



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DANUSA DE CASTRO DAMASIO DE LIMA

**Estudo da citotoxicidade da lectina BJcuL sobre células de  
carcinoma de gástrico (KATO III) e adenocarcinoma de  
côlon (HT-29)**

CURITIBA  
2010



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DANUSA DE CASTRO DAMASIO DE LIMA

# **Estudo da citotoxicidade da lectina BJcuL sobre células de carcinoma de gástrico (KATO III) e adenocarcinoma de cólon (HT-29)**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Novais Moreno**  
**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selene Elíbio Esposito**  
**Mestranda: Danusa de Castro Damasio**

CURITIBA  
2010

**Danusa de Castro Damasio**

**Estudo da citotoxicidade da lectina BJcuL sobre células de carcinoma de gástrico (KATO III) e adenocarcinoma de cólon (HT-29)**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS). Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).  
Área de Concentração: Medicina e Áreas afins.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Novais Moreno.  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selene Elíbio Esposito.

CURITIBA  
2010



**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos vinte e oito dias do mês de julho de 2010, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação "ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA LECTINA BJcuL SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS" apresentada por DANUSA DE CASTRO DAMASIO para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Selene Elífo Esposito PUCPR - Presidente	
Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Lucia de Noronha PUCPR	
Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Silvia Maria Suter Correia Cadena UFPR	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Selene Elífo Esposito

Conceito: Aprovado

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lucia de Noronha

Conceito: APROVADO

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvia Maria Suter Correia Cadena

Conceito: Aprovado

Conceito Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:

---

---

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Selene Elífo Esposito  
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho  
Coordenador do PPGCS PUCPR

## AGRADECIMENTOS

À minha família recém construída com a chegada do Luiz Felipe, que me deu todo apoio, suporte e força para caminhar com meus objetivos.

Aos meus pais, pela confiança e amor que depositaram em meu sucesso.

Ao meu tio, José Luiz de Castro e família, que me acolheram em sua casa quando cheguei a Curitiba.

À minha orientadora, Dra. Andréa Moreno, que é uma excelente pesquisadora, sempre presente me ajudando, apoiando, discutindo novas idéias. Enfim, agradeço-a pela oportunidade cedida, pela amizade, compreensão e pelos cuidados dedicados ao nosso trabalho e pesquisa.

À minha co-orientadora, Dra. Selene Elíffio Esposito, pela paciência e ajuda principalmente nos finalmente em que dispôs considerável parte do seu tempo para a realização do trabalho.

Às companheiras de laboratório, Juliane Monteiro e em especial Stefanie Nolte, por me ensinar as práticas do cultivo celular e pelo prazer da parceria.

À Dra. Lúcia de Noronha por ceder parte de seu material para a realização da imunohistoquímica e por dispor de seu precioso tempo para a avaliação do trabalho no CAP.

Às técnicas do laboratório de patologia, Marina e Ana Paula, pela ajuda na montagem das lâminas e pelas conversas jogadas fora.

À Capes, pela bolsa cedida no ano de 2009.

E, acima de tudo, agradeço a Deus, pelo alcance de meus objetivos, novas amizade de pessoas sinceras, por iluminar minha família durante minha ausência e me dar bênçãos para a realização e conclusão deste trabalho.

## RESUMO

A lectina purificada do veneno de *Bothrops jararacussu* (BJcuL) é específica para ligação com D-galactose e foi descrita como inibidora da proliferação de carcinoma renal e pancreático humano, bem como da proliferação de glioma e células endoteliais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* da lectina BJcuL sobre células das linhagens de carcinoma gástrico (KATO III) e carcinoma de cólon (HT-29). Os resultados demonstram que BJcuL reconhece glicoligantes-alvo na superfície de ambas as linhagens, sendo a interação inibida na presença de D-galactose. A interação de BJcuL à superfície celular foi citotóxica de maneira dose-dependente e de forma mais acentuada para a linhagem HT-29. A diminuição da adesão às moléculas de matriz extracelular também foi observada de modo dose-dependente em ambas as linhagens, porém quando as células foram incubadas previamente com as proteínas da matriz, a lectina não teve efeito sobre a adesão. A análise da inibição da proliferação celular foi avaliada por marcação anti-PCNA e o resultado mostrou que a lectina reduziu a proliferação de KATO III mas, não de HT-29. Porém, a marcação com anti-caspase-8, foi intensa em HT-29. Os resultados sugerem que a atividade citotóxica de BJcuL avaliada através da viabilidade celular induzida para ambas as linhagens, atuam distintamente, uma vez que para KATO III, BJcuL foi inibidora da proliferação celular e para HT-29 induziu apoptose.

## ABSTRACT

The lectin extracted from *Bothrops jararacussu* (BJcuL) is specific for D-galactosides. It was described as an inhibitor of human pancreatic carcinoma proliferation as well as for glioma and endothelial cells. This study aimed to evaluate the *in vitro* effect of the BJcuL over the gastric carcinoma (KATO III) and colon carcinoma (HT-29) cells lines. The results show that BJcuL interact with glycolingand targets on the surface of both carcinoma cells lines, and this interaction was inhibited in the presence of D-galactose. The interaction between BJcuL and the cellular surface was cytotoxic in a dose-dependent manner and more pronounced for HT-29. A decrease in adhesion to extracellular matrix was also observed in a dose-dependent manner for both cells lines, but when the cells were previously incubated to the matrix, the lectin had no effect on adherence. The analysis of the inhibition of cell proliferation was assessed by anti-PCNA and the result showed that the lectin reduced the KATO III proliferation but not HT-29. However, caspase-8 expression was intense in HT-29. These results suggest that the cytotoxic effect of BJcuL assessed by induced cell viability, is contrasting for both cells lines, since that for KATO III, BJcuL inhibited proliferation and for H-T29 induced apoptosis.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
SUMÁRIO.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CÂNCER.....	1
1.2 CARCINOMA GASTRINTESTINAL.....	3
1.1.1 TUMORIGÊNESE.....	4
1.3 GLICOSILAÇÃO ABERRANTE.....	5
1.4 LECTINAS.....	7
1.4.1 BJCUL: UMA LECTINA COM MÚLTIPLAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS.....	9
1.5 MORTE CELULAR.....	10
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 OBJETIVO GERAL.....	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. OBTENÇÃO DE BJCUL.....	15
4.2 BIOTINILAÇÃO DA LECTINA BJCUL.....	15
4.3 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES.....	15
4.4 ENSAIO DE RECONHECIMENTO DE GLICANA ESPECÍFICA NA SUPERFÍCIE DE CÉLULAS TUMORAIS.....	16
4.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DIRETA OBSERVADA POR VIABILIDADE CELULAR.....	16
4.6 ENSAIOS DE ADESÃO.....	17
4.7 AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE BJCUL NA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE CASPASE 8.....	18
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1 ENSAIO DE RECONHECIMENTO DE GLICANA ESPECÍFICA NA SUPERFÍCIE DE CÉLULAS TUMORAIS.....	19
5.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DIRETA.....	19
5.3 ENSAIO DE ADESÃO.....	22
5.4 AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE BJCUL NA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	24
5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CASPASE 8.....	24
6. DISCUSSÃO.....	26
7. CONCLUSÃO.....	31
8. REFERÊNCIAS.....	32



## LISTA DE ABREVIATURAS

APAF-1 – Fator de ativação de proteases pró-apoptóticas  
APO 3L – Ligante APO3 do recetor DR  
ATP – Adenosina Trifosfato  
CCRm – Câncer colorretal metastático  
CEA – Antígeno carcinoembrionário  
CRD – Domínio de reconhecimento de carboidrato  
Con A – Lectina concavalina A  
DD – Domínio de morte  
DISC – Complexo sinalizador de indução da morte  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
DR3 – Receptor de morte tipo 3  
DR4 – Receptor de morte tipo 4  
DR5 – Receptor de morte tipo 5  
EGFR – Receptor do fator de crescimento epidermal  
FAAD – Domínio de morte associado ao Fas  
FasL – Ligante Fas  
FasR – Receptor do ligante Fas  
GS1B4 – Lectina de *Grinifonia simplicifolia*  
GlcNac – *N-acetilglucosamina*  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de oxigênio  
HeLa – Câncer cervical humano  
HT-29 – câncer de cólon  
IAP – Proteínas indutoras da apoptose  
INCA – Instituto Nacional do Câncer  
INF- $\gamma$  – Interferon-gama  
KM<sup>+</sup> - Lectina purificada de *Artocarpus integrifolia*  
KML-C – Lectina de *Viscum album coloratum*  
NF- $\kappa$ B - Fator de necrose tumoral  $\kappa$ B  
NO – Óxido nítrico  
PCL – Lectina de *Polygonatum cytonema*  
PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular  
PBS – Solução salina fosfatada tamponada  
PHA – Lectina fitohematoglutina

ROS – Espécies reativas de oxigênio  
Smac – Ativador secundário da caspase mitocondrial  
SBA – Lectina do feijão de soja  
TGF- $\beta$  – Fator de crescimento transformador  $\beta$   
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa  
TNFR1 – Receptor do fator de necrose tumoral  
TRAAD – Domínio de morte TNFR1  
TRAF-2 – Fator 2 associado ao TNFR  
TRAIL/APO-2L – Ligantes indutores da apoptose relacionado ao TNF 1 e 2.  
TRAIL R/1 – Receptor TRAIL do tipo 1  
TRAIL R/2 – Receptor TRAIL do tipo 2  
WGA – Lectina de gérmen de trigo  
WHO – World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - PROCESSO DE GLICOSILAÇÃO .....	6
<b>FIGURA 2</b> - REPRESENTAÇÃO SISTEMÁTICA DO EVENTO DE APOPTOSE.....	13
<b>FIGURA 3</b> - INTERAÇÃO DE BJCUL BIOTINILADA X LINHAGEM DE CARCINOMA DE CÓLON (HT-29).....	20
<b>FIGURA 4</b> - INTERAÇÃO DE BJCUL BIOTINILADA X LINHAGEM DE CARCINOMA GÁSTRICO (KATO III).....	20
<b>FIGURA 5</b> - ATIVIDADE CITOTÓXICA DA LECTINA DO VENENO DE <i>BOTHROPS JARARACUSSU</i> SOBRE KATO III E HT-29.....	21
<b>FIGURA 6</b> - ENSAIOS DE ADESÃO REALIZADO COM KATO III E HT-29 APÓS A INCUBAÇÃO COM BJCUL.....	23
<b>FIGURA 7</b> - AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR APÓS A INCUBAÇÃO DE BJCUL COM KATO III E HT-29.....	25
<b>FIGURA 8</b> – AVALIAÇÃO DA APOPTOSE EM KATO III E HT-29 APÓS A INCUBAÇÃO COM BJCUL.....	25

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer

O câncer configura-se como um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. No Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (INCA, 2007). As mortes por câncer no mundo são projetadas para um contínuo crescimento, estimando-se um número de 12 milhões de mortes por câncer em 2030 (WHO, 2010).

Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo, representando um conjunto de mais de 100 doenças (WHO, 2010). Neoplasia maligna, ou câncer, é definida como uma proliferação anormal de células geneticamente alteradas que pode ser causada por vírus oncogênicos ou condições predisponentes (GOYOS; ROBERT, 2009). A mudança também pode ser causada por agentes externos (físicos, químicos e biológicos) e fatores genéticos hereditários (WHO, 2010).

Entre os fatores que podem levar ao desenvolvimento de uma neoplasia estão:

1 - Fatores genéticos - existem vários genes envolvidos na carcinogênese. Genes supressores do tumor estão presentes em todas as células e auxiliam na regulação do ciclo celular. Eles atuam regulando o crescimento celular e determinando quando as células danificadas estão além do reparo e devem degenerar através de um processo conhecido como apoptose. Estes genes promovem carcinogênese quando inativados. Como exemplo estão os genes *Tp53* e *K-ras*. Por outro lado, os proto-oncogenes, são genes funcionais que quando mutados, tornam-se oncogenes promovendo a proliferação celular descontrolada. *K-ras* é um exemplo de um oncogene no trato gastrointestinal (SONG, 2009).

2 - Agentes infecciosos - vírus e bactérias são capazes de induzir a carcinogênese. Os vírus são classificados em dois grupos gerais baseados na composição de seu genoma (DNA ou RNA) que é considerada a partícula viral infecciosa. Além da diferença na reprodução e ciclo vital, os vírus DNA e RNA, também diferem nos mecanismos de indução à transformação celular. Os vírus RNA são caracterizados pela capacidade de transportar ou modificar genes celulares

importantes para a regulação do crescimento (oncogenes). Os vírus DNA causam transformação celular porque codificam proteínas de origem exclusivamente viral e essenciais para a replicação viral, o exemplo mais marcante é a associação do vírus Epstein Barr com o desenvolvimento de carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitt e linfoma de Hodgkin (BERGONZINI *et al.*, 2010). Algumas bactérias são consideradas um fator de risco para o desenvolvimento de uma neoplasia, como *Helicobacter pylori* associada ao câncer gástrico (ATSUMI *et al.*, 2007). Os mecanismos pelos quais as bactérias relacionam-se ao câncer estão associados ao binômio infecção–inflamação (ANAND *et al.*, 2008).

3- Cigarro - contém, aproximadamente, 50 substâncias carcinogênicas (ANAND *et al.*, 2008) como hidrocarbonetos policíclicos, aminas aromáticas, aldeídos, componentes orgânicos voláteis, metais nitrosaminas (HECHT, 2008). Cerca de 90% dos cânceres de pulmão estão associados ao cigarro (HAMMERSCHMIDT; WIRTZ, 2009).

Outros fatores ambientais, poluição (ANAND *et al.*, 2008), exposição à radiação, substâncias químicas sintéticas ou naturais são as principais causas de câncer. Componentes químicos ambientais ou seus metabólitos são depositados em tecidos humanos, fluidos corporais ou mesmo inalados, entre eles estão: hidrocarbonetos policíclicos, aminas heterocíclicas, organoclorados (WILD, 2009).

Aproximadamente 90% dos casos de câncer são relacionados ao ambiente e hábitos de vida e somente cerca de 5 a 10% são devidos a defeitos genéticos (ANAND *et al.*, 2008; WHO, 2010), mas a maioria dos tumores são causados pela associação de fatores ambientais e hereditários (GHAVAMI, 2009).

O diagnóstico precoce e as formas de intervenção terapêuticas são essenciais para um controle efetivo da doença. Os tratamentos convencionais para o câncer incluem cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A quimioterapia, também conhecida como terapia medicamentosa, é amplamente utilizada e desempenha um papel importante, porém sua eficácia é afetada pela toxicidade dose-dependente e efeitos colaterais. Novos procedimentos terapêuticos são necessários e a aquisição de novos conhecimentos para a melhor abordagem contra o câncer humano impõe o desenvolvimento de projetos multicêntricos (DONG, ZHU, 2010). A biologia molecular avançou muito em relação ao câncer e atualmente existem vários exemplos de técnicas moleculares, algumas estabelecidas, outras emergindo, que têm sido aplicadas para diagnóstico ou, em alguns casos, para a prevenção da disseminação tumoral. A imunobiologia de tumores é uma das novas áreas básicas

que tenta desvendar os mecanismos envolvidos na interação entre células neoplásicas e a ativação de uma resposta imune eficiente. Em todo o mundo, estuda-se a terapia-alvo, que por focalizar a orientação e localização do tumor oferece vantagens como redução da dosagem, eficácia do tratamento e diminuição da toxicidade (DONG, ZHU, 2010).

## **1.2 Carcinoma gastrintestinal**

O câncer gástrico é a segunda maior causa de morte por câncer no mundo. As variações geográficas influenciam, sendo que a maior incidência de câncer gástrico é na China. Embora os tratamentos cirúrgicos, como gastrectomia, demonstrem eficácia para alguns carcinomas gástricos, o prognóstico destes pacientes é pobre devido à recorrência após a cirurgia da disseminação linfática, metástase via sanguínea, ou peritoneal (ZHI *et al.*, 2010).

A hipóxia, por exemplo, é uma característica na formação de tumores sólidos e constitui um fator comum em diversos tipos de tumores. O fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  (fator-1 $\alpha$  induzível por hipóxia) é frequentemente superexpresso nos cânceres gastrointestinais (ROHWER *et al.*, 2009). O enxerto da linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) contém regiões com hipóxia, similar a 79% dos casos clínicos cirúrgicos observados de câncer colorretal. Tais regiões hipóxicas avascularizadas têm acesso limitado aos agentes terapêuticos. Estas regiões são como “santuário fornecedores” para a proliferação de algumas células tumorais que podem escapar da quimioterapia e contribuir para o re-crescimento do tumor e resistência aos medicamentos (ZHI *et al.*, 2010).

Os adenocarcinomas colorretais são caracterizados pela presença de irregularidades como estruturas glandulares atípicas, com seu lúmen formado por multicamadas de células tumorais, como observado em enxertos de HT-29, diferentemente da mucosa colônica normal que não apresenta microvasos na estrutura glandular, no entanto, o microambiente destas estruturas apresentam um tecido periglandular bem vascularizado que permite a difusão de nutrientes e oxigênio para as células dentro da estrutura glandular. A característica estrutural glandular é mantida nos enxertos de HT-29, entretanto, algumas linhagens de carcinoma colorretal, como HCT-8, apresentam características histológicas uniformes e pouco diferenciadas, sem formação glandulares pelas células tumorais (BHATTACHARYA *et al.*, 2009).

A ressecção cirúrgica com intenção curativa é o tratamento mais viável, porém levando a um prognóstico ruim, com taxas de sobrevivência em 5 anos de 30% a 55%. Portanto, uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a invasão local e disseminação sistêmica do câncer é necessário para projetar e avaliar novas estratégias terapêuticas para essa doença letal (ZHI *et al.*, 2010).

### **1.1.1 Tumorigênese**

A tumorigênese é um processo constituído de três etapas: iniciação, promoção e progressão tumoral. É durante a iniciação e promoção que ocorrem as primeiras alterações genéticas que levam uma célula normal à transformação. O câncer é resultado de seis classes de alterações que interferem com a fisiologia normal de uma célula: (1) auto-suficiência de fatores de crescimento; (2) insensibilidade a fatores inibitórios de proliferação; (3) evasão da apoptose; (4) potencial replicativo infinito; (5) angiogênese sustentada e (6) invasão tecidual e metástase. A fase de progressão tumoral corresponde à fase de aquisição de um comportamento invasivo, associado ou não, à capacidade de formação de metástase à distância (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

A metástase implica inicialmente na susceptibilidade do tecido à invasão das células tumorais. A proliferação tumoral a partir da evolução de células somáticas diversificadas geneticamente sofrem pressões seletivas do microambiente que determinam as condições para o comportamento celular, por isso, somente uma pequena porcentagem destas células irão colonizar em órgãos distantes (GUPTA; MASSAGUÉ, 2006). As interações entre o microambiente e o tumor são complexas, recíprocas e altamente dependentes em situações particulares. O microambiente pode promover, por exemplo, a progressão através do aumento da angiogênese (COOK; FIGG, 2010), a proliferação, metástase, invasividade e, crucialmente, a resistência à apoptose. Este efeito alcançado através da ativação de receptores protéicos na superfície das células tumorais, o que leva a um padrão de expressão alterada de proteínas dessas células (WESTHOF; FULDA, 2009). Por isso a biologia de cada tumor difere (RAZ *et al.*, 1987).

### **1.3 Glicosilação Aberrante**

Várias moléculas são expressas diferentemente nas células tumorais, principalmente as que sofrem alterações quantitativa e qualitativa no seu padrão, como as glicanas. Glicosilação é a forma mais comum de modificação pós-traducional, mediado por enzimas no qual as cadeias laterais de oligossacarídeos são ligados covalentemente a qualquer lado da cadeia de asparagina (N-ligada) ou (O-ligada) serina/ treonina, sendo a primeira a mais proeminente. A fração de oligossacarídeo de proteínas muitas vezes é essencial para o reconhecimento, sinalização e eventos de interação entre células e proteínas e podem desempenhar papel importante no dobramento e na definição da conformação protéica (LI; D'ANJOU, 2009).

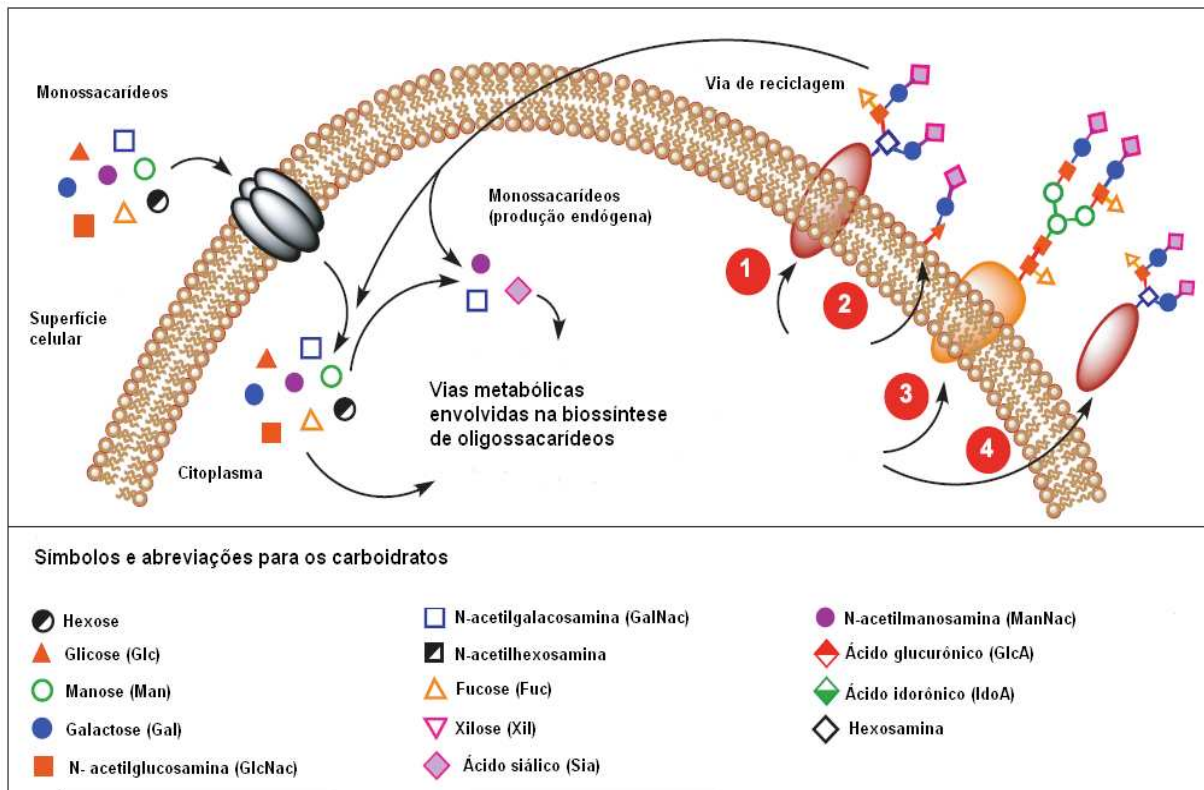
A superfície das células de mamíferos contém complexos de carboidratos, conhecidos coletivamente como glicocálix, constituídos de monossacarídeos simples em diversos arranjos de oligossacarídeo (Figura 1). As glicanas apresentam alta complexidade e diversidade e medeiam a comunicação celular com o exterior, papel de grande importância em muitos processos biológicos como recombinação e adesão célula-célula, tráfego celular (células vermelhas do sangue, neutrófilo polimorfonuclear, linfócitos), regulação da rota de catabolismo de moléculas glicosiladas, manutenção da conformação específica de moléculas da membrana ou em solução e funcionando como receptores de hormônios e outras moléculas biologicamente ativas (KILPATRICK, 2002; GABIUS, 2008).

Ao longo do processo de transformação tumoral, as glicanas sofrem diferenças significativas na sua expressão e composição e, portanto, podem ser consideradas moléculas associadas ao tumor. Este processo chamado de glicosilação aberrante (RAZ *et al.*, 1987; HAKOMORI, 1989) é importante para a invasão tumoral e adesão celular por afetar moléculas de adesão (BROCKHAUSEN, 2003). Além disso, a expressão e função alterada de várias glicosiltransferases e glicosidases, geram carboidratos de superfície celular que podem fornecer uma vantagem seletiva para as células tumorais durante a progressão de fenótipos invasivos para mais agressivos e metastático (LEI; CHANG, 2009).

Mudanças na glicosilação também alteram vias de sinalização que regulam a proliferação, diferenciação, migração e angiogênese, afetando assim, não só as células tumorais propriamente ditas, mas também outras moléculas do microambiente tumoral (DENNIS *et al.*, 1999, ONO; HAKOMORI, 2004, FUSTER; ESKO, 2005).



A primeira evidência de que ocorrem alterações na glicosilação durante a progressão tumoral, veio da observação de que as células tumorais têm maior habilidade de se ligar a lectinas vegetais, quando comparadas com as células normais (RAEDLER; SCHREIBER, 1988). Desde então, lectinas têm sido utilizadas como alvos para diagnósticos e terapêuticas no câncer (LEI; CHANG, 2009), servindo como sondas estruturais para o estudo glicobiológico em mamíferos (YANG *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Visão geral do processo de glicosilação. (a) Complexos de carboidratos são constituídos por carboidratos obtidos através de fonte dietética, por conversão endógena de outros monossacarídeos ou por vias de reciclagem e salvamento. Oligossacarídeos de várias composições podem ser ligados a várias proteínas incorporadas na membrana plasmática (1 e 3) ou diretamente a lipídeos (2). Coletivamente, esses carboidratos na superfície celular (1, 2 e 3) compreendem o glicocálix que dá a cada célula uma identidade molecular única. Oligossacarídeos também podem ser ligados a proteínas secretadas (4). (b) Símbolos e abreviaturas utilizadas na ilustração para carboidratos comuns. Fonte: Adaptado de YAREMA e BERTOZZI, 2001.

## 1.4 Lectinas

Peter Hermann Stillmark observou pela primeira vez que proteínas presentes em extratos da semente de *Ricinus communis* (mamona) induziam aglutinação em células vermelhas do sangue (MOREIRA *et al.*, 1991). Após esse estudo pioneiro com as aglutininas, ou como são hoje conhecidas, as lectinas, passaram a ser amplamente estudadas. No século XIX, tais proteínas foram referidas como hematoaglutininas, ou fitoaglutininas devido a sua origem vegetal, mas hoje sabe-se que são encontradas e distribuídas na natureza em diferentes organismos como microrganismos, fungos e animais (CASTILLO-VILLANUEVA *et al.*, 2005).

A característica fundamental das lectinas é sua propriedade de reconhecimento de carboidratos tanto em solução como na superfície celular. Baseado na análise da seqüência de aminoácidos das lectinas animais, Kurt Drickamer, da Universidade de Columbia (Nova York) propôs em 1988, que a atividade do ligante carboidrato na sua maioria reside em um segmento polipeptídico, designado como Domínio de Reconhecimento de Carboidrato (CRD, do inglês *Carbohydrate recognition domain*) (SHARON; LIS, 2004). Até o momento, diversos tipos de CRDs foram descritos, cada um compartilhando um padrão invariante e altamente conservado de resíduos de aminoácidos. Com isso, é possível dividir a maioria das lectinas animais em cinco classes principais, com base nos alinhamentos das seqüências de aminoácidos dos CRDs (POWELL; VARKI, 1995, DRICKAMER, 1998).

✓ Lectinas do tipo C: requerem cálcio para a ligação ao carboidrato, CRD conservado, possuem especificidade variável a carboidratos, como manose, galactose, fucose, entre outros (POWELL; VARKI, 1995, DRICKAMER, 1998).

✓ Lectinas do tipo S ou Galectinas: independem de cálcio, possuem CRD conservado e ligação a  $\beta$ -galactosídeos (POWELL; VARKI, 1995, DRICKAMER, 1998). A origem das galectinas é um grande mistério, segundo evidências experimentais demonstram que elas são originadas a mais de 800 milhões de anos atrás e são amplamente distribuídas no reino animal, desde nematódeos a vertebrados, e têm sua propriedade molecular básica conservada como especificidade e arquitetura protéica. Elas são consideradas decifradoras de glicocódigos por reorganizar estruturas de alguns açúcares (KASAI; HIRABAYASHI, 1996). As galectinas são estudadas intensivamente devido ao seu desempenho no

papel na adesão, regulação do crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (KILPATRIK *et al.*, 2002. PERILLO *et al.*, 1998; KASAI; HIRABAYASHI, 1996).

✓ Lectinas do tipo P: altamente específico para manose-6-fosfato; possuem CRD homólogo, mas ainda não bem definido (POWELL; VARKI, 1995, DRICKAMER, 1998).

✓ Lectinas do tipo I: com CRD semelhante ao domínio de imunoglobulina, com ligação variável à carboidratos (POWELL; VARKI, 1995, DRICKAMER, 1998).

Entres as lectinas tipo I reconhecendo ácido siálico estão as Siglecs (superfamília das lectinas de ácido siálico vinculado à Imunoglobulina), uma subclasse estruturalmente distinta das lectinas tipo I. Até o momento 11 subclasses diferentes Siaglec foram descritas. Elas estão expressas em várias células como molécula de adesão de macrófagos (Siglec-1), expressão de CD22 em células B (Siglec-2), linhagem mielomonocítica (Siglec-3), oligodendrócitos (Siglec-4), entre outros (ANGATA; LINDEN, 2002).

✓ Pentraxinas: com motivo estrutural pentamérico e ligação variável como galactose e monossacarídeos fosforilados e sulfatados. (POWELL; VARKI, 1995; DRICKAMER, 1998). São encontradas em muitas espécies de vertebrados, e é dividida em CRP ou SAP baseada tanto na preferência por fosforilcolina (CRP) ou fosfoetanolamina (SAP). A lectina *L. polyphemus* é a de maior interesse na história das pentraxinas por sua atividade hematoaglutinante (KILPATRICK, 2002).

O reconhecimento de que as lectinas participam dos mais diversos eventos celulares, onde o reconhecimento célula-célula ou célula-matriz extracelular são requeridos, fez com que o seu estudo e aplicação se ampliasse. A lectinologia pode ser dividida em duas grandes partes: a primeira visa a caracterização estrutural e funcional da lectina e seu carboidrato ligante, enquanto que a segunda área estuda a aplicação das lectinas no estudo de glicoconjugados ou como interferente de fenômenos que naturalmente envolvem seus glicoligantes. Nos últimos anos foi demonstrado o efeito tóxico de lectinas sobre células de linhagem tumoral como as de carcinoma humano (SCHWARTZ *et al.*, 1999, WANG; LIU, 2000, KURAMOTO *et al.*, 2005) e ativação do sistema imune frente a neoplasias (MANUELE *et al.*, 2006, GRUNDY, *et al.*, 2007, LEI; CHANG, 2009). Além disso, ensaios *in vitro* já demonstraram a morte celular por apoptose de células tumorais após períodos de incubação com lectinas (LIU, *et al.*, 2009, YAN, *et al.*, 2009).

### **1.4.1 BJcuL: Uma Lectina Com Múltiplas Propriedades Biológicas**

Muitas lectinas de venenos de serpentes, denominadas SVL (*snake venom lectins*), foram isoladas do veneno de animais pertencentes às famílias Elapidae, Viperidae e Crotalidae (HIRABASYASHI *et al.*, 1991, KOMORI *et al.*, 2000, NIKAI *et al.*, 2000, HAVT *et al.*, 2005) Compõem a família das lectinas tipo-C e correspondem de 1 a 5% do peso seco do veneno. Na sua maioria, aparecem como homodímeros com massa molar de 28 a 32 kDa (HIRABAYASHI *et al.*, 1991; LOMONTE *et al.*, 1994; OZEKI *et al.*, 1994).

SVL têm a característica de causar hemaglutinação e, entre outras ações está a atividade mitogênica em linfócitos (OGILVIE *et al.*, 1986, OZEKI *et al.*, 1994), indução de edema em ratos (LOMONTE; CARMONA, 1992), inibição da proliferação de células tumorais (PEREIRA-BITTENCOURT *et al.*, 1999.), citotoxicidade sobre linhagens de células tumorais e endoteliais (DE CARVALHO *et al.*, 2001) e estimulação da migração e adesão de neutrófilos *in vivo* (ELIFIO-ESPOSITO *et al.*, 2007). Adicionalmente, os venenos também contém moléculas semelhantes a lectinas sem habilidade de causar aglutinação (HAVT *et al.*, 2005).

A lectina do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) foi purificada e descrita como molécula contendo CRD homólogo ao de lectinas endógenas (animais) do tipo-C (DE CARVALHO *et al.*, 1998). Os CDRs do domínio tipo-C são caracterizados pela sequência de 32 resíduos de aminoácidos em intervalos fixos, incluindo duas pontes dissulfídicas, distribuídas em aproximadamente 120 aminoácidos. Esses resíduos conservados aparentemente formam o processo geral dependente de cálcio da estrutura ligante de carboidrato. A especificidade por carboidratos, em particular, é determinada por alguns resíduos não conservados na molécula, o que confere as lectinas tipo-C uma gama de especificidade a carboidratos diferentes (WEIS *et al.*, 1991). A sequência de BJcuL é composta de 135 resíduos de aminoácidos (KASSAB *et al.*, 2001), dentro da mesma a posição e a sequência de Gln-Pro-Asp (QPD) (96-98), é essencial para a ligação com galactose, e está de acordo com a estrutura de outras lectinas de veneno de serpentes (KOMORI *et al.*, 1999). Assim, BJcuL caracterizou-se como molécula composta de subunidades de ~15kDa e que demonstra ter grande afinidade por glicoproteínas contendo  $\beta$ -D-galactosídeos (DE CARVALHO *et al.*, 1998).

A lectina BJcuL demonstrou ser inibidora efetiva da proliferação de células humanas de carcinoma renal e pancreático (PEREIRA-BITTENCOURT *et al.*, 1999), bem como demonstrou ser uma potente inibidora do crescimento de glioma e células

endoteiais (DE CARVALHO *et al.*, 2001). Os mecanismos envolvidos nas atividades biológicas propostas para BJcuL ainda são obscuros. Porém, lectinas foram descritas como capazes de induzir morte ou inibir o crescimento de células transformadas, pela interação direta com os carboidratos aberrantes. O efeito citotóxico direto de lectinas sobre células transformadas em grande parte relaciona-se a indução da apoptose (DE MEJI'A; PRISECARU, 2005). Adicionalmente, lectinas podem exercer a atividade antitumoral de forma indireta por induzir imunestimulação e imunomodulação (GHOSH; MAITI, 2007).

### **1.5 Morte Celular**

A morte celular desempenha um papel central na fisiologia normal e em determinadas doenças como câncer e doenças cardiovasculares. Embora a morte celular seja frequentemente caracterizada por apoptose (programada) ou necrose (causada), existem formas adicionais de morte celular programada (autofagia, oncoses e piroptoses) (TAIT, 2008).

Necrose é um termo comum utilizado por patologistas e refere-se a qualquer morte associada com a perda do controle do balanço iônico, aumento de água, inchaço e lise celular. Esta lise, lança muitos constituintes intracelulares, atraindo células do sistema imune e provocando uma resposta inflamatória. Adicionalmente, a morte celular por necrose está relacionada à uma resposta a um estímulo de estresse celular, que inclui isquemia ou excitotoxicidade por glutamato nos neurônios ou células cancerígenas expostas a agentes alquilantes que causam danos ao DNA (FULDA, 2009). Dentre as alterações morfológicas características da necrose estão: inchaço, disfunção mitocondrial, permeabilização da membrana plasmática, disfunção e estresse oxidativo mitocondrial. Ao contrário da apoptose não há sinais de fragmentação nuclear (SASI, 2009).

A apoptose é um evento mais regulado. É destinada à eliminação de populações indesejadas de células durante a embriogênese e em vários processos fisiológicos, estados patológicos como câncer e doenças cardiovasculares (TAIT, 2008). Atualmente, morte programada das células é sinônimo de apoptose, baseando-se nesta definição, a autofagia, um processo de múltiplos passos que é caracterizado pelo sequestro e degradação de proteínas e organelas citoplasmáticas de vida longa (ex:mitocôndria), resultando em vesículas de membrana dupla, denominada autofagossoma, também se encaixa nesta definição. O termo apoptose

foi inicialmente usado para descrever a morfologia particularmente comum deste tipo de morte celular. Essa morfologia inclui o encolhimento das células, arredondamento e fragmentação dos núcleos junto à condensação e marginação da cromatina, retração, e fagocitose de fragmentos celulares (FULDA, 2009) e, diferentemente da necrose na apoptose a estrutura das organelas são mantidas mesmo após a formação dos corpos apoptóticos nem o desenvolvimento de uma resposta inflamatória (SASI, 2009; FULDA, 2009).

Existem duas vias de apoptoses bem caracterizadas, uma inicia-se através da ligação de receptores na superfície das células com seus ligantes específicos (extrínseca) e a outra é desencadeada pelas mudanças na integridade celular interna (intrínseca) (VUCIC; FAIRBROTHER, 2007; PAPALIAGKAS *et al.*, 2007).

A iniciação da apoptose é desencadeada através de membros da família de receptores de morte TNF (fator de necrose tumoral). Esses receptores são caracterizados pela presença de um domínio de interação proteína-proteína (também chamado de domínio de morte, DD) na sua parte citoplasmática (GLOIRE *et al.*, 2008, MAGNUSSO; VAUX, 1999). Os ligantes mais bem caracterizados e seus correspondentes receptores de morte são: FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5 (ELMORE, 2007).

A ligação aos receptores alvos leva a oligomerização do receptor, resultando na ativação da proteína adaptadora TNFR1 e sua associação ao domínio de morte (TRADD), que serve como uma plataforma na associação aos complexos receptores das ligações de Fas-(FADD) e do fator TNFR-(TRAF-2). Este último pode, então, promover a ativação de caspase-8, um dos iniciadores dos processos apoptóticos (BOLETI *et al.*, 2008). O papel das caspases na apoptose é bem estabelecido há pelo menos uma década. Nesse processo caspases-2, -8, -9 e -10 são iniciadores do processo, enquanto caspase-3, e em menor grau caspase-6 e -7, servem como moléculas efetoras. Caspase-8 é considerada a chave iniciadora de morte mediada pelo receptor membro da família TNF. Seguida a ativação dos receptores da família de TNF, a caspase-8 é recrutada para a sinalização de morte através do complexo de sinalização de morte (DISC) via ligação ao adaptador de proteína FADD. Esse recrutamento resulta na ativação da caspase-8 e morte celular (CHOWDHURY *et al.*, 2008). A ativação de caspases é um passo chave no comprometimento da apoptose celular e é dependente da permeabilização externa de membrana mitocondrial (MOMP) e da liberação do citocromo c da mitocôndria (SAMALLIA *et al.*, 2010).

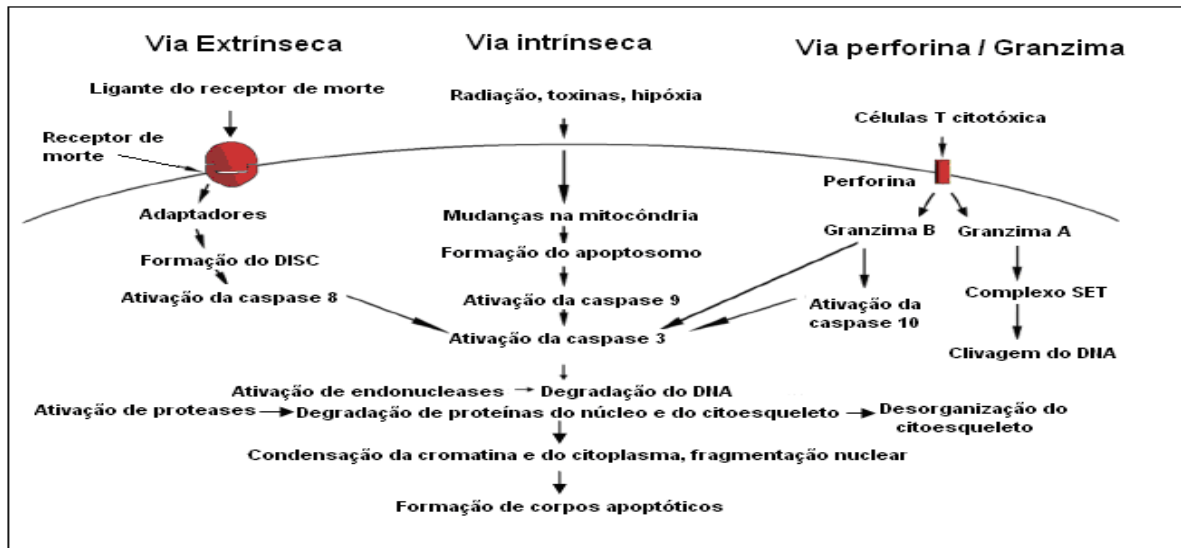
A via de morte intrínseca acontece em células submetidas a estresse causando dano nuclear ou privação de alguma fator de crescimento. Esta via é regulada pela proteína Bcl-2 ativada por sinais internos. A família de proteínas Bcl-2 consiste em aproximadamente 15 membros alguns são anti-apoptose e outros pró-apoptose. As proteínas pró-apoptose (Bax, Bak) atuam facilitando o lançamento do citocromo c da membrana mitocondrial (PAPALIAGKAS *et al.*, 2007). Quando o citocromo c é lançado da mitocôndria, se liga à APAF1 no citosol, ativando a montagem do apoptosomo que ativa a caspase-9 (ELMORE *et al.*, 2007).

O estágio de controle mitocondrial da apoptose é um passo anterior à ativação de caspase e é mediada pela família de proteínas Bcl-2 (SUEN *et al.*, 2008), localizada na mitocôndria, com função reguladora central na apoptose pela promoção ou bloqueio de mudanças na permeabilidade mitocondrial, e consequentemente, na atuação de fatores pro-apoptóticos e ativação de caspases (BRUMATTI, *et al.*, 2010).  $Ca^{+2}$  é o segundo mais importante mensageiro que também é no equilíbrio entre sobrevivência e morte celular (SAMALLI A., *et al.*, 2010). Na mitocôndria saudável, os cátions lipofílicos são acumulados devido ao forte potencial transmembrana negativo produzido durante o metabolismo oxidativo normal. O colapso do potencial eletroquímico é um evento central na apoptose e um alvo potencialmente abundante devido a grande quantidade de mitocôndrias nas células (TAIT, 2008).

Existe uma via adicional de apoptose que envolve mediação de citotoxicidade de célula T e dependência de perforina e granzima B ou granzima A. Tanto a via extrínseca, intrínseca e granzima B convergem para o mesmo término ou via de execução (Figura 2). Essa via é iniciada pela clivagem da caspase-3, resultando em fragmentação de DNA, degradação do citoesqueleto e de proteínas nucleares, vinculação de proteínas, formação de corpos apoptóticos, expressão de ligantes para receptores de células fagocíticas e finalmente, absorção pelas células fagocíticas (ELMORE, 2007).

O câncer é uma das doenças associadas a defeitos no processo apoptótico. O mal funcionamento da apoptose desempenha um papel importante na patogênese dos tumores. Uma ampla gama de células tumorais humanas têm a capacidade diminuída de apoptose, sendo sua sobrevivência induzida pela inativação de sinais pró-apoptóticos ou ativação de vias antiapoptóticas (GHAVAMI, 2009). O desenvolvimento de agentes terapêuticos que tem como alvo a indução da apoptose na célula tumoral é fortemente investigado, especialmente a indução da apoptose

nas células tumorais através de um processo ativo e instrutivo como o mediado por receptores de morte celular na superfície da célula que transmitem sinais de morte quando ligados ao seu receptor correspondente (GRIFFITH, 2009).



**Figura 2.** Representação sistemática do evento de apoptose. As duas vias de apoptose extrínseca e intrínseca, assim como a via perforina/granzima, requerem o desencadeamento de sinais para iniciar a cascata de eventos moleculares. Cada via ativa o iniciador de caspase (8,9,10) que por sua vez ativa a caspase-3 efetora. Entretanto, granzima A induz uma forma de morte independente de caspase. A execução das vias resultam nas características citomorfológicas como o encolhimento celular, condensação da cromatina, formação de vacuolos citoplasmáticas e corpos apoptóticos e finalmente a fagocitose dos corpos apoptóticos por células adjacentes parênquimais, como macrófagos. Fonte: Adaptado de ELMORE, 2007.

Diversos estudos relacionam lectinas e morte celular. Algumas lectinas recentemente têm demonstrado estarem envolvidas com a apoptose, podendo através desta explicar sua citotoxicidade (BOLETI *et al.*, 2008, LEI; CHANG, 2009). Indicativos de apoptose em células de linhagem cancerígena humana pancreática após incubação com a lectina de semente de trigo (WGA), promoveu a indução da condensação da cromatina, fragmentação e liberação de DNA do núcleo, sinais indicativos de apoptose (SCHWARZ *et al.*, 1999).



## 2. JUSTIFICATIVA

Estudos demonstram a atividade citotóxica de lectinas frente às células tumorais. Muitos demonstram que a atividade é dependente da ligação da lectina com seu carboidrato específico e que esta ligação induz diminuição da viabilidade celular. Essa redução muitas vezes é avaliada como morte celular, e é devido na maioria desses estudos a uma exposição dose-dependente de lectina, refletindo diretamente na diminuição de população de células cancerígenas. Alguns autores já demonstraram indícios de que a lectina BJcuL exerce um efeito citotóxico frente a células tumorais. O presente trabalho tem como foco principal caracterizar qual via de morte celular induzida pela lectina sobre as linhagens tumorais KATO III (carcinoma gástrico) e HT-29 (adenocarcinoma de cólon) célula tumoral. A consequência da explicação desta via pode resultar em uma melhor avaliação das lectinas como alvos terapêuticos para o câncer.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 *Objetivo Geral*

Avaliar o efeito *in vitro* da lectina BJcuL sobre as células de linhagem tumoral KATO III e HT-29.

### 3.2 *Objetivos Específicos*

- 1) Avaliação da interação da lectina com glicoligantes alvo presentes na superfície de KATO III e HT-29;
- 2) Avaliação da citotoxicidade induzida pela lectina em ambos os tipos celulares;
- 3) Identificar a interferência de BJcuL na adesão e proliferação celular;
- 4) Caracterizar a morte celular induzida pela lectina BJcuL nas linhagens tumorais.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Obtenção de BJcuL**

O veneno bruto de *Bothrops jararacussu* foi cedido na forma de pool liofilizado pelo Instituto Butantan-SP. BJcuL foi purificada segundo Elifio-Esposito e colaboradores (2007) em que veneno bruto foi suspenso em tampão CTBS (NaCl 150mM, Tris-HCl 20mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM), pH 7,5, até a concentração final de 20mg/ml e aplicado a uma coluna de agarose -D-galactose (5mL) (Pierce, E.U.A.). Após 4h de agitação a 4 ° C, eluição foi realizada com o mesmo tampão. O material retido foi eluído com 100mM de lactose e esta fração foi exaustivamente dialisado contra água destilada para a remoção completa do açúcar. A quantidade de carboidratos na água de diálise foi estimado por espectrofotometria como proposto por Dubois e colaboradores (1956) . As concentrações de proteína foram determinadas usando albumina bovina como padrão.

### **4.2 Biotinilação da lectina BJcuL**

Uma amostra de 100µg de lectina foi submetida a marcação com biotina (Biotin-Ester Sulfo-NHS, Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA). Para tanto, lectina de *Bothrops jararacussu* foi diluída na solução de NaCO<sub>3</sub> (50mM) com pH 8,6 e misturada à 74µL da solução de biotina (1mg/mL). Após 40 minutos de incubação na ausência de luz, a mistura foi ultrafiltrada utilizando-se a membrana YM3, poro tamanho de 3 kDa NMWCO (Amicon Division, W.R. Grace & Co., Beverly, MA) e estocada a -20 °C.

### **4.3 Manutenção das linhagens celulares**

As células de linhagem de carcinoma gástrico (semi aderente de epitélio gástrico - KATO III) foi isolada de tecido estomacal humano, do sexo masculino, asiático, 55 anos, sendo caracterizada como carcinoma gástrico derivado de sítios metastáticos: derrame pleural, glânglios linfáticos axilares e subclavares. A propriedade de propagação é tanto em adesão como em suspensão.

A linhagem de adenocarcinoma de cólon (HT-29) foi isolada em 1964, de tecido colônico humano, do sexo feminino, caucasiano, 44 anos e que apresenta expressão antigênica (sangue tipo A; Rh+; HLA A1, A3, B12, B17, Cw5). Sua propriedade de propagação é a aderência. As estruturas observadas nas células HT-

29 células incluem microvilosidades, microfilamentos, mitocôndrias vacuolizadas com grandes grânulos escuros, liso e retículo endoplasmático rugoso com ribossomos livres, gotículas lipídicas, alguns dos principais e muitos lisossomos secundários (ATCC, 2010).

KATO III e HT-29 foram cedidas pelo Instituto de Patologia e Imunologia da Universidade do Porto (IPATIMUP) – Portugal. Em e mantidas em cultura com meio RPMI 1640 completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino + 100 IU/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina), em estufa a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>, sendo feitos repiques a cada três dias de cultivo. Em fluxo laminar estéril, as células foram distribuídas em novas garrafas placas para cultivo (repique) , após a avaliação quanto à viabilidade celular foi realizada com o corante Azul de Tripán 0,4% que tem cromóforo em sua composição que penetra em membranas danificadas possibilitando a visualização e contagem em câmara de Neubauer.

#### ***4.4 Ensaio de reconhecimento de glicana específica na superfície de células tumorais***

Para avaliar a existência de ligantes D-galactose na superfície das células de linhagem (KATO III e HT-29), as células em cultivo foram lavadas através de centrifugação (1000 rpm por 10 minutos a 22°C) com RPMI incompleto, para então serem contadas e acondicionadas ( $1 \times 10^6$  células/ml) em lamínulas de vidro por 24h a 37°C. Após a incubação as células aderidas foram fixadas com paraformaldeído 2% por 20 minutos a 22°C, submetidas a lavagens com PBS para 1L de água destilada, pH 7,4), PBS contendo glicina 0,1M e novamente com PBS e então incubadas com BJcuL biotinilada (10 µg/ml) por 45 minutos a 22 °C. Após sucessivas lavagens com PBS, foram novamente incubadas com Estreptavidina-FITC por 30 minutos a 22°C. As lamínulas foram montadas em lâminas histológicas com fluormout-G (EMScience; Gibbstown, NJ) e observadas em microscópio de fluorescência. Como controle, as células foram incubadas somente com PBS (controle negativo) ou ainda com lectina pré-incubada com 2mM D-Galactose (D-Gal) ou 2mM N-acetilglicosamina (GlcNac).

#### ***4.5 Ensaio de citotoxicidade direta observada por viabilidade celular***

Com o objetivo de avaliar a atividade citotóxica de BJcuL através da viabilidade celular, as células de linhagem em cultivo foram lavadas por meio de centrifugação com meio RPMI incompleto a 200g por 10 minutos a 22°C. Após

contagem em câmara de Neubauer,  $1 \times 10^4$  células foram acondicionadas em microplaca de 96 poços na presença ou não de diferentes concentrações de BJcuL (200, 100, 75, 50 e 25 ng/ml) pré-incubada com 2mM D-Gal ou 2mM GlcNac. As células junto às lectinas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após período de incubação, foi adicionado aos poços 10 µL de MTT (Sigma, 5mg/ml: (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide), que é reduzido a um formazam púrpura insolúvel por mitocôndrias em células vivas, seguindo incubação por 3 horas. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e as células foram solubilizadas com DMSO (Sigma). A absorbância da solução corada foi quantificada através da medida do comprimento de onda a 550nm em leitor de microplaca.

#### **4.6 Ensaio de adesão**

Com o intuito de avaliar a interferência de BJcuL na adesão das linhagens celulares de carcinoma à matrigel (BD Matrigel™), foram realizados 4 protocolos de adesão descritos a seguir:

1. Ensaio de adesão: As células KATO III e HT-29 ( $1 \times 10^6$ /poço) foram adicionadas aos poços da microplaca de 96 poços coberta com 30µL de matrigel na ausência e na presença de BJcuL em diferentes concentrações (200ng, 100ng, 75ng, 50ng, 25ng) e incubadas por 24 horas a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>.
2. Ensaio de Interferência: KATO III e HT-29 foram incubadas na ausência e na presença de BjcuL em diferentes concentrações por 1 h e após a incubação foram adicionadas aos poços de microplaca recobertos com matrigel, permanecendo por 24 h.
3. Ensaio de Competição I: Poços de microplaca recobertos com matrigel foram incubados com BjcuL em diferentes concentrações por 1 h e após foram adicionados aos poços KATO III e HT-29 para seguir em incubação por 24 h.
4. Ensaio de Competição II: Poços de microplaca recobertos com matrigel foram incubados com as células KATO III e HT-29 por 1 h antes da adição das diferentes concentrações de BJcuL para, então seguir em incubação por 24 h.

Nos poços controle as células tumorais foram incubadas somente com meio RPMI.

Após período de incubação, foi adicionado aos poços 10 µL de MTT. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e as células foram solubilizadas com DMSO (Sigma) para a avaliação das células viáveis aderidas com a medida da absorbância realizada a 550nm em leitor de microplaca.

#### **4.7 Avaliação da Interferência de BJcuL na inibição da proliferação celular e expressão de caspase 8**

Células de ambas as linhagens ( $5 \times 10^4$  células/ml) foram plaqueadas dentro do fluxo laminar estéril em placa de 24 poços contendo lamínulas estéreis e permaneceram incubadas em estufa umidificada contendo  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  com meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO®) suplementado com 20% de soro fetal bovino até atingirem ampla confluência. Posteriormente, adicionou-se BJcuL (100ng ou 25ng/ml) e incubou-se novamente por 24 h. Após o período de incubação, as células foram lavadas com soro fisiológico 0,9%, fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos a  $22^\circ\text{C}$ . As células foram então incubadas com anticorpo anti-PCNA (antígeno de proliferação nuclear) por 45 minutos, com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 15 minutos e para a visualização da reação foi utilizado DAB (DakoCytomation®). A análise foi realizada após a coleta de imagens no microscópio óptico e contagem de imunomarcação através do software Image Pro Plus®.

O mesmo procedimento acima descrito foi utilizado na imunomarcação para caspase, sendo o anticorpo primário específico para caspase-8.

#### **4.9 Análise Estatística**

Cada resultado obtido nos ensaios experimentais (mínimo de 2 experimentos independentes, realizados em triplicata) foram analisados por ANOVA, seguido pelo teste Tukey. Foram considerados significativos os valores nos quais  $p < 0,05$ .

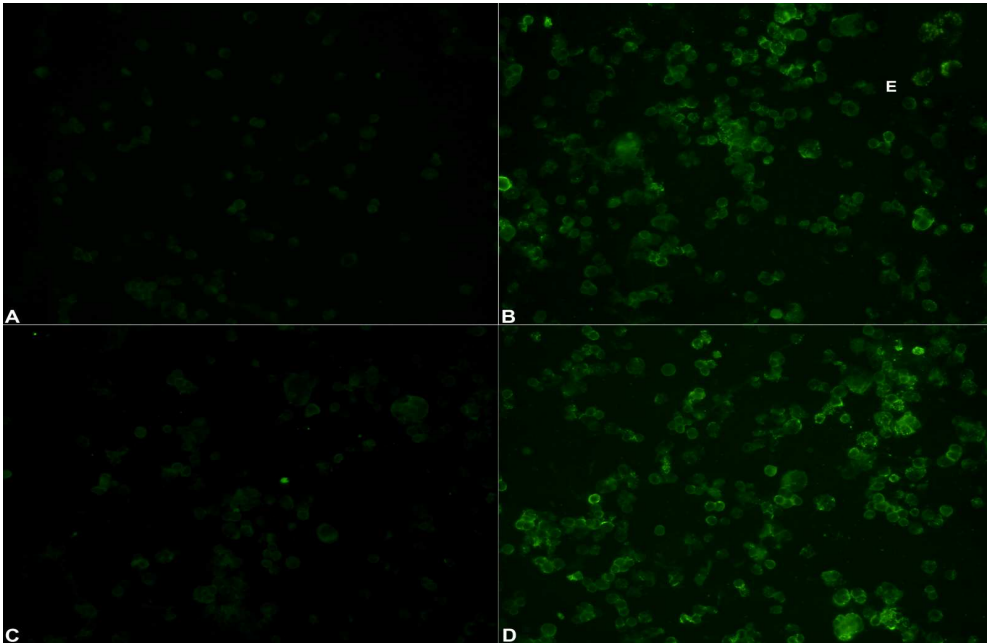
## 5. RESULTADOS

### **5.1 Ensaio de reconhecimento de glicana específica na superfície de células tumorais**

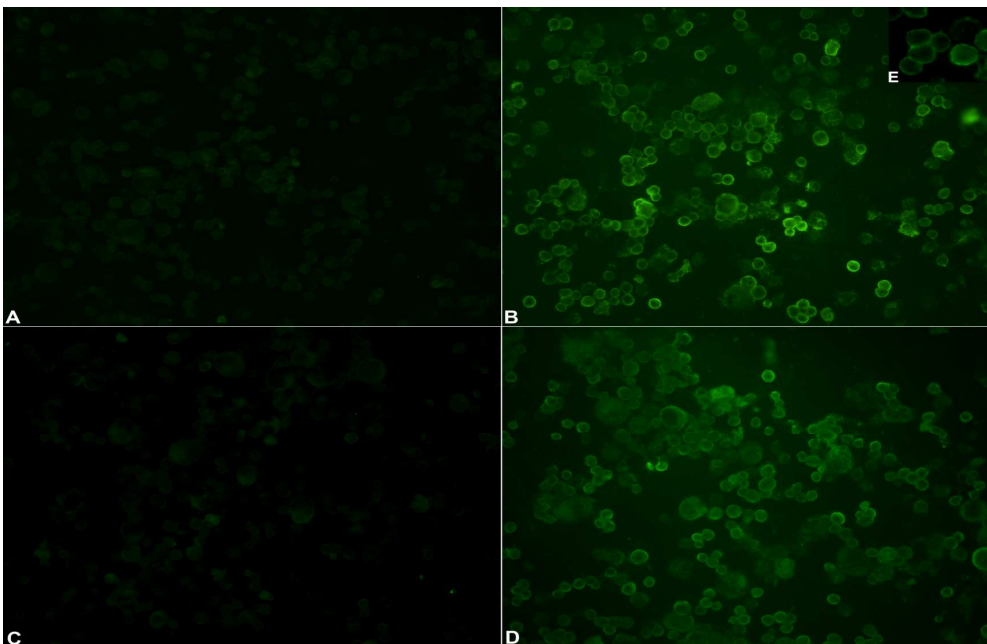
A lectina BJcuL foi biotinilada para avaliação de sua interação com carboidratos presentes na superfície celular. Os resultados revelam que tanto células do carcinoma gástrico (KATO III) como as de carcinoma de cólon (HT-29) (Figuras 3B e 4B, respectivamente) revelam intensa marcação de superfície quando incubadas com BJcuL-biotinilada. Na sua ausência (controle) não foi observada marcação (Figuras 3A e 4A, respectivamente). Os resultados revelam a especificidade da lectina BJcuL ao seu carboidrato específico, uma vez que a marcação, em ambos os tipos celulares KATO III e HT-29 (Figuras 3C e 4C, respectivamente), foi completamente abolida quando BJcuL-biotinilada é pré-incubada com D-galactose. O mesmo não ocorre quando a lectina é pré-incubada com carboidrato não específico (N-acetilgalactosamina, GlcNac), onde a interação de BJcuL-biotinilada na superfície das células tumorais KATO III e HT-29 é novamente visualizada (Figuras 3D e 4D, respectivamente), sugerindo que esta interação é dependente do domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD).

### **5.2 Ensaio de citotoxicidade direta**

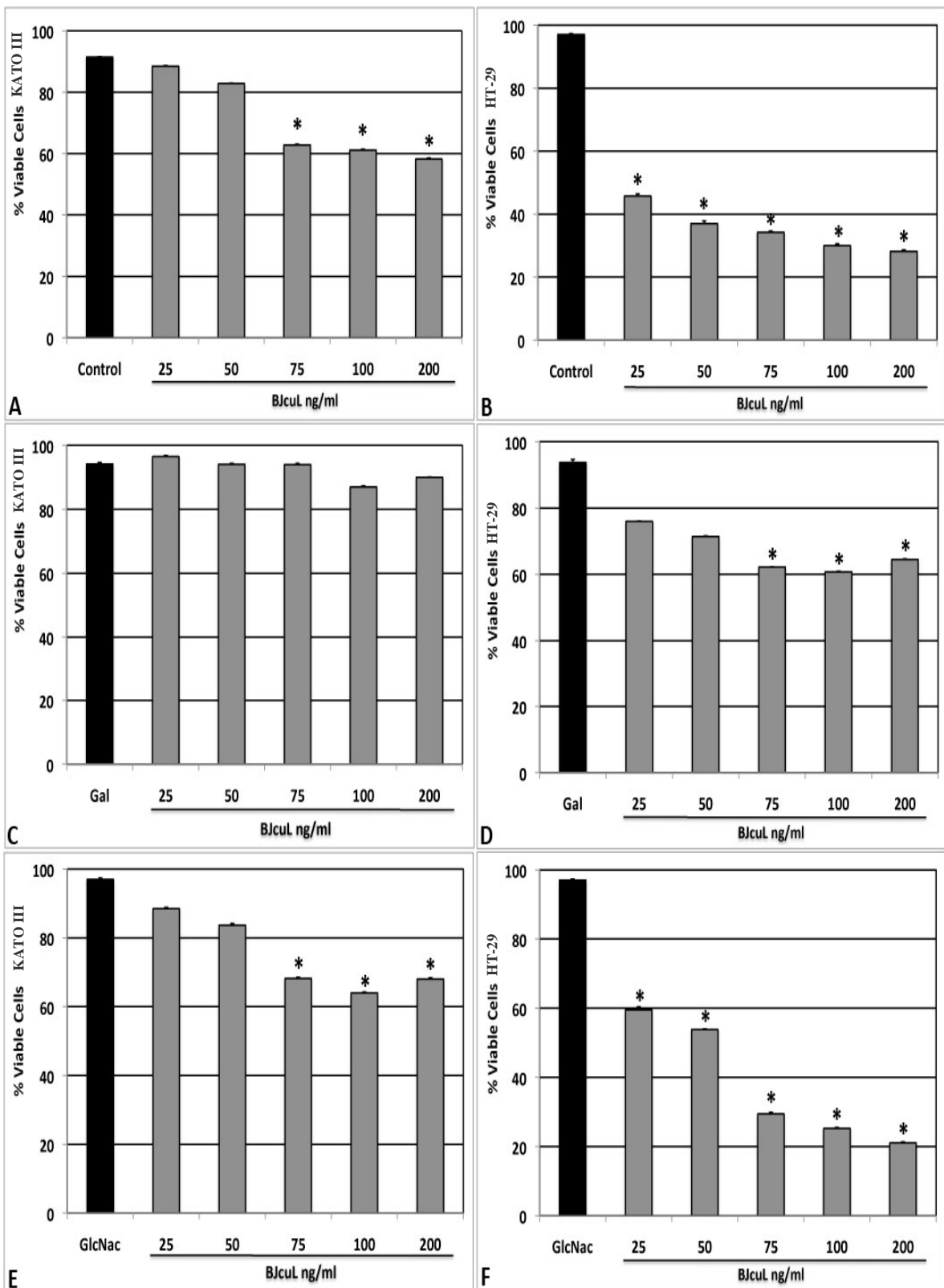
O método do MTT , utilizado para se avaliar a citotoxicidade direta da lectina frente às células tumorais, consiste na redução deste sal por mitocôndrias de células viáveis formando o produto formazan. Este, é acumulado dentro da célula e é extraído pela adição de um solvente apropriado (Mosmann, 1983). Observa-se que a incubação de ambos os tipos celulares com diferentes concentrações de BJcuL resulta na diminuição da viabilidade celular de maneira dose dependente (Figura 5). Os resultados mostram diferença na citotoxicidade sobre as duas linhagens: BJcuL é mais tóxica para a HT-29 do que para KATO III, para a qual a lectina foi tóxica somente nas maiores concentrações (75, 100 e 200ng). Para HT-29 todas as concentrações utilizadas se mostraram capazes de induzir perda de viabilidade celular. Quando BJcuL foi pré-incubada com seu carboidrato específico (Gal), a citotoxicidade não foi visualizada para KATO III (Figura 5C) e houve diminuição da porcentagem de HT-29 de aproximadamente 20% nas três maiores concentrações de BJcuL (Figura 5D), porém quando a lectina foi pré-incubada com carboidrato não específico (GlcNac), a atividade citotóxica é novamente evidenciada. Esses dados refletem o envolvimento dos domínios de reconhecimento de carboidrato (CRDs).



**Figura 3.** KATO III aderidas em lamínulas, após fixação com paraformaldeído 2%, foram incubadas com (A) PBS; (B) BJcuL-biotinilada; (C) BJcuL-biotinilada pré-incubada com 2mM D-Gal ou (D) BJcuL-biotinilada pré-incubada com 2mM GlcNac. A revelação foi obtida pela Estreptavidina-FITC e as imagens obtidas microscópio de luorescência Leica DMBL (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) com câmera Digital (Polaroid) acoplada ao microscópio. (Aumento 20x)



**Figura 4.** HT-29 aderidas em lamínulas, após fixação com paraformaldeído 2%, foram incubadas com (A) PBS; (B) BJcuL-biotinilada; (C) BJcuL-biotinilada pré-incubada com 2mM D-Gal ou (D) BJcuL-biotinilada pré-incubada com 2mM GlcNac. A revelação foi obtida pela Estreptavidina-FITC e as imagens obtidas microscópio de fluorescência Leica DMBL (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) com câmera Digital (Polaroid) acoplada ao microscópio. (Aumento 20x)

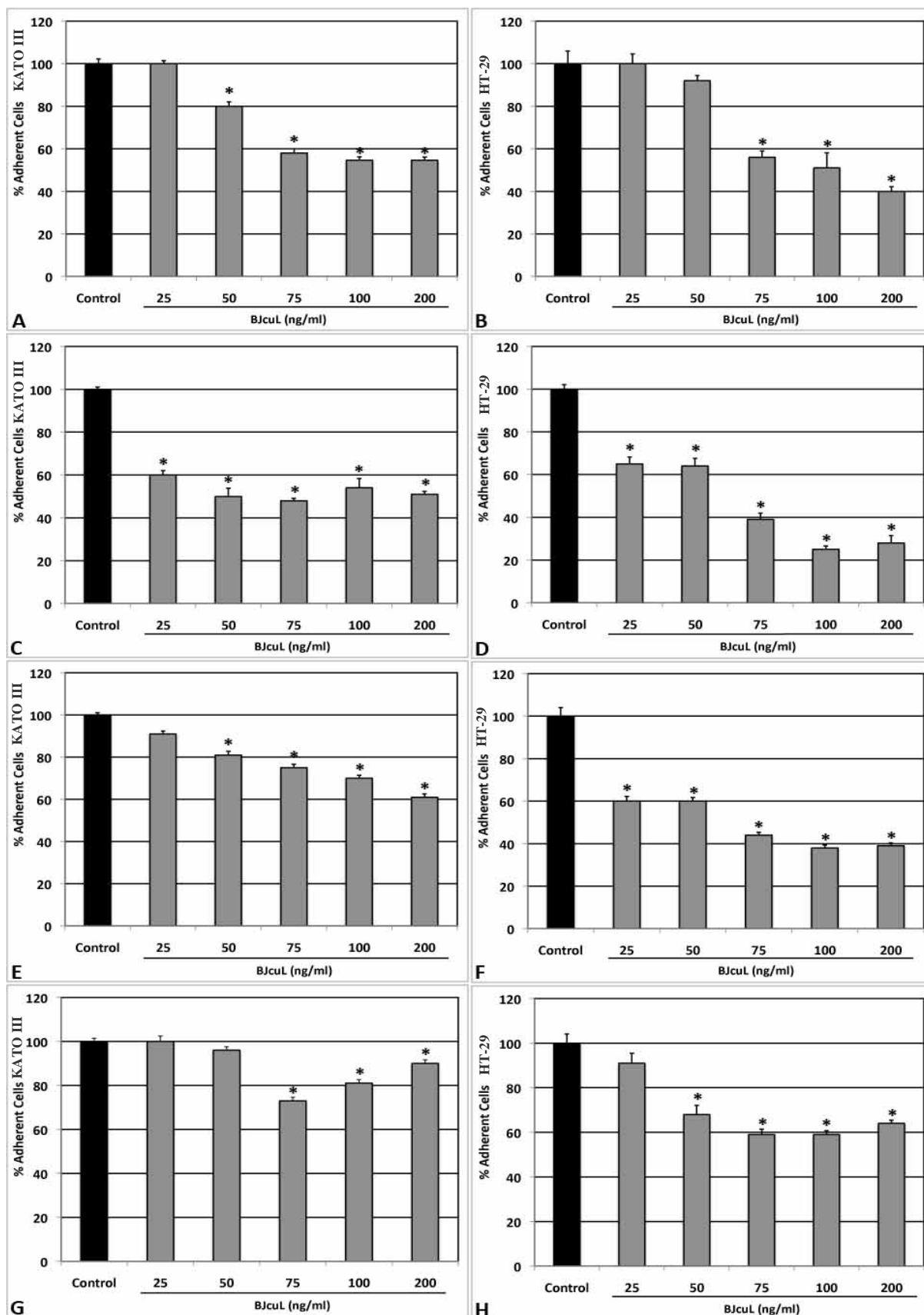


**Figura 5.** Atividade citotóxica da lectina de veneno de *Bothrops jararacussu* frente às células tumorais KATO III (coluna da esquerda) e HT-29 (coluna da direita). As células foram incubadas por 24 horas a 37°C com (A e B) BJcuL, (C e D) BJcuL pré-incubada com 2mM D-Gal ou (E e F) BJcuL pré-incubada com 2mM GlcNac. Após coloração com MTT, foi determinada a quantidade de células viáveis e não viáveis. Os dados são apresentados como média e desvio padrão de três ensaios independentes realizados em duplicata. ( $p < 0.05$ )



### **5.3 Ensaio de adesão**

A capacidade de adesão das células de linhagem tumoral foi examinada pela incubação de ambas as linhagens, KATO III e HT-29, na presença de diferentes concentrações de BJcuL em poços de placas de 96 poços recobertos com matrigel. O ensaio demonstrou que a presença de BJcuL diminuiu a adesão de ambas as linhagens quando comparadas às células controles. Ambas as linhagens obtiveram um menor perfil de adesão nas maiores quantidades de BJcuL (75, 100, 200ng), enquanto as menores concentrações foram estatisticamente iguais às células controle (Figura 6 A e B). Entretanto, quando ambas as linhagens celulares foram pré-incubadas por 1 hora com diferentes concentrações da lectina e somente após este período de incubação foram acondicionadas aos poços contendo matrigel, todas as concentrações de BJcuL avaliadas foram capazes de inibir a adesão de ambas as linhagens (Figuras 6 C e D, respectivamente). De forma semelhante, quando os poços recobertos de matrigel foram pré-incubados com as diferentes concentrações de BJcuL e após 1h adicionado as células KATO III e HT-29, resultou em intensa inibição da adesão celular para ambas as linhagens quando comparado às células controle (Figuras 6 E e F). Por outro lado, a lectina não foi capaz de induzir inibição na adesão de KATO III quando as células foram pré-incubadas por 1h nos poços recobertos com matrigel e posteriormente adicionado de BJcuL, nos poços contendo matrigel (Figura 6 G). O mesmo ocorreu com HT-29, porém as concentrações de 100ng e 75ng de BJcuL inibiram levemente a adesão desta linhagem celular (Figura 7 H), porém de forma menos acentuada ao observado no ensaio de interferência (Figura 6 D).



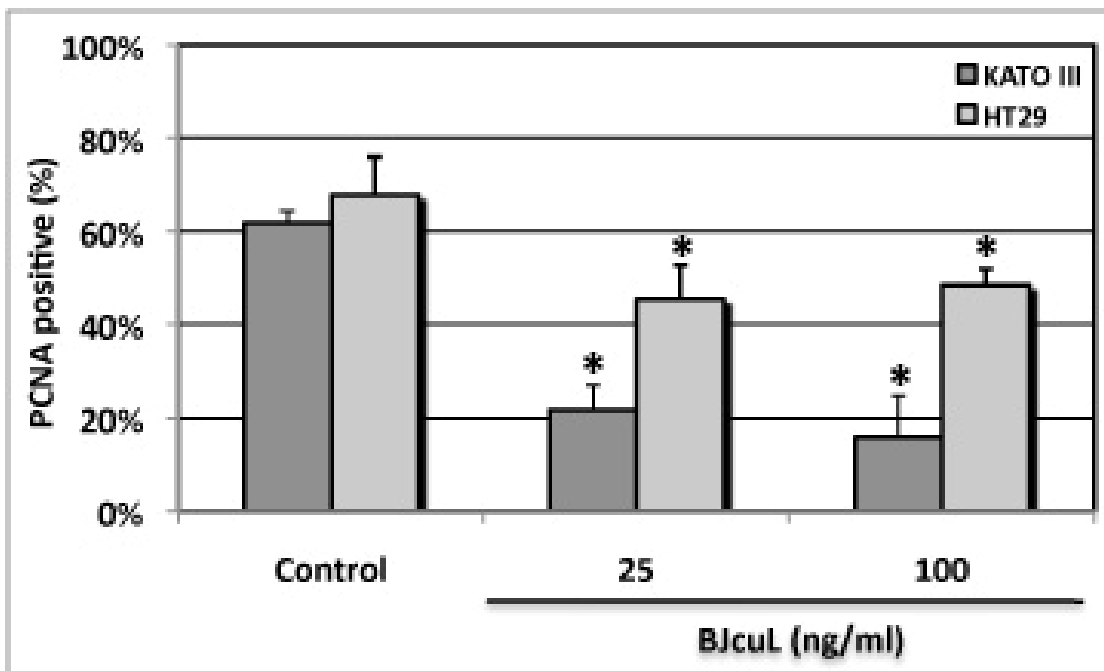
**Figura 6.** Ensaios de adesão foram realizados utilizando 4 diferentes protocolos para ambas as linhagens celulares KATO III (coluna da esquerda) e HT-29 (coluna da direita) denominados (A e B) Ensaio de Adesão, (C e D) Ensaio de Interferência, (E e F) Ensaio de Competição I e (G e H) Ensaio de Competição II, conforme descrito no item 2.6 do Desenvolvimento. Os dados são apresentados como média e desvio padrão de três ensaios independentes realizados em duplicata. ( $p < 0.05$ )

#### **5.4 Avaliação da Interferência de BJcuL na inibição da proliferação celular**

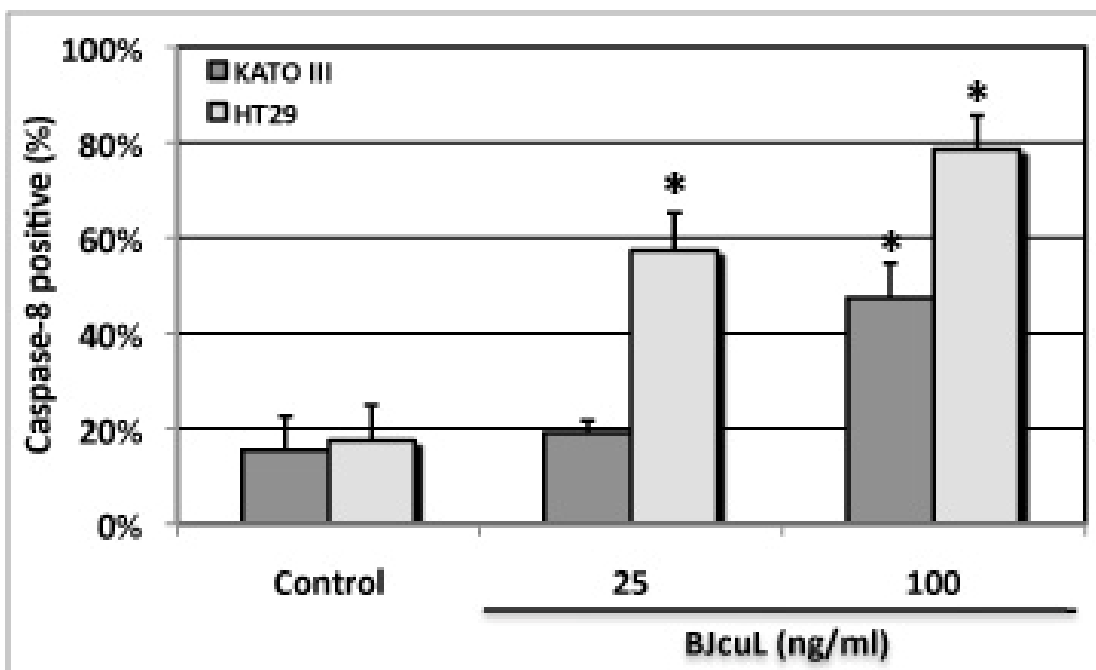
Para avaliar a capacidade de BJcuL de interferir na proliferação celular, às células de linhagem tumoral (KATO III e HT-29) foram incubadas com BJcuL (25ng e 100ng) e incubadas por 24 h. O anticorpo anti-PCNA foi então adicionado e possibilitando a seguinte análise: nas células KATO III (carcinoma gástrico) a expressão deste marcador é reduzida a pouco mais de 40% na concentração de 25ng de BJcuL e em menos de 40% na concentração de 100ng de BJcuL quando comparadas ao controle em que as células não foram incubadas com a lectina, demonstrando que a lectina diminui a proliferação de KATO III .A marcação de PCNA nas células de carcinoma de cólon (HT-29) reduziu aproximadamente 10% demonstrando estar bem próximas ao o controle em ambas as concentrações da lectina, não demonstrando ser significativa como com KATO III (Figura 7).

#### **5.5 Avaliação da expressão de caspase 8**

A avaliação da apoptose foi realizada mediante a imunomarcação com anticorpo anti-Capase 8, sendo que após a incubação das linhagens KATO III (câncer gástrico) e HT-29 (câncer colorretal) com diferentes concentrações de BJcuL (25ng e 100ng), as células foram incubadas com anti-caspase-8 revelando que HT-29 apresentou aumento da expressão desta caspase em torno de 40% após a incubação com 25ng de BJcuL e 50% com 100ng da lectina quando comparado ao grupo controle. Já a análise com KATO III, mostrou aumento da expressão de caspase 8 na maior concentração utilizada, diminuindo drasticamente na concentração mais baixa (Figura 8).



**Figura 7.** Avaliação da proliferação das linhagens de carcinoma após a incubação com BJcuL (100 e 25ng/ml), realizada com o anticorpo anti-PCNA. A visualização da imunomarcação foi feita no microscópio e contagem através do software Image Pro Plus®. Os dados são apresentados como média e desvio padrão de três ensaios independentes realizados em duplicata. ( $p < 0.05$ )



**Figura 8.** Avaliação da expressão de caspase 8 nas linhagens de carcinoma após a incubação com BJcuL (100 e 25ng/ml), realizada com o anticorpo anti-caspase-8. A visualização da imunomarcação foi feita no microscópio e contagem através do software Image Pro Plus®. Os dados são apresentados como média e desvio padrão de três ensaios independentes realizados em duplicata. ( $p < 0.05$ )

## 6. DISCUSSÃO

As lectinas são (glico)proteínas com potente atividade biológica ao interagir com carboidratos específicos na superfície celular. Por participarem de fenômenos biológicos importantes, como indução da agregação plaquetária (OZEKI *et al.*, 1994), hemaglutinação (MASTRO *et al.*, 1986), ativação da proliferação de linfócitos, participação na regulação do crescimento celular (KNIBBS *et al.*, 1994); adesão celular (BARONDES, 1984, SHARON; LIS, 1989) e da ativação da apoptose (PERILLO *et al.*, 1998), sugere-se que as lectinas possam ser multifuncionais e, por esta razão, estão sendo consideradas moléculas de grande interesse científico e farmacológico. A propriedade antitumoral das lectinas tem sido demonstrada *in vitro* e *in vivo*, sugerindo seu papel como agente terapêutico. A aglutinina de *Viscum album* (VAA-I) é uma lectina que possui propriedades citotóxicas e antitumorais e foi aplicada como um adjuvante anticancerígeno no tratamento de diversos tipos de tumores malignos (OLNES *et al.*, 1982). As lectinas BJcuL (do veneno de *Bothrops jararacussu*), CEL-I e CEL-III (do invertebrado marinho *Cucumaria echinata*), WGA (lectina da semente de trigo), Con A (Concavalina A) entre outras, são conhecidas por ligarem-se na membrana de células cancerosas ou, mais especificamente em receptores nelas presentes, causando citotoxicidade, apoptose e inibindo o crescimento tumoral (HATAKEYAMA *et al.*, 2004, DE MEJI´A; PRISECARU, 2005, LEI ;CHANG, 2009).

No presente trabalho verificou-se a ligação de BJcuL na superfície das células das linhagens KATO III (carcinoma gástrico) e HT-29 (carcinoma de cólon), indicando que estas apresentam D-Galactose na sua superfície, uma vez que a interação foi abolida pela pré-incubação com o carboidrato específico e não pela pré-incubação com GlcNac. Durante o processo de tumorigênese as células tumorais sofrem um processo denominado glicosilação aberrante, em que os carboidratos na sua superfície apresentam um padrão diferenciado em quantidade e variedade, quando comparadas com as células normais (RAZ *et al.*, 1987; HAKOMORI, 1989). No caso específico das linhagens estudadas não são conhecidas as alterações moleculares dos receptores de membrana, mas a presença de D-galactose é esperada, por ser um componente comum nas cadeias glicosiladas de glicoproteínas e glicolipídeos (Figura 1).

A ligação da lectina com os carboidratos na superfície das células tumorais é apenas um passo inicial para a citotoxicidade mediada por esta. BJcuL demonstrou

ser muito mais citotóxica para HT-29 do que para KATO III, pois todas as concentrações da lectina foram capazes de diminuir a viabilidade de HT-29 e somente as maiores concentrações foram capazes de diminuir a viabilidade de KATO III. É esperado que as diferenças na susceptibilidade das linhagens à citotoxicidade de lectinas com mesma especificidade possam ser explicadas pelos diferentes níveis de receptores glicosilados na superfície celular (KURAMOTO *et al.*, 2005). No entanto, a marcação com a lectina biotinilada foi aparentemente igual para as duas linhagens (Fig. 4) o que pode sugerir que a diferença esteja no tipo de receptor expresso e apresentado por cada tipo celular. Diferentemente de WGA, uma lectina da semente de trigo, que apresenta atividade citotóxica para nove linhagens celulares de carcinoma pancreático humano supostamente através da sua internalização (SCHWARZ *et al.*, 1999), BJcuL parece agir na superfície celular, levando à diminuição da viabilidade das células do tumor pela perda da adesão.

BJcuL foi capaz de diminuir a adesão das células das linhagens tumorais à moléculas da matrigel de maneira dose-dependente, ao contrário do que foi observada por DE CARVALHO *et al.* (2001) que demonstraram que BJcuL não inibe a adesão de células de câncer de mama metastásicas humanas (MDA-MB-435) e carcinoma ovariano humano (OVCAR-5) à proteínas de matriz extracelular, como fibronectina, laminina e colágeno tipo I. Porém, observaram que a lectina liga-se nas células e que a viabilidade destas foi suprimida, assim como observado no presente trabalho para as linhagens KATO III e HT-29.

A perda de adesão celular por BJcuL poderia ser induzida pelo bloqueio dos sítios de ligação da célula tumoral a matrigel pela lectina. Foi verificado que BJcuL também se liga à proteínas da matrigel (dados não mostrados), o que explica a diminuição da taxa de adesão no ensaio em que a lectina foi pré-incubada à matrigel e após uma hora adicionadas as células tumorais (Fig. 6 E, F). Contrariamente, pouca ou nenhuma interferência na adesão é verificada quando as células foram pré-incubada à matrigel, antes da adição da lectina ao sistema, especialmente para KATO III (Fig. 6 G, H). Observa-se que, assim como a perda de viabilidade, a diminuição da adesão também foi maior para HT-29 do que para KATO.

As mudanças na adesão célula-célula e célula matriz são centrais na conversão de uma lesão pré-maligna em carcinomas invasivos e pode contribuir para a diminuição do crescimento, uma das etapas do processo de disseminação tumoral, pois para colonizar em novos sítios as células tumorais precisam alcançar os vasos linfáticos e sanguíneos, disseminar, extravasar e invadir o parênquima de

novos órgãos. Em todos estes processos requerem os eventos que envolvem a adesão e migração celular (SARRAY, 2009). Diversas moléculas de adesão são moduladas na carcinogênese, entre elas e-caderina e integrinas. Em câncer de cólon por exemplo, integrinas envolvidas na adesão célula-matriz são altamente expressas (CHU *et al.*, 2008), o que poderia permitir às células maior disseminação. Esses receptores são importantes indicadores que sinalizam para o meio intracelular, em especial para o citoesqueleto, alterações que favorecem a adesão à outras células ou à matriz extracelular. Os venenos de serpentes contém um grupo de moléculas de baixa massa molar com ação do tipo desintegrina (SARRAY, 2009), que se ligam à diferentes integrinas impedindo sua associação com seu ligante natural. Do mesmo modo, as lectinas tipo-C de veneno também foram descritas como desintegrinas. Lelectina, uma lectina tipo C extraída do veneno de *Macrovipera lelectina*, inibiu o adesão mediada por integrina em várias linhagens tumorais a diferentes substratos e bloqueou completamente a migração celular em direção à fibronectina em ensaio de haptotaxia, impedindo também a invasão de células tumorais a géis de fibrina. Ao mesmo tempo, Lelectina inibiu a proliferação de diferentes células tumorais (SARRAY, 2009). Apesar de não terem sido identificados os glicoligantes de BJcuL na superfície de células KATO III e HT-29, pode-se esperar que integrinas sejam alvos preferenciais e ainda que, a expressão diferenciada destes receptores nessas duas linhagens possa explicar as diferenças dos efeitos descritos para BJcuL. Dydensborg e colaboradores (2009) observaram diferença na expressão de integrinas em células colônicas normais e carcinogênicas, entre elas, HT-29. Os adenocarcinomas, na ausência da subunidade  $\alpha 6B$  da integrina, apresentavam um perfil antiproliferativo. Similarmente em células de carcinoma gástrico apresentam uma maior expressão de sindecan-1, que proporciona maior adesão célula-matriz extracelular e aumento na proliferação celular (CHU *et al.*, 2008). Mostrando mais uma vez a adesão como um requisito para proliferação.

As proteínas que desempenham o maior papel nos processos de proliferação tumoral estão assumindo importância como biomarcadores na quimioprevenção. A expressão de PCNA, por exemplo, pode ser avaliada pela imunomarcagem nas células em proliferação, forte característica de fenótipos invasivos, como os cânceres de estômago, sustentada por mutações genéticas, desregulação da diferenciação celular, evasão da apoptose, além de angiogênese. Isso é revelado em

alguns tipos de cânceres gástricos, como MNNG (linhagem de câncer gástrico), em que esta proteína está superexpressa (MANIKANDAN *et al.*, 2007).

A lectina isolada de *Pholiota adiposa*, diminuiu a proliferação de maneira dose dependente em Hep, G2 (hepatoma) e MCF (carcinoma de pulmão) (ZHANG *et al.*, 2009). Similarmente a lectina isolada de sementes de *Phaseolus vulgaris cv.* também inibiu a proliferação de MCF (carcinoma de pulmão) (SHARMA *et al.*, 2009). No presente trabalho, a presença de BJcuL reduziu a expressão de PCNA em KATO III em todas as concentrações utilizadas quando comparados ao controle. A cinética celular fornece indicadores importantes sobre o comportamento do câncer. A diminuição da expressão de PCNA em KATO III indica que a proliferação exacerbada, característica de câncer gástrico, pode estar sendo reduzida pela lectina, uma vez já observada sua citotoxicidade sobre a mesma. Em HT-29 BJcuL promoveu uma diminuição menos acentuada à observada para KATO III.

A proliferação celular é essencial para a vida das células normais, no entanto quando é excessiva, ela potencializa a ação de substâncias cancerígenas alvos de DNA e pode levar a uma neoplasia. Apoptose em contrapartida, tem papel oposto em populações de células humana. A alteração do equilíbrio entre proliferação e apoptose resultam na perturbação da homeostasia tecidual, no qual associa-se o câncer (FORONES *et al.*, 2005).

A apoptose é mediada pelas caspases, entre elas, a *Caspase-8* é considerada a chave iniciadora de morte mediada pelo receptor membro da família TNF. Seguida a ativação de TNF, ela é recrutada para a sinalização de morte através do complexo de sinalização de morte (DISC) via ligação ao adaptador de proteína FADD. Seu recrutamento resulta na ativação da caspase 3 e morte celular (ELMORE, 2007). Além do seu papel na apoptose, sob condições não apoptóticas está envolvida na motilidade e adesão celular, como em alguns tipos de câncer, entre eles, câncer de pulmão e de pâncreas (HELFER, 2006, FRISCH, 2008). A expressão de caspase-8 foi avaliada nas linhagens tumorais após a incubação com a lectina, o que resultou no aumento da expressão da caspase-8 em HT-29 de maneira dose-dependente. Em contraste, o aumento da expressão de caspase-8 em KATO III não foi tão expressiva quanto à observada para HT-29, o que demonstra que as vias de inibição de proliferação anteriormente descritos para BJcuL (MANIKANDAN *et al.*, 2007) sugere mecanismos diferentes nas linhagens estudadas.



*Polygonatum odoratum* (POL), uma lectina de origem vegetal, apresenta potencial antiproliferativo sobre células de linhagem de fibrosarcoma murino (L929) e assim como BJcuL, POL demonstra induzir a apoptose através da ativação de caspase de modo tempo-dependente (LIU, *et al.*, 2009). AMML, uma lectina extraída de raízes de *Astragalus mongholicus* teve efeito antiproliferativo contra as linhagens celulares HeLa (carcinoma cervical humano) e K562 (célula de leucemia humana). A incubação da lectina AMML com as células da linhagem HeLa ocasionou interrupção do ciclo celular, impedindo-as de entrar na fase S e indução da apoptose avaliada pela marcação de anexina V por citometria de fluxo (YAN *et al.*, 2009).

Em suma, lectinas já têm sido mostradas como potenciais ferramentas no combate ao câncer. Nesse sentido, os diversos estudos que visam avaliar o efeito antitumoral das lectinas são conduzidos com o mesmo perfil: primeiramente avalia-se a citotoxicidade de determinada lectina para então seguir na determinação da via em que esta possa estar envolvida para induzir a citotoxicidade (HATAKEYAMA *et al.*, 2004; DE MEJI´A; PRISECARU, 2005; LIU *et al.*, 2009).

Além da confirmação da presença de glicanas específicas para a ligação com BJcuL, na superfície das células tumorais este estudo abre uma ampla possibilidade de estudo sobre as vias de atuação de BJcuL na citotoxicidade, adesão, proliferação e apoptose. A adesão celular é um processo muito importante, pois sua perda pode levar a morte celular. Poucos estudos avaliaram a perda da adesão celular induzida pelas lectinas em células tumorais, e, nenhum estudo até o momento, avaliou tal propriedade de BJcuL. Com o mesmo perfil inovador, os ensaios de incubação de BJcuL com KATO III e HT-29 demonstram que os mecanismos envolvidos na diminuição de viabilidade dessas linhagens sigam caminhos diferentes: para KATO III, BJcuL inibiu sua proliferação e enquanto HT-29 aumenta a expressão de caspase-8.

As lectinas por sua especificidade e envolvimento em diferentes mecanismos podem gerar futuramente, o desenvolvimento de uma melhor abordagem terapêutica tanto para fins de diagnóstico como para um tratamento específico contra o câncer.

## 7. CONCLUSÃO

- ✓ BJcuL é capaz de ligar-se na superfície das células de linhagem de carcinoma gástrico (KATO III) e de carcinoma de cólon (HT-29) de maneira dependente do reconhecimento de carboidrato.
- ✓ BJcuL é citotóxica para ambas as linhagens. Esta citotoxicidade é dose-dependente e para HT-29 a atividade da lectina é mais intensa do que para KATO III.
- ✓ BJcuL é capaz de impedir a adesão de KATO III e HT-29 à matrigel e compete com as moléculas da matrigel pelos sítios de ligação na superfície da célula tumoral.
- ✓ A lectina BJcuL induz a perda de viabilidade para as linhagens e sugerimos vias diferentes para esta atividade:
  - Para KATO III diminui a proliferação celular;
  - Para HT-29 induz a ativação de caspase-8, ativador da apoptose.

## 8. REFERÊNCIAS

ANAND, P. *et al.* Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. **Pharm Res.** v. 25, n. 9, p. 2097-2016, 2008.

ANGATA, T, LINDEN, V.D.B. I-type lectins. **Biochim Biophys Acta.** v. 1572, n. 2-3, p. 294-316, 2002.

ATSUMI *et al.* Toll-like receptor (TLR) 2 induced through TLR4 signaling initiated by *Helicobacter pylori* cooperatively amplifies iNOS induction in gastric epithelial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 293, n. 5, p. 1004-12, 2007.

BARBOSA, A.M., *et al.* Effect of low-level laser therapy in the myonecrosis induced by Bothrops jararacussu snake venom. **Photomed Laser Surgery.** v. 27, n. 4, p. 501-7, 2009.

BARONDES, S.H. Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. **Science.** v. 223, n. 4642, p. 1259-64, 1984.

BHATTACHARYA A, TÓTH K, SEN A, SESHADRI M. Inhibition of colon cancer growth by methylselenocysteine-induced angiogenic chemomodulation is influenced by histologic characteristics of the tumor. **Clin Colorectal Cancer.** v. 8, n. 3, p. 155-62, 2009.

BELIZÁRIO, J.A. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. **Braz J Med Biol Res.** V. 40, n. 8, p. 1011-1024, 2007.

BERGONZINI, V., *et al.* View and review on viral oncology research. **Infect Agent Cancer.** v. 5, n. 11, 2010.

BOLETI, A. P.A., *et al.* Pouterin, a novel potential cytotoxic lectin-like protein with apoptosis-inducing activity in tumorigenic mammalian cells. **Toxicon.** v. 51, p. 1321–30, 2008.

BHUTIA, SK, *et al.* Abrus abrin derived peptides induce apoptosis by targeting mitochondria in HeLa cells. **Cell Biol Int.** v. 33, n. 7, p. 720-7, 2009.

BROCKHAUSEN, I. Glycodynamics of mucin biosynthesis in gastrointestinal tumor cells. **Adv Exp Med Biol.** v. 535, p.163-88, 2003.

BRUMATTI, G., *et al.* Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals. **Cell Mol Life Sci.** v. 67, n. 10, p. 1619-30, 2010.

BUTTERS, T.D. Control in the N-linked glycoprotein biosynthesis pathway. **Chem Biol.** v. 9, n.12, p.1266-8, 2002.

CASTILHO-VILLANUEVA A. Plant lectins and their effects on cancer. **Rev. Invest Clín.** v. 57, n. 1, p. 55-64, 2005.

COOK, K.M.; FIGG, W. Angiogenesis Inhibitors: Current Strategies and Future Prospects. **Cancer J Clin.** v. 16, n. 6, 2010.

CHU, Y.Q., *et al.* Relationship between cell adhesion molecules expression and the biological behavior of gastric carcinoma. **World J Gastroenterol.** v. 14, n. 13, p. 1990-96, 2008.

CHOWDHURY I; THARAKAN B; BHAT G.K. Caspases — An update. **Comp Biochem Physiol.** v. 151, p. 10–27, 2008.

DE CARVALHO, D.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J.C.. Purification and characterization of a new lectin from the venom of snake *Bothrops jararacussu*. **Biochem Biol Mol Inter.** v. 44, p. 933-938, 1998.

DE CARVALHO, D.; SHIMTMEIER, S.; NOVELO, J.C.; MARKLAND, F.S.. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon.** v. 39, p.1471-1476, 2001.

DE CARVALHO, D.; MARANGONI S.; NOVELO, J.C. Primary Structure Characterization of *Bothrops jararacussu* Snake Venom Lectin. **J. Protein Chem.** v. 21, n.1, 2002.

DE MEJI'A & PRISECARU. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. **Crit Rev Food Sci Nutr.** v. 45, n. 6, p. 425-45, 2005.

DENNIS J.W.; GRANOVSKY, M.; WARREN, C.E. Protein glycosylation in development and disease. **Bioessays.** v. May;21, n.5, p. 412-21, 1999.

DOMAGOJ, V.; FAIRBROTHER J. The Inhibitor of Apoptosis Proteins as Therapeutic Targets in Câncer. **Clin Cancer.** v. 13 n. 20, 2007.

DONG, B.; ZHU, Y. Molecular targeted therapy for câncer. **Chinese J Câncer Res.** v. 340, n.9, p. 340-45, 2010.

DRICKAMER, TAYLOR, M.E.; WEIS, W.I. The C-type lectin superfamily in the immune system. **Immunol Rev.** v. 163, p. 19-34, 1998.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **J Biol Chem.** v. 263, n.20, p.9557-60, 1988.

DUBOIS, M.K., *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chem.** v. 28, n. 3, p. 350-57, 1956.

DYDENSBOR, *et al.* Integrin alpha6Bbeta4 inhibits colon cancer cell proliferation and c-Myc activity. **BMC Cancer.** v. 223, n. 9, 2009.

ELÍFIO-ESPOSITO S. L., *et al.* A c-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom can adhere to extracellular matrix proteins and induce the rolling of leucocytes. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** v. 13, n. 14, p.782-799, 2007.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol Pathol.** v. 35(4), p.495–516, 2007.

ESPOSITO J.P. *et al.* Immunohistochemical expression of markers pcna, ki67 and p53 in Squamous cell carcinomas of upper aerodigestive tract. **Rev Col Bras Cir.** v. 27 , n. 5, p. 327, 2000.

FRISCH, S. Caspase-8: Fly or Die. **Cancer Res.** v. 68, n. 12, p. 4491-3, 2008.

FORONES, M.N, *et al.* Cell proliferation and apoptosis in gastric cancer and intestinal metaplasia. **Arq Gastroenterol.** v. 42 , n. 1, 2005.

FUSTER M.M.; ESKO J.D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. **Nat Rev Cancer.** v. 5, n. 7, p. 526-42, 2005.

FULDA, S., *et al.* Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. **Int J of Cell Biol.** v. 24, n. 8, 23p, 2009.

GABIUS, J.H. Glycans: bioactive signals decoded by lectins. **Biochem Soc t.** v. 36, n 6, p. 1491-1496, 2008.

GAVHAMI, S., *et al.* Apoptosis and cancer: mutations within caspases genes. **J Med Genet.** v. 46, p. 497–510, 2009.

GLOIRE G; CHARLIER E; PIETTE J. Regulation of CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis by protein phosphatases. **Biochem Pharmacol.** v. 76, p. 1451-1458, 2008.

GHOSH, D.; MAITI, T.K. Effects of native and heat-denatured Abrus agglutinin on tumor-associated macrophages in Dalton's lymphoma mice. **Immunobiology.** v. 212, n. 8, p. 667-73, 2007.

GOYOS, A.; ROBERT, J. Tumorigenesis and anti-tumor immune responses in *Xenopus*. **Front Biosc.** v. 14, p.167-176, 2009.

GRIFFIT, T.S., *et al.* TRAIL gene therapy: From preclinical development to clinical application. **Curr Gene Ther.** v. 9, n. 1, p. 9–19, 2009.

GUPTA, G.P.; MASSAGUÉ, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. **Cell**. v.127, n.11, 2006

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**. v. 33, n. 11, p. 1405-24, 1995.

GRUNDY, A.M; ZHANG, T.; SENTMAN, C.L. NK cells rapidly remove B16F10 tumor cells in a perforin and interferon-gamma independent manner in vivo. **Cancer Immunol Immun**. v.56, p. 1153–61, 2007.

HAKOMORI S. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. **Adv Cancer Res**. v. 52, p. 257-331, 1989.

HAMMERSCHMIDT, S.; WIRTZ, H. Lung Cancer: Current Diagnosis and Treatment. **Dtsch Arztebl Int**. v. 106, n.49, p. 809-18, 2009.

HANAHAHAN D.; WEINBERG R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**. v. 7, n. 100(1), p. 57-70, 2000.

HART, D.A. Lectins in biological systems: applications to microbiology. **Am J Clin Nut**. v. 33, p. 2416-2425, 1980.

HATAKEYAMA T, *et al*. Characteristic recognition of N-acetylgalactosamine by an invertebrate C-type Lectin, CEL-I, revealed by X-ray crystallographic analysis. **Biol Chem**. v. 279, n. 43, p. 45219-25, 2004.

HAVT, A., *et al*. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **Int J Biochem and Cell Biol**. v. 37, n. 1, p. 130-41, 2005.

HELPER, *et al*. Caspase-8 promotes cell motility and calpain activity under nonapoptotic conditions. **Cancer Res**. v. 66, n. 8, p. 4273-8, 2006.

HETCH, S.S. Progress and Challenges in Selected Areas of Tobacco Carcinogenesis. **Chem Res Toxicol**. v. 21, n. 1, p160-71, 2008.

HIRABAYASHI, J.; KUSONOKI, T.; AND KASAI, K-I. Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*. Homologies with Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent-type lectins. **Biol Chem.** v. 266, p. 2320-26, 1991.

KASSAI, K.; HIRABAYASHI, J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. **J Biochem.** v. 119, n. 1, p. 1-8, 1996.

KASSAB, B.H. *et al.* Cloning, expression, and structural analysis of recombinant BJcuL, a c-type lectin from the *Bothrops jararacussu* snake venom. **Protein Expr Purif.** v. 35, n. 2, p.344-52, 2001.

KILPATRICK, David C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochim Biophys Acta.** v. 1572, p. 187– 197, 2002.

KNIBBS, R.N, *et al.* Differential expression of cell surface sialoglycoconjugates on wild-type and cultured Ehrlich tumor cells as revealed by quantitative lectin-gold ultrastructural cytochemistry. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 91, n. 24, p. 11353-7, 1994.

KOMORI, Y.; NIKAI, T.; AND SUGIHARA, H. Amino acid sequence and biological properties of the lectin from the venom of *Trimeresurus okinavensis* (Himehabu). **Toxicon.** v. 37, p. 1053-64, 2000.

KURAMOTO, T,m *et al.* Cytotoxicity of a GalNAc-Specific C-Type Lectin CEL-I toward Various Cell Lines. **J. Biochem.** v. 137, p. 41–50, 2005.

LEI, H.Y; CHANG, C.P. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. **J Biomed Sci.** v. 16, n. 10, 2009.

LI H; D'ANJOU M. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. **Curr Opin Biotechnol.** v. 20, n. 6, 678-84, 2009.



LOEFLER, M.; KREMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Exp Cellular Res.** v. 256, p. 19-26, 2000.

LIS H; SHARON N. Lectins as molecules and as tools. **Annu Rev Biochem.** v. 55, p. 35-67, 1998.

LIS H; SHARON N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. **Eur J Biochem.** v. 218, n. 1, p. 1-27, 1993.

LIU, B., *et al.* Induction of apoptosis by *Polygonatum odoratum* lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells. **Biochim Biophys Acta.** v. 1790, n. 8, p. 840-4, 2009.

LOMONTE, B.; CARMONA, E. Individual Expression Patterns of Myotoxin Isoforms in the Venom of the Snake *Bothrops asper*. **Comp Biochem Physiol. B.** v.102, p. 325-29, 1992.

LOMONTE, B. *et al.* Neutralizing interaction between heparin and myotoxin II, a Lys49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytotoxic region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J. Biol Chem.**, v. 269, p. 29867-73, 1994.

MAGNUSSON, C.; VAUX, D.L. Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death. **Immunol Cell Biol.** v. 77, n. 1, p. 41-6, 1999.

MANUELE, M.G; FERRARO, G; BARREIRO A.M.L.; LÓPEZ, P., Cremaschi G, Anesini C. Comparative immunomodulatory effect of scopoletin on tumoral and normal lymphocytes. **Life Sci.** v. 79, n. 21, p. 2043-8, 2006.

MASTRO, A.M.; HURLEY, D.J.; WINNING, R.K.; FILIPOWSKI, R.; OGILVIE, M.L.; GARTNER, T.K. Mitogenic Activity of snake venom lectins. **Cell Tissue Kinet.** v. 5, p. 557-66, 1986.

MANIKANDAN, P., *et al.* Proliferation, angiogenesis and apoptosis-associated proteins are molecular targets for chemoprevention of MNNG-induced gastric carcinogenesis by ethanolic *Ocimum sanctum* leaf extract. **Singapore Med J.** v. 48, n. 7, p. 645-51, 2007.

MOREIRA, R.A.; AINOZ, I.L.; DE OLIVEIRA, J.T.; CAVADA, B.S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 86, n.2, p. 211-8, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** v. 65, n 1-2, p. 55-63, 1983.

NIKAI, T.; SUZUKI, J.; KOMORI, Y.; OHKURA, M.; OHIZUMI, Y.; SUGIHARA, H. Amino acid sequence and biological properties of the lectin from the venom of *Trimeresurus okinavensis* (Himehabu). **Toxicon.** v. 38, p. 707-11, 2000.

OLGIVIE, M.L.; GARTNER, T.K. Identification of lectins in snake venoms. **J. Herpetol.** v. 18, p. 285-90, 1984.

OLGIVIE, M.L.; DOCKTER, M.E.; GARTNER, T.K. Isolation and characterization of lactose-binding from the venoms of the snakes *Lachesis muta* and *Dendroaspis jamesonii*. **Biochem J.** v. 100, p.1425-31, 1986.

OLNES, S. *et al.* Action of viscum, a toxic lectin from mistletoe, on cells in culture. **J Biol Chem.** v. 257, n. 22, p. 13271-7, 1982.

ONO, M; HAKOMORI, S. Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness. **Glycoconj J.** v. 20, n. 1, p. 71-8, 2004.

OZEKI, Y., *et al.* C-type galactoside-binding lectin from Bothrops jararaca venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. **Arch biochem and biophys.** v. 308, n. 1, p. 306-10, 1994.

PANUNTO, P.C. *et al.* Biological activities of a lectin from Bothrops jararacussu snake venom. **Toxicon**. v.47, n. 1, p. 21-31, 2006.

PAPALIAGKAS, V. *et al.* The proteins and the mechanisms of apoptosis: A mini-review of the fundamentals. **Hippokratia**. v. 11, n. 3, p.108-13, 2007.

PEREIRA-BITTENCOURT M.; DE CARVALHO, D.D.; GAGLIARDI, A.R.; COLLINS, D.C. The effect of a lectin from the venom of the snake, Bothrops jararacussu, on tumor cell proliferation. **Anticancer Res**. v 19, n. 5B, p. 4023-5, 1999.

PERILLO, N.L.; MARCUS, M.E.; BAUM, L.G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation and cell death. **J Mol Med - JMM**. v. 76, n. 6, p. 402-12, 1998.

POWELL, L.D.; VARKI, A..I-type lectins. **J Biol Chem**. v. 270, n. 24, p. 142443-6, 1995.

RAEDLER, A.; SCHREIBER, S. Analysis of differentiation and transformation of cells by lectins. **Crit Rev Clin Lab Sci**. v. 26, n.2, p. 153-93, 1988.

RAZ A.; AVIVI A.; PAZERINI, G.; CARMI, P. Cloning and expression of cDNA for two endogenous UV-2237 fibrosarcoma lectin genes. **Exp Cell Res**. v. 173, n. 1, p.109-16, 1987.

ROHWER, N., *et al.* HIF-1 $\alpha$  determines the metastatic potential of gastric cancer cells. **Br J Cancer**. v. 100, n. 5, p. 772-781, 2009.

SAMALI, A. *et al.* Cell Stress and Cell Death. **Int J Cell Biol**. v. January ,27, 2010.

SARRAY, S. *et al.* Lelectin increases N-cadherin-mediated adhesion through PI3K/AKT pathway. **Cancer Lett**. v. 285, n. 2, p. 174-81, 2009.

SASI N. *et al.* Regulated cell death pathways: new twists in modulation of BCL2 family function. **Mol Cancer Ther**. v. 8, n 6, p. 1421-9, 2009.

SCHWARZ R.E., *et al.*. Wheatgerm agglutinin-mediated toxicity in pancreatic cancer cells. **Brit J Câncer**. v. 80, n.11, p. 1754–62, 1999.

SHARMA, A; NG, T.; WONG, J.H., LIN, P. Purification and characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. (*Anasazi beans*). **J Biomed Biotechnol**. v. 939, 2009.

SHARON N.; LIS H. Lectins as molecules and as tools. **Annu Rev Biochem**. v. 55, n. 35, p. 67, 1986.

SHARON, N; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**. v. 246, n. 49, p. 227-34, 1989.

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

SONG, I.S., *et al.* Human ZNF312b promotes the progression of gastric cancer by transcriptional activation of the K-ras gene. **Cancer Res**. v. 69, n. 7, p. 3131-9, 2009.

SUEN D.F; NORRIS K.L; YOULE R.J. Mitochondrial dynamics and apoptosis. **Gene Dev**. v. 22, p.1577–1590, 2008.

TAIT J.F. Imaging of Apoptosis. **J Nuc Med**. v. 49, n.10, 1573-6, 2008.

TOLEDO K.A. *et al.* Neutrophil activation induced by ArtinM: release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. **Immunology Lett**. v. 123, n. 1, p. 14-20, 2009.

VUCIC, D.; FAIRBROTHER W. The Inhibitor of Apoptosis Proteins as Therapeutic Targets in Cancer. **Clin Cancer Res** . v.13 (20), October ,15, 2007.

WANG, H.; NG, T.B.; OOI, V.E.; LIU W.K. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. **Int J Biochem Cell Biol**. v. 32, n. 3, p.365-72, 2000.

WEIS, W.I. *et al.* Physical characterization and crystallization of the carbohydrate-recognition domain of a mannose-binding protein from rat. **J Biol Chem.** v. 266, n. 31, p. 20678-86, 1991.

WEIS W.I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annu Rev Biochem.** v. 65, p. 441-73, 1996.

WHESTHOFF, M.A., FULDA, S. Adhesion-mediated apoptosis resistance in câncer. **Drug Resist Update.** v. 4, n. 5, p.127-36, 2009.

WILD, C. Environmental exposure measurement in cancer epidemiology. **Mutagenesis.** v. 24, n. 2, p.117–25, 2009.

YAN, Q., *et al.* Antiproliferation and apoptosis of human tumor cell lines by a lectin (AMML) of *Astragalus mongholicus*. **Phytomed.** v. 16 , p. 586–593, 2009.

YANG, Z.; WU, A.M; LISOWSKA, E.; DUK, M..Lectins as tools in glycoconjugate research. **Glycoconjugate J.** v. 26, n. 8, p. 899-913, 2009.

YAREMA, K.J; BERTOZZI, C.R. Characterizing glycosylation pathways. **Genome Biol.** v. 2, n. 5, 2001.

ZHA, H-G.; LEE, W.-H.; ZHANG, Y. Cloning of cDNAs encoding C-type lectins from Elapidae snakes *Bungarus fasciatus* and *Bungarus multicinctus*. **Toxicon.** v. 9, p. 1887-1892, 2001.

ZHANG, *et al.*, A novel lectin with antiproliferative activity from the medicinal mushroom *Pholiota adipose*. **Acta Biochim Pol.** v. 56, n. 3, p. 415–421, 2009.

ZHI, K.; SHEN, X.;ZHANG, H.;BI, J. Cancer-associated fibroblasts are positively correlated with metastatic potential of human gastric cancers. **J Exp Clin Cancer Res.** v. 29, n. 1, p. 66 , 2010.

Disponíveis *on-line*:

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **KATO III**: Product Description. ATCC. USA. Disponível em:

<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-103&Template=cellBiology> Acesso em 10 de jun. 2010.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **HT-29**: Product Description. ATCC. USA. Disponível em:

<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-38&Template=cellBiology#aProp99223> Acesso em 10 de jun. 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer**: estatísticas do câncer. INCA report 2007. Brasil. Disponível em:

[http://www.inca.gov.br/regpop/2003/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=11](http://www.inca.gov.br/regpop/2003/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=11)  
Acesso em 20 de jan. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Câncer**: Global burden of cancer , causes of cancer: WHO report 2005. Geneva: World Health Organization, 2005. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> Acesso em 12 de abr. 2010.