



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

JULIANA MENDES BRANDÃO

**SONDAS LUMINESCENTES APLICADAS NA IDENTIFICAÇÃO DE
CARBOIDRATOS E GLICOPROTEÍNAS EM TECIDOS MAMÁRIOS**

Recife

2017

JULIANA MENDES BRANDÃO

**SONDAS LUMINESCENTES APLICADAS NA IDENTIFICAÇÃO DE
CARBOIDRATOS E GLICOPROTEÍNAS EM TECIDOS MAMÁRIOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Brandão, Juliana Mendes

Sondas luminescentes aplicadas na identificação de carboidratos e glicoproteínas em tecidos mamários / Juliana Mendes Brandão. – Recife, 2017.

91 f.: il.

Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2017.

Inclui referências e apêndice

1. Mamas – Câncer 2. Câncer – Diagnóstico I. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (orient.) II. Título.

616.99449
375

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Profa. Dra. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETORA DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

Profa. Dra. Maria Eduarda de Lazarrábal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Profa. Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta

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

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BRANDÃO, Juliana Mendes

Título: SONDAS LUMINESCENTES APLICADAS NA IDENTIFICAÇÃO
DE CARBOIDRATOS E GLCOPROTEÍNAS EM TECIDOS MAMÁRIOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção
do título de Doutor em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 14/03/2017

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Assinatura: _____

Profa. Dra. Steffany de Almeida Ferreira

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Assinatura: _____

Profa. Dra. Juliana Lúcia de Albuquerque Vasconcelos

Instituição: Associação Caruaruense de Ensino Superior e Técnico (ASCES)

Assinatura: _____

Prof. Dr. João Luiz Quirino da Silva Filho

Instituição: Faculdade de Integração do Sertão (FIS)

Assinatura: _____

Prof. Dr. Arthur Tenório Ribeiro Clark

Instituição: Universidade de Pernambuco (UPE)

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Jorge (in memoriam) e Lúcia, à minha irmã Annamélia, ao meu esposo Fred e aos meus três tesouros: Caio, Gabriel e Theo, que sempre me apoiaram e me inspiraram em busca de transformar o meio no qual vivemos em algo melhor.

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, motivação, confiança e compreensão durante todo o curso deste trabalho;

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

Ao Prof. Dr. Hermi Felinto de Brito (USP) e a Profa. Ana Valéria Santos de Lourenço (UNIFESP) por ter disponibilizado o Laboratório dos Elementos do Bloco-f para realização dos experimentos, além dos ensinamentos e amizade que surgiram durante a execução de etapas deste trabalho;

Ao Prof. Petrus d'Amorim Santa Cruz Oliveira (UFPE) pela participação no projeto “Rede de Formação de RH para Estudo das Implicações das Nanotecnologias em Saúde e Meio Ambiente através de Dispositivos Baseados em Marcadores” e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo e auxílio financeiro para realização deste trabalho;

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

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Paulo Germano Brito, pela maneira atenciosa, eficiente e educada 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 Juliana Lúcia, Steffany, Jéssica, Aline, Bruno e João, que estiveram diretamente envolvidas no desenvolvimento da minha tese;

Aos funcionários do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), em especial Ilma, Edson e Paulina pela atenção, amizade e disponibilidade de ajuda sempre que foi preciso;

Ao meu marido pelo companheirismo, paciência, incentivo, dedicação e amor, que me tornaram mais forte e persistente, e à minha sogra, Valmira, pelo carinho e apoio;

Ao meus queridos e amados filhos, Caio e Theo, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo amor constante e por serem a força impulsionadora de buscar fazer sempre o melhor;

À minha irmã Annamélia pelo seu incentivo e por ser exemplo de mulher guerreira em quem me inspiro e ao meu queridíssimo e amado sobrinho, Gabriel, por me mostrar serenidade e ensinar que o amor multiplica, acalma e conforta.

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

À minha mãe Lúcia, peça fundamental na minha vida, pelo amor incondicional, dedicação sem medida, confiança acima de tudo, incentivo em busca dos meus objetivos e por todos os ensinamentos recebidos durante o curso da vida.

“Todo conhecimento começa com o
sonho. O sonho nada mais é que
a aventura pelo mar
desconhecido, em busca da
terra sonhada. Mas sonhar é
coisa que não se ensina, brota
das profundezas do corpo, como
a alegria brota das profundezas
da terra. Como mestre só posso
então lhe dizer uma coisa.
Contem-me os seus sonhos para
que sonhemos juntos.”

Rubem Alves

RESUMO

BRANDÃO, J. M. Sondas luminescentes aplicadas na identificação de carboidratos e glicoproteínas em tecidos mamários. 2017. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Introdução: A imunohistoquímica (IHQ) é a técnica mais empregada para subtipagem molecular do câncer de mama. Embora suas análises sejam de grande utilidade, o método está sujeito à subjetividade e dependência de variáveis pré-analíticas. Assim, recursos mais precisos e concretos permitiriam maior aperfeiçoamento a esses ensaios. Estudos histoquímicos têm mostrado que alterações quantitativas e qualitativas são observadas em glicoconjugados da superfície celular durante o processo neoplásico. Biomoléculas conjugadas a marcadores luminescentes podem funcionar como sondas luminescentes possibilitando elevar a sensibilidade das análises. **Objetivos:** Este trabalho teve como objetivo conjugar marcadores luminescentes a lectinas e/ou anticorpos e propor como potenciais sondas luminescentes em histoquímica com lectinas e imunohistoquímica de tumores mamários. **Metodologia:** Conjugados de lectinas (Con A e UEA-I) com criptato de Eu^{3+} (Crip(Eu^{3+})), foram sintetizados, caracterizados através da atividade hemaglutinante (AH), dicroísmo circular (CD) e espectrofluorimetria; e avaliados como sondas luminescentes em histoquímica com lectinas (HqL) para tecidos mamários humanos normal e transformado (fibroadenoma, FIB e carcinoma ductal invasivo, CDI). Anticorpos anti-uPAR, anti-GP88 e anti-MUC1 foram conjugados ao éster de acridina (EA) e empregadas em imunohistoquímica para tecidos mamários com CDI e normal. **Resultados:** O conjugado UEA-I-Crip(Eu^{3+}) preservou AH e manutenção da estrutura da lectina determinada por DC. Con A-Crip(Eu^{3+}) apresentou redução da AH e alteração não significativa em DC. Após conjugação com as lectinas, o Crip(Eu^{3+}) manteve sua capacidade de luminescência. A HqL com as sondas lectina-Crip(Eu^{3+}) revelou diferenças de marcação entre os tecidos normal e transformados avaliados e equivalentes àquelas resultantes do uso de conjugados lectina-FITC (disponíveis comercialmente). A conjugação dos anticorpos (anti-uPAR, anti-MUC I e anti-GP88) com EA permitiu o reconhecimento de seus respectivos alvos possibilitando sua utilização na IHQ luminescente na qual anti-MUC1-EA demonstrou variação do perfil de expressão de MUC1 em tecido mamário normal e CDI expressa em URL (unidades relativas de luz). **Conclusão:** as sondas luminescentes, conjugados lectina-Crip(Eu^{3+}) se apresentam como potenciais ferramentas na HqL agregando a vantagem de serem fotoestável. Na IHQ luminescente as sondas anticorpos-EA permitem a quantificação da marcação podendo ser aliada à análise ótica para diminuição da subjetividade no diagnóstico inerente a metodologias qualitativas. **Palavras-chave:** Sondas (quimi)luminescentes. Mama Humana. CDI. FIB.

ABSTRACT

BRANDÃO, J. M. Luminescent probes applied in the identification of carbohydrates and glycoproteins in breast tissues 2017. Thesis (PhD). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Background: Immunohistochemistry (IHC) is the most commonly used technique for molecular subtyping of breast cancer. Although their analyzes are very useful, the method is subject to subjectivity and dependence of pre-analytical variables. Thus, more precise and specific resources would allow further improvement to these trials. Histochemical studies have shown that quantitative and qualitative changes are observed in cell surface glycoconjugates during neoplastic process. Biomolecules conjugated to luminescent markers can function as luminescent probes decreasing the subjectivity of tissue analysis and allowing its quantification. **Objectives:** This study aimed to conjugate, characterize, evaluate and apply lectins and/or antibodies to luminescent markers as potential luminescent probes in lectin histochemistry (LHC) and immunohistochemistry of human mammary tissues. **Methodology:** Lectin (*Ulex europaeus* agglutinin I, UEA-I and *Canavalia ensiformis*, Concanavalin A, Con A) and Eu^{3+} cryptate conjugates were synthesized, characterized via haemagglutinating activity (HA), circular dichroism (CD) and spectrofluorimetry; and evaluated as luminescent probes in LHC to normal and transformed (fibroadenoma, FIB and invasive ductal carcinoma, IDC) human mammary tissues. Antibodies (anti-uPAR, anti-GP88 and anti-MUC I) were conjugated to Acridinium ester (AE) and used in IHC to normal and IDC human breast tissues. **Results:** UEA-I-Crip(Eu^{3+}) conjugate preserved its HA and the lectin structure determined via CD while Con A-Crip(Eu^{3+}) presented a decrease in the HA and small change in lectin structure. Both conjugates kept their luminescence. LHC with these probes showed different emissions among breast tissues evaluated (normal and with FIB and IDC) and they were equivalent to the results using the same lectins conjugated to FITC (commercially available). Antibodies (anti-uPAR, anti-MUC I and anti-GP88) conjugated to AE allowed the recognition of their respective targets enabling their use in the luminescent IHC in which anti-MUC1-EA demonstrated variation in MUC1 expression profile between normal and IDC breast tissues, expressed in relative light units (RLU). **Conclusions:** Lectins-Crip(Eu^{3+}) probes showed to be potential tools in LHC with the advantage of photostability. Luminescent IHC with antibodies-AE probes allowed to quantify the different staining being an allied to the optical analysis since decreases the subjectivity in the diagnostic and prognostic using qualitative methods.

Keywords: (Chemi)luminescent Probes. Human Breast. IDC. FIB

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Etapas de formação do câncer em tecido epitelial, partindo de uma célula cancerígena até a invasão.	23
Figura 2	– Diagrama representando os diversos componentes que compõem a membrana plasmática.	28
Figura 3	– Processos celulares nos quais a glicosilação desempenha papel crucial durante a carcinogênese.	29
Figura 4	– Estrutura da lectina UEA-I.	32
Figura 5	– Estrutura da Con A sem ligante.	33
Figura 6	– Estrutura do criptato de lantanídeo.	38
Figura 7	– Sequência de aminoácidos de monômero de UEA- I.	46
Figura 8	– Sequência de aminoácidos de monômero de Con A.	46
Figura 9	– Teste da atividade hemaglutinante da lectina Con A com eritrócitos de coelho.	47
Figura 10	– Atividade hemaglutinante da lectina UEA-I com eritrócitos de coelho e eritrócitos humanos.	48
Figura 11	– 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.	50
Figura 12	– Espectro do dicroísmo circular apresentando a absorção das amostras da lectina UEA-I e do conjugado UEA-I-Crip(Eu^{3+}), na concentração de 0,1 mg/mL.	50
Figura 13	– Espectro de emissão do conjugado UEA-I-Crip(Eu^{3+}) em diferentes proporções.	52

Figura 14	– Espectros de emissão resolvida no tempo do conjugado UEA-I-Crip(Eu^{3+}) com diferentes atrasos (delays).	54
Figura 15	– Espectros de emissão resolvida no tempo do conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}) com diferentes atrasos (delays).	54
Figura 16	– Espectros de luminescência de tecidos mamários humanos normal, com diagnóstico de CDI e FIB, ambos sem corante ou lectinas.	56
Figura 17	– Espectros mostram a ausência de luminescência em tecidos controle tratados com Con A-Crip(Eu^{3+}) e UEA-I-Crip(Eu^{3+}).	56
Figura 18	– Espectro de emissão da amostra de FIB marcada com o conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}).	57
Figura 19	– Comparação entre as diferentes marcações realizadas com o conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}) nos diversos diagnósticos.	58
Figura 20	– Espectro apresenta ausência de emissão do íon Eu^{3+} em tecidos com diagnóstico de FIB e CDI marcados com UEA-I-crip(Eu^{3+})	58
Figura 21	– Comparação entre diferentes tecidos marcados com os conjugados UEA-I-FITC e Con A-FITC.	59
Figura 22	– Resultado da análise luminescente das 14 alíquotas separadas pela coluna cromatográfica após conjugação da sonda quimiluminescente anti-GP88-EA.	60
Figura 23	– Resultado da Espectrometria realizada nas frações do conjugado GP88-EA	61
Figura 24	– Gráfico de dispersão das amostras distribuídas de acordo com marcação pelo conjugado anti-GP88-EA, levando em consideração o tamanho do tumor.	63
Figura 25	– Dispersão da marcação das amostras de CDI e tecido normal (controle) incubadas com o conjugado anti-MUC1-EA .	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Especificidade de lectinas na ligação aos carboidratos.	30
Tabela 2	–	Descrição das soluções analisadas nos ensaios de luminescência.	42
Tabela 3	–	Descrição da diluição dos anticorpos usados na imunohistoquímica.	44
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.	45
Tabela 5	–	Resultados das medidas de excitação e emissão das amostras testadas	52
Tabela 6	–	Resultado da atividade luminescente, medida em RLU, de amostras de CDI e controle submetidas a Imunohistoquimiluminescência com anti-GP88-éster de acridina.	62
Tabela 7	–	Análise da marcação em amostras de CDI pela anti-GP88-EA em relação às características tumorais	62
Tabela 8	–	Resultado da atividade luminescente, medida em RLU, de amostras de CDI e controle submetidas a Imunohistoquimiluminescência com anti-MUC1-éster de acridina.	65
Tabela 9	–	Análise da marcação em amostras de CDI em relação às características tumorais.	66
Tabela 10	–	Resultado da atividade luminescente, medida em RLU, de amostras de CDI e controle submetidas a Imunohistoquimiluminescência com anti-uPAR-éster de acridina.	68

Tabela 11 – Análise da marcação em amostras de CDI em relação às características tumorais com o conjugado anti-uPAR-EA. 69

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AH:	Atividade Hemaglutinante
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CdTe-MAS	Quantum Dots de Telureto de Cádmio conjugado a Con A
Con A:	lectina concanavalina A
Crip(Eu ³⁺):	criptato de európio(III)
CTS:	Contagem de fótons por Segundo
DC:	Dicroísmo Circular
Eu ³⁺ :	íon európio trivalente
FIB	Fibroadenoma
FITC :	isotiocianato de fluoresceína
GalNAc:	N-acetil-galactosamina
GlcNAc:	N-acetil-glicosamina
GP88	Glicoproteína / Progranulina de 88 kDa
H.E.:	hematoxilina e eosina
Ln (III):	íon lantanídeo trivalente
MEC:	Matrix extracelular
MUC1	Glicoproteína Mucina 1
PBS:	(<i>Phosphate Buffered Saline</i>) Tampão Fosfato Salino
PDB:	(<i>Protein Data Bank</i>) Banco de Dados de Proteínas
Per:	Peroxidade
PNA :	(<i>Peanut Agglutinin</i>) lectina de amendoim
QD-ConA	lectina concanavalina A conjugada a quantum dots
RLU	Unidade de luz relativa
Tb ³⁺ :	íon térbio trivalente
UEA-I :	lectina <i>Ulex europaeus</i> I
uPAR	Receptor do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase
WGA :	(<i>Wheat Germ Agglutinin</i>) lectina de gérmen de trigo
λ_{em} :	Comprimento de onda de emissão
λ_{exc} :	Comprimento de onda de excitação
σ	Desvio padrão

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	XV
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Geral	21
2.2 Específicos	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 Câncer	22
3.1.1 Câncer de mama e fibroadenoma: os tumores mais comuns da mama	23
3.1.2 Diagnóstico de tumores mamários	25
3.2 Glicobiologia	26
3.2.1 Biomarcadores e o papel dos carboidratos	26
3.2.2 Lectinas aplicadas no reconhecimento de biomoléculas	28
3.2.3 Glicoproteínas atuando como biomarcadores	33
3.3 Técnicas histológicas	35
3.4 Marcadores luminescentes	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	39

4.1 Material e equipamentos	39
4.2 Seleção de amostras	39
4.3 Bioconjugação	40
4.3.1. Conjugação de lectinas ao criptato de Eu^{3+}	40
4.3.2 Conjugação de anticorpos ao éster de acridina	40
4.4 Caracterização dos conjugados lectinas-crip(Eu^{3+})	41
4.4.1 Atividade Hemaglutinante (A.H.)	41
4.4.2 Discoísmo Circular (DC)	41
4.4.3 Ensaios de luminescência	42
4.5 Histoquímica com lectinas (HqL) em tecidos mamários humanos usando os conjugados lectinas-crip(Eu^{3+})	43
4.6 Análises luminescente e espectroscópica após conjugação dos anticorpos ao éster de acridina	43
4.7 Imunohistoquímica (IHQ) utilizando sondas quimiluminescentes	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Conjugação das lectinas ao criptato de Eu^{3+}	45
5.2 Caracterização dos conjugados lectinas-crip(Eu^{3+})	47
5.2.1 Atividade Hemaglutinante (A.H.)	47
5.2.2 Dicroísmo circular (DC)	49
5.2.3 Ensaios de luminescência	51
5.3 Histoquímica com lectinas-crip(Eu^{3+})	55
5.3.1 Análise espectroscópica de tecidos mamários humanos submetidos à histoquímica com lectina-crip(Eu^{3+})	55

5.4 Análises luminescente e espectroscópica após conjugação dos anticorpos ao éster de acridina	60
5.5 Imunohistoquimiluminescência	61
5.5.1 Análise de marcação do conjugado anti-GP88-éster de acridina (anti-GP88-EA) através da imunohistoquímica	61
5.5.2 Análise de marcação do conjugado anti-MUC1-éster de acridina (anti-MUC1-EA) através da imunohistoquímica	65
5.5.3 Análise de marcação do conjugado anti-uPAR-éster de acridina (anti-uPAR-EA) através da imunohistoquímica	67
6 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
APÊNDICE A. Artigo resultante deste trabalho	80

1 INTRODUÇÃO

O câncer tornou-se, nas últimas décadas, um evidente problema de saúde pública internacional afetando países de todos os níveis econômicos. Na mama, esta neoplasia é a segunda mais frequente no mundo e a mais comum entre as mulheres (WHO, 2014). 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, 2015).

Para superar essa dificuldade e acompanhar a evolução da doença, estudos de biomarcadores no câncer vêm sendo desenvolvidos (MISEK; KIM, 2011; PULTZ, et al., 2014). 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 (MISLOVICOVÁ, et al., 2009; ANDRADE, et al., 2013). Estudos em diversos tipos de câncer já demonstraram o envolvimento estreito entre a glicosilação alterada e o processo carcinogênico (SILVA, et al., 2014; JI, et al., 2017; SOLIMAN; YURIEV; RAMSLAND, 2017).

Uma ferramenta que pode contribuir na identificação desses biomarcadores são as lectinas, proteínas com capacidade de reconhecer especificamente carboidratos e oligossacarídeos, livres ou em glicoconjugados (ISKRATSCH et al., 2009; SOBRAL et al., 2010). A avaliação do padrão de glicosilação de glicoconjugados em diferentes estágios fisiológicos e patológicos tem sido verificada através desse mecanismo (RÊGO, 2009).

Marcadores luminescentes são dispositivos usados com frequência na identificação de biomoléculas em análises biológicas. Dentre estes, destaca-se o criptato de európio (III), que tem meia vida de fluorescência longa, permitindo a medição em escalas de tempo, de forma que a autofluorescência não seja um problema, além de possuir comprimentos de onda de emissão bem definidos (KNEPP; SAKMAR; HUBER, 2013). Outro marcador luminescente usado em imunoensaios é o éster de acridina, que é facilmente quantificado, substituindo o luminol (RÊGO et al., 2013).

Este trabalho propôs uma investigação em tecidos tumorais mamários benignos e malignos utilizando métodos de diagnóstico padrão e auxiliar com sondas luminescentes a fim de identificar carboidratos e glicoproteínas em tecidos mamários humanos e assim apresentar uma ferramenta auxiliar que possa contribuir para o diagnóstico destas patologias.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Conjugar marcadores luminescentes a lectinas e/ou anticorpos e propor como potenciais sondas luminescentes em histoquímica com lectinas e imunohistoquímica de tumores mamários.

2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Conjugar o criptato de Eu^{3+} , Crip(Eu^{3+}), às lectinas *Ulex europeus* agglutinin I (UEA-I) e de *Canavalia ensiformis* (Concanavalina A, Con A);
- ✓ Caracterizar o conjugado lectina-crip(Eu^{3+}) através de análise de luminescência (espectrofotometria), atividade hemaglutinante e dicroísmo circular;
- ✓ Utilizar os conjugados lectina-crip(Eu^{3+}) como sondas sacarídicas em histoquímica com lectinas (HqL) em tecidos mamários humanos normal e transformados (fibroadenoma, FIB e carcinoma ductal invasivo, CDI) e comparar com as sondas comerciais lectinas-FITC;
- ✓ Conjugar os anticorpos anti-uPAR, anti-GP88 e anti-MUC1 ao éster de acridina (EA);
- ✓ Aplicar os conjugados anticorpos-EA em tecidos mamários humanos normal e transformado (carcinoma ductal invasivo, CDI) empregando Imunohistoquímica (IHQ).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 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, 2015). 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 interrompe, permitindo o reparo adequado do material danificado (SHEER; BARTEK, 2016). Nas células cancerígenas o DNA danificado não é reparado desencadeando uma série de erros (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Como consequência, surgem os tumores que são tecidos complexos formados por tipos celulares variados que interagem de maneira heterogênea uns com os outros. Com a proposta de explicar o comportamento das células cancerígenas Hanahan e Weinberg, em 2000, publicaram um artigo sobre a biologia do câncer contemplando características e habilidades que permitem as células cancerígenas sobreviver, proliferar e disseminar. Essas propriedades ficaram conhecidas como *hallmarks* do câncer e incluem: sinalização proliferativa sustentada, inabilidade em responder aos supressores de crescimento, potencial replicativo ilimitado, indução da angiogênese, resistência à morte celular (apoptose) e invasão e metástase. Em 2011, os mesmos pesquisadores propuseram a inclusão de inflamação e fuga da destruição imunológica como *hallmarks* adicionais envolvidas na patogênese de alguns e, talvez, de todos os cânceres (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Recentemente, no decurso de progressos em pesquisas com câncer, novas observações têm modificado o processo multi-etapas que culminam na tumorigênese, sendo proposta a glicosilação como uma representante desses marcos (VAJARIA, PATEL, 2016).

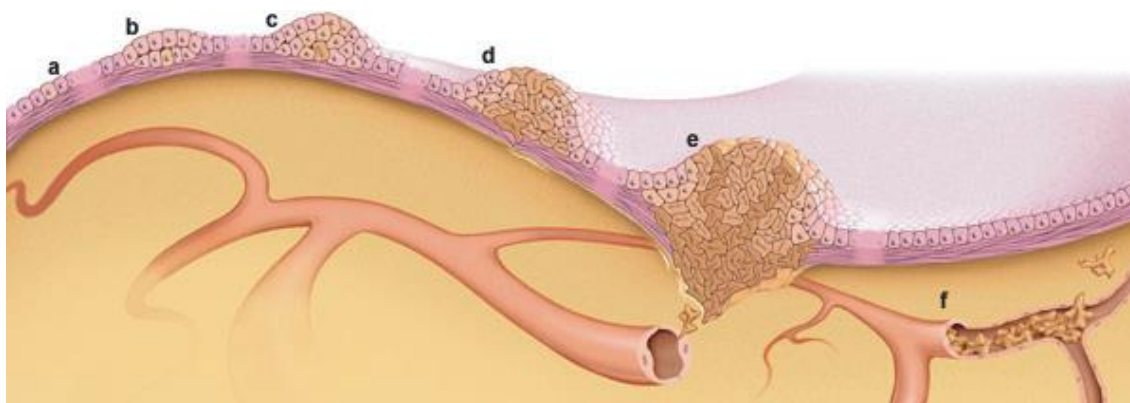


Figura 1 – Etapas de formação do câncer em tecido epitelial, partindo de uma célula cancerígena até a invasão.

(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 (2008).

A figura 1 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 (HANAHA; WEINBERG, 2011).

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 20 milhões de casos novos de câncer para o ano de 2030 e a projeção de aumento para o número de óbitos por esta causa é de 13 milhões (WHO, 2014). No Brasil, as estimativas para 2017 apontam a ocorrência de aproximadamente 600.000 casos novos de neoplasias (INCA, 2015).

3.1.1. Câncer de mama e fibroadenoma: os tumores mais comuns da mama

O câncer de mama, considerado o segundo tipo mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, tem sua incidência aumentada ao longo dos anos. A cada ano, 25% dos casos novos de câncer em mulheres no mundo são de mama, sendo esperados no Brasil aproximadamente 58 mil casos novos em 2017 (WHO, 2014; INCA, 2015).

No Nordeste, esta neoplasia é responsável por 11.220 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 segundo estado com maior incidência (2.550 casos novos) (INCA, 2015).

Existem vários fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, podendo alguns 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. Alguns desses fatores não podem ser alterados como idade ou raça; outros, são relacionados à escolha pessoal como o hábito de fumar, consumir bebidas alcoólicas ou hábitos alimentares (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). 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 (MAIA, et al., 2016).

Um nódulo palpável na mama ou um achado no rastreamento mamográfico, embora seja fator de impacto emocional para a maioria das pacientes, não é sinônimo de câncer. 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 (NAZARIO, REGO; OLIVERIA, 2007). Tumores benignos têm o crescimento de suas células de forma organizada, lenta, expansiva e bem nítida, permanecendo no seu local de origem com células semelhantes às de origem e seus núcleos não estão alterados. (MEISNER et al., 2008; VIZECHI, et al, 2016).

Os fibroadenomas, inseridos nessa categoria, representam uma lesão frequente da mama, uma vez que 80% dos tumores mamários detectados em exames clínicos evidenciam essa alteração (NAZARO; REGO; OLIVEIRA, 2007). Ocorre em cerca de 30% das mulheres de forma assintomática e a faixa etária de maior incidência é de 15 a 35 anos de idade (GURAY; SAHIN, 2006). São considerados como resultado de proliferação dos componentes mesenquimal e epitelial da mama. O componente varia de acordo com o estado evolutivo, assim, na fase proliferativa, observa-se estroma rico em fibroblastos, com dilatações císticas e proliferações epiteliais benignas intraductais. Já no estágio avançado, o estroma é fibroso, com calcificação e epitélio ductal é atrófico. Clinicamente, são tumores de tamanhos variados, indolores, bem

delimitados, de consistência dura, elástica e móvel (MACÍAS; QUINTANA; RAMOS, 2014).

Em contrapartida, o desenvolvimento do câncer de mama pode envolver 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 80% de todos os cânceres de mama. Neste as células mioepiteliais e a membrana basal estão ausentes e as células tumorais estão dispersas no estroma. 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 (TOILLON et al., 2007, CHEN et al., 2011).

Alguns sinais clínicos podem ser percebidos pelas mulheres como: nódulo fixo e indolor, pele avermelhada e retraída, alteração no mamilo, nódulos na axila ou no pescoço, saída de líquido anormal da mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

3.1.2 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).

A mamografia é o método mais conhecido e utilizado nos seguimentos de saúde para o rastreamento e diagnóstico de câncer de mama, com sensibilidade variando entre 85-95% (NASCIMENTO; PITTA; RÊGO, 2015). Por recomendação do Ministério da Saúde brasileiro, como medida preventiva e de diagnóstico, o rastreamento da mama deve ser realizado para mulheres entre 50 e 69 anos através da mamografia bienal (TESSER; D'ÁVILA, 2016). Contudo, só a mamografia não é suficiente para determinar se o tumor é benigno ou maligno, sendo necessária a biópsia (NASCIMENTO; PITTA; RÊGO, 2015).

O exame histopatológico permite a avaliação da arquitetura tecidual através de análise microscópica da biópsia, no qual confere se há perda da organização tecidual e verifica a relação entre os tecidos adjacentes, sendo possível indicar o potencial invasivo das células tumorais (BRAZ et al., 2016). Para visualização dos diferentes componentes do tecido sob microscópio, as secções são coradas com um ou mais corantes, que revelam os componentes celulares. Recentemente, diferentes métodos de aquisição de dados espectrais têm sido usados para auxiliar o processo de diagnóstico com informações complementares como a composição bioquímica de células e constituintes de tecidos (GURCAN et al., 2009).

3.2 Glicobiologia

3.2.1 Biomarcadores e o papel dos carboidratos

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” (ASADULLAH; KRAMER, 2011).

Em outras palavras, a presença de DNA, RNA, proteínas e metabólitos, encontrados em fluidos corporais ou tecidos, em níveis anormais sinaliza uma condição patológica como o câncer. Uma molécula secretada por uma neoplasia

ou uma resposta específica do corpo diante da presença do câncer, são exemplos de biomarcadores (WHO, 2014).

Existem várias categorias de biomarcadores, podendo destacar aqueles que indicam o estado e a severidade da doença bem como aqueles de estratificação, auxiliando na seleção de pacientes com maior possibilidade em 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). 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 no monitoramento da recorrência da doença (LEVENSON, 2007).

Diante deste conceito de biomarcadores, os carboidratos são incluídos nessa classe devido seu papel na codificação de informações biológicas, tanto normais quanto patológicas (MISLOVICOVÁ et al., 2009). 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). São encontrados na superfície das células, num ambiente extracelular conhecido como matrix extracelular (MEC) ou glicocálix (MAURYA et al, 2010). A figura 2 apresenta um diagrama da membrana plasmática e seus componentes, sendo possível destacar a presença de carboidratos ligados a lipídeos e proteínas.

Essa localização permite que os carboidratos exerçam funções como sinalização, adesão e reconhecimento celular, atuando em reações imunológicas, e funcionando como receptores e transdutores em processos regulatórios como crescimento celular e apoptose (FUSTER; ESKO, 2005; MAURYA et al., 2010; GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

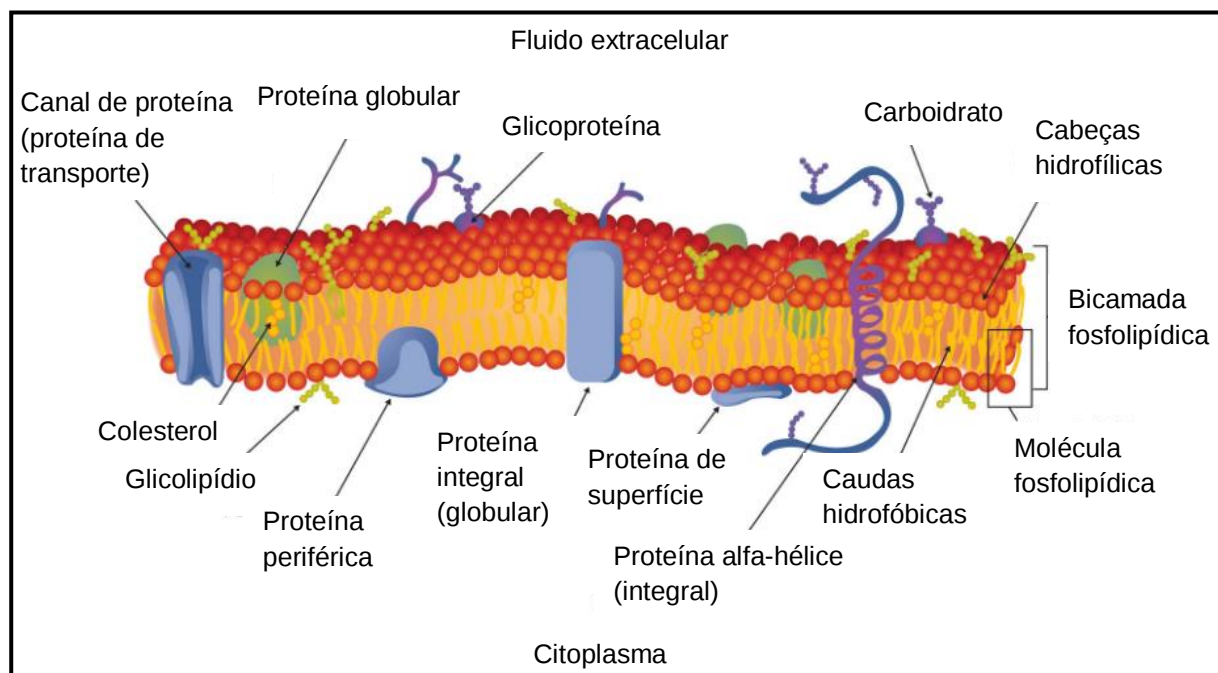


Figura 2 – Diagrama representando os diversos componentes que compõem a membrana plasmática.

Fonte: Adaptado de <<http://juanribon.com/design/plasma-membrane-diagram.php>> (2017).

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). A figura 3 apresenta numerosos processos celulares de grande importância para a carcinogênese envolvendo a glicosilação.

3.2.2 Lectinas aplicadas no reconhecimento de biomoléculas

Uma molécula que pode contribuir na identificação de carboidratos é a lectina, proteína de origem não imunológica que tem a capacidade de reconhecer especificamente carboidratos em oligossacarídeos e glicoconjugados (ISKRATSCH et al., 2009; SOBRAL et al., 2010). As lectinas se ligam aos carboidratos através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas altamente específicas e reversíveis (WU et al., 2009). A maioria 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).

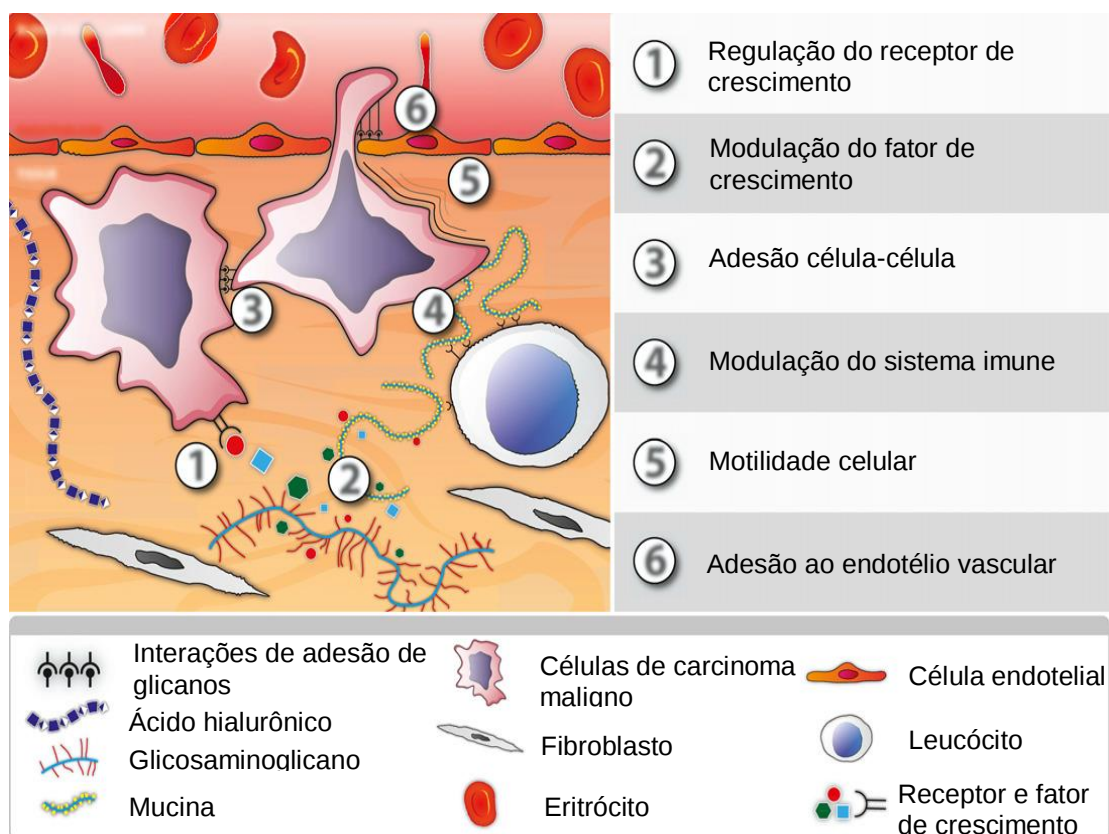


Figura 3 – Processos celulares nos quais a glicosilação desempenha papel crucial durante a carcinogênese. (1) Receptores de crescimento são influenciados pela N-glicosilação: com atuação das galectinas; (2) Fatores de crescimento podem ter concentrações elevadas ou retidas por glicosaminoglicanos e mucinas O-glicosiladas; (3) Adesão célula-célula pode ser mediada através da modulação de integrinas e caderinas N-glicosiladas; (4) Mucinas O-glicosiladas podem agir como barreira física em receptores de leucócitos, modulando o sistema imunológico; (5) A motilidade de células transformadas pode ser aumentada por N-glicosilação de integrinas e (6) A adesão ao endotélio pode ser mediada por antígenos de Lewis por meio de selectinas endoteliais. Fonte: Adaptado de Potapenko et al (2010).

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 (AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005).

Entendida a especificidade das ligações lectina-carboidrato e devido a sua versatilidade, as lectinas têm sido aplicadas para compreensão de vários processos biológicos: 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; WU *et al.*, 2009).

Alguns exemplos de lectinas são apresentados da tabela 1. 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 (AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005; DOMENEGHINI *et al.*, 2005).

Tabela 1 – 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 (β 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).

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 (SHARON; LIS, 2004; BLOMME, et al., 2009; GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

A UEA-I é uma metaloglicoproteína hemodimérica, tendo cada subunidade aproximadamente 27 KDa. 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. 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. Em lectinas leguminosas íons metálicos positivamente carregados são componentes estruturais dessas proteínas. Eles estão adjacentes ao sítio de ligação sendo muito frequente 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 4 exibe a estrutura da lectina *Ulex europaeus* I mostrando os sítios de ligação a carboidratos.

Em 1936, Sumner e Howell revelaram que a lectina Concanavalina A (Con A), presente em extratos de sementes de feijão, *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. Essa proteína, membro mais bem estudado dentro da família de lectinas leguminosas, 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 (SHARON, 2008; PDB, 2011).

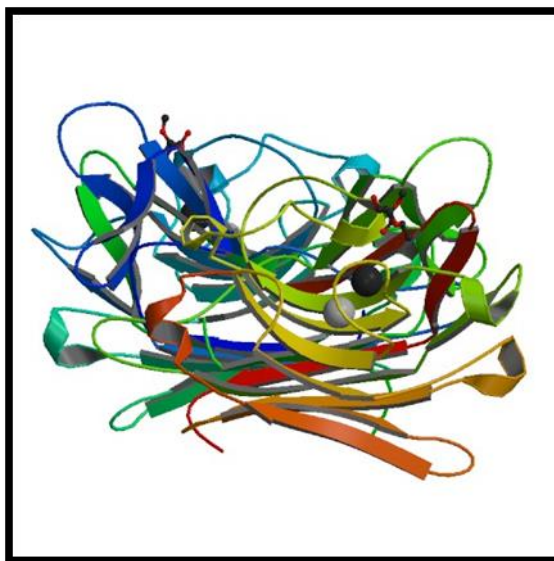


Figura 4 – Estrutura da lectina UEA-I.
Em cinza claro, o íon manganês; em cinza escuro, o íon cálcio.
Fonte: AUDETTE et al.(2002 *apud* PDB, 2011).

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. 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 (SHARON, 2008).

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. As interações estão centradas no núcleo trimanosídeo, encontrado em todos os glicanos N-ligados (SHARON, 2007). A figura 5 ilustra a estrutura da Concanavalina A livre, sendo observados os íons cálcio e manganês.

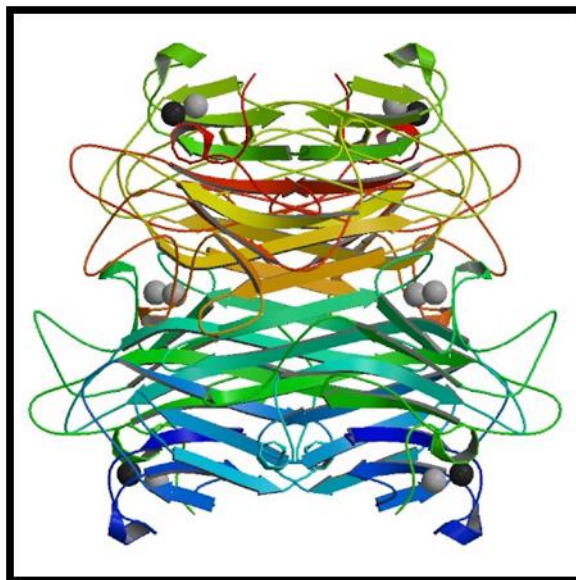


Figura 5. Estrutura da Con A sem ligante.
Em cinza claro, o íon manganês e em cinza escuro, o íon cálcio.
Fonte: HARDMAN; AINSWORTH (1972, *apud* PDB, 2011).

Estudos sobre câncer de mama apontam para alteração do padrão de expressão dos açúcares glicose e fucose, pelos quais as lectinas e Con A e UEA-I têm afinidades. Alfa-L-fucose, componente chave incorporada à superfície de células de câncer de mama, contribui para as características de progressão tumoral na mama, sendo sua expressão aumentada em células epiteliais de várias origens, incluindo câncer de mama (CHENG et al., 2015). Já a Con A foi utilizada para identificar os carboidratos D-glicose/D-manose em tecidos mamários humanos normais e transformados, estando mais presentes no estroma (ANDRADE et al., 2013).

3.2.3 Glicoproteínas atuando como biomarcadores

Muitos marcadores moleculares usados para o diagnóstico são úteis para acompanhar a evolução da doença e metástase, porém ineficientes para o diagnóstico precoce (MISEK; KIM, 2011). As glicoproteínas de membrana plasmática uPAR, GP88 e MUC1 estão presentes em níveis aumentados no soro de pacientes com diversos tipos de cânceres, inclusive câncer de mama, estando associadas a uma via de disseminação das células tumorais (MEIJER-VAN GELDER et al., 2004; DUFFY et al., 2014).

O marcador sorológico mais utilizado para o diagnóstico de câncer de mama é o CA 15-3 que mede níveis da glicoproteína de membrana mucina (MUC-1) disseminada pelas células tumorais na corrente sanguínea. (TKACZUK et al., 2011). Mucina 1 (MUC1) é uma proteína transmembranar altamente O-glicosilada, expressa na superfície apical de células epiteliais. Sabe-se que no processo tumorigênico, há aumento dessa proteína, favorecendo interações entre moléculas sinalizadoras (GHOSH et al., 2013). Este marcador mostra níveis elevados de MUC-1 em 75% a 90% das pacientes com câncer de mama metastático (TKACZUK et al., 2011).

Mudanças fenotípicas associadas com transformação maligna, como proliferação celular, adesão e migração, geralmente são mediadas ou iniciadas por proteínas associadas à membrana plasmática (LETH-LARSEN; LUND; DITZEL, 2010). Um receptor de membrana envolvido no processo carcinogênico é uPAR. A protease uPA (ativador do plasminogênio do tipo uroquinase) e seu inibidor PAI-1 (inibidor do ativador de plasminogênio -1) são considerados um dos melhores biomarcadores disponíveis para câncer de mama, embora não seja ainda usado tão usados na clínica. A uPA funciona quando ligada ao receptor de membrana plasmática, receptor de uPA (uPAR), estando a ativação desse complexo (uPA-uPAR), envolvida na sinalização que regula a proliferação, migração e metástase. Dois inibidores endógenos estão envolvidos na restrição da função proteolítica da uPA (PAI-1 e PAI-2). Quando ligados ao complexo uPA-uPAR, sofrem endocitose, sendo o complexo degradado e uPAR reciclado parcialmente para a membrana (DUFFY et al., 2014). Em um estudo de marcadores tumorais baseado em soro de pacientes com câncer de mama foi observado que altos níveis de uPAR estavam relacionados a um pior prognóstico (MEIJER-VAN GELDER et al., 2004).

Outra glicoproteína de membrana plasmática envolvida com a sobrevivência e crescimento celular em câncer de mama é a GP88 (EDELMAN et al., 2014). A glicoproteína GP88, também conhecida como progranulina, fator de crescimento derivado de célula PC, precursor epitelina/progranulina ou acrogranina, é o maior membro da família de fatores de crescimento chamados epitelina/granulina, caracterizado por possuir porção rica em cisteína dupla. Identificada inicialmente por sua expressão aumentada em câncer de mama, foi

investigada em vários tipos de câncer onde mostrou o mesmo comportamento, ao passo que em tecidos normais sua expressão é baixa ou ausente (FERRERO et al, 2016). No câncer de mama, sua alta expressão está associada a um maior risco de recorrência e de morte (EDELMAN et al., 2014).

3.3 Técnicas histológicas

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, permitindo a identificação dos elementos teciduais, de forma a proporcionar um diagnóstico histológico (TIMM, 2005). No entanto, embora seja o principal método empregado para observação de tecidos, existe a necessidade de técnicas complementares visando um diagnóstico diferencial mais preciso (VIZECHI et al., 2015).

Estudos histoquímicos têm mostrado que alterações quantitativas e qualitativas são observadas em glicoconjugados de superfície celular durante processos oncogênicos (LIMA, A. L. R. et al, 2010; LIMA, L. R. A. et al., 2013; RÊGO, 2009; SILVA, et al., 2014). Já se sabe que a glicosilação alterada constitui uma via universal para transformação e progressão tumoral (PINTO et al., 2010).

A imunohistoquímica (IHQ), é uma técnica adicional, apresentando-se como um poderoso meio de identificação *in situ* de várias estruturas celulares e teciduais que podem estar diretamente associadas a patologias, bem como das consequências, a nível funcional e morfológico, da ação desses mesmos elementos (FERRO, 2014). Esse método baseia-se na reação anticorpo-antígeno para detecção e caracterização de moléculas no seu local de origem (FERRO, 2014). Como essa reação não visível sob microscopia de luz, a visualização do complexo antígeno-anticorpo torna-se possível pela adição de um fluorocromo (conjugado) ao anticorpo, que pode então ser observado ao microscópio, ou, alternativamente, de uma enzima, cujo produto de reação pode igualmente ser visualizado (CAPELOZZI, 2009). IHQ hoje é considerada a técnica padrão ouro e complementar, indispensável na resolução de certos problemas de diagnóstico diferencial formulados nas lâminas coradas com a

coloração básica de rotina (VIZECHI, et al., 2015). Mesmo diante do grande subsídio, algumas dificuldades são persistentes. Podem ser citadas, por exemplo: em virtude da técnica possuir muitas etapas, é possível incorrer em interações indesejadas, com resultados falsos; os anticorpos podem reagir de maneira cruzada com mais de um antígeno resultando em altos níveis de coloração de fundo; problemas de sensibilidade do sistema de detecção; além disso, a contribuição da IHQ para a resolução de problemas em anatomia patológica depende da experiência dos que executam e interpretamos resultados (GARCIA, 2013; FERRO, 2014, VIZECHI et al., 2015).

Dentro deste contexto, a técnica de histoquímica com lectinas vem sendo utilizada em adição a imunohistoquímica como ferramenta auxiliar na diferenciação de tecidos normais e transformados. Através de secções de parafina, lectinas são tradicionalmente estudadas via coloração direta ou indireta. 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 (LEAL, et al., 2012), da mama (CAZET et al., 2010; SANTOS et al., 2014), de pele (FERREIRA et al., 2013), de próstata (LIMA et al., 2010), dentre outros.

3.4 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).

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). 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 (VILA NOVA, 2003; SANTOS et al., 2006; LIMA et al., 2013).

Complexos de íons lantanídeos têm recebido atenção devido as suas propriedades fotofísicas e seu uso como candidatos para uma variedade de aplicações (SOTOMAYOR et al. 2008; MARTINS et al., 2010). A característica chave da luminescência de lantanídeos que rende seu interesse bioanaliticamente é o fato dos íons lantanídeos terem luminescência por um tempo de vida extremamente longo. Além disso, as bandas de emissão são estreitas, sem sobreposição dos espectros de excitação e de emissão, podendo formar complexos com várias classes de ligantes (HAGAN; ZUCHNER, 2011). 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, que tem o papel de 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 é conhecido como efeito antena (MARTINS; ISOLANI, 2005).

Algumas características fazem desses complexos excelentes reveladores tais como alta estabilidade cinética e termodinâmica, baixo custo, 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 (SÁ et al., 2000; MARTINS; ISOLANI, 2005; MARTINS et al., 2010).

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 boa solubilidade em água, elevada estabilidade cinética e fotoquímica, demonstrando grande potencial para

aplicação em sistemas biológicos (VILA NOVA, 2003). A figura 6 apresenta a estrutura de um criptato de lantanídeo.

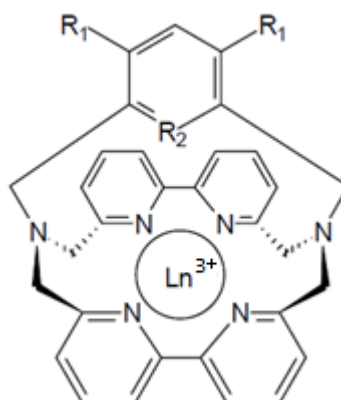


Figura 6 – Estrutura do criptato de lantanídeo.
Fonte: VILA NOVA (2003).

Outro meio de se obter geração de luz pode ser através da quimioluminescência, a qual é gerada por intermédio de uma reação química, acompanhada de liberação de energia, sendo a emissão de luz proporcional à concentração da amostra (NASCIMENTO, 2013). Esse fenômeno é observado em marcadores, como os ésteres de acridina, os quais são altamente sensíveis sendo aplicados em ensaios imunológicos para diagnósticos clínicos (NATRAJAN; WEN, 2015)

Dentre as vantagens desse marcador luminescente estão a possibilidade de detecção em limites muito baixos (fentomoles ou atomoles), instrumentação simples, rapidez durante as análises e fotoestabilidade (NASCIMENTO, 2013).

Vários estudos em histoquímica têm propostos a substituição de enzimas, usadas como marcadores, por compostos quimioluminescentes, como por exemplo, a conjugação de lectinas a éster de acridina em tumores cutâneos e prostáticos (SILVA, et al., 2014; LIMA, et al., 2013).

Esse estudo propôs o uso de sondas luminescentes aplicadas em métodos de diagnósticos auxiliares como instrumento de contribuição para melhorar a diferenciação de tecidos mamários.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material e Equipamentos

As lectinas de *Ulex europeus* agglutinin I (UEA-I) e de *Canavalia ensiformis* (Concanavalina A, Con A) foram adquiridas da Sigma-Adrich (EUA). Criptatos de Eu³⁺ foram sintetizados no Laboratório de Terras Raras (BSTR) do Departamento de Química Fundamental – UFPE. 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). Os espectros de luminescência das amostras foram registrados em espectrofluorímetro SPEX-FLUOROG 2 com monocromadores duplos SPEX 1680, no Laboratório dos Elementos do Bloco-f, Instituto de Química, USP-SP. Os anticorpos GP88 (Acrogranin – sc-11342), MUC1 (Mucin 1 – sc-53377), uPAR (sc-9793) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology. Para a bioconjugação com o éster de acridina foi usado o kit de conjugação “Chemiluminescent labeling kit catalog No ADI-907-001, adquirido da Enzo Life Sciences. A análise de quimioluminescência foi realizada em Luminômetro Luminometer Modulus Single Tube 9200-001 (Turner BioSystems, EUA).

4.2 Seleção das amostras

A população de estudo foi composta por uma coorte retrospectiva de base hospitalar de mulheres com diagnóstico prévio de tumores mamários (fibroadenoma, FIB, e carcinoma ductal invasivo, CDI) atendidas no ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco no período de 2009 a 2014. Foram também utilizadas biópsias fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFEP) de tumores mamários (fibroadenoma e carcinoma ductal invasivo, CDI) do Banco de Tumores do Grupo Biomarcadores no Câncer (BmC) da UFPE, obtidas através de doação do Hospital do Câncer de Pernambuco e LACEN (Laboratório Central de Saúde Pública). Biópsias de mastoplastias redutoras bilaterais foram utilizadas como tecido normal (controle). Os critérios de elegibilidade para pacientes com câncer de mama incluíram: o diagnóstico

confirmando o câncer de mama, a doença está enquadrada nos estágios de 1 a 4, e a cirurgia ser do tipo lumpectomia ou mastectomia. Os critérios para voluntárias saudáveis foram não ter histórico familiar de câncer de mama e não ter este diagnóstico no momento da pesquisa. Para histoquímica com lectinas (HqL) foram selecionadas 24 biópsias: 10 com FIB, 10 com CDI, 4 mastoplastias (controle normal). Para imunohistoquímica (IHQ) foram selecionadas 87 biópsias: 77 com CDI e 10 mastoplastias (controle normal). Todos os casos foram selecionados a partir dos laudos emitidos pelos médicos patologistas das respectivas instituições. Os dados clínico-patológicos das pacientes (idade da paciente, tamanho do tumor, presença de carcinoma ductal *in situ* – CDIS, e invasão linfonodal) foram coletados no SAME (Serviço de Atendimento Médico e Estatística) do Hospital das Clínicas da UFPE. O uso das biópsias foi aprovado pelo Comitê de Bioética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CAE 06586612.9.0000.5208 – 2012).

4.3 Bioconjugação

4.3.1 Conjugação das Lectinas ao criptato de Eu^{3+}

A conjugação das lectinas Con A e UEA-I ao criptato de Eu^{3+} foi realizada através da ligação direta dos grupamentos carboxílicos, uma vez que o crip(Eu^{3+}) estava funcionalizado com etilenodiamina. Para isso, foram feitas buscas no banco de dados Protein Data Bank (PDB) para coletar informações sobre as sequências primárias de ambas as lectinas, identificação do número e tipos de cadeias laterais de cada aminoácido e suas estruturas.

4.3.2 Conjugação de anticorpos ao éster de acridina

Os anticorpos anti-uPAR, anti-GP88 e anti-MUC1 foram conjugados ao éster de acridina seguindo as instruções contidas no kit de conjugação. Brevemente, 0,1mg dos anticorpos anti-uPAR e anti-MUC1 e 0,2 mg do anticorpo anti-GP88 foram incubados com 2,64 μL , 0,79 μL e 3,59 μL do éster de acridina (2mg/mL, diluídos em N,N-dimetilformamida), respectivamente, agitando-se por 30 minutos à 25°C, seguida de adição de 10 μL de Lisina 10%

(em tampão bicarbonato de sódio, pH 8,5). Cada conjugado foi aplicado em coluna de filtração em gel e eluído em tampão de coluna, ambos fornecidos pelo fabricante, sendo coletadas 14 frações de 1mL em tubos de eppendorf.

4.4 Caracterização dos conjugados lectinas-crip(Eu³⁺)

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 Eu³⁺ após a conjugação com as lectinas.

4.4.1 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.

4.4.2 Dicroísmo Circular (DC)

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 Eu³⁺. 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).

4.4.3 Ensaios de Luminescência

As medidas de luminescência estática e dinâmica são baseadas na emissão da radiação eletromagnética. Os espectros de luminescência das amostras foram registrados em um espectrofluorímetro cujas 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 bem 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. Os ensaios de luminescência das soluções foram realizados conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – 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 $\mu\text{g/mL}$

4.5 Histoquímica com lectinas (HqL) em tecidos mamários humanos usando os conjugados lectinas-cripto(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 montagem das lâminas com PBS. A histoquímica sem a lectina também foi realizada sendo a incubação da amostra apenas com o criptato de Eu^{3+} . 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. 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.

4.6 Análises luminescente e espectroscópica após conjugação dos anticorpos ao éster de acridina

Alíquotas de 1 μL foram recolhidas de cada fração para análise quimioluminescente em luminômetro. Para medição de quimioluminescência foram adicionadas 50 μL das soluções Trigger 1 e 2 (soluções diluídas de ácido nítrico e hidróxido de sódio (<0,2M)). Os valores obtidos de quimioluminescência foram avaliadas em Unidade de Luz Relativa (RLU). As frações também foram examinadas quanto ao conteúdo proteico, espectrofotometricamente a 280nm. As frações que apresentaram tanto luminescência quanto proteína foram agrupadas e estocadas a 4° C até o uso.

4.7 Imunohistoquímica (IHQ) utilizando sondas quimiluminescentes

Cortes (4 µm) de tecidos mamários transformados (CDI) e normais (mastoplastia) foram fixados em lâminas de vidro. Os tecidos foram desparafinizados em xilol por 90 min e hidratados em álcool graduado (3x 100% e 1x 70%, 5 minutos por cuba), seguidos de lavagem com PBS por 5 minutos e incubação com o conjugado por 2 horas à 4°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3x com PBS por 5 minutos. A área tumoral de 1 cm² foi identificada através de sobreposição das lâminas coradas com HE, sendo essa região transferida para tubo de polipropileno contendo 50 µL de PBS. A intensidade de emissão de cada amostra foi medida em luminômetro, o mesmo utilizado para análise luminescente dos conjugados. As amostras foram examinadas quanto à intensidade de luminescência recebendo a denominação de maior ou menor intensidade, caso estivessem respectivamente acima ou abaixo da média de emissão.

As sondas luminescentes obtidas pela bioconjugação foram usadas na imunohistoquímica diluídas conforme discriminado na Tabela 3.

Tabela 3 – Descrição da diluição dos anticorpos usados na imunohistoquímica.

Anticorpo	Diluição
Anti-MUC1	1:20
Anti-uPAR	1:10
Anti-GP88	1:50

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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.

5.1 Conjugação das lectinas ao criptato de Eu^{3+}

A Figura 7 apresenta a sequência primária de um monômero da lectina UEA-I (número de identificação 1FX5 no PDB, metaloglicoproteína dimérica, massa molecular 68.000 daltons, composta de 484 resíduos de aminoácidos, específica para L-fucose em grupo sanguíneo humano determinante H do tipo 2).

A sequência primária da Con A (PDB número 1JBC, metaloglicoproteína tetramérica, massa molecular 102.332 daltons composta por 948 resíduos de aminoácidos, específica para α -D-manose e α -D-glicose). A Figura 8 apresenta a sequência primária de aminoácidos de um monômero da Con A.

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

S	D	D	L	S	F	K	F	K	N	F	S	Q	N	G	K	D	L	S	F	Q	G	N	A	S	V	I	E	T	G	10	20	30
V	L	Q	L	N	K	V	G	N	N	L	P	D	E	T	G	G	I	A	R	Y	I	A	P	I	H	I	W	N	C	40	50	60
N	T	G	E	L	A	S	F	I	T	S	F	S	F	F	M	E	T	S	A	N	P	K	A	A	T	D	G	L	T	70	80	90
F	F	L	A	P	P	D	S	P	L	R	R	A	G	G	Y	F	G	L	F	N	D	T	K	C	D	S	S	Y	Q	100	110	120
T	V	A	V	E	F	D	T	I	G	S	P	V	N	F	W	D	P	G	F	P	H	I	G	I	D	V	N	C	V	130	140	150
K	S	I	N	A	E	R	W	N	K	R	Y	G	L	N	N	V	A	N	V	E	I	I	Y	E	A	S	S	K	T	160	170	180
L	T	A	S	L	T	Y	P	S	D	Q	T	S	I	S	V	T	S	I	V	D	L	K	E	I	L	P	E	W	V	190	200	210
S	V	G	F	S	G	S	T	Y	I	G	R	Q	A	T	H	E	V	L	N	W	Y	F	T	S	T	F	I	N	T	220	230	240
N	S																													242		

Figura 7 – Sequência de aminoácidos de monômero de UEA- I. Os aminoácidos com cadeias laterais com grupamentos aminas ou amidas (42) estão destacados em azul e os com cadeias laterais com grupamentos carboxílicos (24) estão destacados em vermelho.

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

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	

Figura 8 – Sequência de aminoácidos de monômero de Con A. Os aminoácidos com cadeias laterais com grupamentos aminas ou amidas (37) estão destacados em azul e os com cadeias laterais com grupamentos carboxílicos (25) estão destacados em vermelho.

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

O criptato de Eu^{3+} (Crip(Eu^{3+})) utilizado estava funcionalizado com o etilenodiamina e por isso a conjugação foi realizada 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). Não ocorrendo impedimento estérico destes resíduos de aminoácidos a conjugação obedeceria a proporção de 1 mol de UEA-I para 48 mols de criptato de Eu^{3+} , assim como 1 mol de Con A para 100 mols de criptato de Eu^{3+} . Com base na Tabela 2, uma solução de criptato de Eu^{3+} foi incubada com uma solução da lectina (200 $\mu\text{g/mL}$), em tampão fosfato de sódio (PBS) 100 mM pH 7,2, suplementado com NaCl 150mM, por 2h a 25°C. Após a conjugação, a solução de lectina-criptato foi dialisada (Dialysis Tubing Cellulose – AldrichSigma Ltda) contra PBS, à 4° C por 16 horas, sob agitação branda.

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

5.2.1 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 crip(Eu^{3+}) (Figura 9).

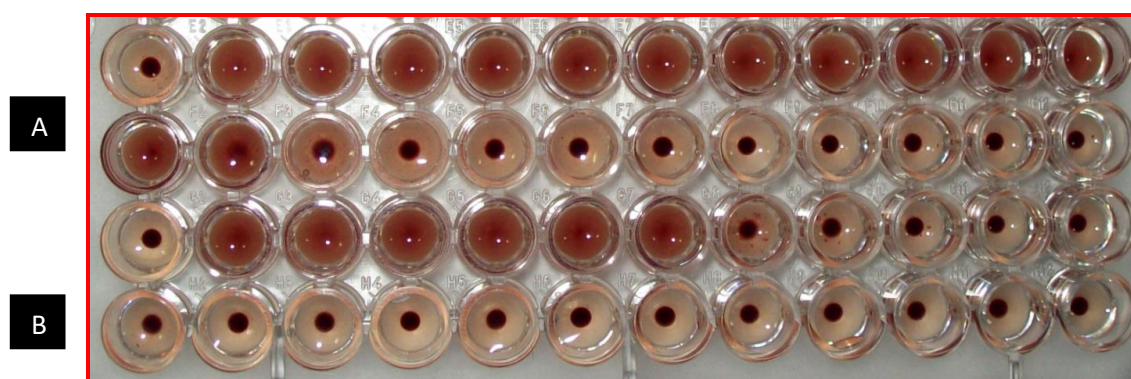


Figura 9 – Teste da atividade hemaglutinante da lectina Con A com eritrócitos de coelho.

Teste consistiu em 24 poços para cada amostra, sendo o primeiro poço considerado o branco (sem lectina). A partir do segundo poço, diluições seriadas foram realizadas. Teste positivo tanto para a lectina Con A pura (A) quanto para a lectina Con A conjugada ao crip(Eu^{3+}) (B).

Fonte: Autora.

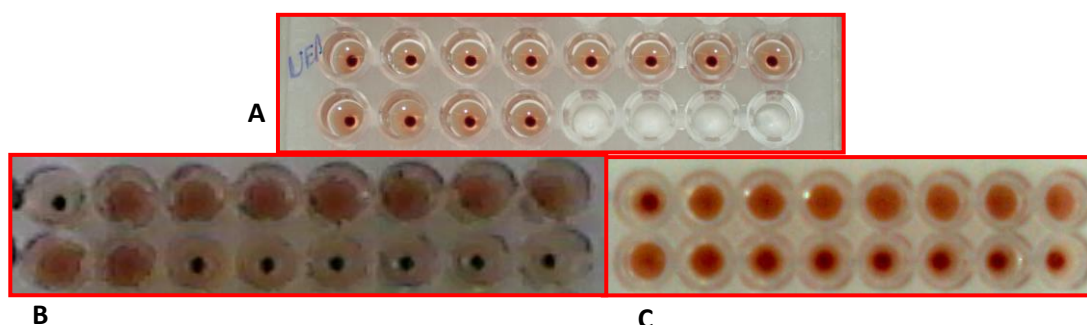


Figura 10 – Atividade hemaglutinante da lectina UEA-I com eritrócitos de coelho e eritrócitos humanos.

Teste consistiu em 16 poços para cada amostra, sendo o primeiro poço considerado o branco (sem lectina). A partir do segundo poço, diluições seriadas foram realizadas. (A) Teste negativo realizado com eritrócitos de coelho. Testes positivos realizados com eritrócitos humanos: (B) lectina pura; (C) lectina conjugada ao criptato (Eu^{3+}).

Fonte: Autora

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 10).

Diferente deste estudo, Tenório e colaboradores (2015) publicaram um estudo no qual propuseram uma sonda molecular fluorescente usando Con A conjugada a Quantum Dots de Telureto de Cádmio (CdTe). A conservação da atividade biológica da lectina Con A foi avaliada após a conjugação através da atividade hemaglutinante, exibindo atividade equivalente ao controle. Outro estudo (Menezes, 2007) também testou a hemaglutinação da lectina Con A após conjugação com criptatos de lantanídeos (Eu^{3+} e Tb^{3+}), referindo a aglutinação dos eritrócitos de coelho. Contudo, como a análise foi qualitativa e baseando-se apenas na lectina conjugada, é insuficiente para concluir se houve redução da atividade biológica da lectina após conjugação (MENEZES, 2007).

Em estudo sobre a detecção da atividade lectínica em tecidos de *Cassia fistula* L., fontes diversas de eritrócitos foram usadas para medir a atividade hemaglutinante de extratos proteicos extraídos dessa planta, como eritrócitos humanos tipo A, de coelho, de carneiro e de bezerro. Os resultados mostraram que a atividade é maior quando o ensaio é realizado com eritrócitos de coelho (ARAÚJO et al., 2013).

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). O sistema do grupo sanguíneo ABO possui 3 antígenos diferentes (A, B e/ou O (H)), sendo a L-fucose o precursor dos antígenos A e B. Corroborando com nosso estudo, Cabral Filho (2013) investigou antígenos eritrocitários usando quantum dots conjugados a UEA-I e verificou que os eritrócitos do tipo O tiveram a maior quantidade de L-fucose expressa na membrana dessas células (aproximadamente 85%). Por outro lado, no grupos A, B e AB a maior parte da L-fucose é convertida nos antígenos A ou B, resultando numa pequena parcela de células marcadas (A e B, aproximadamente 8%; AB<5%). O fundamento exposto acima para a maior atividade dos eritrócitos tipo O sustenta a escolha deste componente para os ensaios de hemaglutinação para a lectina UAE-I.

5.2.2 Dicroísmo circular (DC)

Para realização do DC várias concentrações foram testadas, no entanto, a que obteve melhor resultado foi de 0,1mg/mL por apresentar um espectro com menor ruído. O espectro de dicroísmo circular da Con A pode ser visto na figura 11. 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.

A figura 12 apresenta o comparativo entre o espectro do dicroísmo circular da UEA-I pura e conjugada aos criptatos de Eu^{3+} . 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 a resposta obtida na AH após a conjugação, mostrando a manutenção de atividade.

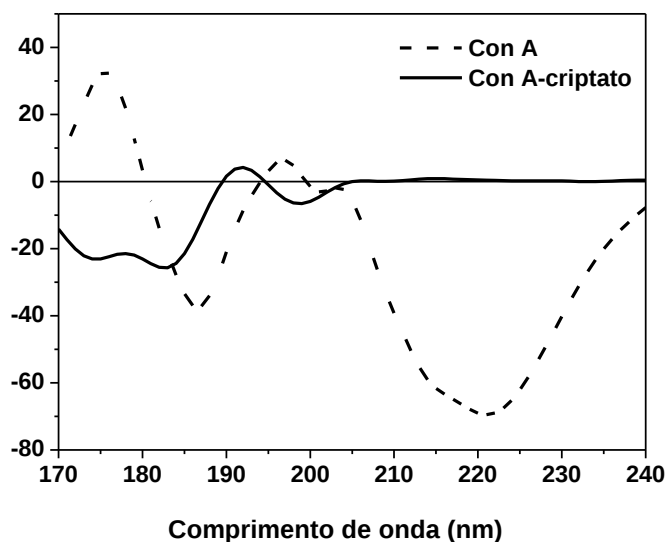


Figura 11 – Espectro do dicroísmo circular apresentando a absorção das amostras da lectina Con A e do conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}), na concentração de 0,1 mg/mL.

Fonte: Autora

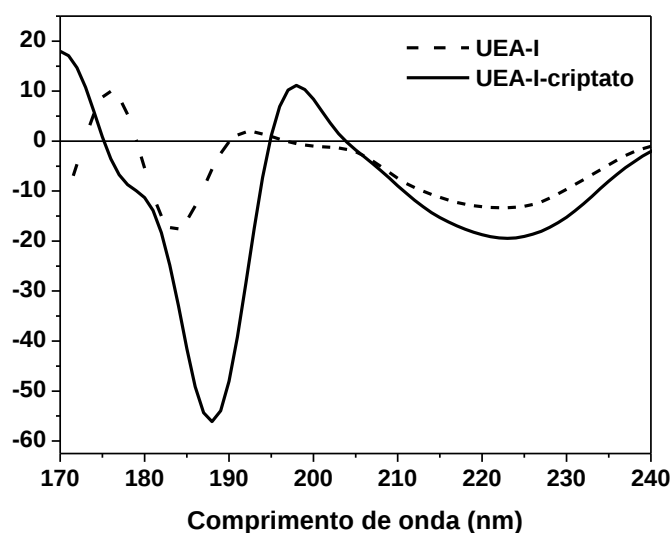


Figura 12 – Espectro do dicroísmo circular comparando a amostra da lectina UEA-I pura e do conjugado, UEA-I-Crip(Eu^{3+}), na concentração de 0,1 mg/mL.

Fonte: Autora

No estudo de Tenório e seus colegas (2015), o espectro de DC na região próxima a UV indicou que não houve desmembramento da estrutura secundária da lectina quando comparado o conjugado CdTe-MSA QD-(Con A) com a proteína nativa.

Num estudo de revisão sobre biofuncionalização de nanopartículas, foi descrito que a conjugação covalente inespecífica, como a adotada neste trabalho, apresenta vantagens e desvantagens. Esse método de conjugação liga grupos funcionais de proteínas a nanopartículas, permitindo a condensação dos grupos amino e carboxílicos, podendo ser usado um agente intermediário como o glutaraldeído. Dentre as vantagens está a garantia da associação entre as biomoléculas. Em contrapartida, a atividade biológica das proteínas pode ter prejuízos devido a distorções estruturais resultantes de interações com a nanopartícula (AVVAKUMOVA et al., 2014). Portanto, a alteração no espectro de DC do conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}) pode ter sido o resultado de acomodação das moléculas durante a conjugação entre a lectina e o composto luminescente, não significante para o sítios de reconhecimento a carboidrato.

5.2.3 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.

A conjugação nas diferentes proporções foi testada e o espectro de emissão pode ser observado na figura 13. 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 aqui analisados foram preparados conforme a segunda opção.

A lectina UEA-I apresentou dois comprimentos de onda para excitação e, consequentemente, de emissão. Nos espectros de luminescência das lectinas puras o comprimento de onda de excitação foi 293,8 nm e 379,2 nm para UEA-I e de 377nm 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 4).

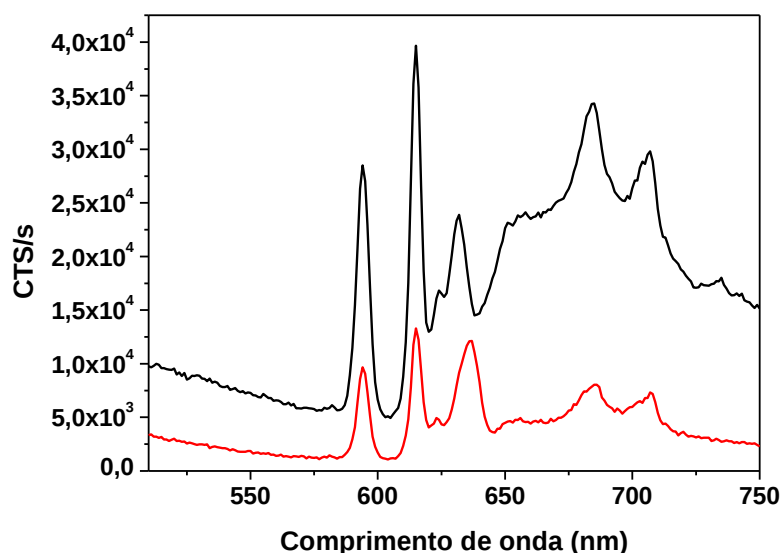


Figura 13 – Espectro de emissão do conjugado UEA-I-Crip(Eu^{3+}) em diferentes proporções.

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

Fonte: Autora.

Tabela 5 – Resultados das medidas de excitação e emissão das amostras testadas.

Amostra	$\lambda_{\text{exc.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em.}}$ (nm) $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$	$\lambda_{\text{em.}}$ (nm) $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$	$\lambda_{\text{em.}}$ (nm) $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$	$\lambda_{\text{em. máximo}}$ (nm)	Intensidade Máx. (CTS/s)
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 CTS/s (contagem de fótons por segundo), 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 CTS/s (Con A-Crip(Eu^{3+})). A tabela 5 apresenta os valores obtidos durante as análises das amostras. Transições fracas como, $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ e $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_3$ 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 14 estão representados espectros de emissão resolvida no tempo do conjugado UEA-I-Crip(Eu^{3+}) com atraso (delay) de 0 msec e 1 msec. Na figura 15, 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. Background (sinal de fundo) de medições de luminescência pode surgir de várias fontes, incluindo vasos e membranas celulares. Em amostras típicas, soro ou tecido, há uma multiplicidade de substâncias luminescentes, por exemplo, proteínas (HAGAN; ZUCHNER, 2011). A emissão de proteínas já é esperada ocorrer uma vez que resíduos de triptofano, aminoácido que absorve luz ultravioleta, está presente na grande maioria dessas moléculas. Em sua tese, Vila Nova (2003) realizou análise espectroscópica de fluorescência obtendo emissão intrínseca da lectina Con A no comprimento de onda em torno de 330 nm. Ensaio de luminescência resolvida no tempo é um método que detecta o sinal de fluorescência a partir de tempo específico, determinado de acordo com as características do composto luminescente. Desta forma, a contagem dos fótons que chegam ao detector antes do tempo estipulado é ignorada. Em comparação com os corantes luminescentes convencionais, o criptato de Eu^{3+} apresenta a vantagem de possuir longo tempo de vida, sendo possível iniciar o ciclo de aquisição de fótons após a fluorescência indesejada da amostra ter sido cessada (escala de nanossegundos) (HAGAN; ZUCHNER, 2011). Portanto, neste estudo pode-se notar que ao analisar os conjugados com atraso de 1msec houve ausência da emissão característica das lectinas, cuja banda encontra-se na região entre 410 e 570nm.

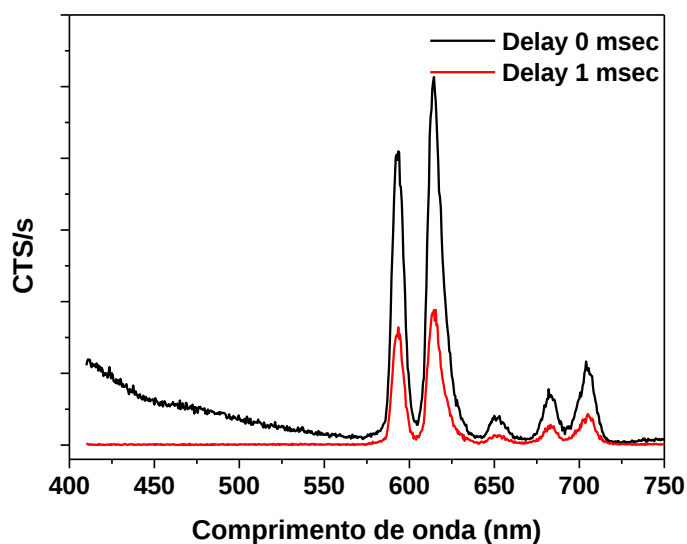


Figura 14 – Espectros de emissão resolvida no tempo do conjugado UEA-I-Crip(Eu^{3+}) com diferentes atrasos (delays).

Fonte: Autora.

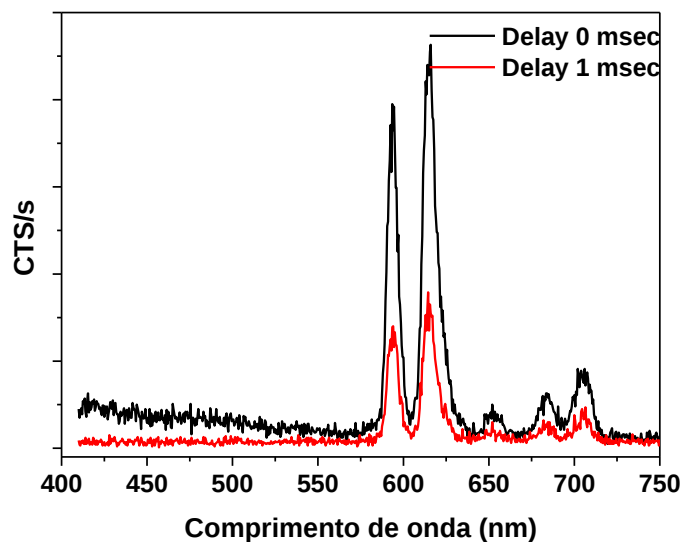


Figura 15 – Espectros de emissão resolvida no tempo do conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}) com diferentes atrasos (delays).

Fonte: Autora.

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 utilizar

os conjugados até aqui estudados para ensaios histoquímicos e verificar seu desempenho como sondas luminescentes em análise quantitativa.

5.3 Histoquímica com lectinas-Crip(Eu^{3+})

5.3.1 Análise espectroscópica de tecidos mamários humanos submetidos à histoquímica com lectinas conjugadas ao crip(Eu^{3+})

O criptato de Eu^{3+} tem 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).

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 $1,4 \times 10^7$ CTS/s. 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 apresentado na figura 16, nenhum dos tecidos analisados (normal, FIB e Con A) apresentou autofluorescência através desse método. Em 2007, Menezes investigou a luminescência de tecidos mamários (FIB, CDI e normal) usando o conjugado Con A-crip-Tb(III) e verificou que mesmo na ausência do conjugado, os tecidos examinados apresentaram luminescência, associando esse fato a autofluorescência do tecido. Diante desse evento, em seus estudos, o criptato de Eu^{3+} foi eleito para ser usado em conjugações futuras, uma vez que emite na região do vermelho, distante da região onde ocorre esse efeito.

Os conjugados Con A-crip(Eu^{3+}) e UEA-I-crip(Eu^{3+}) apresentaram diferentes resultados nos tecidos testados. Em tecidos normais, tratados com ambos os conjugados, não foram observadas as transições do íon Eu^{3+} (Figura 17).

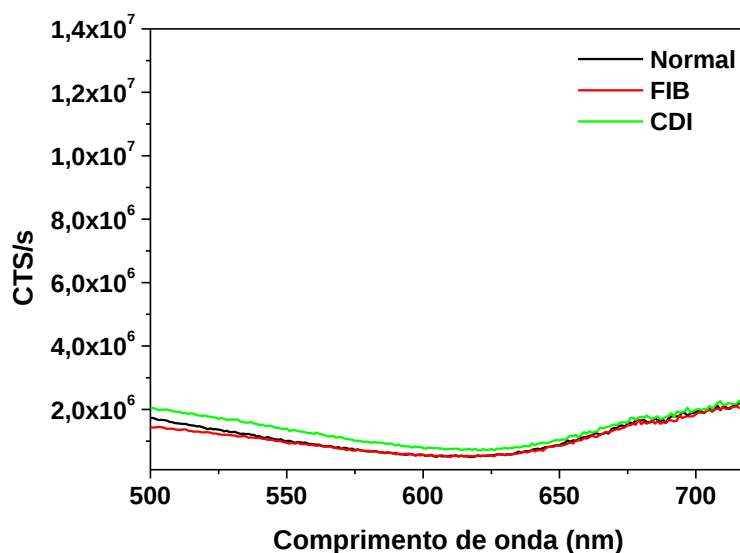


Figura 16 – Espectros de luminescência de tecidos mamários humanos normal, com diagnóstico de CDI e FIB, ambos sem corante ou lectinas.

Fonte: Autora.

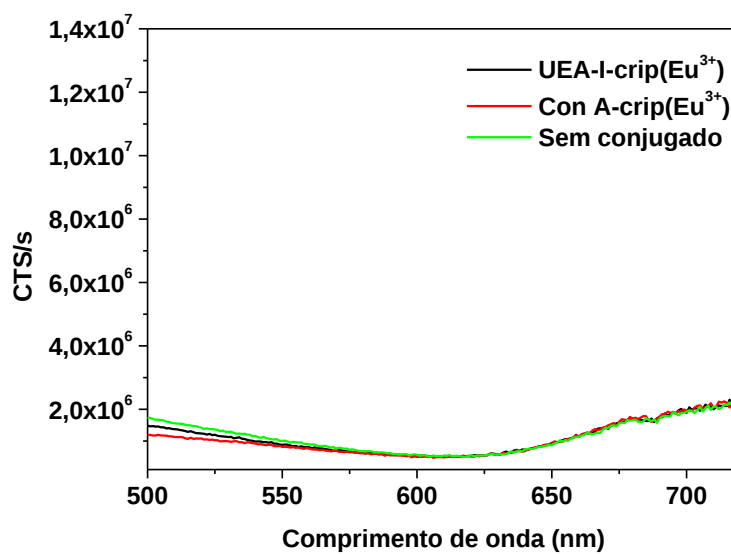


Figura 17. Espectros mostram a ausência de luminescência em tecidos controle tratados com Con A-Crip(Eu^{3+}) e UEA-I-Crip(Eu^{3+}).

Fonte: Autora

Amostras de fibroadenoma tratadas com Con A-crip(Eu^{3+}) mostraram luminescência na região entre 580 nm e 707 nm (Figura 18). Portanto, foi detectada nessas amostras a presença das transições do íon, com máximo de

emissão em 616 nm ($^5D_0 \rightarrow ^7F_2$). Tecidos de FIB submetidos à marcação pelo conjugado UEA-I-crip(Eu^{3+}) não mostraram luminescência.

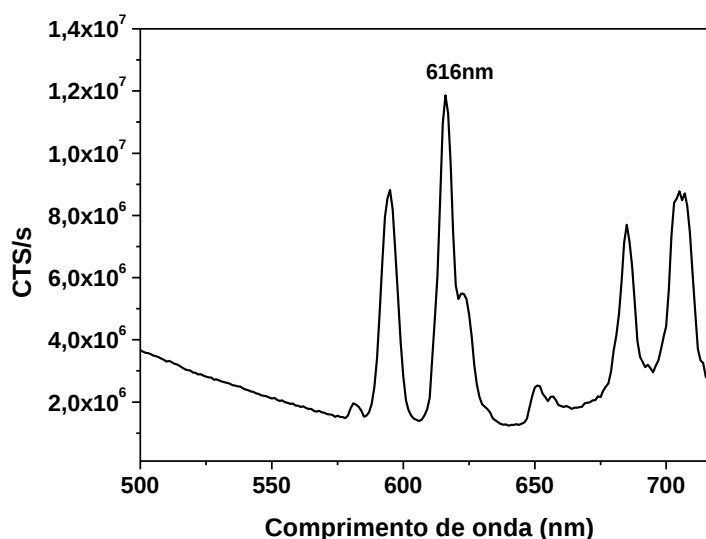


Figura 18 - Espectro de emissão da amostra de FIB marcada com o conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}).

Fonte: Autora.

Secções histológicas com CDI 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 19).

Esses resultados corroboram com o estudo de Menezes (2007) que encontrou bandas de emissão do íon Tb(III) e Eu(III) nos tecidos (FIB, CDI e normal) marcados com os conjugados de Con A-crip-Eu(III) e Con A-cripTb(III), bem como ausência da emissão quando na privação dos conjugados.

A figura 20 mostra ausência da marcação pelo conjugado UEA-I-crip(Eu^{3+}) em tecidos de FIB e CDI.

Para comparar as marcações obtidas com as lectinas-Crip(Eu^{3+}), a histoquímica com lectinas conjugadas com o FITC mostrou 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 (Figura 21). Já o conjugado Con A-FITC marcou com maior intensidade CDI, seguido de FIB e tecido normal, nessa ordem (Figura 21).

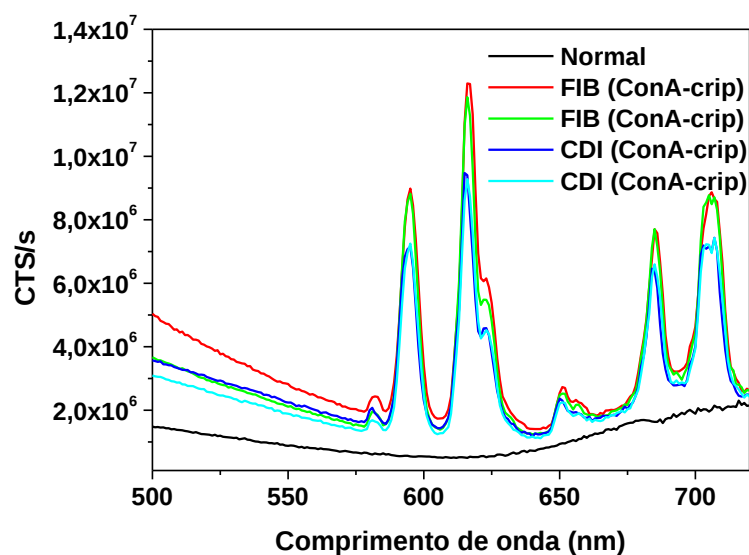


Figura 19 – Comparação entre as diferentes marcações realizadas com o conjugado Con A-Crip(Eu^{3+}) nos diversos diagnósticos.

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

Fonte: Autora.

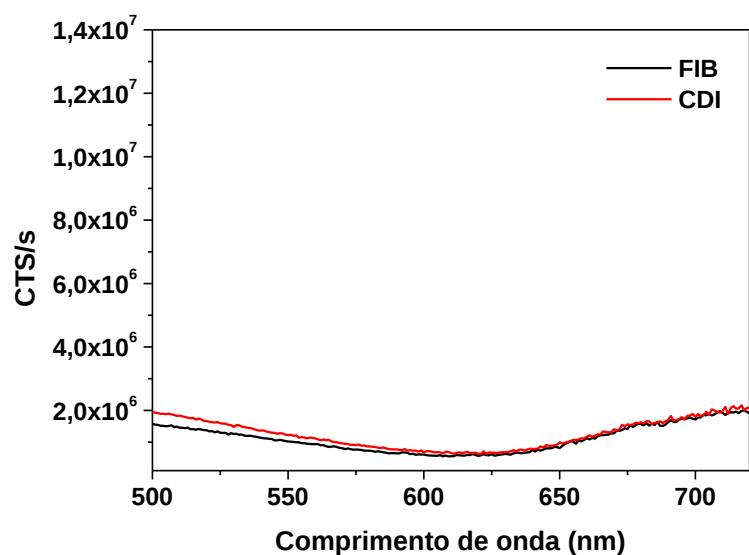


Figura 20 – Espectro apresenta ausência de emissão do íon Eu^{3+} em tecidos com diagnóstico de FIB e CDI marcados com UEA-I-crip(Eu^{3+}).

Fonte: Autora

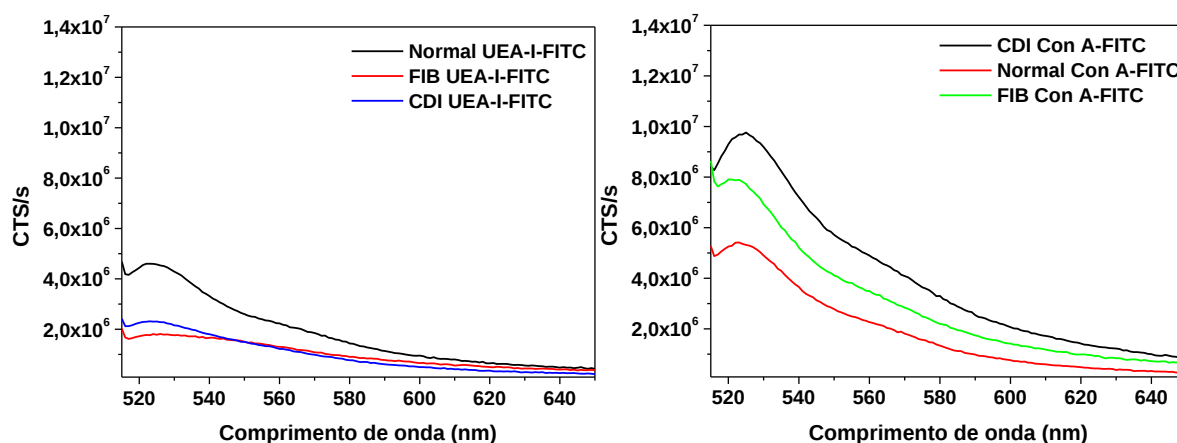


Figura 21 – Comparação entre diferentes tecidos marcados com os conjugados UEA-I-FITC e Con A-FITC.

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

Fonte: Autora

Os diferentes padrões de marcação obtidos entre os marcadores luminescentes usados (Crip(Eu^{3+}) e FITC)), correlacionam-se com os achados em estudo prévio de Melo-Júnior (2008) ao comparar o padrão de marcação na mucosa gástrica humana infectada por *Helicobacter pylori*. Foram usadas, dentre outras lectinas, a Con A conjugada ao FITC e conjugada com peroxidase (Per) na investigação de carboidratos na mucosa de pacientes positivos para *H. pylori*, sendo encontrada a marcação fraca em Con A-FITC e negativa com Con A-Per. Nesse mesmo estudo, a avaliação realizada com a lectina WGA-FITC e WGA-Per resultou em marcações iguais.

Criptatos de lantanídeos (Eu^{3+} e Tb^{3+}) conjugados a lectinas já foram propostos como ferramenta auxiliar em histoquímica para marcação de tumor de mama diagnosticado com CDI (VILA NOVA, 2003). Neste estudo, criptato de íon Tértio (Tb^{3+}) foi conjugado a Con A, o qual atuou como revelador luminescentes em amostra de CDI, sendo identificadas as transições do íon Tb^{3+} . Nosso estudo fortalece o uso de criptatos de lantanídeos como marcador luminescente, sendo neste caso, aplicado na identificação de carboidratos em tecidos mamários através da sonda luminescente formada com a lectina Con A.

5.4 Análises luminescente e espectroscópica após conjugação dos anticorpos ao éster de acridina

A Figura 22 apresenta os valores de luminescência obtidos das alíquotas retiradas das 14 frações eluídas da coluna cromatográfica após a conjugação de anti-GP88-EA. Percebe-se que duas das frações se destacam quanto as maiores intensidades, correspondendo às maiores concentrações do éster de acridina. Ao examinar o conteúdo proteico dessas mesmas frações, verificou-se a maior concentração de proteínas nas frações 4 e 5 (figura 23). Diante desses resultados, as frações 4 e 5 foram agrupadas usadas em Imunohistoquímica. Para os outros conjugados, esses testes também foram realizados sendo para anti-uPAR-EA o valor máximo de 35.002 RLU e para anti-MUC1-EA, 77.465 RLU (dados não mostrados).

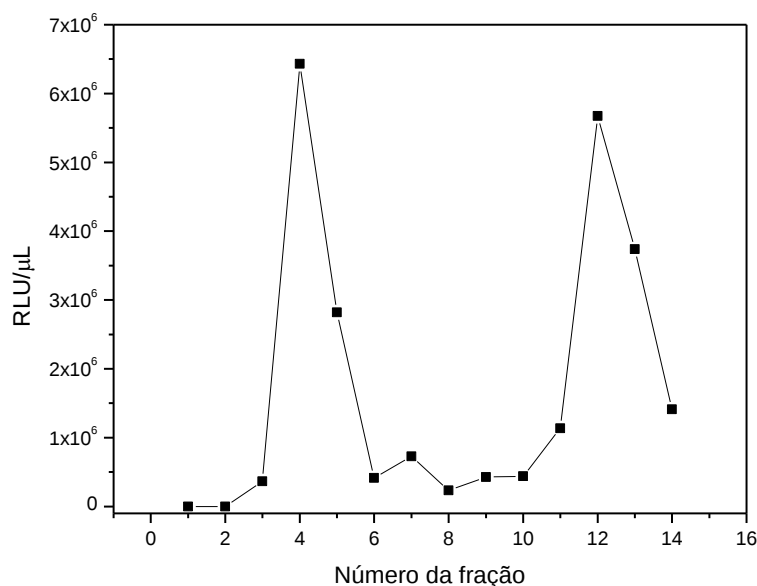


Figura 22. Resultado da análise luminescente das 14 alíquotas separadas pela coluna cromatográfica após conjugação da sonda quimiluminescente anti-GP88-EA.

Na abscissa, os pontos indicam o número da alíquota testada; A ordenada aponta a intensidade máxima de emissão obtida em cada alíquota.

Fonte: Autora

Para estabelecer a diluição mais eficiente para revelação por anti-uPAR-EA, anti-MUC1-EA e anti-GP88-EA foram testadas as diluições 1:10, 1:20 e 1:30. Os resultados indicaram a diluição de 1:20, 1:10 e 1:50 como a mais indicada devido a maior manutenção das características quimiluminescentes e

quantitativo protéico para anti-uPAR-EA, anti-MUC1-EA e anti-GP88-EA, respectivamente.

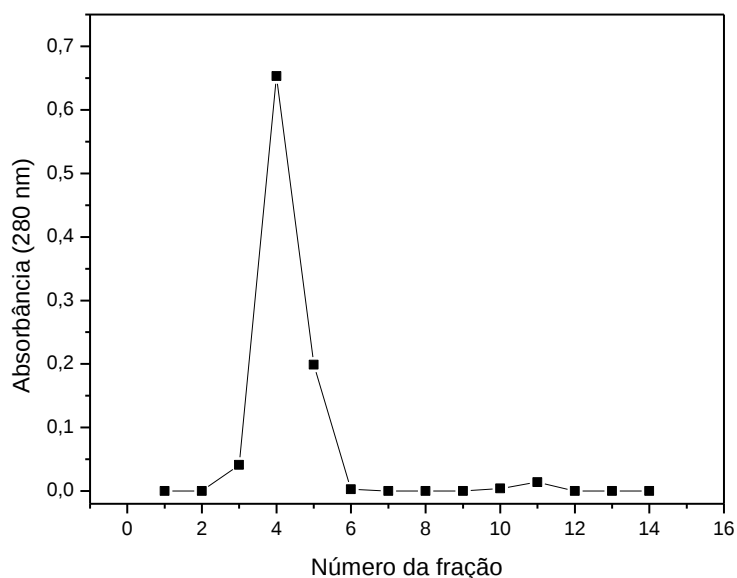


Figura 23. Resultado da Espectrometria realizada nas frações do conjugado GP88-EA.

Na abscissa, os pontos indicam o número da alíquota testada; A ordenada aponta a intensidade máxima de absorção de luz UV em 280 nm para cada alíquota.

Fonte: Autora

5.5 Imunohistoquimiluminescência

Os anticorpos anti-uPAR, anti-MUC I e anti-GP88 foram conjugados ao Éster de Acridina (EA) e a capacidade de reconhecer seus alvos específicos foi analisada em tecidos mamários humanos normal (mastoplastia) e transformado (carcinoma ductal invasivo).

5.5.1 Análise de marcação do conjugado anti-GP88-éster de acridina (anti-GP88-EA) através da imunohistoquímica

A Imunohistoquímica utilizando o conjugado anti-GP88-EA foi realizada em 53 casos de CDI. Foram excluídos do estudo casos de CDI com dados clínicos incompletos, verificando-se a luminescência de 46 amostras, medida em unidade de luminescência relativa (RLU). O critério utilizado para analisar a marcação das amostras de CDI foi a média de emissão obtida em amostras controle. A partir desta média, verificou-se a quantidade a amostras de CDI que

estava acima ou abaixo daquela média. Desta forma, obteve-se que 43,5% das amostras de CDI tiveram marcação acima da média. A tabela 6 apresenta os valores obtidos comparando amostras de CDI e controle normal. Embora o valor médio de marcação em amostras controles seja superior ao encontrado em amostra de CDI, essa diferença não é significativa estatisticamente ($p=0,77$).

Tabela 6. Resultado da atividade luminescente, medida em RLU, de amostras de CDI e controle submetidas a Imunohistoquimiluminescência com anti-GP88-éster de acridina.

	CDI	Controle
Emissão média	34.186	36.787
Desvio padrão	14.721	12.343
Emissão máxima	67.044	55.291
Emissão mínima	13.526	20.294

RLU - unidade de luminescência relativa; CDI – carcinoma ductal invasivo

Levando em consideração os dados clínico-patológicos das pacientes com CDI (idade, tamanho do tumor, presença de CDIS e invasão linfonodal), os resultados da marcação com a sonda anti-GP88-EA não mostraram distinção entre os grupos dentro de cada indicador, como mostra a tabela 7.

Tabela 7. Análise da marcação em amostras de CDI pela anti-GP88-EA em relação às características tumorais.

Dados clínico-patológicos	Grupos	Média de emissão (RLU)	Nº de amostras	
			< média	> média
Idade	20-39 anos	28.145	7	2
	40-59 anos	34.165	12	11
	> 60 anos	38.103	7	7
Tamanho	< 2 cm	43.278	1	4
	2 à 5 cm	32.614	16	10
	> 5 cm	31.680	7	4
CDIS	Presente	37.309	16	16
	Ausente	30.440	5	4
Invasão linfonodal	Sim	36.982	20	16
	Não	34.448	4	4

RLU - unidade de luminescência relativa; CDIS – carcinoma ductal invasivo in situ.

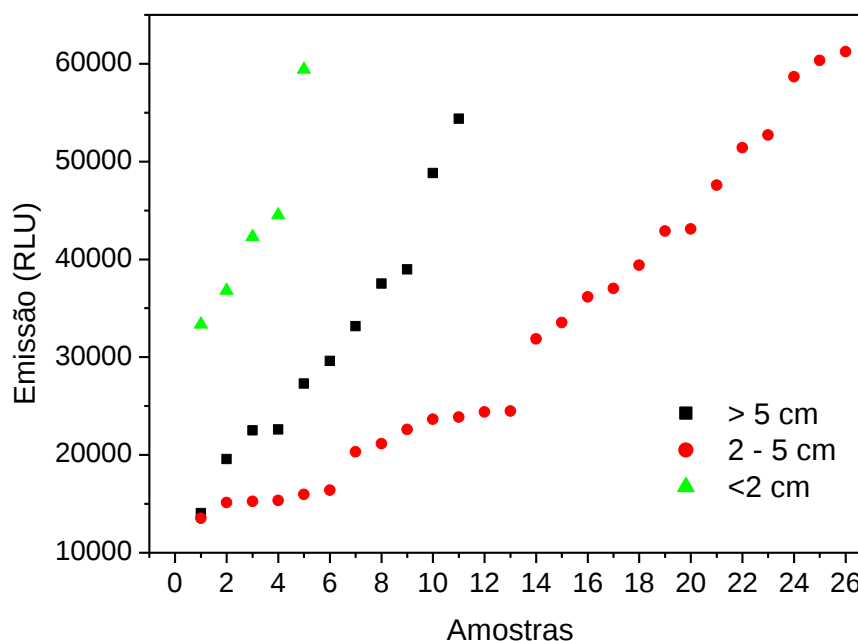


Figura 24. Gráfico de dispersão das amostras distribuídas de acordo com marcação pelo conjugado anti-GP88-EA, levando em consideração o tamanho do tumor.

As pacientes acima de 60 anos apresentaram marcação mais intensa, quando comparadas com os outros dois grupos, sendo essa diferença não significativa ($p=0,3545$). A figura 24 apresenta a distribuição das amostras quanto ao tamanho do tumor, podendo ser vista a marcação mais intensa naqueles menores de 2 cm. Avaliando a presença do componente carcinoma ductal in situ (CDIS) no tumor, observa-se uma maior média de marcação nos casos positivos, porém sem significado estatístico ($p=1$). Quanto à invasão linfonodal, não houve diferença entre os casos com ou sem disseminação ($p=1$), entretanto, a maioria dos casos analisados apresentaram os linfonodos comprometidos (81,8%), os quais apresentaram marcação tanto acima como abaixo da média.

Ao investigar os dados clínico-patológicos nesses casos, pretende-se entender a influência da expressão das glicoproteínas, como a GP88, no câncer de mama, e assim, verificar seu valor para um possível prognóstico. O estadiamento do tumor relaciona-se com características e taxa de crescimento tumorais. Tamanho do tumor e condução dos linfonodos axilares são os indicadores de prognósticos indispensáveis para o câncer de mama, de forma

que tumores maiores e com invasão linfonodal estão relacionados a uma sobrevida menor (STAFIN, et al., 2012).

Há também o interesse em se conhecer a idade da paciente, pois embora o câncer de mama esteja mais presente em mulheres na pós-menopausa, a presença desta neoplasia em mulheres jovens, abaixo de 35 anos, está associada a um prognóstico mais reservado (STAFIN et al., 2012). Neste estudo, a marcação mais intensa foi vista em tumores menores, assim como ocorreu em amostras controle, o que corrobora com uma maior semelhança à sua correspondente normal. Já ao analisar outros fatores como invasão e presença de CDIS, a marcação mais intensa foi vista na presença dessas características, que correspondem a indicadores de maior malignidade.

Esses resultados mostram que a GP88 pode ser detectada em amostras de câncer de mama bem como em tecido normal, no entanto, a expressão dessa glicoproteína não pareceu ter papel preditivo ao correlacionar com os dados clínico-patológicos. Semelhante ao nosso estudo, Serrero e colaboradores (2012) examinaram a associação em câncer de mama entre GP88 e cada indicador clínico, revelando a GP88 como fator independente de características demográficas (idade e etnia) e dos tumores (tamanho e grau tumoral, status RP e linfonodos, estágio da doença e tratamento). Um estudo imunohistoquímico com tecidos mamários benignos e malignos verificou a expressão de GP88, relatando a baixa ou ausente expressão em tecidos benignos e elevada expressão em tecidos malignos (SERRERO; IOFFE, 2003). Além disso, outro estudo chamou atenção ao demonstrar que a alta expressão de GP88 em CDI, positivo para HER-2, está drasticamente associada a um maior risco de recorrência (5,9 vezes) e mortalidade (2,5 vezes) quando comparados com pacientes com baixa ou pouca expressão (SERRERO et al., 2012). Todos os estudos citados aqui utilizaram a imunohistoquímica com anticorpo secundário conjugado a peroxidase para análise da expressão de GP88. Há escassez na literatura de estudos que tenham relatado o uso de reveladores quimioluminescentes em tecido humano para análise dessa expressão.

5.5.2 Análise de marcação do conjugado anti-MUC-éster de acridina (anti-MUC1-EA) através da imunohistoquímica

Foram testadas 77 amostras de CDI, no entanto levou-se em consideração 56 dessas para comparação com os dados clínico-patológicos após exclusão de dados incompletos. A emissão média dos casos de CDI marcados com anti-MUC1-EA foi de 4.353 RLU, conforme tabela 8. Todos os casos de CDI analisados tiveram marcação abaixo da média normal, como pode ser observado na tabela 8 e na figura 25. Comparando as médias, houve diferença significativa entre controle e CDI ($p < 0,05$).

Examinando a marcação dos tumores quanto aos dados clínico-patológicos, constatou-se que em todos os parâmetros (idade, tamanho tumoral, presença de CDIS e invasão dos linfonodos) a marcação foi inferior a média normal, como exposto na tabela 9.

Tabela 8. Resultado da atividade luminescente, medida em RLU, de amostras de CDI e controle submetidas a Imunohistoquimiluminescência com anti-MUC1-éster de acridina.

	CDI	Controle
Emissão média	4.353	8.289
Desvio padrão	1.432	2.738
Emissão máxima	7.363	12.366
Emissão mínima	1.659	3.695

RLU - unidade de luminescência relativa; CDI – carcinoma ductal invasivo

Os resultados da marcação com a sonda anti-MUC1-EA mostram uma redução da expressão dessa glicoproteína, à medida que o tumor ganha características mais malignas. Por exemplo, a marcação menos intensa foi vista em tumores com invasão linfonodal, na presença do componente CDIS, e com maiores tamanhos.

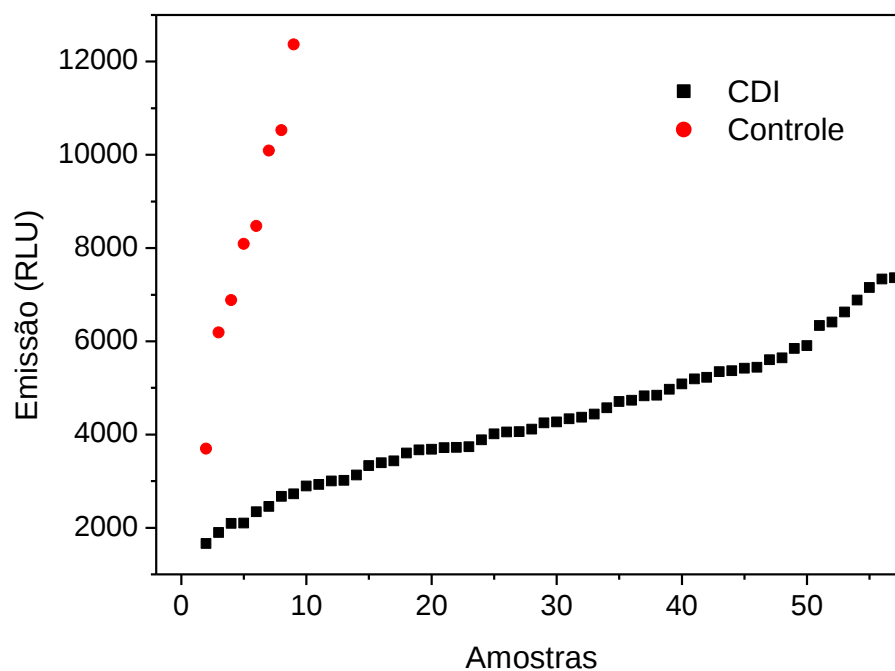


Figura 25. Dispersão da marcação das amostras de CDI e tecido normal (controle) incubadas com o conjugado anti-MUC1-EA .

Tabela 9. Análise da marcação em amostras de CDI em relação às características tumorais.

Dados clínico-patológicos	Grupos	Média de emissão (RLU)	N° de amostras	
			< média	> média
Idade	1 (20-39 anos)	3.853	10	0
	2 (40-59 anos)	4.847	29	0
	3 (> 60 anos)	3.702	16	0
Tamanho	< 2 cm	4.287	7	0
	2 – 5 cm	4.546	34	0
	> 5 cm	4.129	17	0
CDIS	Presente	4.271	34	0
	Ausente	4.533	13	0
Invasão linfonodal	Sim	4.210	37	0
	Não	4.608	15	0

RLU - unidade de luminescência relativa; CDIS – carcinoma ductal invasivo in situ

A redução da expressão da MUC1 em tumores malignos mamários vista no nosso trabalho está de acordo com os achados de Ghosh e colaboradores (2013). Eles investigaram a expressão da MUC1 subglicosilada em tecidos normais e cancerosos da mama, revelando variação significativa na expressão da glicoproteína entre tecidos tumorais e normais, usando clone VU4H5 (anticorpo monoclonal de camundongo). Ao analisar os resultados da qRT-PCR, observou-se picos de expressão da MUC1 nos estágios iniciais e diminuição dessa expressão nos estágios mais invasivos da doença.

A diminuição da expressão da MUC1 também foi relatada no trabalho de Ohash e colaboradores (2016) no qual se avaliou o significado prognóstico de perfis da expressão de mucinas em câncer de mama quanto a baixa e alta expressão da MUC1. 9 pacientes no grupo com baixa expressão tinham tumores maiores, ao passo que 8 pacientes no grupo com alta expressão possuíam tumores pequenos. A maior parcela de pacientes com invasão dos linfonodos expressou fracamente a MUC1. Além disso, relatou-se não haver correlação significativa entre o padrão de expressão de MUC1 e outras variáveis, como idade, tipo histológico e grau nuclear (OHASH et al., 2016).

5.5.3 Análise de marcação do conjugado anti-uPAR-éster de acridina (anti-uPAR-EA) através da imunohistoquímica.

Das 62 amostras submetidas à Imunohistoquimiluminescência para avaliação da expressão da glicoproteína uPAR através da sonda luminescente anti-uPAR-EA, 51 foram analisadas e correlacionadas com os dados clínico-patológicos das pacientes. A emissão média das amostras de CDI foi 3.147 RLU, encontrando valores que variaram entre 1,408 RLU e 6.700 RLU (tabela 10). A figura 26 mostra a distribuição da marcação pelas amostras, tendo 61% dos casos analisados de CDI marcação abaixo da média normal. Comparando as médias, não houve diferença significativa em controle e CDI ($p=0,85$).

Tabela 10. Resultado da atividade luminescente, medida em RLU, de amostras de CDI e controle submetidas a Imunohistoquimiluminescência com anti-uPAR-éster de acridina.

	CDI	Controle
Emissão média	3.147	3.053
Desvio padrão	1.305	1.100
Emissão máxima	6.700	4.855
Emissão mínima	1.408	1.953

RLU - unidade de luminescência relativa; CDI – carcinoma ductal invasivo

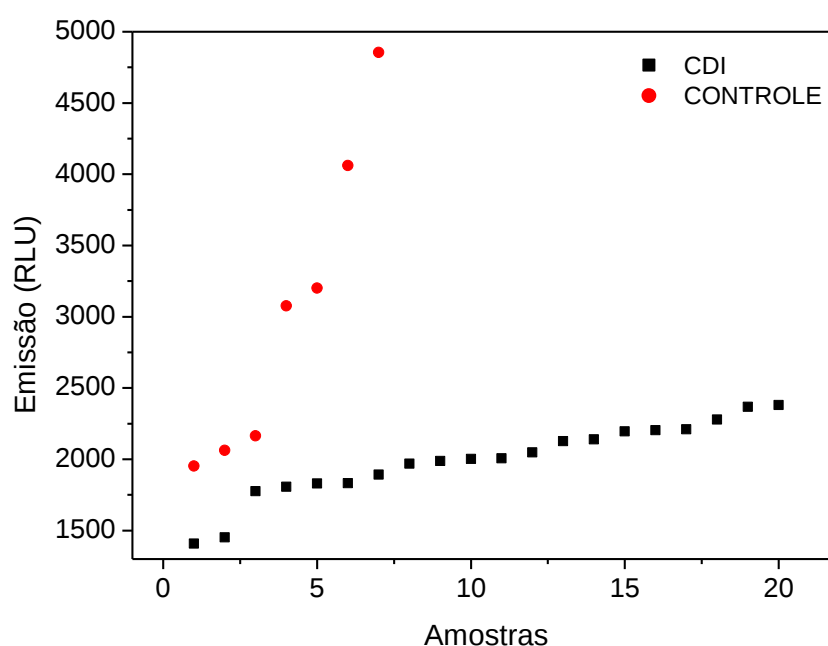


Figura 26. Dispersão da marcação das amostras de CDI e tecido normal (controle) incubadas com o conjugado anti-uPAR-EA .

Levando em consideração os dados clínico-patológicos das pacientes com CDI, os resultados da marcação com a sonda anti-uPAR-EA exibiram marcação mais intensa para pacientes acima de 60 anos, com tumores acima de 5 cm, na ausência de invasão e CDIS, conforme mostrado na tabela 11.

LeBeau e colegas (2013) explicam que uPAR também pode ser encontrada em outros tecidos não cancerosos, durante a migração celular e proliferação, porém não estando altamente expressa em outros estados normais.

Também relaciona o aumento da expressão da uPAR com prognóstico mais reservado, ao encontrar o maior nível de mRNA de uPAR em fenótipo triplo-negativo. Contrariamente, nossos dados mostraram a expressão de uPAR em tecidos normais, não diferenciando-os de tumores malignos da mama.

Tabela 11. Análise da marcação em amostras de CDI em relação às características tumorais com o conjugado anti-uPAR-EA.

Dados clínico-patológicos	Grupos	Média de emissão (RLU)	N° de amostras	
			< média	> média
Idade	1 (20-39 anos)	3.039	7	3
	2 (40-59 anos)	2.862	17	7
	3 (> 60 anos)	3.714	6	10
Tamanho	< 2 cm	3.132	3	3
	2 – 5 cm	3.209	17	12
	> 5 cm	3.547	8	5
CDIS	Presente	3.105	20	15
	Ausente	3.972	4	5
Invasão linfonodal	Sim	3.487	24	18
	Não	3.747	3	5

RLU - unidade de luminescência relativa; CDIS – carcinoma ductal invasivo in situ

No trabalho de Andres e colaboradores (2012) a distribuição dos níveis de uPA, uPAR e PAI-1 em câncer de mama foi investigada com relação a algumas características das pacientes e dos tumores, usando a técnica ELISA. Ao verificar a estratificação de pacientes com linfonodos negativos pelo nível de uPAR, observaram diferença estatística significativa na sobrevida livre da doença e sobrevida global. Da mesma maneira que o nosso trabalho, não houve correlação entre idade e a expressão de uPAR (ANDRES; EDWARDS; WITTLIFF, 2012).

No presente estudo, a utilização das sondas luminescentes anti-GP88-EA, anti-MUC1-EA E anti-uPAR-EA aplicadas à Imunohistoquimiluminescência possibilitou detectar as glicoproteínas correspondentes, embora suas

expressões não tenham sido correlacionadas como fatores preditivos juntamente com os dados clínico-patológicos. Sugere-se que estudos adicionais sejam realizados, ampliando-se a amostragem e considerando-se distinguir os tipos tumorais de CDI.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados se pode concluir que:

- o DC 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;
- as sondas luminescentes, conjugados lectina-Crip(Eu^{3+}) foram capazes de diferenciar variação no conteúdo glicídico de superfície celular em tecidos mamários humanos normal e transformados (fibroadenoma e carcinoma ductal invasivo) sendo potenciais ferramentas na histoquímica com lectinas (HqL) apresentando marcações equivalentes aquelas resultantes do uso de conjugados lectina-FITC (disponíveis comercialmente) e apresentar a vantagem de ser fotoestável;
- a conjugação dos anticorpos (anti-uPAR, anti-MUC I e anti-GP88) com éster de acridina não influenciou negativamente o reconhecimento de seus respectivos alvos permitindo sua utilização;
- a imunohistoquimiluminescência empregando anti-MUC1-EA como sonda apresentou a variação do perfil de expressão de MUC1 em tecido mamário normal e transformado (carcinoma ductal invasivo) expressa em URL (unidades relativas de luz) que permite a quantificação da marcação podendo ser aliada à análise ótica para diminuição da subjetividade no diagnóstico inerente a metodologias qualitativas;
- O emprego das sondas anti-GP88-EA e anti-uPAR-EA foi capaz de detectar a presença de suas respectivas glicoproteínas, não diferenciando tecido mamário normal de transformado;
- Não houve correlação entre as marcações obtidas utilizando os anticorpos conjugados com éster de acridina e os dados clínico-patológicos das pacientes.

REFERÊNCIAS

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. **Cancer Facts & Figures 2016**. Atlanta: American Cancer Society, 2016. Disponível em: <
<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-factsfigures/cancer-facts-figures-2016.html>>. Acesso em: Dez. 2016.

ANDRADE, C.G. et al. Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, p. 4623-4629, 2013.

ANDRADE, C.G. et al. Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, p. 4623-4629, 2013.

ANDRES, S. A.; EDWARDS, A. B.; WITTLIFF, J. L. Expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA), its receptor (uPAR), and inhibitor (PAI-1) in human breast carcinomas and their clinical relevance. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 26, p. 93-103, 2012.

ARAÚJO, J. R. C. et al. Detecção de atividade lectínica em tecidos de *Cassia fistula* L. In: Congresso Internacional de Ciências Biológicas, v. 2, 2013, Universidade Católica de Pernambuco, **Anais I CONICBIO / II CONABIO / VI SIMCBIO**, Recife: CONICBIO, CONABIO, SIMCBIO, 2013. 12p.

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. et al. 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.

AVVAKUMOVA, S. et al. Biotechnological approaches toward nanoparticle biofunctionalization. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 11-20, 2014.

BANDEIRA, A. R. G. et al. Criptato de Eu(III) conjugado a PNA: Caracterização via difracto 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. et al. 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. et al. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningotheelial tumour. **European Journal of Histochemistry**, v. 47, n. 2, p. 139-142, 2003.

BLOMME, B. et al. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 50, n. 3, p. 592-603, 2009.

BRAZ, P. H. et al. Comparação entre a citopatologia por biopsia com agulha fina e a histopatologia no diagnóstico das neoplasias cutâneas e subcutâneas de cães **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n.3, p. 197-203, 2016.

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.

CABRAL FILHO, P. E. **Investigação de antígenos eritrocitários do sistema ABO utilizando quantum dots conjugados a anticorpos monoclonais e a lectina *Ulex europaeus***. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), 2013.

CAMPOS, L. M. et al. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. **Biomarkers**, v. 11, n. 5, p. 480-484, 2006.

CAPELOZZI, V. L. Papel da imuno-histoquímica no diagnóstico do câncer de pulmão. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 4, p. 375-382, 2009.

CAZET, A. et al. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 3, p. 204, 2010.

CHEN, D. et al. Breast Carcinoma Metastasizes to Brain-Three Unique Cases. **The Internet Journal of Pathology**, v. 12, n. 1, 2011.

CHENG, T. C. et al. Down-regulation of α -L-fucosidase 1 expression confers inferior survival for triple-negative breast cancer patients by modulating the glycosylation status of the tumor cell surface. **Oncotarget**, v. 6, n. 25, p.21283-21300, 2015.

DOMENEGHINI, C. et al. Histochemical analysis of glycoconjugate secretion in the alimentary canal of *Anguilla anguilla* L. **Acta Histochemica**, v. 106, n. 6, p. 477-487, 2005.

DUFFY, M. J. et al. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 428, p. 1-10, 2014.

EDELMAN, M. J. et al. GP88 (Progranulin): A novel tissue and circulating biomarker for non-small cell lung carcinoma. **Human Pathology**, v. 45, n. 9, p. 1893-1899, 2014.

FERREIRA, S.A. et al. Sialic acid differential expression in non-melanoma skin cancer biopsies. **Med Mol Morphol**, DOI 10.1007/s00795-013-0025-0, 5p, 2013.

FERRO, A. G. *Imunohistoquímica*. Lisboa, Portugal: [s.n.], 2014.

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.

GARCIA, C. S. P. **Avaliação da técnica imunohistoquímica como método de detecção da apoptose a nível celular**. Viseu: Instituto Politécnico de Viseu - Escola Superior Agrária de Viseu, 2013. Dissertação (Mestrado em Tecnologias da Produção Animal).

GELDER, M. E. M. et al. Urokinase-type plasminogen activator system in breast cancer: association with tamoxifen therapy in recurrent disease. **Cancer Research**, v. 64, p. 4563-4568, 2004.

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.

GHOSH, S. K. et al. A. Expression of underglycosylated MUC1 antigen in cancerous and adjacent normal breast tissues. **Clin. Breast Cancer**, v. 13, n. 2, p. 109-118, 2013.

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

GURCAN, M. N. et al. Histopathological Image Analysis: A Review. **IEEE Reviews in Biomedical Engineering**, v. 2, p.147-171, 2009.

HAGAN, A. K.; ZUCHNER, T. Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays. **Anal Bioanal Chem**, v. 400, p. 2847-2864, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 4, p. 646-674, 2011.

INCA. Estimativa 2016: **Incidência de câncer no Brasil**, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, 2015.

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

JI, Y. et al. Integrated proteomic and N-glycoproteomic analyses of doxorubicin sensitive and resistant ovarian cancer cells reveal glycoprotein alteration in protein abundance and glycosylation. **Oncotarget**, doi: 10.18632/oncotarget.14542., p. 1-15, jan. 2017.

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.

KNEPP, A.M.; SAKMAR, T. P.; HUBER, T. Homogeneous Time-Resolved Fluorescence Assay to Probe Folded G Protein-Coupled Receptors. **Methods Enzymol**, v. 522, p. 169-189, 2013.

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).

LEAL, A. F. G. et al. Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Aspergillus* species in brain and lung tissues using lectin histochemistry. **Medical Mycology**, v. 50, n. 7, P. 756-9, 2012

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.

LETH -LARSEN, R.; LUND, R. R.; DITZEL, H. J. Plasma membrane proteomics and its application in alinical cancer biomarker discovery. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, n.7, p.1369-1382, 2010.

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.

LIMA, A. L. R. et al. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Article ID 179817: 6 pages, 2010.

LIMA, L.R.A. et al. Glycophenotype evaluation in cutaneous tumors using lectins labeled with acridinium ester. **Disease Markers**, v. 35, n. 3, p. 149-154, 2013.

MAIA, C. S. et al. Câncer de mama: profilaxia por mastectomia na presença de alterações dos genes BRCA1 e BRCA2. **RSC on line**, v. 5, n.2, p. 84-93, 2016.

MACÍAS, I. G.; QUINTANA, A.N.; RAMOS, D S. Fibroadenoma gigante en una adolescente. **Medisan**, v. 18, n. 4, 2014.

MARTINS, R. F. et al. 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. et al. 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-JUNIOR, M. R. et al. Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to *Helicobacter pylori*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 238-240, 2008.

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**. 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. et al. Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. **Biologia**, v. 64, n. 1, p. 1-19, 2009.

MONTEIRO, J.H.S.K. **Propriedades fotofísicas de complexos de íons lantanídeos no estado sólido e em solução aquosa: imageamento e atividade citotóxica**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2014. Tese (Doutorado em Ciências).

NASCIMENTO, F. B.; PITTA, M. G. R.; RÊGO, M. J. B. M. Análise dos principais métodos de diagnóstico de câncer de mama como propulsores no processo inovativo. **Arquivos de Medicina**, v. 29, n. 6, p. 153-159, 2015.

NASCIMENTO, G. A. F. **Estudo quimiluminescente de granuloma hepático de esquistossomose mansônica utilizando lectinas conjugadas a éster de acridina**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada a Saúde).

NATRAJAN, A; WEN, D. A comparison of chemiluminescent acridinium

dimethylphenyl ester labels with diferente conjugation sites. **Organic & Biomolecular Chemistry**, DOI: 10.1039/c4ob02528h, 12 p, 2015.

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.

OHASH, R. et al. Prognostic significance of mucin expression profiles in breast carcinoma with signet ring cells: a clinicopathological study. **Diagnostic Pathology**, v. 11, n. 131, 10p, 2016.

PINTO, V. P. T. et al. 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.

POTAPENKO, I. O. et al. 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. 2014.

PULTZ, B. A. et al. Far beyond the usual biomarkers in breast cancer: a review. **Journal of Cancer**, v.5, p. 559-571, 2014.

RAO, S. et al. 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.

RÊGO, M. J. B. et al. Immunohistochemiluminescence detection: A quantitative tool in breast cancer HER-2 status evaluation. **Disease Markers**, v. 34, p. 373-377, 2013.

SÁ, G. F. et al. Spectroscopic properties and design of highly luminescent lanthanide coordination complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 196, n. 1, p. 165-195, 2000.

SANTOS, B. S. et al. 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.

SANTOS, P. B. et al. Lectin histochemistry reveals SNA as a prognostic carbohydrate-dependent probe for invasive ductal carcinoma of the breast: a clinicopathological and immunohistochemical auxiliary tool. **Int J Clin Pathol**, v. 7, n. 5, p. 2337-2349, 2014.

SERRERO, G. et al. Determination of GP88 (progranulin) expression in breast tumor biopsies improves the risk predictive value of the Nottingham Prognostic Index. **Diagnostic Pathology**, v. 11, n. 71, 2016.

SERRERO, G. et al. Progranulin (GP88) tumor tissue expression is associated with increased risk of recurrence in breast cancer patients diagnosed with estrogen receptor positive invasive ductal carcinoma. **Breast Cancer Research**, v. 14, n.1:R26, 2012.

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.

SHERR, C. J.; BARTEK, J. Cell Cycle–Targeted Cancer Therapies. **Annu. Review of Cancer Biology**, v. 1, p. 41-57, 2017.

SILVA, L. P. B. G. et al. Evaluation of glycophenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, n. 7, p. 3800-3808, 2014.

SOBRAL, A. P. V. et al. Con A and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. **Journal of Oral Science**, v. 52, n. 1, p. 49-54, 2010.

SOLIMAN, C.; YURIEV, E.; RAMSLAND, P. A. Antibody recognition of aberrant glycosylation on the surface of cancer cells. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 44, p. 1-8, [doi: 10.1016/j.sbi.2016.10.009.], nov. 2016.

SOTOMAYOR, M. D. P. T. et al. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1755-1774, 2008.

STAFIN, I. et al. Fatores prognósticos no cancer de mama. **HU Revista**, v. 38, n.3 e 4, p. 193-201, 2012

TENÓRIO, D. P. et al. CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as potential fluorescent molecular probes for saccharides detection in *Candida albicans*. **Journal of Photochemistry and Phobiology B, Biology**, v. 142, p. 237-243, 2015.

TESSER, C. D.; D'ÁVILA, T. L.C. Por que reconsiderar a indicação do rastreamento do câncer de mama? **Caderno de Saúde Pública**, v. 32, n. 5, p. 1-12, 2016.

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

TKACZUK, K. R. et al. Increased Circulating Level of the Survival Factor GP88 (Progranulin) in the Serum of Breast Cancer Patients When Compared to Healthy Subjects. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 5, 2011.

TOILLON, R. A. et al. 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.

VAJARIA, B. N.; PATEL, P. S. Glycosylation: a hallmark of cancer? **Glycoconjugate Journal**, v.34, n. 2, p. 147-156, 2017.

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

VIZECHI, M. A. F. et al. A imuno-histoquímica como um auxílio na distinção entre tumores benignos e malignos. **Perspectivas Médicas**, v. 27, n. 1, p. 15-25, 2016.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Cancer Report 2014. **International Agency for Research on Cancer**, 2014. Disponível em: <<http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>>. Acesso em: Jan. 2017.

WU, A. M. et al. 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.

YUAN, K. et al. 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.

APÊNDICE A. Artigo resultante deste trabalho.**Europium (III) cryptate conjugated to the lectins as luminescent probes in histochemistry for transformed human breast tissues**

BRANDÃO JM¹, BANDEIRA ARG², MENEZES EHSC², CAVALCANTI CLB¹, JUNIOR AS², BELTRÃO EIC^{1,2}

1 Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), UFPE

2 Departamento de Química Fundamental, UFPE

3 Departamento de Bioquímica, UFPE

Abstract

The differentiation between benign and malignant breast tumors, as well as to detect the lesions at early stages are of great importance to the most 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 histochemistry with lectins. The latter bind specifically to carbohydrates and are usually combined with molecules that enable visualization of the staining. Europium (III) cryptate conjugated to lectins is excellent alternative to luminescent staining, especially because the photo stability. This study aimed to conjugate europium (III) cryptates to lectins UEA-I, Con A, PNA and WGA, characterize the conjugates and apply them in histochemistry as luminescent probes in tissues with fibroadenoma and invasive ductal carcinoma, benign and malignant tumors, respectively. Histological sections incubated with the conjugates were analyzed in a spectrofluorometer. The luminescence intensity of the probes showed different patterns, reflecting the expression of carbohydrates in the tissues studied when compared with normal tissues. These results suggest the use of the conjugates lectins-europium (III) cryptate as luminescent probes to identify and quantify changes in the carbohydrates expression being very suitable for application in diagnostic.

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

Background

Breast cancer is the second kind of cancer of 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, 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 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, a method of diagnosis that is being proposed is the study of biomarkers in cancer, like carbohydrates. Those macromolecules are of great importance for the diagnosis of this disease 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 molecules able to recognize specifically carbohydrates and / or free oligosaccharides or in glycoconjugates.^{8, 9} They have been used as probes in histochemistry to detect carbohydrates on cell surfaces and thus reveal the organization of these sugars in different physiological states.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 markers, the europium (III) cryptates present themselves as excellent display because they have good water solubility and high kinetic and photochemical stability.¹³⁻¹⁵

Given the above, this paper proposed the conjugation of the lectins Con A, UEA-I, WGA and PNA to europium (III) cryptate in order to obtain a luminescent probe to be used as an auxiliary tool in 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 (*Canavalia ensiformis*), UEA-I (*Ulex europaeus I*), WGA (*Triticum vulgaris*) and PNA (*Arachis hypogaea*) specific for D-glucose/D-manose, L-fucose, N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) and D-galactose/N-acetyl-galactosamine (GalNAc)^{16, 17}, respectively, were purchased commercially (Sigma, 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 Archive of the Department of Pathologic Anatomy, Hospital das Clinicas (UFPE) and the Cancer Hospital, both from Pernambuco. Of these biopsies, 10 were diagnosed as invasive ductal carcinoma (IDC), a malignant tumor, 10 as fibroadenoma (FIB), a benign tumor, and 4 were from reducing mastoplasty bilateral, used as 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

After the conjugation, tests were conducted to check the preservation of 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, which aim at studying the secondary structure of proteins, were obtained from a Spectropolarimeter (Jasco J-815 CD Spectrometer). Luminescence assays of the samples 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 used xenon lamps of 450 w (for analysis at steady state) and 150 W (for time-resolved analysis). In all techniques were analyzed lectins conjugated and unconjugated.

Application of luminescent probes in histochemistry for human breast tissues

Human breast tissue sections were deparaffinized in xylene and hydrated in ethyl alcohol. The tissues were treated with 0.1% trypsin for 2 min at 37°C and then incubated with the solution of the conjugates (125µL) for 2 h at 4°C. After, the tissues were stained with hematoxylin or not, and finally, assembled the slides using PBS or glycerin. Histochemistry without lectin also was performed, being the incubation only with cryptates.

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. In this case, the ion terbium (III) was used as developer (Vila Nova, 2003). 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), which assesses the preservation of biological activity after conjugation of lectins, showed positive results for all conjugations (see table 1). For the lectin UEA-I, the HA test was carried out with human erythrocytes and for other lectins, with rabbit erythrocytes.

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

Lectina	AH	Conjugado	AH
Con A	2^{-13}	Con A-Eu(III)Crip	2^{-6}
UEA-I	2^{-9}	UEA-I-Eu(III)Crip	2^{-8}
PNA	2^{-6}	PNA-Eu(III) Crip	2^{-4}
WGA	2^{-9}	WGA-Eu(III) Crip	2^{-6}

The circular dichroism test, carried out with the conjugates, showed that the most positive and least negative were practically maintained when compared with those obtained by pure lectins, meaning that the secondary structure of the lectins was not destabilized by conjugation. However, the CD result for the conjugate Con A-Eu(III)Crip showed changes when compared to its counterpart. This result can justify the considerable decrease in hemagglutinating activity obtained from this conjugate.

Luminescence analysis measured excitation and emission of all samples, as shown in Table 2.

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

Amostra	$\lambda_{exc.}$ (nm)	$\lambda_{emiss.}$ máximo (nm)	Intensidade Max. (CTS/s)	$\lambda_{emiss.}$ (nm) $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$	$\lambda_{emiss.}$ (nm) $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$	$\lambda_{emiss.}$ (nm) $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$
UEA-I	293,8	405,6	259.780	-	-	-
	379,2	438,2	45.726	-	-	-
UEA-I-crip	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-crip	321	616,4	23.885.720	595,2	616,4	708,4
PNA	367	437,2	37.399	-	-	-
PNA-crip	320	616,2	3.461.444	595,2	616,2	708,4
WGA	366	440	35.988	-	-	-
WGA-crip	319,4	616,6	2.425.866	595,6	616,6	708,6

The lectins 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 an emission intensity between 37,000 and 45,000 CTS / s, with the exception of Con A and UEA-I (> 250,000 CTS / s), 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.

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)Crip. 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.

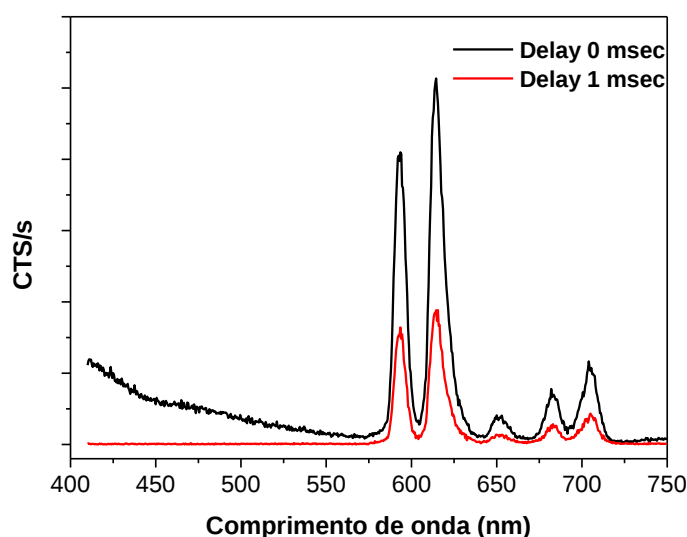


Figure 1. Time resolved emission spectra of the conjugate UEA-I-Eu(III)Crip with different delays.

Given these results, the luminescent probes were used in tests with lectins histochemistry thus enabling a quantitative and less subjective analysis.

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).

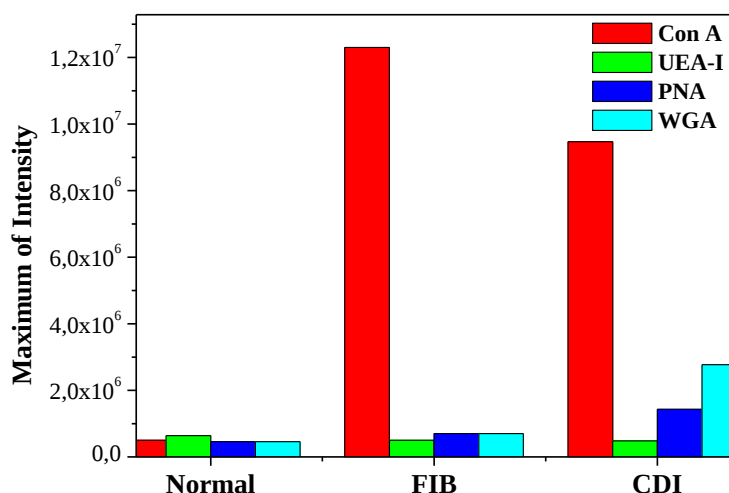


Figure 2. Emission measurements of different tissues treated with the conjugates (Con A-Eu(III)Crip, in red; UEA-I-Eu(III)Crip, in green; PNA-Eu(III)Crip, in dark blue; and WGA-Eu(III)Crip, in light blue).

In normal tissues were not observed transitions of the Eu (III) ion for all treatments. Fibroadenoma tissues treated with Con A-Eu (III)Crip, 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)Crip, PNA-Eu (III)Crip and WGA-Eu (III)Crip. However, the two latter showed reduced intensity.

These results suggest the availability or access to carbohydrates D-glucose and D-mannose 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 invasive ductal carcinoma. These carbohydrates, which are identified in greater quantities in transformed tissues are reported in the literature as coming from the change in glycosylation.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, which arise as a consequence of altered activity of glycosyltransferase and glycosidases.²⁰

In 1998, Beltrão and co-workers studying human breast lesions (fibroadenoma, fibrocystic disease and CDI) using lectins Con A and isoform 1 from Cramol (specific for mannose and glucose residues) reported that cells of fibroadenoma showed a staining pattern more than observed in normal cells.¹⁸ Another study correlated the abundance of mannose in serum with the progression of cancer. 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

However, it is well described the fucosylation increase in breast cancer, which was not observed in this study. Investigation of Patel and co-workers (1990) showed increased incorporation of fucose in glycoproteins from serum of patients with breast cancer.²² Also Yuan et al. (2008) studying various cell lines of human breast cancer showed that all lineages studied showed virtually α -L-fucose on the cell surface.²³ The fact this study did not identify L-fucose in the tissues studied may be related to difficulty of access to carbohydrates, requiring further study for better understanding.

Front this evidence the difference in glycosylation pattern between normal and transformed tissues can aid in the diagnosis of these diseases since these sugars act as indicators of intracellular events.

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 in glycoconjugates. This research showed that the proposed luminescent probes, lectins-Eu(III)Cryp are effective devices to identify the glycan study by its emission, allowing to differentiate the staining by intensity values. Therefore, this instrument can be used in histochemical trials for the diagnosis of breast tumors, allowing to expand into other tissues and / or pathology as well as increase the number of carbohydrates to be evaluated.

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 INCT-INAMI.

References

- (1) Instituto Nacional de Câncer - INCA. (2016) 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.