 14 - Martins TS, Isolani PC. Terras raras: aplicações industriais e biológicas. Quím. Nova. 2005; 28(1): 111-117.
- 15 - Timm LL. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológica. Caderno La Salle XI. 2005; 2(1): 231-239.

- 16 - Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. Patologia estrutural e funcional – Robbins. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 1996.
- 17 - Guray M, Sahin A. Benign breast disease: classification, diagnosis and management. *The Oncologist*. 2006; 11(5): 435-449.
- 18 - Pastor LM, Morales LM, Polo LA, Calvo A, Pallarés J, De La Viesca S. Histochemical study of glycoconjugates in active and photoperiodically-regressed testis of hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta histochem*. 2003; 105(2): 165-173.
- 19 - Nishi K, Tanegashima A, Yamamoto Y, Ushiyama I, Ikemoto K, Yamasaki S, et al. Utilization of lectin-histochemistry in forensic neuropathology: lectin staining provides useful information for postmortem diagnosis in forensic neuropathology. *Legal Med*. 2003; 5(3): 117-131.
- 20 - Beltrão EIC, Correia MTS, Figueredo-Silva J, Coelho LCBB, Lectina conjugada a Ester de acridina como marcador histoquímica quimioluminescente. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 1998; 74: 125-134.
- 21 - Blum HF, Spealman CR. Photochemistry of fluorescein dyes. *J. Phys. Chem*. 1933; 37(9): 1123-1133.
- 22 - Mendonça JC, Dolci JEL. Imunofluorescência para neuropeptídeos na mucosa nasal humana: avaliação de técnica para peptídeo intestinal vasoativo (VIP). *Rev Bras. Otorrinolaring*. 2005; 71(2): 123-131.
- 23 – Brunet E, Juanes O, Rodriguez-Ubis JC. Supramolecularly Organized Lanthanide Complexes for Efficient Metal Excitation and Luminescence as Sensors in Organic and Biological Applications. *Curr. Chem Biol*. 2007; 1: 11-39.
- 24- Yuan K, Listinsky CM, Singh RK, Listinsky JJ, Siegal GP. Cell Surface associated alpha-L-fucose moieties modulate human breast cancer neoplastic progression. *Pathol. Onc. R*. 2008; 14(2): 145-156.

- 25 - Potapenko IO, Haakensen VD, Lüders T, Helland A, Bukholm I, Sørli, T, et al. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Mol. Onc.* 2010; 4(2): 98-118.
- 26 – Cazet A, Julien S, Bobowski M, Burchell J, Delannoy P. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010; 12(3): 204.
- 27 – Chacko BK, Appukuttan PS. Peanut (*Arachis hypogaea*) lectin recognizes α -linked galactose, but not *N*-acetyl lactosamine in *N*-linked oligosaccharide terminals. *Int. J. Biol. Macromol.* 2001; 28(5): 365-371.
- 28 - Metzler DE, Metzler CM. *Biochemistry: the chemical reactions of living cells.* California: Academic Press; 2003.
- 29 - Wang Y, Ao X, Vuong H, Konanur M, Miller FR, Goodison S, Lubman DM. Membrane glycoproteins associated with breast tumor cell progression identified by a lectin affinity approach. *Journal of Proteome Research*, v. 7, n. 10, p. 4313-4325, 2008.
- 30 - Alpha-Bazin B, Bazin H, Boissy L, Mathis G. Europium Cryptate-Tethered Ribonucleotide for the Labeling of RNA and Its Detection by Time-Resolved Amplification of Cryptate Emission. *Anal. Bioch.* 2000; 286: 17-25.

Artigo submetido à **Revista Bioconjugate Chemistry**

Europium (III) cryptate conjugated to the lectins as luminescent probes in histochemistry for transformed human breast tissues

BRANDÃO JM, BANDEIRA ARG, CAVALCANTI CLB, JUNIOR AS, BELTRÃO EIC.

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), UFPE

Departamento de Química Fundamental, UFPE

Departamento de Bioquímica, UFPE

Abstract

Differentiation between benign and malignant breast tumors, as well as the detection of lesions at early stages, are of great importance to choose an appropriate treatment and to reduce the number of deaths. Carbohydrates are considered important cancer biomarkers to be capable of mediating pathophysiological events during tumor progression. Changes in glycosylation of cell surface glycoproteins can be detected by lectin histochemistry. The latter bind specifically to carbohydrates and are usually conjugated to molecules that enable visualization of the lectin-carbohydrate binding. Europium (III) cryptate conjugated to lectins is an alternative to luminescent stainings, especially because its photo stability. This study aimed to conjugate Europium (III) cryptates to lectins UEA-I (*Ulex europeus* agglutinin), Con A (Concanavalin A), PNA (Peanut agglutinin) and WGA (Wheat germ agglutinin), characterize the conjugates and use them in lectin histochemistry as luminescent probes for human mammary tissues such as fibroadenoma (benign tumor), invasive ductal carcinoma (malignant tumor) and normal tissue. Histological sections incubated with the conjugates were analyzed in a spectrofluorometer. Stained tissues presented luminescence intensity with different patterns, reflecting changes in the expression of carbohydrates in their cell surface glycoconjugates, mainly glycoproteins, when compared to normal tissues. Results suggest the use of lectins-europium (III) cryptate conjugates as luminescent probes to identify and quantify cell biochemistry changes regarding carbohydrates in the diagnosis of human mammary tissues.

Keywords: lectin, europium (III) cryptate, histochemistry, breast, tumor

Background

Breast cancer is the second kind of cancer with the highest incidence in the world and the one more frequent among women. Each year, about 22% of new cancer cases in women are breast, reaching 49.240 in 2010, with an estimated risk of 49 cases per 100 000 women. In Brazil, the Southeast region is the one with the highest incidence, with an estimated risk of 65 new cases per 100 000 women.¹

Although breast cancer is considered a cancer with relatively good prognosis when diagnosed and treated properly, it still results in a high number of deaths among women in Brazil. This condition is probably due to the diagnosis in advanced stages.¹

The recommended strategy for controlling breast cancer in Brazil, is the mammographic screening.¹ After the identification of breast lesions it is performed the triple test, which includes fine needle aspiration cytology, core biopsy and radio and images techniques. However, each diagnostic method has its limitations and need for additional diagnostic procedures.^{2, 3}

As an alternative to overcome these difficulties, methods of diagnosis based on cancer cell biomarkers, such as carbohydrates have been investigated. These macromolecules have great importance in normal and diseased tissues by participating in regulatory processes such as cell growth and apoptosis, as well as intracellular signaling.^{4, 5} Alterations in glycosylation pattern of glycoconjugates in cell membranes are crucial in the development and progression of many diseases, including diabetes, immunodeficiency, neurodegeneration, hereditary diseases and cancer.^{6, 7} Given this fact, lectins are presented as diagnostic probes since they are molecules able to recognize specifically free carbohydrates and/or oligosaccharides or bound in glycoconjugates.^{8, 9, 10} Generally, they are used labeled with molecules with enzymatic, luminescent or chemiluminescent properties, e.g. peroxidase, fluorescein isothiocyanate (FITC), acridine esters, among others.¹¹⁻¹³

In this context, complexes of lanthanide ions have received attention due to their photophysical properties. As alternative luminescent label, the europium (III) cryptates present themselves as excellent display because they have good water solubility and high kinetic and photochemical stability.¹³⁻¹⁵

In this scenario this paper proposed the conjugation of the lectins Concanavalin A (Con A from *Canavalia ensiformis*), Ulex europeus agglutinin (UEA-I), wheat germ agglutinin (WGA from *Triticum vulgaris*) and peanut agglutinin (PNA from *Arachis hypogea*) to europium (III) cryptate in order to obtain a luminescent probe to be used as an auxiliary tool in lectin histochemistry and thus contribute to the diagnosis of human breast tumors such as fibroadenoma and invasive ductal carcinoma, benign and malignant tumors, respectively.

Materials and Methods

Materials

Lectins Con A (Concanavalina A, *Canavalia ensiformis*), UEA-I (*Ulex europaeus* I), WGA (*Triticum vulgaris* agglutinin) and PNA (*Arachis hypogea* agglutinin) specific for D-glucose/D-manose, L-fucose, N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) and D-galactose/N-acetyl-galactosamine (GalNAc)^{16, 17}, respectively, were purchased from Sigma Co. (USA). Europium (Eu) (III) cryptate was synthesized at the Laboratory of Rare Earth (BSTR), Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco (UFPE). Biopsies (n = 24) of human breast tissues fixed in formalin and embedded in paraffin were obtained from the Archives of the Department of Pathologic Anatomy, Hospital das Clinicas (UFPE) and Cancer Hospital, both from Pernambuco: 10 biopsies were diagnosed as invasive ductal carcinoma (IDC), a malignant tumor; 10 as fibroadenoma (FIB), a benign tumor; and 4 were from bilateral reducing mastoplasty, normal control. This work was conducted under approval of the Bioethics Committee of the Health Sciences Center, UFPE (SISNEP FR - 272931, CEP / CCS / UFPE No. 195/09).

Preparation of the luminescent probes

Eu (III) cryptate was conjugated with lectins through of the ethylenediamine grouping, available in structure of the cryptate, and of the carboxylic groups of amino acid residues of the lectins. Thus, lectins (200 $\mu\text{m mL}^{-1}$) were incubated with Eu (III) cryptate (0.13 to 0.88 mg) for 2 h at 25°C in 10 mM phosphate buffer (PBS) containing 0.15 M NaCl. Then, the conjugates were dialysed for 16 h at 4 °C, under agitation.

Characterization of the luminescent probes

Pure lectins and cryptates and lectins-cryptate conjugates were assayed to evaluate the biological activity of lectins and the luminescence of europium (III) ion. The hemagglutinating activity was performed in microtiter plate using a solution of 0.15 M NaCl and rabbit or human erythrocytes treated with glutaraldehyde, according to Beltrão *et al.* (1998)¹⁸. Circular dichroism measurements were developed in a Spectropolarimeter (Jasco J-815 CD Spectrometer). Luminescence assays were recorded at 25°C using a quartz cuvette with 1 cm optical path in a SPEX spectrofluorometer FLUOROG-2 with SPEX 1680 double monochromators. As light sources were from xenon lamps of 450 w (for analysis at steady state) and 150 W (for time-resolved analysis).

Lectin histochemistry for human breast tissues

Human breast tissue sections (4µm) were deparaffinized in xylene and hydrated in ethanol. Tissues were treated with 0.1% trypsin solution for 2 min at 37°C and then incubated with the solution of the conjugates (125µL) for 2 h at 4°C. After that tissues were stained with hematoxylin or not, and finally, tissue cover slides were assembled using PBS or glycerin. Histochemistry with cryptates non-conjugated to lectins were also performed as binding/luminescent controls.

Spectroscopic measurements

The staining of the tissues was evaluated by UV excitation and emission in the visible region through the spectrofluorometer, the same used for the characterization of the conjugates in solution. All measurements were registered in an area of 3.0 mm x 8.0 mm, each tissue sample analyzed in three different areas. Filters (370 and 399 nm) were used when necessary. The emission was monitored between 400 and 720 nm and the emission intensity was used as a criterion of comparison between samples.

Results and Discussion

The conjugation of lectins and cryptate has been done previously to identify cell surface sugars in human breast tissues.¹³ In this case, the ion terbium (III) was used as label. In this study, Eu (III) cryptate was functionalized with ethylenediamine,

therefore, the conjugation with the lectins occurred between the amino groups of the cryptate and the carboxylic group of terminal residues of the amino acid side chains. Tests were performed with the conjugates formed to verify the feasibility for use as luminescent probes in histochemistry. The hemagglutinating activity (HA), used to assay the preservation of biological activity after conjugation of lectins, showed positive results for all conjugates (Table 1). For UEA-I, the HA test was carried out with human erythrocytes and for the other lectins, with rabbit erythrocytes.

Table 1 – Hemagglutinating activity (HA) test conducted between conjugated and unconjugated lectins.

Lectin	HA	Conjugated	HA
Con A	2^{-13}	Con A-Eu(III)Cryp	2^{-6}
UEA-I	2^{-9}	UEA-I-Eu(III)Cryp	2^{-8}
PNA	2^{-6}	PNA-Eu(III) Cryp	2^{-4}
WGA	2^{-9}	WGA-Eu(III) Cryp	2^{-6}

The circular dichroism (CD) test, carried out with UEA-I, PNA and WGA conjugates, showed that the secondary structure of these lectins was not destabilized by conjugation with cryptate, results were compared with non-conjugated lectins. However, the CD result for the conjugate Con A-Eu(III)Cryp showed changes when compared to non-conjugated Con A. This result can justify the considerable decrease in hemagglutinating activity obtained from this conjugate.

Luminescence analysis of conjugated and non-conjugated lectins are shown in Table 2. UEA-I, Con A, PNA and WGA showed excitation wavelengths in the range of 365-380 nm. Maximum emission occurred between 337-340 nm for most lectins, except Con A that showed emission at a wavelength of 473 nm. Lectins reached emission intensities between 37,000 and 45,000 a.u., with the exception of Con A and UEA-I (> 250,000 a.u.), the latter when excited at 293.8 nm. Samples containing the conjugates showed the characteristic spectrum of the europium (III) ion. In these spectra it was possible to visualize the presence of transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ ($J = 0, 1, 2, 3, 4$) from the Eu (III) ion encapsulated in cryptate, with maximum emission at 616.4 nm, related to the hypersensitive transition.

Table 2 – Results of measurements of excitation and emission of samples tested in solution.

Sample	$\lambda_{\text{exc.}}^*$ (nm)	Max. λ emiss.** (nm)	*** Max. Intensity (a.u.)	$\lambda_{\text{emiss.}}$ (nm) $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$	$\lambda_{\text{emiss.}}$ (nm) $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$	$\lambda_{\text{emiss.}}$ (nm) $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$
UEA-I	293,8	405,6	259.780	-	-	-
	379,2	438,2	45.726	-	-	-
UEA-I-cryp	307,4	616,4	3.367.277	595,2	616,4	708,6
	320,0	616,4	3.411.765	595,2	616,4	798,2
Con A	377	473,4	289.569	-	-	-
Con A-cryp	321	616,4	23.885.720	595,2	616,4	708,4
PNA	367	437,2	37.399	-	-	-
PNA-cryp	320	616,2	3.461.444	595,2	616,2	708,4
WGA	366	440	35.988	-	-	-
WGA-cryp	319,4	616,6	2.425.866	595,6	616,6	708,6

* exc – excitation; ** emiss – emission; *** Max. – maximum.

Time-resolved measurements were also carried out to suppress the emission of lectins that could result in false positive. Figure 1 shows the suppression of emission in conjugated lectin UEA-I-Eu(III)Cryp.

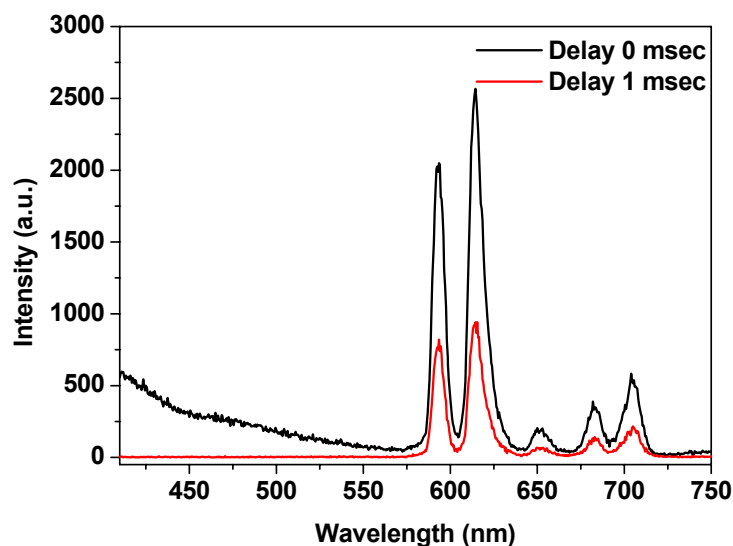


Figure 1 – Time resolved emission spectra of the conjugate UEA-I-Eu(III)Crip with different delays.

The same result was obtained with the other conjugates (data not shown). Thus, analysis of conjugates with 1 msec delay was sufficient to cause the absence of characteristic emission of lectins, whose band was in the region between 410 and 570 nm.

By using Eu (III) cryptate as revealer the staining it was obtained a brief methodology and safer due to elimination of steps such as incubation with methanol and revelation with diaminobenzidine (DAB), the latter known for its neurotoxic effects. As to whether or not the dye hematoxylin, the results were indifferent. Once Entellan®, used routinely in the process of mounting the slides, suppresses the luminescence of europium(III) ion, by absorbing at a wavelength close to the cryptate, Glycerin and PBS were used as alternatives, since they do not interfere in the emission ion.

Figure 2 presents the analysis results of tissues treated with different conjugates which showed distinct results. It was taken into account the intensity at the wavelength of maximum emission of the Eu(III) ion in each sample (616nm).

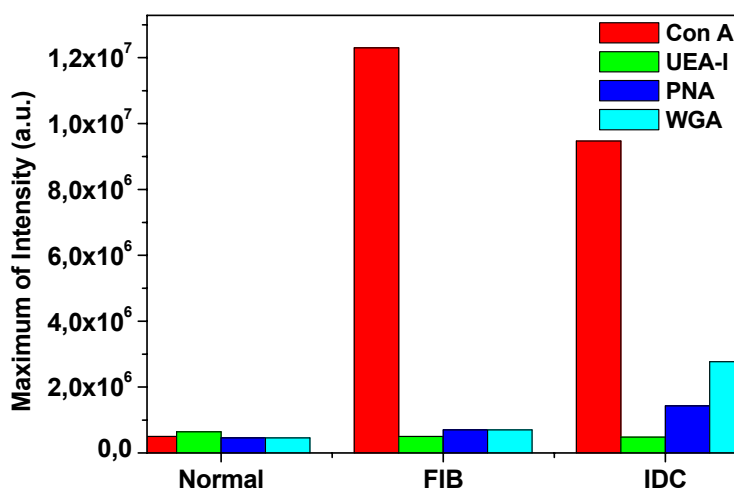


Figure 2 – Emission measurements of different tissues treated with the conjugates (Con A-Eu(III)Cryp, in red; UEA-I-Eu(III)Cryp, in green; PNA-Eu(III)Cryp, in dark blue; and WGA-Eu(III)Cryp, in light blue).

In normal tissues were not observed transitions of the Eu (III) ion for all treatments. Fibroadenoma tissues treated with Con A-Eu (III)Cryp, showed luminescence in the region between 580 nm and 707 nm. In these spectra evidenced the presence of Eu (III) ion transitions, with maximum emission at 616 nm (transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$). Tissues of FIB that received other conjugates showed no luminescence. Histological sections with IDC exhibited luminescence for the majority of luminescent probes: Con A-Eu(III)Cryp, PNA-Eu (III)Cryp and WGA-Eu (III)Cryp. However, the two latter showed reduced intensity.

These results suggest the availability or access to D-glucose and/or D-mannose in glycoconjugates on the cell surface of human breast tissues diagnosed with fibroadenomas and, additionally, N-acetyl-glucosamine, D-galactose and N-acetyl-galactosamine in tissues with IDC. These carbohydrates, which are identified in greater quantities in transformed tissues are reported as result of overexpression or higher enzymatic activity of glycosyltransferases and glycosides in glycosylation mechanisms.¹⁹

Glycosylation, the addition of carbohydrates to glycoproteins or glycolipids, is an essential process for the performance of normal functions of the cell. During the oncogenic process, as well as many types of diseases there are changes in the pattern of glycosylation of cell surface carbohydrates.²⁰

These changes can be detected in lectin histochemistry related to benign or malign cell transformation or physiologic processes. In 1998, Beltrão et al. studying human breast lesions (fibroadenoma, fibrocystic disease and IDC) using Con A and isoform 1 from Cramoll (specific for mannose and glucose residues) reported that cells of fibroadenoma showed a staining pattern more intense than observed in normal cells.¹⁸ Another study correlated the abundance of mannose in serum with the progression of cancer where it was found that the intensity of mannose is elevated in serum of both patients and in mice with breast cancer and decreased after tumor removal.²¹

Besides increasing fucosylation in breast cancer is well described, that was not observed in our study. Patel *et al.* (1990) showed increased incorporation of fucose residues in glycoproteins from serum of patients with breast cancer²² while Yuan *et al.* (2008), studying cell lines of human breast cancers, showed that all studied lineages showed virtually L-fucose on the cell surface in a normal or increased pattern.²³ In our study the non-observed L-fucose residues in the studied tissues, differently of *in vitro* studies, may be related to difficulties of access to this carbohydrate (inner localization in glycode of cell surface glycoconjugates), requiring a previous enzymatic treatment of tissues.

Conclusion

In this research, we studied the glycosylation pattern in normal tissues and tissues with FIB and IDC using lectins with different specificities to carbohydrates.

This research showed that the proposed luminescent probes, lectins-Eu(III)Cryp are effective devices to identify the glycan identity by its emission, allowing to differentiate the staining by intensity values. Therefore, this instrument can be used in histochemical tests for the diagnosis of breast tumors, allowing to expand into other tissues and/or pathologies as well as to increase the number of carbohydrates to be evaluated. From the evidences here presented the difference in glycosylation pattern between normal and transformed tissues can aid in the diagnosis of these diseases since these sugars act as biomarkers.

Acknowledgment

The authors thank Professor Dr. Hermi Felinto de Brito, from the Elements Laboratory of f-block of the University of São Paulo, by the availability of equipment to accomplishment this study. Also acknowledge the research funding agencies, CNPq and FACEPE, and the Institute of Science and Technology- INAMI (INCT-INAMI).

References

- (1) Instituto Nacional de Câncer - INCA. (2009) Estimativa 2010: *Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro.
- (2) Calado, S. S., and Abreu and Lima, M. C. C. (2004) Estudo morfológico dos fibroadenomas da mama: uma análise comparativa entre grupos etários. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 40, 411-419.
- (3) Rao, S., Latha, P. S., Ravi, A., and Thanka, J. (2010) Ductal carcinoma in a multiple fibroadenoma: diagnostic inaccuracies. *J. Cancer Res. Ther.* 6, 385-387.
- (4) Fuster, M. M., and Esko, J. D. (2005) The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer* 5, 526-542.
- (5) Maurya, S. D., Aggarwal, S., Dhakar, R. C., Tilak, V. K., and Prajapati, S. K. (2010) Targeted delivery of drug to the colon with lectins and neoglycoconjugates: a review. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 1, 178-194.
- (6) Guimarães, M. T., Melo-Júnior, M. R., Costa Silva, R. B., Cavalcanti, C. B. L., and Beltrão, E. I. C. (2008) Estudo comparativo da expressão de carboidratos no sistema

ovo-granuloma hepático na esquistossomose humana e experimental. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 67, 59-63.

(7) Mislovicová, D., Gemeiner, P., Kozarova, A., and Kozár, T. (2009) Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. *Biologia* 64, 1-19.

(8) Iskratsch, T., Braun, A., Paschinger, K., and Wilson, I. B. H. (2009) Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. *Anal. Biochem.* 386, 133-146.

(9) Sobral, A. P. V., Rêgo, M. J. B. M., Cavalcanti, C. L. B., Carvalho Júnior, L. B., and Beltrão, E. I. C. (2010) Con A and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. *J. Oral Sci.* 52, 49-54.

(10) Rêgo, M. J. B. M., Cordeiro, M. F., Cavalcanti, C. B. L., Souza, J. R., and Beltrão, E. I. C. (2010) Análise da expressão de carboidratos no estroma do carcinoma ductal invasivo da mama e sua correlação com dados clínicos e histopatológicos. *Rev. Bras. Mastol.* 20, 109-114.

(11) Campos, L. M., Cavalcanti, C. L. B., Lima-Filho, J. L., Carvalho, L. B., and Beltrão, E. I. C. (2006) Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers* 11, 480-484.

(12) Lima, A. L. R., Cavalcanti, C. L. B., Silva, M. C. C., Paiva, P. V. G., Coelho, L. C. B. B., Beltrão, E. I. C., and Correia, M. T. S. (2010) Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. *J. Biomed. Biotechnol.* doi:10.1155/2010/179817, 6 pages.

(13) Vila Nova, S. P. *Novos macrociclos de lantanídeos: marcadores fotônicos projetados para aplicações biotecnológicas*. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003. Tese (Doutorado em Química).

(14) Martins, R. F., Neri, C. R., Sousa Filho, P. C., and Serra, O. A. (2010) Estudos fotoluminescentes em compostos de íons terras raras coordenados por um derivado carbazólico. *Quim. Nova* 33, 2118-2123.

(15) Sotomayor, M. D. P. T., Dias, I. L. T., Lanza, M. R., Moreira, A. B., and Kubota, L. T. (2008) Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Quim. Nova* 31, 1755-1774.

(16) Pastor, L. M., Morales, L. M., Polo, L. A., Calvo, A., Pallarés, J., and De La Viesca, S. (2003) Histochemical study of glycoconjugates in active and photoperiodically-regressed testis of hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta histochem.* 105, 165-173.

(17) Nishi, K., Tanegashima, A., Yamamoto, Y., Ushiyama, I., Ikemoto, K., Yamasaki, S., Nishimura, A., Rand, S., and Brinkmann, B. (2003) Utilization of lectin-histochemistry in forensic neuropathology: lectin staining provides useful information for postmortem diagnosis in forensic neuropathology. *Leg. Med. (Tokyo)* 5, 117-131.

- (18) Beltrão, E. I. C., Correia, M. T. S., Figueredo-Silva, J., and Coelho, L. C. B. B. (1998) Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 74, 125-134.
- (19) Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Burchell, J., and Delannoy, P. (2010) Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12, 204.
- (20) Ghazarian, H., Idoni, B., and Oppenheimer, S. B. (2011) A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem.* 113, 236-247.
- (21) Leoz, M. L. A., Young, L. J. T., An, H. J., Kronewitter, S. R., Kim, J., Miyamoto, S., Borowsky, A. D., Chew, H. K., and Lebrilla C. B. (2011) High-mannose glycans are elevated during breast cancer progression. *Mol Cell Proteomics.* 10, doi:10.1074/mcp.M110.002717.
- (22) Patel, P. S., Baxi, B. R., Adhvaryu, S. G., and Dalar, B. D. (1990) Evaluation of serum sialic acid, heat stable alkaline phosphatase and fucose as markers of breast cancer. *Anticancer Res.* 10, 1071-1074.
- (23) Yuan, K., Listinsky, C. M., Singh, R. K., Listinsky, J. J., and Siegal, G. P. (2008) Cell surface associated alpha-L-fucose moieties modulate human breast cancer neoplastic progression. *Pathol Oncol Res.* 14, 145-156.