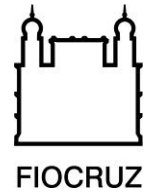




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE DA MARCAÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM C6 DE GLIOMA COM
AS LECTINAS VEGETAIS CpL, WGA e Con A**

ALANA ALVES FARIAS

**Salvador – Bahia
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ANÁLISE DA MARCAÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM C6 DE GLIOMA COM
AS LECTINAS VEGETAIS CpL, WGA e Con A**

ALANA ALVES FARIAS

Orientador: Dr. Ramon dos Santos El-Bachá

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Patologia, para obtenção do grau
de Mestre.

**Salvador – Bahia
2015**

Dedico este trabalho a minha família por acreditar nos meus sonhos e pelo apoio durante toda a jornada para a realização dos meus projetos. Aos meus pais principalmente pelos ensinamentos morais e éticos que moldaram meu caráter e pelo esforço em me oferecer a melhor educação possível. A meu pai por alimentar minhas ideias e metas mesmo que parecessem dificilmente inalcançáveis. A minha mãe por me lembrar de manter os pés no chão e seguir em frente mesmo que adiante houvesse pedras no caminho e, finalmente a meu irmão que sempre ergueu sua mão em minha direção quando eu precisava de apoio para pular sobre tais pedras.

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente aos meus pais por me guiar com amor a caminho da independência biológica, por orientar e aceitar minhas decisões por mais difíceis que fossem para eles.

Ao meu orientador prof. Dr. Ramon dos Santos El-Bachá pelo seu comprometimento como educador e pesquisador moldado na ética e no culto a reflexão. Exemplo a ser seguido não só como grande profissional, mas também como humanista.

Às profas. Dra. Sílvia Costa, Dra. Maria de Fátima Dias, Dra. Giselle de Faria e Dra. Elisabete Freire pela partilha dos seus conhecimentos e pelo tão afetuoso acolhimento.

Ao prof. Dr. Evandro José Lima Rego que tive a honra de tê-lo como orientador ministrando meus primeiros passos na pesquisa e pelo zelo sempre presente como conselheiro. Um arquétipo de educador digno dos livros de Paulo Freire e Jean Piaget.

A Alessandra Bispo pelo apoio e acolhimento sempre com delicadeza e generosidade. Características que se escondem no seu lado maternal e nos seus cachinhos dourados.

A todos os membros do laboratório pelo amparo tão prontamente ao grupo. E em especial à Socorro Grangeiro, Paulo Lucas, Cleonice dos Santos, Lívia Bacelar, Érica Patrícia e Cleide Souza pelos esclarecimentos técnicos.

A Rute Lima pela assistência sempre com presteza e generosidade, certamente um exemplo no qual me espelho.

A Geraldo Pedral pela dedicação e contribuição nas análises de citometria de fluxo.

Aos funcionários do CPqGM/FIOCRUZ e do LabNq/ICS pelo profissionalismo e competência indispensáveis para o bom funcionamento das respectivas instituições, em especial aos membros da biblioteca.

Aos meus amigos, especialmente a Elen, Débora, Nancy, Pietro, Pedro, Gabriel e Rosana pela força e apoio ao longo desta jornada.

A Deus, por me guiar ao lado da paz e permitir que eu percebesse a felicidade ao longo de todo o caminho e, assim O encontrasse em cada nova descoberta.

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

Albert Einstein

FARIAS, Alana Alves. Análise da marcação de células da linhagem C6 de glioma com as lectinas vegetais CPL, WGA e Con A. 70 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

Introdução e objetivos: O glioblastoma multiforme é um glioma de alto grau que apresenta um prognóstico ruim. O diagnóstico definitivo é estabelecido pela avaliação histológica, porém este pode apresentar conflitos na classificação, com isso surge à necessidade de ferramentas que auxiliem o patologista em sua análise. Atualmente, maior ênfase tem sido dada a alterações na glicosilação, pois estão associadas a neoplasias, e a descoberta da capacidade de lectinas em reconhecer tais alterações fez destas, ferramentas aplicáveis para o diagnóstico biomédico. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é analisar a marcação das lectinas CpL, WGA e Con A em células da linhagem C6 e astrócitos. **Métodos:** As células foram cultivadas em condições estéreis, a 37°C em atmosfera com 5 % de CO₂ até atingirem confluência. Em seguida, foram lavadas com PBS e marcadas com as lectinas CpL, WGA e Con A numa concentração de 1 mg/ml, o controle negativo foi obtido com adição do carboidrato inibidor das lectinas (D-galactose, β-N-acetilglucosamina e glicose), respectivamente, numa concentração de 0,1 M. A incubação se deu por uma hora com proteção da luz, a análise foi realizada em microscópio de fluorescência. Para a quantificação em citometria de fluxo, as células foram marcadas obedecendo ao mesmo protocolo anterior, com exceção do tempo de incubação que se deu por 15 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas, centrifugadas, transferidas para tubos e ressuspensas em PBS para a realização da leitura em citômetro. **Resultados:** A lectina CpL apresentou melhor marcação para os astrócitos, porém, ainda assim, mostra baixo desempenho comparado com as demais lectinas. Já a lectina WGA apresentou marcação eficiente tanto para astrócitos quanto para as células C6, esta última apresentou o dobro de emissão. Desta forma, é possível inferir que as lectinas CpL e WGA não são capazes de reconhecer diferenças importantes no perfil de glicoconjugados nas membranas das células C6 e dos astrócitos. Entretanto, a lectina Con A revelou marcação eficiente em relação às células C6 capaz de definir a forma celular, mostrando que há uma distribuição quase uniforme destes carboidratos ao longo da superfície da membrana, e ainda exibiu mediana de fluorescência cerca de 99 vezes superior em relação aos astrócitos. Assim, a Con A mostrou ser um marcador capaz de diferenciar as células da linhagem de glioma murino das células de cultura primária. **Conclusão:** Com base nestes resultados podemos inferir que a lectina Con A pode auxiliar numa identificação mais eficiente com possibilidade de um diagnóstico mais seguro.

Palavras-chave: Glioblastoma, Diagnóstico, Lectinas, CpL, WGA, Con A.

FARIAS, Alana Alves. C6 glioma cells labelling with plant lectins CpL, WGA and Con A. 70 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Introduction and objectives: Glioblastoma multiforme is a high-grade glioma that has a poor prognosis. The definitive diagnosis is established by histological assessment. However, this can present conflicts in grading gliomas, which justifies new tools to assist the pathologist in his analysis. Currently, it is known that there are changes in glycosylation pattern of molecules associated with cancer, and the discovery of the ability of lectins to recognize these changes made these tools applicable for biomedical diagnosis. Thus, the aim of this study is to analyze the labelling of C6 and astrocyte lineage cells with fluorescent lectins CpL, WGA and Con A. Methods: The cells were cultured under sterile conditions at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂ until they reached confluence. They were then washed with PBS and labeled with CpL, WGA, or Con A lectins in a concentration of 1 mg/ml. Negative controls were incubated with the carbohydrate that competitively inhibits the reaction (D-galactose, β -N-acetylglucosamine and glucose, respectively), at a concentration of 0.1 M. The incubation occurred for one hour with protection from the light, the analysis was performed on a fluorescence microscope. For flow cytometry quantitation, cells were labeled following the same previous protocol, except that the incubation time was 15 minutes. Subsequently, the cells were washed, centrifuged, transferred to tubes and resuspended in PBS to carry out the reading on a cytometer. Results: The CpL lectin better labeled astrocytes. However, it showed a poor performance compared to other lectins. On the other hand, the WGA lectin efficiently marked both astrocytes and C6 cells; the latter presented the double emission compared to the former. Thus, it is possible to infer that the CpL and WGA lectins are not able to recognize important differences in the glycosylation profile in the membranes of C6 cells and astrocytes. However, the lectin Con A efficiently marked C6 cells, defining their morphology and showing that there is a nearly uniform distribution of glucose along the surface of the membrane, which was not observed in astrocytes. This also exhibited a median fluorescence about 99 times greater than that obtained for astrocytes. Thus, Con A showed to be a marker capable of differentiate cells of murine glioma lineage from primary astrocytes. Conclusion: Based on these results we can infer that the Con A lectin may be a tool for a more efficient identification of glioma cells in histopathological analysis.

Keywords: Glioblastoma, Diagnosis, Lectins, CpL, WGA, Con A.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Etapas da carcinogênese.	14
Figura 2.	Representa o esquema da reação da ligação do FITC à CpL. A conjugação ocorre através dos grupos amina livres da CpL formando uma ligação estável tioureia. Fonte: Boletim técnico Sigma – Aldrich.	37
Figura 3	A imagem evidencia a presença de astrócitos na cultura marcados na cor verde com GFAP em contraste com o núcleo marcado com DAPI em azul (Microscopia confocal, a barra representa um aumento de 50 μ m).	42
Figura 4.	Os cromatogramas mostram as frações que contêm a lectina conjugada com leitura de absorbância em 280 nm. A purificação foi realizada em coluna de Sephadex G-25 equilibrada e eluída em tampão PBS com pH 7,4. Os cromatogramas A, B e C representam as amostras 5:1, 10:1 e 20:1, respectivamente.	43
Figura 5.	Eritrócitos humanos do tipo A+ aglutinados e marcados com as lectinas CpL, WGA e Con A em A, B e C, respectivamente. A barra corresponde a 50 μ m.	44
Figura 6.	A imagem exibe a forma celular das culturas. Em A, a imagem representa a cultura primária (astrócitos) e em B, a linhagem celular derivada glioma murino (C6). A barra corresponde a 50 μ m.	46
Figura 7.	Avaliação da marcação por microscopia de fluorescência. Em A e B: Astrócitos marcados com a lectina CpL – grupo amostral e grupo bloqueio (D-galactose), respectivamente; a seta em vermelho indica o processo de aglutinação. Em C e D: C6 marcadas com a lectina CpL – grupo amostral e grupo bloqueio (D-galactose), respectivamente. A barra corresponde a 50 μ m.	47
Figura 8.	Avaliação da marcação por microscopia de fluorescência. Em A e B: Astrócitos marcados com a lectina WGA – grupo amostral e grupo bloqueio (β -N-acetilglucosamina), respectivamente. Em C e D: C6 marcadas com a lectina WGA – grupo amostral e grupo bloqueio (β -N-acetilglucosamina), respectivamente. A barra corresponde a 50 μ m.	48
Figura 9.	Avaliação da marcação por microscopia de fluorescência. Em A e B: Astrócitos marcados com a lectina Con A – grupo amostral e grupo bloqueio (glicose), respectivamente. Em C e D: C6 marcadas com a lectina Con A – grupo amostral e grupo bloqueio (glicose), respectivamente. A barra corresponde a 50 μ m.	49
Figura 10	Avaliação por citometria de fluxo da marcação de astrócitos e células C6 com as lectinas (A) CpL, (B) WGA e (C) Con A. A comparação entre os grupos foi realizada através do teste não paramétrico Mann-Whitney; os asteriscos representam significância estatística ($p < 0,05$).	50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Estimativa regional do território brasileiro em 2014 para novos casos de tumores do SNC por 100.000 habitantes e percentual correspondente a todas as neoplasias ocorridas neste ano. Adaptada Inca, (2014). 19
- Tabela 2. Estudos com base no diagnóstico com uso de lectinas. Adaptada de Mislovicová *et al.*, (2009). 27
- Tabela 3. Ensaio de hemaglutinação da lectina CpL. Os dados representam a concentração mínima em mg/ml capaz de promover a hemaglutinação numa solução a 2% de eritrócitos intactos ou tripsinizados e a concentração em mM dos carboidratos D-rafinose e D-galactose capaz de gerar inibição da atividade hemaglutinante. Tabela adaptada de Rego, (2000). 30
- Tabela 4. Representa a razão molar de proteínas conjugadas (FITC/CpL) obtidas das amostras 5:1; 10:1 e 20:1. 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Con A	Concanavalina A
CpL	lectina da <i>Crotalaria pallida</i>
Cramoll	lectina da <i>Cratylia mollis</i>
CSC	células tronco tumorais (do inglês – <i>cancer stem cells</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	fluoresceína-5-isotiocianato
GBM	glioblastoma multiforme
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
HPA	lectina da <i>Helix pomatia</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LCA	lectina da <i>Lens culinaris</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	solução salina tamponada com fosfato
Pgp	glicoproteína P transportadora
PHA	lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PNA	lectina do amendoim (do inglês – <i>Peanut agglutinin</i>)
PSA	lectina da <i>Pisum sativum</i>
P53	Proteína de 53 KDa
SDS	duodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
WGA	Aglutinina do Gérmen de Trigo (do inglês – <i>Wheat Germ Agglutinin</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	NEOPLASIA	12
1.2	GLIOMAGÊNESE	15
1.3	GLIOBLASTOMA	16
1.4	DIAGNÓSTICO	20
1.5	LECTINAS	24
1.5.1	CpL	28
1.6	CULTURAS DE CÉLULAS COMO MODELO DE ESTUDO	32
2	OBJETIVO GERAL	33
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	CULTURA DE CÉLULAS DE GLIOMA MURINO (C6)	33
3.1.1	Cultura primária de astrócitos	34
3.1.1.2	<i>Marcação de astrócitos em cultura primária por imunocitoquímica para proteína ácida fibrilar glial (GFAP)</i>	35
3.2	LECTINAS	36
3.2.1	Preparação das lectinas CpL, WGA e Con A	36
3.2.2	Dosagem proteica da CpL	36
3.2.3	Conjugação da CpL ao FITC	36
3.2.4	Purificação do conjugado CpL/FITC	37
3.2.5	Determinação das razões molares da lectina conjugada ao FITC	38
3.3	ENSAIO DE MARCAÇÃO DOS ERITRÓCITOS	39
3.4	MARCAÇÃO DAS CÉLULAS C6 DE GLIOMA E ASTRÓCITOS COM A CPL, WGA E CON A	40
3.5	QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO DAS CÉLULAS C6 DE GLIOMA E ASTRÓCITOS COM A CPL, WGA E CON A	40
3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
4	RESULTADOS	41
4.1	ANÁLISE DA MARCAÇÃO POR IMUNOCITOQUÍMICA EM CÉLULAS DE CULTURA PRIMÁRIA	41
4.2	ANÁLISE DA CONJUGAÇÃO DA LECTINA CPL AO FITC	43
4.2.1	Estimativa da razão molar da lectina conjugada ao FITC referente às amostras 5:1; 10:1 e 20:1	43
4.3	ANÁLISE DAS CULTURAS CELULARES MARCADAS COM AS LECTINAS CPL, WGA E CON A	44
4.3.1	Ensaio de marcação dos eritrócitos	44
4.3.2	Análise por microscopia de fluorescência das culturas celulares marcadas com as lectinas CpL, WGA e Con A	45
4.4	ANÁLISE QUANTITATIVA POR CITOMETRIA DE FLUXO DAS CULTURAS CELULARES MARCADAS COM AS LECTINAS CPL, WGA E CON A	49
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÃO	55
7	PERSPECTIVA	56
8	REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 NEOPLASIA

O organismo apresenta diferentes formas de crescimento celular. São elas, o crescimento celular controlado como a hiperplasia, a metaplasia e a displasia, e a forma de crescimento não controlado que corresponde à neoplasia (INCA, 2011).

A neoplasia é definida por Brasileiro Filho *et al.* (2004) como uma proliferação celular anormal, descontrolada e autônoma, onde as células reduzem ou perdem a capacidade de se diferenciar e pode ser classificada como benigna ou maligna. A neoplasia benigna apresenta células agregadas formando uma massa única, enquanto que a neoplasia maligna apresenta células com alta capacidade de infiltrar os tecidos adjacentes, daí a origem da palavra câncer que vem do grego *karkínos* e quer dizer caranguejo, pois assim como os crustáceos, as células que constituem a neoplasia maligna podem aderir a qualquer região em que estejam localizadas (ALBERTS *et al.*, 2010; INCA, 2011).

O desenvolvimento do câncer é um processo microevolucionário no qual uma célula maligna é capaz de reprogramar seu metabolismo para alimentar seu rápido crescimento e trocar sinais moleculares com a microbiota local para escapar da resposta imune do hospedeiro, criando assim um “microambiente do tumor” (HANAHAN e WEINBERG, 2011; SPANOA *et al.*, 2012). A homeostasia do organismo é mantida através da cooperação dos constituintes celulares normais reguladas por sinais para a manutenção do tamanho das populações celulares e limitações territoriais pelo contato célula a célula. Quando alterações moleculares perturbam essa harmonia, as células tornam-se autoindependentes originando uma transformação neoplásica, resultado de um processo denominado de carcinogênese (FARIA & RABENHORST, 2006).

Todo organismo sofre mutações, porém os mecanismos de reparo são tão eficientes que nem toda mutação é capaz de desregular o fluxo normal do comportamento celular, no entanto outras mutações ou acúmulo destas ao longo da

vida podem gerar vantagens seletivas para uma célula como, por exemplo, vantagens sobre a proliferação celular, característica que lhe garante maior possibilidade de escape das respostas geradas pelo sistema imunológico do hospedeiro e assim, com o decorrer das proliferações, esta pode gerar clones mutantes ainda mais adaptados sobre as células normais, selecionados pelas características moduladas durante o ataque imunológico.

Para que a carcinogênese ocorra além da exposição aos agentes carcinógenos (agentes químicos como aminas aromáticas, físicos como radiação eletromagnética e/ou particulada ou biológica como vírus Epstein-Barr) também é necessário a falha do sistema de reparo do DNA. Quando isso acontece, os proto-oncogenes tornam-se oncogenes (genes carcinógenos) que alteram diversas vias de sinalização a exemplo do proto-oncogene *ras* que monitora o ciclo celular e quando alterado, as células não mais obedecem às vias de inibição da proliferação (RIVOIRE *et al.*, 2001; RIBEIRO-SILVA e ZUCOLOTO, 2003; INCA, 2012). Além desses fatores, processos inflamatórios crônicos também contribuem para o processo tumoral, uma vez que as células inflamatórias são capazes de produzir enzimas que degradam a matriz extracelular e assim, atuam como facilitadoras da invasão de células neoplásicas (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

As alterações iniciais causadas pelos agentes oncopromotores são denominadas de estágio de iniciação, a partir daí poderá ocorrer uma série de mutações capazes de causar lesões estruturais e desregular o mecanismo de crescimento e multiplicação da célula sem provocar sua morte. Nessa fase as células não obedecem aos sinais inter e intracelulares que mantêm a homeostase e que regulam seu crescimento, pois não respondem aos inibidores de crescimento e indutores da apoptose. Este é o estágio de promoção do câncer e por fim, ocorre o estágio de progressão que é caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas dando origem à expansão clonal (INCA, 1996). A figura 1 mostra de modo esquemático o processo da carcinogênese.

Estas alterações não são resultados aleatórios da biologia desordenada das células tumorais. Como o câncer é um processo "microevolutivo", é razoável sugerir que estas e outras alterações, como mudanças no perfil dos carboidratos de superfície sejam selecionadas durante a progressão do tumor para eleger as células

mais aptas a sobreviverem numa população geneticamente heterogênea (VARKI *et al.*, 2009).

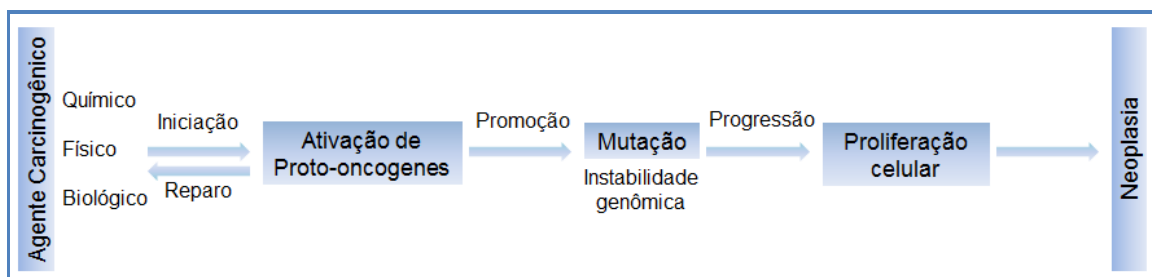


Figura 1. Etapas da carcinogênese.

Isto explica o fato de que apesar da maioria dos tumores serem de origem monoclonal, quando eles se tornam clinicamente evidentes, suas células são extremamente heterogêneas, pois mesmo sendo formados pela expansão clonal de uma única célula precursora, cada célula descendente ao longo do tempo e das proliferações se adaptou ao ambiente de forma distinta. Esse fenômeno é conhecido como progressão tumoral e a heterogeneidade associada a ele resulta de múltiplas mutações que se acumulam em diferentes células sujeitas a pressões de seleção imune e não imune, gerando subclones com habilidades variadas de crescimento, invasão, metástase e resistência à terapia e assim, cria um microambiente favorável para a manutenção do tumor (ROBBINS *et al.*, 2010, HANAHAN e WEINBERG, 2011).

De acordo com Visvader (2011), a heterogeneidade do tumor caracteriza-se por heterogeneidade fenotípica e funcional onde as células tumorais apresentam grande variedade de propriedades funcionais e expressão de diversos marcadores. Tal heterogeneidade pode surgir de diferentes mutações genéticas ou epigenéticas que ocorrem nas células alvo do tumor em diferentes fenótipos ou de diferentes subtipos de tumores que surgem a partir de células distintas dentro do tecido que servem como células de origem.

1.2 GLIOMAGÊNESE

A glia é uma unidade formada por várias células e tem como principal função auxiliar no funcionamento adequado do sistema nervoso central (SNC). A classificação dos seus componentes celulares leva em consideração sua função e morfologia, sendo denominadas como astrócitos, oligodendrócitos, células endimárias e micróglia. Alterações no ciclo celular destas estruturas podem desencadear um tipo de crescimento celular não controlado.

O termo glioma é utilizado para nomear genericamente as neoplasias originárias das células da glia encefálica e correspondem a 80% dos tumores malignos primários do sistema nervoso central (SCHWARTZBAUM *et al.*, 2006). A classificação para as neoplasias se baseia em dois aspectos básicos: a histogênese e a histopatologia, desta forma seguindo a mesma nomenclatura das células gliais juntamente com o grau de malignidade e a localização. A Organização Mundial de Saúde – OMS em 2007 as classificou em quatro grandes grupos, as de origem astrocítica chamadas de astrocitomas, as de origem oligodendrocítica, chamadas de oligodendrogliomas, as de origem endimárias conhecidas como endimomas e os gliomas mistos, chamados de oligoastrocitomas (LOUIS *et al.*, 2007).

Tradicionalmente, acreditava-se que o cérebro humano adulto não continha precursores celulares e que tumores cerebrais derivavam de células parenquimatosas adultas (SANAI *et al.*, 2005). Porém, a alta malignidade associada ao rápido crescimento do glioblastoma multiforme suporta a hipótese da existência das células-tronco do câncer (SINGH *et al.*, 2004), que são células-tronco residentes no cérebro humano adulto. Hoje, acredita-se que o surgimento dos tumores cerebrais seja baseado na hipótese da origem a partir de células gliais maduras desdiferenciadas, células-tronco neurais ou de progenitores gliais (DUCRAY, 2008).

Há algumas hipóteses que se baseiam nas células tronco tumorais para explicar a formação dos tumores. Como a função das células-tronco embrionárias se baseia no desenvolvimento de órgãos durante a embriogênese e as células-tronco teciduais são essenciais para a homeostasia e manutenção dos tecidos, a exemplo das células-tronco neuronais, fatores como a capacidade de regeneração, o fato de

serem reguladas por mecanismos similares ativados em diversos tumores cerebrais e a sua imortalidade lhes permite acumular mutações importantes. Assim, estas células têm despertado o interesse dos especialistas na biologia do câncer e estes fatores reforçam a sua candidatura no estudo da evolução da malignidade tumoral (SANAI *et al.*, 2005; SIEBZEHRUBL *et al.*, 2011).

O termo “célula-tronco cancerosa” é definido como célula cancerosa com capacidade de autorrenovação, capaz de originar outra célula-tronco maligna fenotipicamente diversificada. Estas são derivadas a partir de células estaminais de tecidos específicos, de células-tronco da medula óssea ou a partir de células somáticas que se submetem a processos de transdiferenciação (BJERKVIK *et al.*, 2005).

1.3 GLIOBLASTOMA

Os astrocitomas correspondem ao tipo de glioma mais representativo e de acordo com o grau de malignidade atribuído pela OMS são classificados em 4 grupos. São eles: o astrocitoma pilocítico (grau I), único considerado benigno; o astrocitoma fibrilar (grau II); o astrocitoma anaplásico (grau III) e o glioblastoma multiforme – GBM (grau IV) (LOUIS *et al.*, 2007). O Glioblastoma ou GBM é o astrocitoma maligno primário mais letal do sistema nervoso central e representa aproximadamente 50% de todos os gliomas (CHESLER *et al.*, 2013).

O GBM apresenta um grande desafio para a medicina, pois além de ser frequente, ainda é comparado com outros cânceres incuráveis e apresenta um dos piores prognósticos de todos os tipos de cânceres, com sobrevida inferior a 12 meses mesmo após intervenção terapêutica (LOUIS *et al.*, 2007; TRAN e ROSENTHAL, 2010). Daí a importância de um diagnóstico cada vez mais precoce e seguro.

A taxa de crescimento de um tumor é determinada por três fatores principais: o tempo de duplicação das células tumorais, a fração das células tumorais que se encontram no grupo replicativo e a taxa com que as células são perdidas ou

morrem. Como na maioria dos tumores os controles do ciclo celular estão desordenados, as células tumorais podem ser induzidas a entrar no ciclo sem as restrições usuais, o que aumenta a necessidade do diagnóstico cada vez mais precoce (LEONG e LEE, 1995; ROBBINS *et al.*, 2010).

O GBM apresenta diferentes cascatas moleculares alteradas como transformações genéticas associadas com a desordenada regulação da proliferação celular como apoptose, senescência, migração e comunicação célula-célula, algumas dessas alterações apresentam participação direta do fator de transcrição *p53*, tão importante que é considerado o guardião do genoma, pois protege a célula das transformações malignas através da indução da parada do ciclo celular, da senescência ou da apoptose como resposta ao dano no DNA não reparado. Isso corrobora com Malkin (2001), que relata que alterações na cascata do gene *p53* aumentam a instabilidade genética e podem conduzir a transformações malignas.

Estas mutações não são hereditárias e ocorrem casualmente, assim os fatores ambientais são os principais coadjuvantes no desenvolvimento destes tumores, deste modo as pesquisas concentram-se em estudar melhor estes fatores como, por exemplo, a alta exposição a vírus, a hormônios, a traumas ou a exposição a radiações ionizantes como as radiações eletromagnéticas (raios X e raios γ) e particuladas (partículas α e β , prótons e nêutrons). Esses últimos parecem ser fortes influenciadores das mutações. Assim, conhecendo melhor tais fatores, é possível definir grupos de risco, a fim de auxiliar na prevenção e controle da doença.

Populações de células-tronco tumorais são frequentemente encontradas no GBM e na substância branca subcortical dos hemisférios cerebrais. A maioria é invasiva, porém apesar do crescimento infiltrativo geralmente não invade o espaço subaracnoide e raramente realiza metástase para o fluido cérebro-espinhal (LOUIS *et al.*, 2007). Na grande maioria das vezes, a formação de neovasos não acompanha o rápido crescimento do tumor, assim sem oxigenação adequada, ocorre o desenvolvimento de necrose central do tumor que segundo Ohgaki (2005) ocupa cerca de 80% da massa tumoral.

O GBM, assim como a maioria dos tumores malignos, é caracterizado pela supressão da resposta imunológica antitumoral, formação de neovasos para suprir suas necessidades metabólicas, resistência a estímulos apoptóticos, proliferação

celular excessiva e capacidade de invasão de tecidos, porém diferencia-se quanto à capacidade de gerar metástase, característica comum da maioria dos cânceres. Tais características provocam alguns sinais clínicos que podem se manifestar como hipertensão intracraniana que resulta do aumento da pressão do crânio devido a avançada proliferação celular, enxaquecas, náuseas e alguns pacientes apresentam convulsões epiléticas (LU e SHERVINGTON, 2008).

Até o momento sabe-se que a incidência aumenta de acordo com a idade e pode ser explicada pelo acúmulo de mutações somáticas associadas à emergência de neoplasias malignas e à redução da imunocompetência que acompanha o envelhecimento. Em contrapartida, o declínio das estatísticas após os 80 anos de idade deve-se ao menor número de indivíduos que atingem essa faixa etária, desta forma o grupo mais propenso encontra-se entre 45 e 70 anos de idade (PINTO e CHIMELLI, 2004; BADKE *et al.*, 2014).

Atualmente, as neoplasias cerebrais têm sido cada vez mais frequentes. A incidência de neoplasias do SNC no Brasil no ano de 2014 em mulheres foi de 4,05 novos casos por 100,000 habitantes, o que corresponde a 1,5% de todas as neoplasias ocorridas neste ano, já a incidência para o sexo masculino é um pouco maior, cerca de 5,7 novos casos por 100,000 habitantes, correspondendo a 1,6% do total de neoplasias para 2014 (INCA, 2014). A tabela 1 mostra a estimativa para novos casos por região para o ano de 2014.

Tabela 1. Estimativa regional do território brasileiro em 2014 para novos casos de tumores do SNC por 100.000 habitantes e percentual correspondente a todas as neoplasias ocorridas neste ano. Adaptada Inca, (2014).

Região	Sexo	Localização Primária	Casos Novos	%
Sudeste	Feminino	SNC	1.980	1,4
	Masculino	SNC	2.150	1,4
Sul	Feminino	SNC	860	1,7
	Masculino	SNC	1.230	1,8
Nordeste	Feminino	SNC	770	1,5
	Masculino	SNC	1.070	2,3
Centro-Oeste	Feminino	SNC	350	1,7
	Masculino	SNC	370	1,5
Norte	Feminino	SNC	170	1,7
	Masculino	SNC	200	2,0

O aumento desta incidência pode ser explicado pelo aumento da investigação e notificação desta doença, pelo aumento populacional, prolongamento da expectativa de vida da população e também pelo aumento da exposição aos carcinógenos em especial a radiação eletromagnética (ionizante e não ionizante) (BADKE *et al.*, 2014).

As neoplasias cerebrais são temidas por apresentar mau prognóstico, pois quando diagnosticadas remetem a sobrevida em torno de 12 meses, mesmo após a ressecção cirúrgica e tratamento quimio e radioterápico. Um forte influenciador disso é a taxa de crescimento do tumor, característica também importante em nível de diagnóstico (WANG e JIANG, 2013).

Segundo Robbins *et al.* (2010), a menor massa de tumor clinicamente detectável encontra-se entre 10^9 células (1 g de peso aproximadamente). A partir daí, com mais 10 ciclos de replicação este tumor apresentará 10^{12} células (com aproximadamente 1 kg), tamanho máximo compatível com a vida. Este cálculo não está totalmente correto, pois supõe que todas as suas descendentes estejam viáveis e apresentem a habilidade de se dividir, mas destaca o fato de que quando um tumor sólido for detectado clinicamente, este já tenha completado a maior parte de

seu ciclo de vida, daí a necessidade de desenvolver marcadores diagnósticos para detectar tumores malignos mais precocemente.

Em geral, tumores benignos e malignos podem ser distinguidos com base em suas características anatômicas. Embora a avaliação histológica ainda seja o padrão ouro para o diagnóstico do GBM, fatores como a heterogeneidade e grau do tumor, sobreposição morfológica e qualidade da amostra reforçam a necessidade de novos marcadores para um diagnóstico mais eficiente em cortes com características histológicas ambíguas e também para atuar como ferramenta de monitoramento dos efeitos terapêuticos (NIKIFOROVA e HAMILTON, 2011; WANG e JIANG, 2013). Sendo assim, é necessária a busca de marcadores que auxiliem o patologista num diagnóstico mais seguro.

1.4 DIAGNÓSTICO

O cérebro é um dos órgãos mais complexos do corpo humano. É ele quem coordena todos os sistemas e sentidos do corpo como visão, olfato, audição, tato e paladar. Ele também tem forte influência no gerenciamento da adaptação física e social ao meio ambiente em que o sujeito está inserido, e ainda é responsável por definir a personalidade e a consciência do indivíduo. Diante de tantas funções, é inegável a importância que este órgão tem para o bom funcionamento do corpo e, com todos esses papéis o cérebro traz consigo alguns mistérios que a ciência procura revelar.

O número de investigações sobre este órgão aumenta a cada dia e com elas têm sido diagnosticadas algumas doenças que o afetam. Doenças oriundas do cérebro sempre foram temidas, afinal como vimos, este órgão gerencia o funcionamento do corpo e também define o indivíduo como ser consciente. Dentre as doenças cerebrais mais temidas encontra-se o câncer, principalmente o glioblastoma, pois este tumor possui alto grau de proliferação e malignidade fazendo com que o diagnóstico do GBM ao paciente soe quase como uma sentença de morte devido ao mau prognóstico. Com base nisso, um diagnóstico como este leva o

paciente a enfrentar frente a frente o tempo e a refletir sobre a vida e sua vulnerabilidade (LIMA, 2013).

O diagnóstico do câncer pode apresentar conflitos entre a classificação benigna e maligna exigindo dos patologistas, mesmos os mais experientes, maior prudência em relação à classificação, uma vez que para o paciente é sempre difícil receber um diagnóstico dessa natureza. Assim, surge a necessidade de ferramentas que possam auxiliar o patologista nesta análise (SOUSA *et al.*, 2002).

O diagnóstico inicial dos tumores cerebrais inicia-se com a avaliação do histórico clínico e o exame físico. Em mais de 50% dos casos, na anamnese, a doença gira em torno de 3 meses, frequentemente os pacientes apresentam sinais e sintomas focais ou gerais. Tais sinais dependem da extensão, da topografia e da taxa de crescimento do tumor, e podem incluir cefaleia, náusea, vômitos, alterações no nível de consciência e/ou déficits neurológicos focais (LUCENA *et al.*, 2006; CORREIA *et al.*, 2009; ONCOGUIA, 2012).

A partir da anamnese o médico pode solicitar a avaliação neurorradiológica dos tumores cerebrais que pode ser realizada através da tomografia computadorizada (TC) e da ressonância magnética (RM). Essa última tem sido a técnica de escolha devido ao alto percentual de sensibilidade e capacidade de caracterizar o tumor nos seus três planos ortogonais: axial, coronal e sagital (LUCENA *et al.*, 2006).

Porém, estes sinais e sintomas podem acompanhar outras condições ou doenças e assim, é necessário levar em conta o diagnóstico definitivo que apenas pode ser afirmado histologicamente e como tal é realizado após a cirurgia. Por serem tumores heterogêneos, uma só biopsia aspirativa pode não ser representativa da sua totalidade, os achados histológicos primários incluem: necrose em pseudopaliçada, celularidade aumentada, pleomorfismo, mitoses e proliferação endotelial vascular (SOUSA *et al.*, 2002; OHGAKI, 2005; CORREIA *et al.*, 2009).

Diante disto, nota-se que o aspecto microscópico e a qualidade da amostra disponibilizada para exame são características importantes para se estabelecer uma avaliação segura. A amostra deve ser representativa, apropriadamente preservada e ainda assim, o patologista deve ser muito cauteloso durante a análise, pois a depender do grau de diferenciação ou anaplasia do tumor pode haver a necessidade

de outras técnicas para auxiliar num diagnóstico confiável como a imunohistoquímica, técnica amplamente utilizada ou a citometria de fluxo, técnica quantitativa capaz de mensurar características individuais das células e também os métodos moleculares que já estão em direção à categoria da “rotina” laboratorial apesar de não serem a modalidade primária para o diagnóstico (PITTELLA, 2008).

As alterações genéticas têm sido usadas como marcadores para o diagnóstico de diversas neoplasias até mesmo em neoplasias cerebrais como exemplo das mutações nos genes da isocitrato desidrogenase 1 e 2 (*IDH1* e *IDH2*) que estão presentes na maioria dos gliomas de baixo grau e ainda, anormalidades genéticas que incluem a co-deleção no cromossomo *1p/19q* em oligodendrócitos, mutação no gene *TP53* ou perda no cromossomo *17p13* em astrocitomas que também atuam como marcadores na gliomagênese (NIKIFOROVA e HAMILTON, 2011), mas ainda assim é incessante a busca de marcadores mais confiáveis, eficientes e precoces.

Atualmente, maior ênfase tem sido dada ao estudo de diagnóstico em relação à característica de glicosilação, pois as células de mamíferos apresentam uma maquinaria enzimática que inclui glicosiltransferases e glicosidases que determinam os padrões de glicosilação de proteínas, lipídeos e carboidratos, modificando assim as porções de seus glicoconjugados e numerosos dados têm demonstrado que alterações na expressão de carboidratos estão associadas a transformações malignas (VARKI *et al.*, 2009).

Estas alterações podem ser analisadas através da marcação celular com fluoróforo. Embora os métodos de marcação que exploram a presença de carboidratos e glicoconjugados nos tecidos sejam mais frequentemente utilizados em órgãos ricos em tecidos conjuntivos, estudos realizados com o SNC apontam para a possibilidade de utilização desses procedimentos como ferramentas úteis para a investigação do surgimento de alterações patológicas (DE AGUIAR *et al.*, 2005). A descoberta da especificidade de determinadas glicoproteínas a oligossacarídeos da superfície celular levou à aplicação destas moléculas conjugadas a fluoróforo na pesquisa básica e diagnóstico biomédico para a rotina laboratorial (RUDIGER e GABIUS, 2001).

Estudos clássicos mostraram alto grau de reconhecimento da lectina L-fito-hemaglutinina (PHA-L) para a ramificação β 1-6 de *N*-glicanos. Esta ramificação está relacionada com alterações glicopeptídicas de células tumorais, e assim como a maior expressão da enzima *N*-acetil-glucosamina transferase (V-18) da qual deriva, indicam maior frequência de metástase em modelos animais. O aumento desta ramificação e da expressão desta enzima é resultado do aumento da transcrição do gene *MGAT5* decorrente da carcinogênese química e viral (VARKI *et al.*, 2009).

Com base nisso, as lectinas podem atuar como ferramentas de referência para o diagnóstico de diversas situações fisiológicas e patológicas principalmente em relação ao diagnóstico do câncer, pois diversos estudos detectaram alterações de carboidratos de superfície em células neoplásicas, diferenciação de células do tumor e metástases através do uso destas proteínas (DENNIS *et al.*, 1986).

Tais mudanças incluem alteração de sialização, ramificação, fucosilação e composição ou síntese de resíduos de carboidrato. Tudo isto favoreceu o desenvolvimento de técnicas como histoquímica e citoquímica baseadas na detecção visual de carboidratos por lectinas marcadas especificamente em tecidos, superfícies das células ou soro. Assim, o estudo das interações lectina-carboidrato pode ser útil na pesquisa dos perfis das células malignas, como foi demonstrado anteriormente em análise dos glicolipídeos de células tumorais, que apresentaram grandes alterações de glicosilação baseadas em dois diferentes mecanismos: bloqueio da síntese ou neossíntese de carboidratos (VARKI *et al.*, 2009).

Um bom exemplo de alterações na glicosilação envolve glicoproteínas que compõem parte de proteínas do soro como a alfa-fetoproteína (AFP), a haptoglobina, a α -acidoglicoproteína, o antígeno específico da próstata (PSA) e o T-antígenos. Todas elas mudam sua glicosilação em resposta ao câncer, a AFP do soro, por exemplo, é um marcador útil para o carcinoma hepatocelular e pode ser detectada pelas lectinas LCA e Con A (WU, 1990). Ainda, técnicas como cromatografia de afinidade seriada com lectinas realizada com as lectinas Con A, PHA-E4 e PHA-L4 e a precipitação quantitativa com uso das lectinas Con A e PSA, foram eficientes em diferenciar o câncer de próstata (PCA) da hiperplasia benigna da próstata (HBP) (SUMI *et al.*, 1999).

Um dos métodos bem sucedidos no diagnóstico com uso de lectinas é a histoquímica. Um estudo avaliou a histoquímica com uso da lectina HPA e previu o prognóstico de câncer de pulmão, no qual foi capaz de estratificar os pacientes em grupos de baixo e alto risco (LAACK *et al.*, 2002). Além disso, a HPA também permite indicar o potencial metastático de tumores primários do cólon e carcinomas gástricos (SCHUMACHER *et al.*, 2005). Ainda, algumas lectinas podem atuar como marcadores para detecção de resistência a múltiplas drogas através do reconhecimento da glicoproteína da membrana plasmática P-gp, que por sua vez é um dos principais problemas para o tratamento do câncer e reflete na indução da resistência citostática acompanhada pela alta expressão do gene *MDR1* que a codifica (BREIER *et al.*, 2005).

1.5 LECTINAS

O marco inicial no estudo de purificação e caracterização de aglutininas, proteínas que apresentam a habilidade em aglutinar hemácias, se deu com o trabalho de Dixson em 1887, com a descoberta de uma proteína extraída da mamona (*Ricinus communis*), batizada em 1888 de ricina por Stillmark, que descreve que esta aglutinina purificada era capaz não apenas de aglutinar eritrócitos, mas também de precipitar proteínas do soro. Atualmente, sabe-se que a ricina é uma complexa mistura de moléculas tóxicas e lectinas não tóxicas. Em seguida, Ehrlich (1891) baseado em relatos de agricultores revelou que bezerros eram prevenidos da intoxicação pela ricina (*Ricinus communis*) e abrina (*Abrus precatorius*) quando alimentados por concentrações pequenas de suas sementes e essa característica protetora era transmitida aos seus descendentes (CASTANHEIRA, 2011). Ao identificarem nas aglutininas a propriedade em distinguir hemácias de diferentes tipos sanguíneos, Boyd e Shapleigh (1954) as denominaram de lectinas, termo que vem do latim *legere* e significa selecionar ou escolher (SHARON e LIS, 2004).

De acordo com Zanetti (2007) estas observações foram introduzidas antes da hemaglutinação ser entendida em nível molecular, pois, somente em 1952, Watkins e Morgan em seu estudo demonstraram que esta propriedade é baseada na característica específica de ligação de uma dada lectina a um carboidrato, mesmo que relatos anteriores a este estudo com a lectina Con A tenham demonstrando que a aglutinação desenvolvida por estas moléculas poderia ser inibida por carboidratos específicos (ZATTA e CUMMINGS, 1992; VAN DAMME *et al.*, 1998).

Mais tarde Nowel (1960) verificou a atividade mitogênica da lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) sobre linfócitos e em seguida Aub (1963) descreveu que a lectina do germe do trigo (WGA) aglutinava mais intensamente células transformadas do que células normais e com isso concluiu que alterações malignas eram acompanhadas por mudanças nas superfícies celulares (MOTA, 2001). Estes estudos deram grande contribuição para a fundamentação da imunologia básica como a especificidade da relação antígeno-anticorpo, fenômeno da memória imunológica e transferência de imunidade humoral de mãe para filho (SHARON & LIS, 2004).

Na década seguinte, o termo lectina passou a abranger todas as aglutininas específicas de carboidrato de origem não imune (SHARON & LIS, 1972). Em seguida, o termo foi ampliado por Goldstein *et al.* (1980) que conceituaram lectinas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune ligantes a carboidratos que são capazes de aglutinar células e/ou precipitar polissacarídeos ou glicoconjugados. Atualmente, a definição mais aceita e provavelmente a mais utilizada foi proposta por Peumans e Van Damme (1995) que diz: lectinas são proteínas com no mínimo um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos através de ligações do tipo pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van Der Waals.

Após o trabalho de Sharon e Lis (1972) foi criado o termo “lectinologia” que alude à área de estudo para estas proteínas. Mesmo após um século do seu descobrimento, as lectinas ainda continuam despertando o interesse de diversos campos de estudo (POVINELI e FINARDI FILHO, 2002). Por serem proteínas amplamente distribuídas, pois estão presentes em bactérias, fungos, plantas,

vertebrados superiores e até vírus (CRUZ *et al.*, 2005), acredita-se que estas desempenham funções importantes na natureza.

Com relação à nomenclatura, não existe uma padronização sistemática para sua classificação, contudo esta é originada da denominação científica das espécies de que foram purificadas, de acordo com o protocolo de purificação, pela designação dos monossacarídeos aos quais têm especificidade ou ainda pela designação do tecido ao qual foram extraídas, assim temos como exemplo a Concanavalina A lectina obtida da *Canavalia ensiformis* (KENNEDY *et al.*, 1995).

Talvez a característica mais importante das lectinas seja a capacidade em gerar interações químicas fracas que produzem reconhecimento altamente seletivo a carboidratos ligados a uma superfície (SHARMA e SUROLIA, 1997). Essa interação entre a lectina e o carboidrato aumenta tanto a afinidade como a especificidade através de subsítios e subunidades, e é esta ligação de modelo chave-fechadura que proporciona a atividade biológica (KENNEDY *et al.*, 1995; PEUMANS e VAN DAMME, 1998). A região molecular desta ligação é denominada de domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD), sendo que cada subunidade da lectina possui pelo menos um domínio. A “divalência” ou “polivalência” permite a interação com carboidratos da superfície de células adjacentes, o que origina o fenômeno de aglutinação (LIS e SHARON, 1986). Por isso também são conhecidas como aglutininas.

As lectinas são determinadas de acordo com sua característica de aglutinação, assim para detectá-las, além dos procedimentos de purificação, também é realizado o ensaio de hemaglutinação (DUBOIS *et al.*, 1998), onde a especificidade de uma lectina é determinada pelo monossacarídeo ou oligossacarídeo capaz de inibir o fenômeno de aglutinação nos eritrócitos (KOMPELLA e LEE, 2001).

As lectinas possuem diversas atividades biológicas, algumas são conhecidas como mediadores da inflamação ou quimiotáticas, na superfície celular algumas lectinas participam de processos como adesão célula-célula ou célula-matriz extracelular, bem como processos de sinalização, proliferação celular e apoptose. As selectinas, por exemplo, são moléculas de adesão celular envolvidas na interação célula-leucócito (SILVA *et al.*, 2010).

Diante de tantas propriedades, diversos grupos de pesquisa têm voltado seus interesses para estas proteínas, principalmente grupos com foco em diagnóstico do câncer, já que estas são capazes de reconhecer alterações em carboidratos através da análise do perfil das modificações estruturais de oligossacarídeos dos glicoconjugados em tecidos, célula, soro e outros fluidos biológicos (MISLOVICOVÁ *et al.*, 2009). A tabela 2 mostra alguns estudos de diagnóstico com base em alterações dos glicoconjugados a partir do reconhecimento das lectinas.

Tabela 2. Estudos com base no diagnóstico com uso de lectinas. Adaptada de Mislovicová *et al.* (2009).

Lectinas	Doença	Métodos	Referências
CON A, WGA, DBA, LTA, PNA, RCA-II	Câncer infantil	Histoquímica	Kumar <i>et al.</i> , (1986)
CON A, WGA, PHA, UEA, GNA, MAA, DBA	Adenocarcinoma endocervical	Histoquímica SPR	Toda <i>et al.</i> , (1998) Kelly <i>et al.</i> , (2007)
CON A, WGA, SBA, AAL, LCA	Hepatoma Hepatoma (tumor primário, metástase)	SPR LAC	Liljeblad <i>et al.</i> , (2002) Buamah <i>et al.</i> , (1987)
CON A, WGA, PHA	Câncer de próstata	LAC Citometria de fluxo	Yoshida <i>et al.</i> , (1997) Sumi <i>et al.</i> , (1999) Gabor <i>et al.</i> , (2001)
CON A, WGA, PNA	Câncer renal	LAC ELLA	Yoshida <i>et al.</i> , (1999) Reddi <i>et al.</i> , (2000)
ECA, RCA, MAA, SNA, TML	Câncer da tireóide	ELLA Lectina <i>blotting</i> Histoquímica	Krzeslak <i>et al.</i> , (2003) Babal <i>et al.</i> , (2006)

A glicosilação é a principal modificação pós-traducional e ocorre durante o desenvolvimento das células normais (LESHLE *et al.*, 2006). Entretanto, a variação da glicosilação está associada com diferenciação e transformação das células neoplásicas (HIRABAYASHI, 2008). Como vimos, diversas lectinas inclusive a Con A

e a WGA têm sido avaliadas como marcadores de células tumorais, além disso, tais proteínas têm sido amplamente empregadas como ferramentas em técnicas de diagnóstico, por exemplo, em imunohistoquímica (FRITZ *et al.*, 1988), ELISA-lectina (WALKER *et al.*, 2004; KUMADA *et al.*, 2012) e lectina-*microarray* (HU e WONG, 2009). Diante destas funções, este estudo abordará as potencialidades das lectinas Concanavalina A (Con A), a Aglutinina do Gérmen de Trigo (WGA) e a Lectina da *Crotalaria pallida* (CpL).

A Concanavalina A (Con A) é caracterizada por sua estrutura tetramérica e por dissociar-se em dímeros, é dependente de pH e apresenta especificidade aos carboidratos D-manose e D-glicose, já a Aglutinina do Gérmen do Trigo (WGA) possui estrutura dimérica e 4 sítios para ligação de carboidrato apresentando especificidade para a β -*N*-acetilglucosamina e ácido *N*-acetilneuramínico (REGO, 2000) ambas, são amplamente estudadas em diversas áreas, desde a clínica à ecologia. A CpL, porém, apresenta apenas um único relato na literatura, o qual analisa suas características, tal estudo foi realizado por Rego *et al.* (2002). Este, estudo, portanto, é o primeiro com base no potencial marcador desta proteína. Assim, mais atenção será dada às características da CpL como descrito no tópico a seguir.

1.5.1 CpL

De acordo com Van Damme *et al.* (1996), centenas de lectinas demonstraram ser um grande e heterogêneo grupo de proteínas diferentes entre si no que se refere à especificidade aos carboidratos, estrutura molecular e funções biológicas, fator importante em se tratando de novas propriedades. Além disso, vimos que diversos estudos mostraram a funcionalidade destas proteínas como ferramentas no diagnóstico de neoplasias através de suas interações com as porções glicídicas dos carboidratos de membrana. Sendo assim, a busca e a caracterização de novas lectinas possibilita o progresso tanto para a lectinologia quanto para a ciência em geral.

O Brasil abriga grande diversidade biológica, o que representa algo entre 10 a 20% da biodiversidade mundial e engloba um rico patrimônio genético, inclusive com espécies que ainda não foram catalogadas (IPEA, 2006). Sendo assim, são necessárias pesquisas que explorem essa biodiversidade no intuito de identificar novas espécies e buscar novas propriedades, a fim de contribuir para o desenvolvimento científico e tecnológico e, concomitantemente estabelecer medidas de preservação e manutenção desta biodiversidade.

Um dos grandes representantes da flora brasileira é a família *Leguminosae* (*Faboideae*) que abriga o gênero *Crotalaria*. Este gênero, no Brasil, representa 42 espécies, sendo que 19 delas são endêmicas e estão distribuídas em todas as regiões e em diferentes domínios fitogeográficos (FLORES, 2012). A ampla distribuição e o fácil acesso de suas espécies refletem na literatura que abriga muitas pesquisas na produção de adubo orgânico; na forragem; no combate a nematoides em plantações; em programas de revegetação de áreas contaminadas com substâncias tóxicas; na medicina popular e em atividades farmacológicas (GARCIA *et al.*, 2013), mas poucos estudos com base em suas propriedades de reconhecimento a carboidratos. Desta forma, surge este estudo para atenuar esta lacuna.

A CpL é uma lectina vegetal que foi extraída de sementes da *Crotalaria pallida*, purificada e caracterizada por Rego (2000). Esta lectina exibe massa molecular de 120 kDa, sugerindo um tetrâmero constituído de 4 subunidades de 30 kDa atreladas por ligações não-covalentes que indicam uma molécula de estrutura quaternária, uma característica comum às lectinas de leguminosas que geralmente são constituídas de 4 cadeias iguais com massa de 25-30 kDa (SHARON e LIS, 1990).

Nos ensaios de hemaglutinação, a CpL foi capaz de aglutinar todos os tipos de eritrócitos humanos com exceção apenas para o tipo sanguíneo O, esta reação foi inibida pela presença de D-rafinose e D-galactose, indicando a especificidade da CpL a estes carboidratos, além disso a CpL manifestou melhor reação diante da presença de cátions divalentes e estabilidade térmica em intervalos de temperatura variando de 30–100°C, onde foi observada perda completa da atividade

hemaglutinante em temperaturas acima de 80°C. A tabela 3 mostra algumas características da CpL obtidas através do ensaio de hemaglutinação.

Tabela 3. Ensaio de hemaglutinação da lectina CpL. Os dados representam a concentração mínima em mg/ml capaz de promover a hemaglutinação numa solução a 2% de eritrócitos intactos ou tripsinizados e a concentração em mM dos carboidratos D-rafinose e D-galactose capaz de gerar inibição da atividade hemaglutinante. Tabela adaptada de Rego, (2000).

Eritrócitos		Intactos	Tripsinizados	Carboidratos	<i>Crotalaria pallida</i>
Humano	A	7.81	0.46	D-Rafinose	25.0
	B	15.62	0.46		
	AB	7.81	0.46	D-Galactose	37.5
	O	--	--		

Como vimos, a glicosilação é uma característica distinguível pelas lectinas. Consiste em reações de modificação pós-traducional mais comuns e quase metade de todas as proteínas conhecidas em eucariotos são glicosiladas. Ainda, alterações em estruturas de oligossacarídeos estão associadas com muitos eventos fisiológicos e patológicos, incluindo o crescimento celular, migração, diferenciação e invasão tumoral, estas características têm atraído os cientistas ao estudo da estrutura e funções dos glicanos (MIYOSHI *et al.*, 2010).

Investigações com base no uso de lectina são vantajosas por causa da sua capacidade em discriminar isómeros de carboidratos (HIRABAYASHI, 2004). Por apresentar grande número de lectinas disponíveis no mercado, grande variedade e especificidade, estruturas cada vez mais complexas de glicanos são reconhecidas por lectinas nas categorias de baixa ou média especificidade (TAO *et al.*, 2008). Assim, a maior variedade de lectinas disponíveis afetará positivamente a detecção de glicanos estruturalmente mais complexos, o que reflete na importância da busca de lectinas ainda não conhecidas.

De acordo com Mislovičová *et al.* (2009), técnicas de lectino-histoquímica ou lectino-citoquímica são importantes ferramentas para estudos em diagnóstico, pois

são capazes de avaliar a glicosilação e consistem na detecção visual de carboidratos em tecidos (biópsia de tecido) e/ou nas superfícies das células com lectinas marcadas especificamente. A histoquímica, por exemplo, é bem avaliada por Gabius (2001) e exemplos adicionais para sondagem e visualização de carboidratos estão disponíveis na literatura como em Babal *et al.* (2006). Tais técnicas além de apresentarem alto valor preditivo, ainda têm como vantagens a fácil execução e o baixo custo.

Outra técnica com alta sensibilidade e especificidade tanto em termos qualitativos quanto quantitativos é a citometria de fluxo multiparamétrica que se baseia nas características de partículas microscópicas imersas em suspensão orientadas num fluxo e interceptadas uma a uma por um feixe de laser, com uso de fluorocromos com diversas características de fluorescência. O citômetro realiza uma varredura minuciosa e mensura características como diâmetro celular, granularidade e intensidade de fluorescência.

Os diferentes fluorocromos que marcam cada antígeno absorvem a luz e emitem-na num comprimento de onda maior e específico, cada fluorocromo possui um padrão espectral distinto de absorção e emissão. O isotiocianato de fluoresceína (FITC), por exemplo, apresenta absorção máxima de 490–495 nm e emissão máxima de 517 nm (DE PIER, 2008).

Por ser uma importante ferramenta diagnóstica para caracterização imunofenotípica, esta técnica tem sido amplamente empregada nos laboratórios clínicos e cada vez mais tem sido usada na pesquisa com lectinas conjugadas a fluorocromos com foco na investigação de carcinomas através da análise de glicoconjugados de superfície celular. Três acontecimentos contribuíram fortemente para o avanço desta técnica, o primeiro foi o progresso da ciência, seguido da ampliação na produção de anticorpos monoclonais e por fim, o aumento do uso de lectinas como ferramenta adicional para identificação e monitoramento de diversas neoplasias (SILVA, 2010).

Em marcação com lectinas é comum o uso do FITC. Algumas lectinas são comercializadas já conjugadas com este fluorocromo como a Con A e a WGA usadas neste estudo. A CpL ao contrário, por ser uma lectina recém descoberta e

por não se tratar de uma lectina comercial, foi conjugada especificamente para este estudo.

1.6 CULTURAS DE CÉLULAS COMO MODELO DE ESTUDO

A cultura de células é utilizada principalmente em pesquisa básica aplicada, pois apresenta vantagens como baixo custo, execução simples e rápida e ainda serve como teste precedente ao teste *in vivo*, permitindo refinar o desenho experimental e, em alguns estudos até permitem resultados bioequivalentes sem a necessidade de se recorrer ao modelo animal.

Células tumorais derivadas de glioblastoma têm sido amplamente utilizadas e constituem modelos alternativos confiáveis para o estudo com base em resposta a agentes externos (BRISMAR, 1995; LAL *et al.*, 1996). Diante disso, avaliamos o potencial de marcação das lectinas através dos ensaios *in vitro* com uso da linhagem C6 derivada de glioma murino.

A linhagem C6 foi desenvolvida por Benda *et al.* (1968) através da administração repetitiva de MNU (metilnitrosourea) em ratos Wistar-Furth adultos e compartilha várias características específicas do GBM humano. Em termos genéticos, a linhagem C6, assim como o GBM humano, apresenta altas taxas de mutação no gene supressor do tumor *p16* (FURNARI *et al.*, 2007). A nível celular, apresenta necrose, polimorfismo nuclear e taxas de mitose elevadas (AUER *et al.*, 1981). Em termos histopatológicos, apresenta características como invasão focal semelhante à infiltração padrão difusa observada no GBM humano (CHICOINE e SILBERGELD, 1995) e expressão de marcadores histopatológicos como as proteínas S100B, e a vimentina (PFEIFFER *et al.*, 1970, CHOU *et al.*, 2003).

2. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como principal objetivo analisar o potencial de marcação das lectinas CpL, WGA e Con A em células da linhagem C6 de glioma murino e astrócitos em cultura primária murina.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conjugar a lectina CpL ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína – FITC;
- Realizar a marcação com lectinas (CpL, WGA e Con A) em células da linhagem C6 de glioma murino e astrócitos em cultura primária murina;
- Analisar o potencial das lectinas abordadas em discriminar células de glioma.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE CÉLULAS DE GLIOMA MURINO (C6)

As células de glioma de rato (C6) foram obtidas do Banco de Células do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq) e mantidas estocadas em 90% de SFB e 10% de DMSO à razão de $1,5 - 2,0 \times 10^6$ células/ml a -70°C . Posteriormente, as células foram descongeladas, centrifugadas e cultivadas a uma densidade de $2,5 \times 10^3$ células/cm² em condições estéreis, a 37°C em atmosfera com 5 % de CO₂ em placas de cultura de poliestireno (KASVI, Curitiba – Brasil) com 100 mm de diâmetro até atingirem 80% de confluência. Para manutenção da cultura, foi utilizado meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com

10% de SFB e 2 mM de L-glutamina, penicilina a 100 U.I./ml e estreptomicina a 100 µg/ml, com troca de meio realizada a cada 48 horas.

Após atingirem a confluência, as células foram descoladas da placa através de uma solução de 0,05% de tripsina (GIBCO® Invitrogen Corporation, Canadá – USA) com 0,02% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e mantidas em incubadora por 3 minutos a 37°C. A digestão enzimática foi neutralizada adicionando-se igual volume de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Os experimentos foram realizados a partir da 3ª passagem das células respeitando o número máximo de 10 passagens.

3.1.1 Cultura primária de astrócitos

A cultura primária de astrócitos foi preparada de acordo com o método de Cookson & Pentreath (1994) com modificações descritas por Pinheiro *et al.* (2006). Foram utilizados ratos *Wistar* neonatos (0–1 dia) obtidos do Biotério do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA). Para a realização dos experimentos o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do ICS–UFBA (Protocolo de aprovação nº 062/2014) e todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas por este.

Para o procedimento, os animais foram decapitados e seus hemisférios cerebrais expostos e removidos assepticamente, as meninges e os vasos sanguíneos foram retirados do córtex cirurgicamente e em seguida, forçados a passar por uma membrana estéril de 80 µm. As células dissociadas foram suspensas e semeadas em garrafas de cultura de poliestireno (TRP, Equipar, Curitiba – Brasil) a uma densidade de $2,5 \times 10^3$ células/cm².

No dia seguinte ao estabelecimento da cultura, as células da microglia foram removidas por meio de agitação mecânica, tal procedimento teve como objetivo garantir a predominância de células astrocíticas. As células foram cultivadas nas mesmas condições estabelecidas para as células tumorais descritas anteriormente e

a confluência ocorreu em aproximadamente três semanas (21 dias) após o estabelecimento da cultura.

3.1.1.2 *Marcação de astrócitos em cultura primária por imunocitoquímica para proteína ácida fibrilar glial (GFAP)*

Após o isolamento e estabelecimento da cultura primária, as garrafas que apresentaram confluência de 80% foram tripsinizadas e cultivadas em placas de 24 poços (KASVI, Curitiba, Brasil) contendo lamínulas previamente lavadas com solução de Triton X-100 (2%) e ácido nítrico (30%). As células foram semeadas a uma densidade de $2,5 \times 10^3$ células/cm² e incubadas em condições estéreis a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol gelado por 20 min e novamente lavadas.

O excesso de PBS foi removido e em seguida, para permeabilizar as células foi adicionado e mantido PBS TWEEN (0,2%) à temperatura ambiente por 10 min. Logo após, as células foram lavadas e bloqueadas com PBS-SFB (10%) também em temperatura ambiente por 30 min.

As células foram marcadas com anticorpo primário monoclonal de coelho anti-GFAP (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil, 9065 – 1:500, diluído em PBS/SFB a 0,1%) e incubadas a 4°C *overnight*. Posteriormente, as células foram lavadas e marcadas com o anticorpo secundário anti-coelho ligado a Alexa fluor (Life Technology, 488 – 1:200, diluído em PBS/SFB a 0,1%) e novamente incubadas em câmara escura a 4°C por 1h.

Posteriormente, as células foram lavadas e marcadas com DAPI (Probes – 5 µg/mL) incubadas por 20 min, lavadas novamente e, em seguida foi realizada a montagem das lamínulas e a observação em microscopia confocal (Leica, SP8), culturas puras apresentam mais de 95% de células marcadas.

3.2 LECTINAS

3.2.1 Preparação das lectinas CpL, WGA e Con A

As lectinas Con A e WGA já conjugadas com isotiocianato de fluoresceína - FITC foram adquiridas da Sigma-Aldrich (São Paulo – Brasil) e foram diluídas sobre proteção da luz com adição de 2 ml de PBS, armazenadas em alíquotas de 20 µl em concentração final de 1mg/ml e mantidas estocadas no freezer a -20°C para uso posterior. A lectina CpL foi extraída de sementes da *Crotalaria pallida*, purificada e caracterizada por Rego (2000), professor da Universidade do Estado da Bahia – UNEB, que gentilmente nos cedeu. Esta lectina foi mantida estocada a -20°C até sua utilização para os procedimentos posteriores.

3.2.2 Dosagem proteica da CpL

A dosagem da proteína foi confirmada através da quantificação obtida conforme as instruções do fabricante (kit DC protein assay; Bio-Rad®, Hercules, CA – USA) com absorbância mensurada em 750 nm que nos revelou grau de pureza de 0,33 mg de CpL/mg de amostra (variação de 0,25 a 0,34).

3.2.3 Conjugação da CpL ao FITC

A lectina CpL foi conjugada ao FITC (Sigma-Aldrich®, São Paulo – Brasil) seguindo as especificações do fabricante e todos os experimentos foram realizados protegidos da luz.

Inicialmente, foi realizada a solução da CpL, onde 1mg da proteína foi diluído em 0,2 ml de tampão carbonato e reservada. Posteriormente, foi realizada a solução do FITC com diluição de 2 mg em tampão carbonato, obedecendo as razões molares (20:1; 10:1; 5:1), a fim de verificar a melhor concentração para conjugação.

A conjugação foi realizada sob agitação com adição gota a gota de 50 µl da solução de FITC em cada razão molar à solução da CpL. A solução final foi incubada por 2 h à temperatura ambiente e protegida da luz. A figura 2 representa o esquema da conjugação em relação aos sítios de ligação do FITC à CpL.

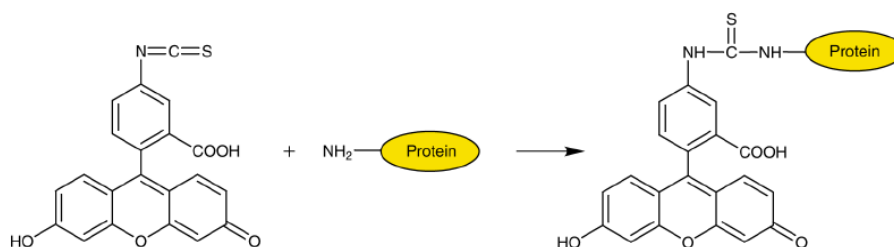


Figura 2. Representa o esquema da reação da ligação do FITC à CpL. A conjugação ocorre através dos grupos amina livres da CpL formando uma ligação estável tioureia. Fonte: Boletim técnico Sigma – Aldrich.

3.2.4 Purificação do conjugado CpL/FITC

Após completa a reação de conjugação, foi realizada a separação das proteínas não conjugadas ao FITC em coluna de Sephadex G-25 seguindo as instruções do fabricante, eluindo-se apenas com tampão PBS a pH 7,4 pela ação da gravidade. Foram obtidas 10 frações de 0.25 ml para cada amostra (20:1; 10:1 e 5:1). Todos os tubos eluídos foram preservados para análises posteriores.

A presença da proteína nas frações obtidas foi mensurada através da leitura da absorbância em 280 nm em espectrofotômetro (MicroNal, B382).

3.2.5 Determinação das razões molares da lectina conjugada ao FITC

Posteriormente, a absorvância do *pool* de proteínas obtidas de cada fração molar (5:1; 10:1 e 20:1) foi mensurada por espectrofotometria, conforme as especificações do fabricante. A partir daí, foi determinada a constante (C) dada para a conjugação da proteína através da seguinte equação:

$$C = \frac{MW \times E_{280}^{0.1\%}}{389 \times 195} \qquad C = \frac{120,000 \times 1,4}{389 \times 195} = 2,21$$

Onde:

C = Constante dada para a conjugação da proteína

MW = Peso molecular da CpL

E = Coeficiente de absorção da proteína em 280 nm a 1.0 mg/ml

389 = Peso molecular do FITC

195 = Absorção do FITC em relação a E0.1% com leitura 490 nm

Em seguida foi realizado o cálculo para se obter as razões molares da proteína conjugada ao FITC (F/P) das frações 5:1; 10:1 e 20:1, de acordo com a equação:

$$\text{Molar F/P} = \frac{MW}{389} \times \frac{A_{495}/195}{A_{280} - [(0.35 \times A_{495})]/E_{280}^{0.1\%}} = \frac{A_{495} \times C}{A_{280} - [(0.35 \times A_{495})]}$$

Onde:

F/P = Razão molar da proteína conjugada

MW = Peso molecular da proteína

E = Coeficiente de absorção da proteína em 280 nm a 1.0 mg/ml

A₂₈₀ = Absorbância da proteína

A₄₉₅ = Absorbância do FITC

3.3 ENSAIO DE MARCAÇÃO DOS ERITRÓCITOS

As hemácias apresentam em suas superfícies uma configuração lipídica e proteica tão complexa que são comparáveis com os mais sofisticados mosaicos bizantinos. Assim, por apresentar grande variedade de carboidratos e glicoproteínas, a membrana eritrocitária exhibe sítios de ligação para diversas lectinas (MURADOR e DEFFUNE, 2007), por isso o ensaio de hemaglutinação é um pré-requisito para a averiguação da atividade de uma determinada lectina.

Tomando como base a variabilidade de glicídios presentes na membrana dos eritrócitos, iniciamos nossa investigação realizando o ensaio de marcação em eritrócitos seguindo o método semelhante ao ensaio de hemaglutinação descrito por Rego (2000), com algumas modificações, dentre elas a realização do esfregaço sanguíneo para determinar a concentração ideal para uma marcação eficiente das lectinas utilizadas no estudo.

Para isso, 4 ml de sangue tipo A+ foi colhido e lavado 3x com PBS, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 100 µl da solução de cada lectina diluída em PBS nas concentrações de 1mg/ml e 0.5 mg/ml. Na extremidade de uma lâmina foi depositada 1 gota desta solução e realizado o esfregaço, todos os procedimentos foram realizados com proteção da luz. Posteriormente, as lâminas foram visualizadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX51) revelando a concentração ideal de 1mg/ml para os experimentos a seguir.

3.4 MARCAÇÃO DAS CÉLULAS C6 DE GLIOMA E ASTRÓCITOS COM A CPL, WGA E CON A

Para realizar a marcação celular, as placas e garrafas que apresentaram confluência de 80% foram tripsinizadas e as células foram cultivadas em placas de 3,5 cm de diâmetro (KASVI, Curitiba – Brasil) a uma densidade de $2,5 \times 10^3$ células por cm^2 em condições estéreis, a 37 °C em atmosfera com 5% de CO_2 por 24 horas.

Posteriormente, o meio foi retirado, as células foram lavadas três vezes com PBS e marcadas com as lectinas CpL, WGA e Con A na concentração de 1 mg/ml. O controle negativo foi obtido com adição do carboidrato inibidor das respectivas lectinas em estudo (D-galactose, β -N-acetilglucosamina e D-glicose, respectivamente) na concentração de 0,1 M. A incubação se deu por uma hora em condições estéreis, a 37°C, em atmosfera com 5% de CO_2 protegida da luz. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência (Olympus BX51).

3.5 QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO DAS CÉLULAS C6 DE GLIOMA E ASTRÓCITOS COM A CPL, WGA E CON A

A quantificação da marcação foi realizada por citometria de fluxo com protocolo semelhante ao da marcação em microscopia de fluorescência. Em resumo, as células que atingiram confluência de 80% foram tripsinizadas e marcadas com as lectinas CpL, WGA e Con A na concentração de 1 mg/ml. O controle negativo foi obtido com adição do carboidrato inibidor das respectivas lectinas em estudo (D-galactose e β -N-acetilglucosamina e D-glicose, respectivamente) na concentração de 0,1 M. A incubação se deu por 15 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas, transferidas para tubos e ressuspensas em PBS para a realização da leitura em citômetro FACSCalibur (BD Biosciences São José – E.U.A.), detector FL – 1 e *Software CellQuest Pro* versão 6.0.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise comparativa entre os grupos foi realizada pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney através do *Software* GraphPad Prism (versão 5.0 para Windows, San Diego, California – USA).

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA MARCAÇÃO POR IMUNOCITOQUÍMICA EM CÉLULAS DE CULTURA PRIMÁRIA

A marcação por imunocitoquímica com GFAP evidencia a presença de astrócitos comprovando a pureza da cultura. A imagem mostra marcações positivas para GFAP, marcador de filamentos do citoesqueleto próprio de astrócitos e DAPI marcador que se liga fortemente à molécula de DNA, desta forma as células foram identificadas como astrocitárias ratificadas pela coloração verde de seu citoplasma em contraste com o azul do núcleo.

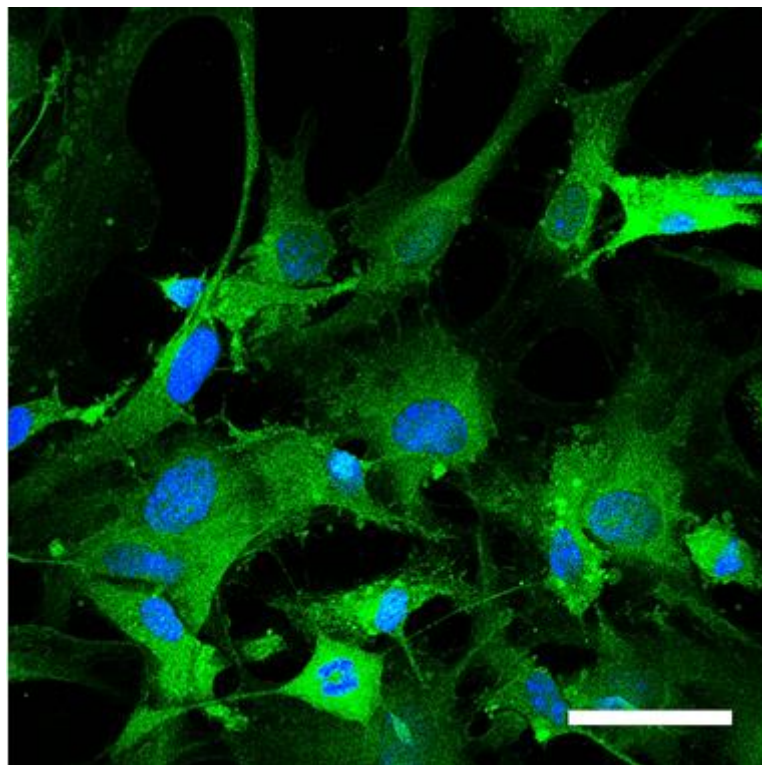


Figura 3. A imagem evidencia a presença de astrócitos na cultura marcados na cor verde com GFAP em contraste com o núcleo marcado com DAPI em azul (Microscopia confocal, a barra representa um aumento de 50 μm).

4.2 ANÁLISE DA CONJUGAÇÃO DA LECTINA CPL AO FITC

A análise da conjugação da CpL ao FITC foi realizada pela leitura da absorbância a 280 nm das frações obtidas pela cromatografia e revelou a presença da lectina conjugada na fração 4 referente à amostra 5:1, nas frações 4 e 5 da amostra 10:1 e nas frações 5, 6 e 7 da amostra 20:1 como mostra o cromatograma na figura 4.

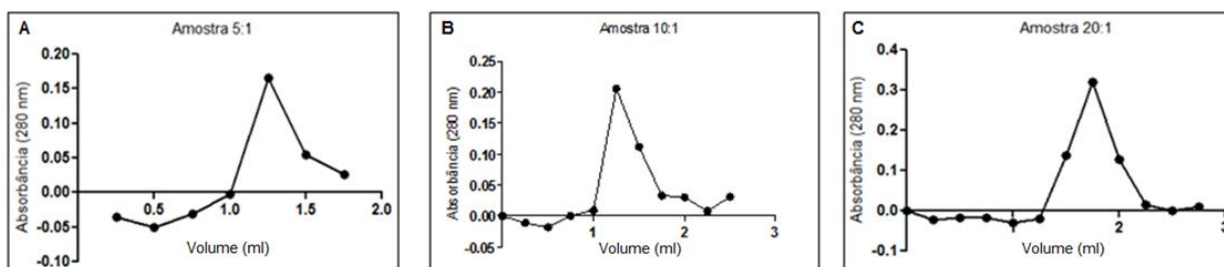


Figura 4. Os cromatogramas mostram as frações que contêm a lectina conjugada com leitura de absorbância em 280 nm. A purificação foi realizada em coluna de Sephadex G-25 equilibrada e eluída em tampão PBS com pH 7,4. Os cromatogramas A, B e C representam as amostras 5:1, 10:1 e 20:1, respectivamente.

4.2.1 Estimativa da razão molar da lectina conjugada ao FITC referente às amostras 5:1; 10:1 e 20:1

A absorbância do *pool* de lectina conjugada CpL/FITC das amostras 5:1; 10:1 e 20:1 também foi medida por espectrofotometria, os valores são mostrados na tabela 4.

Tabela 4. Representa a razão molar de proteínas conjugadas (FITC/CpL) obtidas das amostras 5:1; 10:1 e 20:1.

	FITC/CpL
Amostra 5:1	1,4
Amostra 10:1	1,1
Amostra 20:1	4

Conhecendo as razões molares do FITC conjugado à proteína (F/P) das amostras 5:1; 10:1 e 20:1, determinamos a amostra 20:1 como a fração molar mais

adequada para os experimentos de marcação, pois demonstra uma relação de 4 mol de FITC/mol de proteína.

4.3 ANÁLISE DAS CULTURAS CELULARES MARCADAS COM AS LECTINAS CPL, WGA E CON A

4.3.1 Ensaio de marcação dos eritrócitos

O resultado deste ensaio revelou marcação mais eficiente diante da concentração de 1mg/ml, assim determinamos o uso desta concentração para os posteriores ensaios de marcação celular.

Analisando as imagens quanto à variação na marcação das lectinas é possível perceber marcação mais evidente das lectinas WGA e Con A (Figura 5 B e C) quando comparadas com a marcação da lectina CpL (Figura 5 A). É possível perceber também o processo de aglutinação proveniente da ligação das lectinas CpL e Con A (Figura 5 A e C), respectivamente.

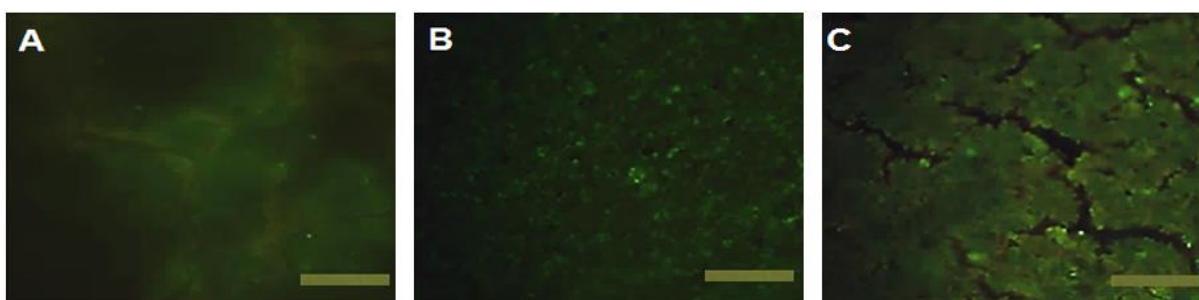


Figura 5. Eritrócitos humanos do tipo A+ aglutinados e marcados com as lectinas CpL, WGA e Con A em A, B e C, respectivamente. A barra corresponde a 50 μ m.

Além disso, este ensaio permitiu destacar que o conjugado CpL/FITC foi capaz de induzir a atividade hemaglutinante indicando que a reação de ligação ao FITC ocorreu conforme o esperado entre os grupos amina livres da proteína não afetando portanto, sítios relacionados ao reconhecimento a carboidratos específicos da lectina CpL.

4.3.2 Análise por microscopia de fluorescência das culturas celulares marcadas com as lectinas CpL, WGA e Con A

Os resultados da microscopia de fluorescência revelaram a capacidade das lectinas CpL, WGA e Con A de marcarem glicoconjugados de superfície das membranas celulares das células de cultura primária murina (astrócitos) e das células de linhagem de glioma murino (C6) de modo que as imagens apontam diferentes graus de marcação.

A lectina CpL apresentou marcação tanto para os astrócitos (Figura 7 A) como para as células C6 (Figura 7 C).

Em contrapartida, os astrócitos marcados com a CpL parecem estar em processo de aglutinação, pois é possível observar uma forte interação entre as células formando uma espécie de rede celular, característica comum do fenômeno de aglutinação (Figura 7 A), e no grupo referente ao controle tal fenômeno não é observado, confirmando a indução da aglutinação pela lectina (Figura 7 B). Já, as células C6 marcadas com a CpL demonstram uma morfologia atípica mostrando-se arredondadas (Figura 7 C), perfil diferente do fenótipo natural destas células (Figura 6 B) e nos grupos em que houve adição do carboidrato inibidor (D-galactose) houve redução da fluorescência, não permitindo mais a visualização da sua morfologia (Figura 7 D).

A Aglutinina do Gérmen de Trigo (WGA), assim como a lectina CpL também não apresentou diferença na marcação e sim marcação positiva similar nos dois tipos celulares e ainda, foi capaz de induzir alteração na morfologia celular em ambas as culturas celulares, alterando a morfologia fusiforme natural destas células

(Figura 6 A) e (Figura 6 B) para uma morfologia arredondada atípica (Figura 8 A) e (Figura 8 C). Nos grupos em que houve a presença do carboidrato inibidor (β -*N*-acetilglucosamina) houve redução da marcação, tanto nos astrócitos (Figura 8 B) quanto nas células C6 (Figura 8 D).

A marcação com a lectina Con A não marcou de forma efetiva os astrócitos (Figuras 9 A), de modo que esta marcação se assemelha com o grupo controle onde houve a adição do carboidrato inibidor, glicose (Figura 9 B). Por outro lado, as células C6 se apresentaram nitidamente marcadas (Figura 9 C), havendo bloqueio da marcação em presença da glicose (Figura 9 D).

Na marcação das células C6 (Figura 9 C) é possível a visualização da forma celular e das interações que constituem o tapete celular diferente da marcação dos astrócitos (Figura 9 A), indicando que a superfície da membrana das células C6 apresenta maior constituição de glicoconjugados derivados da glicose ou manose do que a membrana dos astrócitos. Entretanto, quando se avalia os grupos em que houve adição do carboidrato inibidor, glicose (Figura 9 D) não é mais possível observar tais características e sim alguns pontos com fluorescência indicando que na presença deste carboidrato há uma competição aos domínios de ligação da lectina Con A entre os glicoconjugados da membrana celular e a glicose, assim a Con A não mais se liga aos carboidratos presentes na membrana celular e sim ao seu carboidrato específico, a glicose.

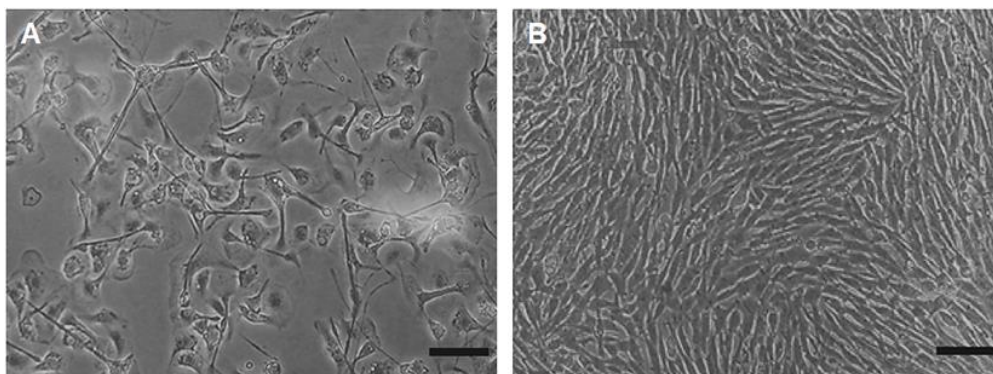


Figura 6. A imagem exibe a forma celular das culturas. Em A, a imagem representa a cultura primária (astrócitos) e em B, a linhagem celular derivada glioma murino (C6). A barra corresponde a 50 μ m.

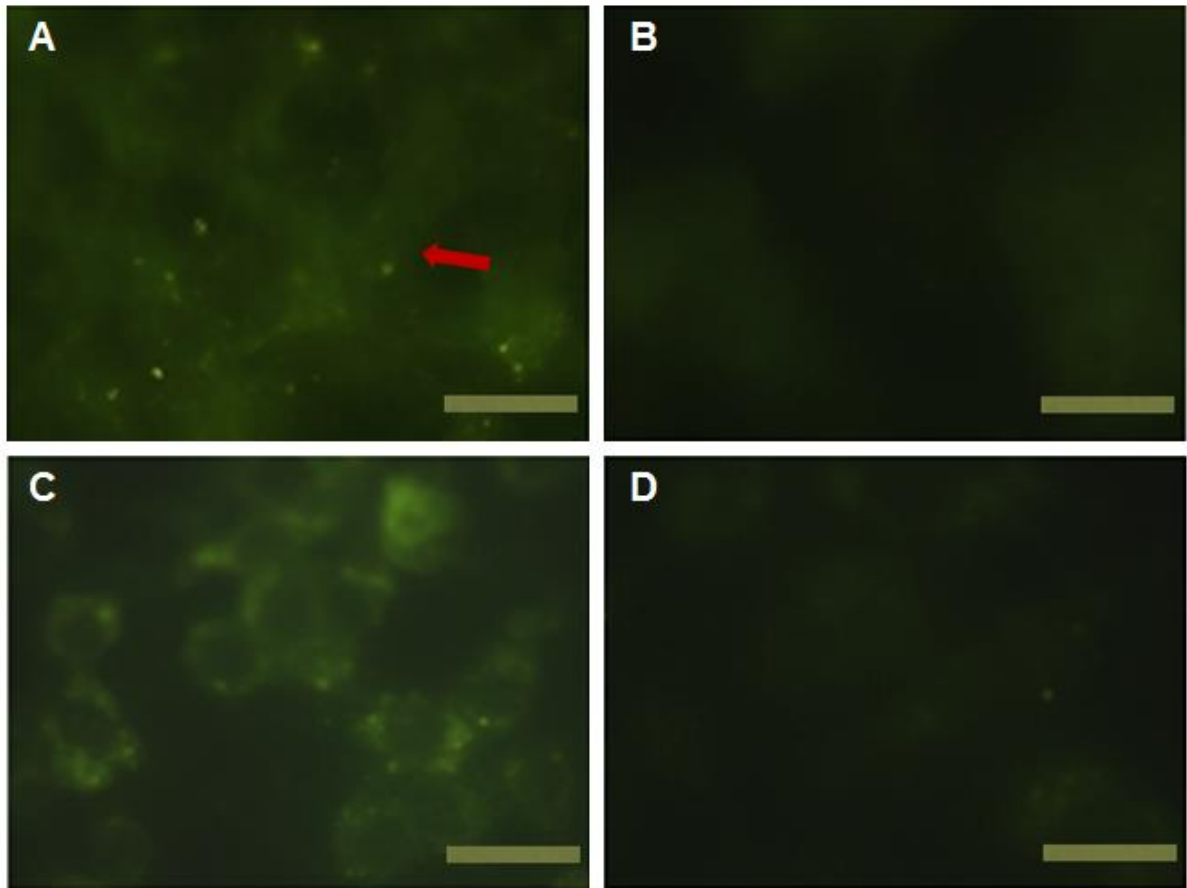


Figura 7. Avaliação da marcação por microscopia de fluorescência. Em A e B: Astrócitos marcados com a lectina CpL – grupo amostral e grupo bloqueio (D-galactose), respectivamente; a seta em vermelho indica o processo de aglutinação. Em C e D: C6 marcadas com a lectina CpL – grupo amostral e grupo bloqueio (D-galactose), respectivamente. A barra corresponde a 50 μ m.

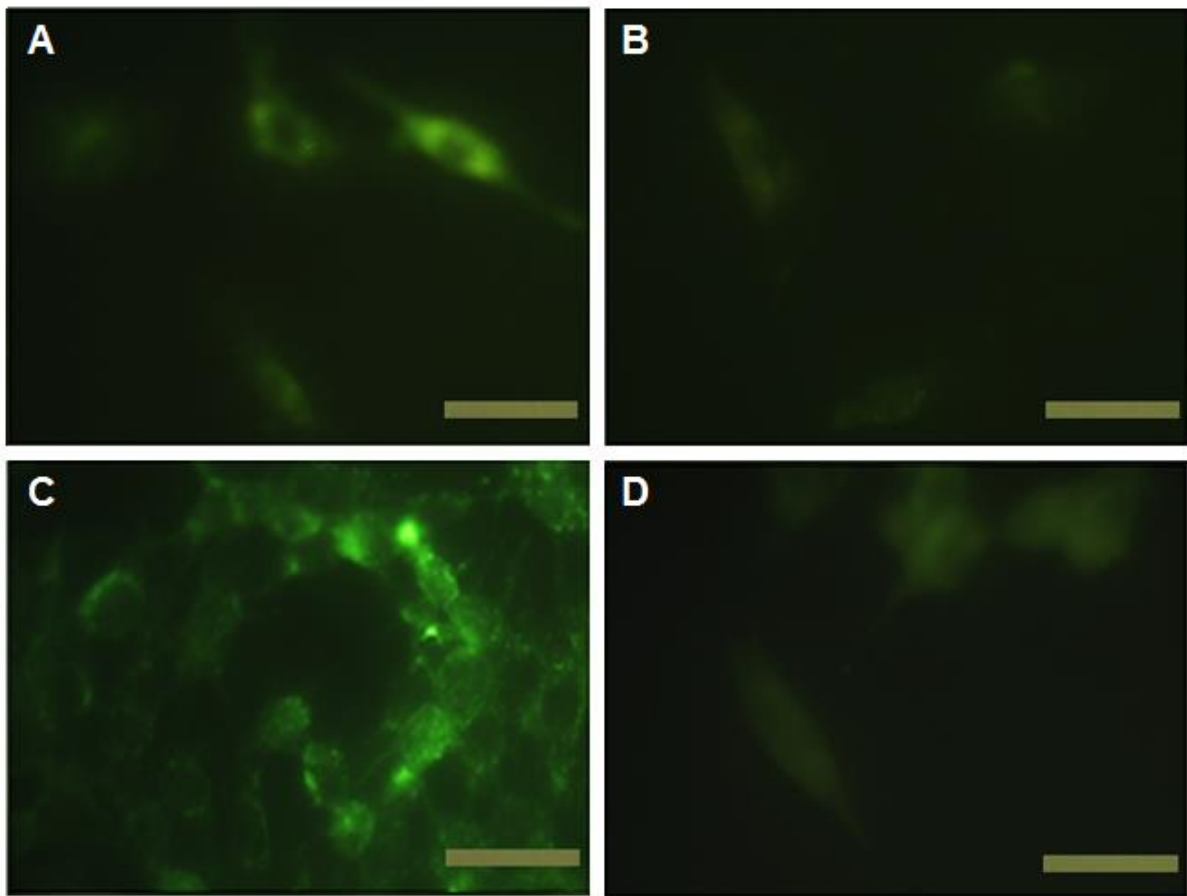


Figura 8. Avaliação da marcação por microscopia de fluorescência. Em A e B: Astrócitos marcados com a lectina WGA – grupo amostral e grupo bloqueio (β -*N*-acetilglucosamina), respectivamente. Em C e D: C6 marcadas com a lectina WGA – grupo amostral e grupo bloqueio (β -*N*-acetilglucosamina), respectivamente. A barra corresponde a 50 μ m.

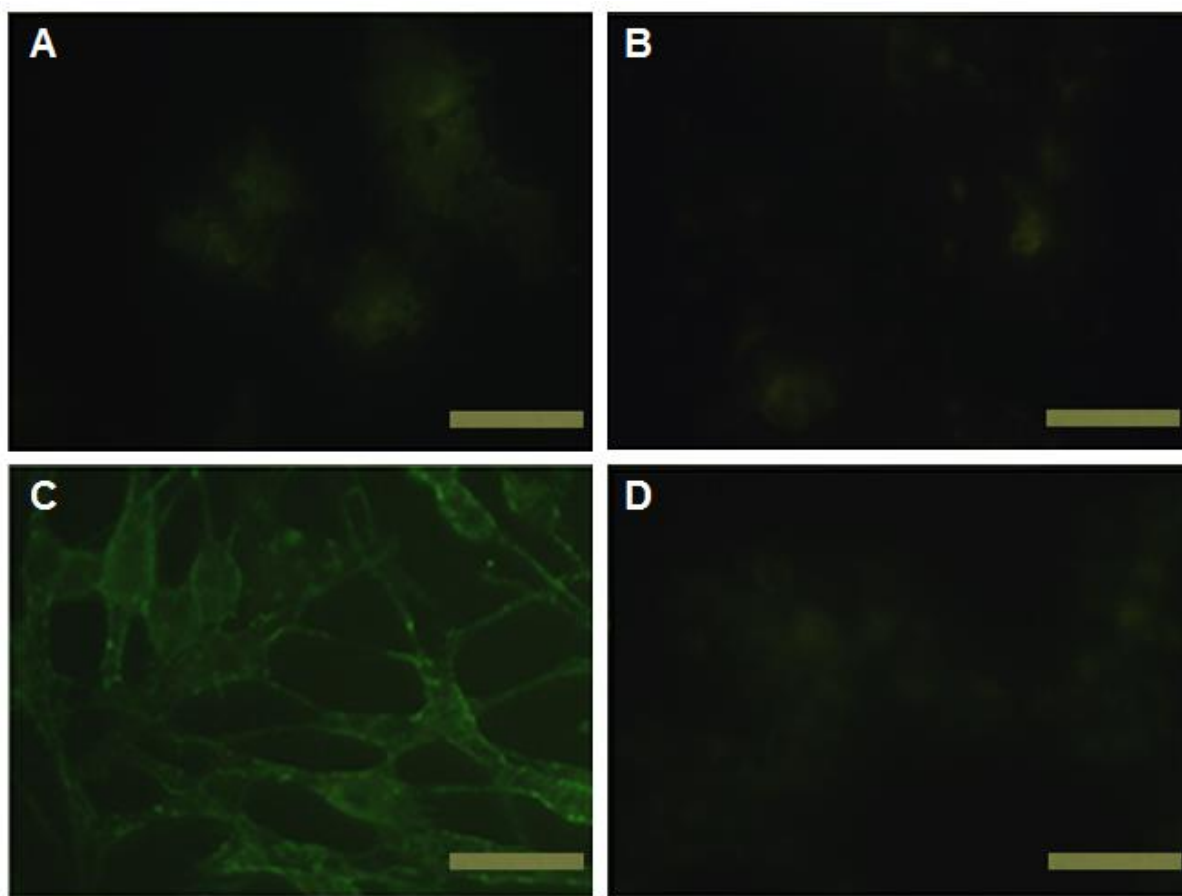


Figura 9. Avaliação da marcação por microscopia de fluorescência. Em A e B: Astrócitos marcados com a lectina Con A – grupo amostral e grupo bloqueio (glicose), respectivamente. Em C e D: C6 marcadas com a lectina Con A – grupo amostral e grupo bloqueio (glicose), respectivamente. A barra corresponde a 50 µm.

4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA POR CITOMETRIA DE FLUXO DAS CULTURAS CELULARES MARCADAS COM AS LECTINAS CPL, WGA E CON A

Os resultados da citometria para os experimentos de marcação com as lectinas CpL, WGA e Con A nas células de cultura primária murina (astrócitos) e de linhagem celular murina (C6) permitiram a obtenção do percentual de células marcadas e da mediana de fluorescência referente aos grupos controles e aos grupos amostrais. Por ser o dado mais importante, destacamos apenas a mediana de fluorescência, como mostra a figura 10.

Os astrócitos marcados com a lectina CpL (Figura 10 A) apresentaram significativa mediana de emissão de fluorescência de 12,64 (variação 12,41 – 12,86; n=4) comparados com as células C6 que apresentaram mediana de emissão de fluorescência de 10,00 (variação 10,00 – 11,14; n=4).

Os astrócitos marcados com a lectina WGA (Figura 10 B) apresentaram mediana de emissão de fluorescência de 333,82 (variação 327,81 – 352,27; n=4). Já as células C6, também marcadas com a lectina WGA (Figura 10 B), apresentaram importante diferença estatística comparados com os astrócitos com mediana de emissão de fluorescência de 697,83 (variação 697,83 – 723,39; n=4).

O grupo que representa os astrócitos marcados com a lectina Con A (Figura 10 C) exibiu mediana de fluorescência de 54,25 (variação 52,33 – 54,25; n=4). Em contrapartida, a marcação da lectina Con A nas células C6 apresentou valores muito superiores em relação à marcação com os astrócitos (Figura 10 C) com mediana de fluorescência de 5424,69 (variação 5232,99 – 5424,69; n=4).

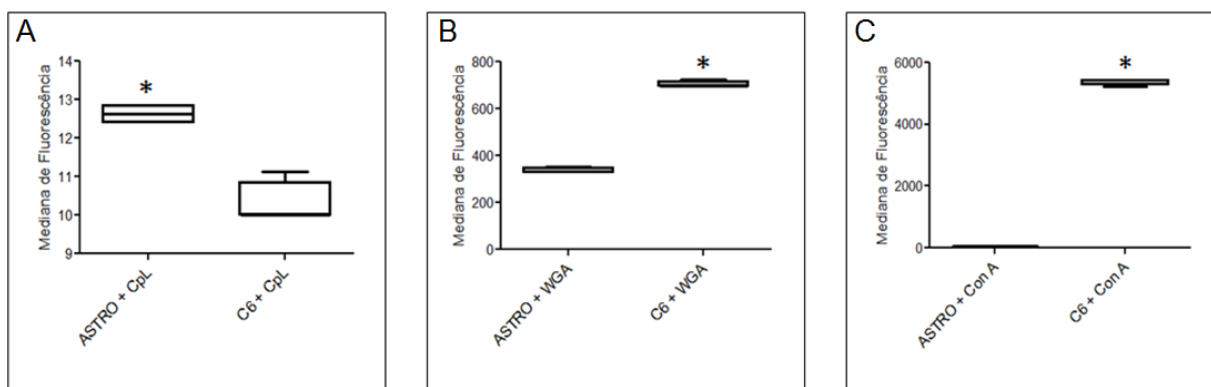


Figura 10. Avaliação por citometria de fluxo da marcação de astrócitos e células C6 com as lectinas (A) CpL, (B) WGA e (C) Con A. A comparação entre os grupos foi realizada através do teste não paramétrico Mann-Whitney; os asteriscos representam significância estatística ($p < 0,05$).

Em síntese, o resultado do experimento de marcação com a lectina CpL ao contrário das lectinas WGA e Con A apresentou marcação com diferença estatística para os astrócitos, com emissão apenas 1,2 vezes maior em relação às células C6.

Portanto, a CpL mostrou baixo desempenho em diferenciar astrócitos das células C6 quando avaliada pela microscopia de fluorescência.

A lectina WGA embora tenha apresentado marcação significativa em relação às células C6, onde exibiu o dobro de emissão quando comparadas com os astrócitos, não pode ser considerada um bom marcador, pois, assim como a lectina CpL, não diferenciou bem um tipo celular do outro através da microscopia de fluorescência.

Em contrapartida, a lectina Con A revelou marcação eficiente quando avaliada tanto pela microscopia de fluorescência quanto pela citometria de fluxo em relação às células C6, exibindo mediana de fluorescência cerca de 99 vezes superior aos astrócitos. Desta forma, é possível inferir que as lectinas CpL e WGA diferente da lectina Con A não são capazes de reconhecer diferenças importantes no perfil de glicoconjugados presentes nas membranas das células aqui apresentadas, diferenças que são fundamentais em estudos de diagnóstico.

5 DISCUSSÃO

Como já mencionado anteriormente, não há trabalhos na literatura sobre a lectina CpL com ênfase no seu potencial como marcador tumoral, sendo este portanto, um estudo inédito e original. Mas, lectinas como a Cramoll 3 e a PNA também específicas para a galactose, mostraram ser marcadores histoquímicos úteis para o diagnóstico do câncer de próstata, capazes de identificar alterações importantes no tecido neoplásico (LIMA *et al.*, 2010).

Entretanto, a CpL ao contrário das lectinas Cramoll 3 e PNA não pode ser considerada um bom marcador para as linhagens abordadas neste estudo, pois, o resultado da microscopia de fluorescência exibiu marcação positiva para ambas as células (astrócitos e C6) e, mesmo que o resultado da marcação da CpL na citometria tenha apresentado diferença estatística com emissão 1,2 vezes maior em relação aos astrócitos, esta lectina não pode ser considerada um marcador imuno-

citoquímico eficiente, pois é incapaz de diferenciar um tipo celular do outro com uso apenas da técnica de microscopia de fluorescência.

Por outro lado, a CpL assim como a WGA exibiu alterações morfológicas nas células C6, e com base do que se conhece na literatura, plantas do gênero *Crotalaria* apresentam vários relatos quanto à sua toxicidade. Este gênero possui mais de seiscentas espécies distribuídas em todo o globo e mais de quarenta no Brasil, as variedades tóxicas mais conhecidas são *C. spectabilis*, *C. crispata*, *C. retusa*, *C. dura* e *C. globifera* (HONÓRIO JÚNIOR *et al.*, 2010), *C. incana* (QUEIROZ *et al.*, 2013).

Em adição a isto, a literatura está repleta de estudos que enfatizam a citotoxicidade de diversas lectinas, como o de Nunes *et al.* (2011), que mostra o potencial citotóxico da lectina de *Bothrops leucurus* (BIL) por indução da apoptose nas linhagens tumorais eritroleucêmica Ph+ (K562), de carcinoma laríngeo humano (Hep-2) e carcinoma mucoepidermóide de pulmão (NCI-H292). Com base nisso, é plausível inferir que a CpL pode ter atuado como possível indutora de toxicidade para as células C6, evidenciada pela alteração da morfologia celular atípica.

A lectina de *Crotalaria pallida* CpL não apresenta estudos quanto ao seu potencial citotóxico, porém existem alguns poucos estudos na literatura com lectinas do gênero *Crotalaria* que podem corroborar com os resultados aqui apresentados, a exemplo do estudo de Pacheco & Silva-López (2010) que isolaram uma lectina da *C. juncea* e a imobilizaram para purificação de partículas do vírus bovino da diarreia, e que mostrou ser uma potente inibidora do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), um importante mediador na reparação do dano vascular. Pando *et al.* (2004), com a lectina de *C. paulina*, demonstraram a capacidade desta, em inibir o crescimento *in vitro* de bactérias causadoras de infecções em culturas de feijões e frutas.

Sabe-se que mudanças nos níveis do ácido siálico é uma característica importante para a detecção de algumas enfermidades com uso de lectinas. Experimentos mostraram o aumento na marcação pela lectina WGA em células tumorais e este fenômeno é decorrente do aumento do teor de ácido siálico na superfície da membrana destas células (VARKI *et al.*, 2009). Os ácidos siálicos são

uma família de nove monossacáridos de carbono derivado de ácido neuramínico e já foram encontradas na natureza mais de 50 formas (LI e CHEN, 2012).

Resíduos de ácido siálico têm papel central em muitos processos fisiológicos e patológicos, incluindo a embriogênese do sistema nervoso, câncer, metástase, dentre outros (ANGATA e VARKI, 2002). Além disso, têm papel fundamental na finalização da síntese de glicanos por bloquear a adição de outros carboidratos.

Diversos estudos mostram que tecidos cancerígenos contêm maior quantidade de ácido siálico e/ou maior atividade da sialiltransferase, enzima envolvida na sua biossíntese, quando comparados com tecidos normais (BANDEIRA *et al.*, 2011). Porém, os resultados deste estudo com a lectina WGA não corrobora com tais citações em relação às células investigadas, pois, as imagens exibiram marcação semelhante tanto nas células C6 quanto para os astrócitos. Em contrapartida, mesmo que os resultados decorrentes da citometria tenham revelado diferença na mediana de emissão cerca de 2 vezes superior no grupo amostral das células C6 em relação aos astrócitos, tal diferença ainda é pequena para que a lectina WGA seja considerada um marcador confiável para diferenciar células normais das células de glioma. Isto sugere que tanto as células C6 quanto os astrócitos apresentam perfil semelhante de carboidratos da família dos ácidos siálicos e da β -N-acetilglucosamina, ambos específicos para a WGA.

As imagens também demonstraram alteração na morfologia das células C6 e dos astrócitos exibindo formato circular atípico. Esta alteração pode ser decorrente da exposição à lectina, pois algumas lectinas, inclusive a WGA, apresentam estudos clássicos na literatura quanto ao seu potencial citotóxico. Ganguly e Das (1994), por exemplo, mostraram o potencial citotóxico das lectinas PHA, SBA e WGA em células de linfoma ascítico murino. Kiss *et al.* (1997) avaliaram cinco lectinas quanto ao perfil citotóxico das linhagens celulares de câncer colorretal humano (LoVo, HCT-15 e SW837), mas apenas a Con A e a WGA foram capazes de inibir o crescimento celular. Mais recentemente, Dalla Pellegrina *et al.* (2009) confirmaram a citotoxicidade da WGA na linhagem Caco-2 (adenocarcinoma caucasiano de cólon humano) através da alteração da integridade da camada do epitélio.

Diante disto, e com base no que relata Willingham (1999) em que o dano celular não é caracterizado apenas pela destruição da célula, mas também em

alterações morfológicas que servem de indícios da toxicidade de uma substância, é possível sugerir um potencial efeito citotóxico das lectinas WGA e CpL, pois quando presentes, as células adquiriram um fenótipo atípico.

Levando em consideração que modificações na morfologia celular é um indício de dano, possivelmente as células adquiriram esta forma como modo de proteção e manutenção de sua viabilidade frente à exposição a estas lectinas. Isso corrobora com Góes (2013) que diz que modificações relevantes na constituição/estrutura da membrana plasmática são responsáveis por alterações morfológicas e a própria morte celular, seja ela por apoptose ou por necrose, mostra mudanças marcantes na forma, dimensões, inclusões citoplasmáticas e estruturas celulares.

A lectina Con A ao contrário das lectinas CpL e WGA apresentou capacidade distinta de reconhecimento das células em estudo. Os resultados obtidos na microscopia de fluorescência referentes à marcação com a lectina Con A indicam que o glioma apresenta um perfil fenotípico em glicoconjugados de superfície celular modificados para glicose e manose, ou seja, modificados quanto à síntese ou expressão destes carboidratos, pois as células derivadas da linhagem de glioma murino (C6) apresentaram marcação positiva para a lectina Con A específica para estes carboidratos, diferente do que ocorreu em relação à marcação com as células de cultura primária (astrócitos).

Os resultados obtidos na citometria corroboram com as análises da microscopia, pois ambos apresentaram eficiente marcação da Con A em relação às células C6, indicando que esta lectina possui a habilidade de reconhecer e distinguir significativamente glicoconjugados presentes na membrana das células C6, característica essencial para ferramentas úteis em diagnóstico.

A marcação nas células C6 foi capaz de definir a forma da célula, mostrando que há uma distribuição quase uniforme destes carboidratos ao longo de toda a superfície da membrana celular diferente da marcação com os astrócitos, onde não se observa a forma celular e sim uma marcação semelhante a uma mancha indicando que a membrana das células de cultura primária não apresenta uma distribuição importante de porções de carboidratos específicos para a Con A em sua superfície.

Em resumo, a Con A mostrou ser um marcador capaz de diferenciar as células da linhagem C6 de glioma murino das células de cultura primária murina, o que corrobora com Padhiar *et al.* (2015) que exibiram forte marcação da lectina Con A em tecidos de astrocitoma humano, além disso, a marcação com a lectina Con A permitiu a investigação da presença da ramificação do β 1-6-GlcNAc e sua enzima GnT-V que desempenham papel crucial na gliomagênese em células de linhagem humana (U-87 e U-251).

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho analisou o potencial de marcação das lectinas CpL, WGA e Con A e os resultados permitem concluir que:

- A lectina CpL foi conjugada com sucesso ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína – FITC e a análise da reação permitiu definir o rendimento molar adequado para os experimentos;
- As lectinas CpL e WGA foram capazes de marcar tanto as células de cultura primária quanto as células de glioma murino. Em contrapartida, a lectina Con A apresentou marcação apenas para as células de glioma murino;
- Dentre as lectinas analisadas, a Con A foi à única que apresentou potencial como marcador para diferenciar as células de cultura primária das células de glioma murino, exibindo mediana de fluorescência de 99 vezes superior em relação aos astrócitos. Assim, podemos concluir que as células da linhagem C6 apresentam maior expressão dos carboidratos glicose e manose, que promovem o reconhecimento pela lectina Con A, fazendo desta um marcador importante para diferenciar estas células das células de cultura primária murina.

7 PERSPECTIVA

Outros trabalhos serão necessários para verificar a alteração morfológica apresentada pelas células após a incubação com as lectinas CpL e WGA e ainda pretendemos realizar a marcação nas demais células da glia e numa linhagem humana, a fim de obter mais um resultado para corroborar com os achados aqui apresentados.

8 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5ª ed., Porto Alegre: Artmed, p. 1268, 2004.

ANGATA, T.; VARKI, A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 439–469, 2002.

AUB, J. C.; TIESLAU, C.; LANKESTER, A. Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 50, p. 613–619, 1963.

AUER, R. N.; DEL-MAESTRO, R. F.; ANDERSON, R. A simple and reproducible experimental *in vivo* glioma model. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 8, p. 325 – 331, 1981.

BABAL, P.; JANECA, P.; CERNA, A.; KHOLOVA, I.; BRABENCOVA, E. Neoplastic transformation of the thyroid gland is accompanied by changes in cellular sialylation. **Acta Histochemica**, v.108 p. 133 – 140, 2006.

BADKE, G. L.; PANAGOPOULOS, A. T.; DE AGUIAR, G. B.; VEIGA, J. C. E. Glioblastoma multiforme em idosos: uma revisão sobre seu tratamento com ênfase na abordagem cirúrgica. **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia**, v. 33, p. 45 – 51, 2014.

BANDEIRA, A. R. G.; BRANDÃO, J. M.; DE ALBUQUERQUE, J. L.; VASCONCELOS, C. L. B.; CAVALCANTI, S. A. J.; BELTRÃO, E. I. C. Avaliação de lectinas conjugadas a criptatos de európio (III) em tecidos mamários humanos empregados em histoquímica. **Revista Saúde Com.**, v. 7, p. 100 – 108, 2011.

BENDA, P.; LIGHTBODY, J.; SATO, G.; LEVINE, L.; SWEET, W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science**, v. 161, p. 370 – 371, 1968.

BJERKVIG, R.; TYSNES, B. B.; ABOODY, K. S.; NAJBAUER, J.; TERZIS, A. J. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. **Nature**, v. 5, p. 899 – 904, 2005.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.

BREIER, A.; BARANCIK, M.; SULOVA, Z.; UHRIK, B. P. Glycoprotein-implications of metabolism of neoplastic cells and cancer therapy. **Current Cancer Drug Targets**, v. 5, p. 457– 468, 2005.

BRISMAR, T. Physiology of transformed glial cells. **Glia**, v.15, p. 231 – 243, 1995.

CASTANHEIRA, L. E. **Purificação e caracterização química e funcional de uma lectina tipo-C ligante de D-galactose da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*)**. 72 f. il. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

CHESLER, D. A.; BERGER, M. S.; QUINONES-HINOJOSA, A. The potential origin of glioblastoma initiating cells. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 190 – 205, 2013.

CHICOINE, M. R.; SILBERGELD, D. L. Invading C6 glioma cells maintaining tumorigenicity. **Journal of Neurosurgery**, v. 83, p. 665 – 671, 1995.

CHOU, Y. H.; KHUON, S.; HERRMANN, H.; GOLDMAN, R. D. Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, p. 1468 – 1478, 2003.

COOKSON, M. R.; PENTREATH, V. W. Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. **Toxicology In Vitro**, v. 8, p. 351 – 359, 1994.

CORREIA, J.; ALEXANDRE, J. C.; DIAS, C.; MATOS, L. C.; MARTINS, I.; RIBEIRO, P.; VAZ, A.; MÓS, M.; LEMOS, J.; CAPELO, J.; MARQUES, C.; REBELO, O.; HENRIQUES, P. P. Glioblastoma multiforme – a propósito de um caso clínico. **Casos Clínicos**, v.16, p. 27 – 32, 2009.

CRUZ, P. H.; CAMPOS, E. P.; MARTÍNEZ, L. M.; ORTIZ, B.; MARTÍNEZ, G. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 24, p. 21 – 27, 2005.

CUMMINGS, R. D.; ETZLER, M. E. **Essentials of glycobiology**. 2ª. ed., Nova York: Cold Spring Harbor, 2009. 784 p.

DALLA PELLEGRINA, C. et al. Effects of wheat germ agglutinin on human gastrointestinal epithelium: insights from an experimental model of immune/epithelial cell interaction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 237, p. 146 – 153, 2009.

DE AGUIAR, C. M. et al. Demonstração de neurônios e células gliais em encéfalo de camundongos por meio de diferentes métodos de coloração. In: 57ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA – SBPC, 2005, Fortaleza. **Anais Eletrônicos...** Fortaleza: SBPC. Disponível em: <http://www.sbpnet.org.br/livro/57ra/programas/jnic/RESUMOS/res_15891.html>. Acesso em: 20 nov 2014.

DENNIS, J. W.; LAFERTE, S.; FUKUDA, M.; DELL, A.; CARVER, J. P. Asn-linked oligosaccharides in lectin-resistant tumor-cell mutants with varying metastatic potential. **European Journal of Biochemistry**, v.161, p. 359 – 373, 1986.

DE PIER, M. G. Imunofenotipagem das leucemias. **Anais da Academia de Ciências e Tecnologia de São Jose do Rio Preto**, 2008.

DIXSON, T. On the active principle of castor oil. **Archive of Medico-Chirurgical Transactions**, v.70, p. 108 – 116, 1887.

DUBOIS, B.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J.; VAN DAMME, J.; OPDENAKKER, G. Regulation of gelatinase B (MMP-9) in leukocytes by plant lectins. **FEBS Letters**, v. 427, p. 275 – 278, 1998.

DUCRAY, F. Biology of gliomas. **Cancer/Radiothérapie**, v. 12, p. 663 – 668, 2008.

EBE, Y. et al. Application of lectin microarray to crude samples: differential glycan profiling of lec mutants. **Journal of Biochemistry**, v. 139, p. 323 – 327, 2006.

EHRlich, P. Experimentelle Untersuchungen über Immunität, II: Euber Abrin. **Deutsch Medicine and Wochenschrift**, v. 17, p. 1218 – 1219, 1891.

FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene *C-MYC* no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, p. 165 – 171, 2006.

FILHO, G. B; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. **Bogliolo Patologia Geral**. 3ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 380 p.

FLORES, A. S. ***Crotalaria* In: Lista de Espécies da Flora do Brasil**, 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB022902>>. Acesso em jun. 2014.

FRITZ, P.; TUCZEK, H. V.; HOENES, J.; MISCHLINSKI, A.; GRAU, A.; HAGE, C.; KOENIG, A.; WEGNER, G. Use of lectin-immunohistochemistry in joint diseases. **Acta Histochemica Supplementband**, v. 6, p. 277 – 283, 1998.

FURNARI, F. B. et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & Development**, v. 21, p. 2683 – 2710, 2007.

GABIUS, H. J. Glycohistochemistry: the why and how of detection and localization of endogenous lectins. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 30, p. 3 – 31, 2001.

GANGULY, C.; DAS, S. Plant lectins as inhibitors of tumour growth and modulators of host immune response. **Chemotherapy**, v. 40, p. 272 – 278, 1994.

GARCIA, J. M.; KAWAKITA, K.; MIOTTO, S. T. S.; DE SOUZA, M. C. O gênero *Crotalaria* L. (*Leguminosae*, *Faboideae*, *Crotalarieae*) na planície de inundação do Alto Rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, p. 209 – 226, 2013.

GÓES, L. M. **Caracterização dos efeitos tóxicos do 1,2- dihidroxibenzeno em células originadas do sistema nervoso: investigação do efeito protetor de derivados de plantas**. 67 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, H. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, p. 1 – 29, 2011.

HIRABAYASHI, J. Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. **Journal Glycoconjugate**, v. 21, p. 35 – 40, 2004.

HIRABAYASHI, J. Concept, strategy and realization of lectin-based glycan profiling. **The Journal Biochemistry**, v. 144, p. 139 – 147, 2008.

HONÓRIO JÚNIOR, J. E. R. H. et al. Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 453 – 458, 2010.

HU, S.; WONG, D. T. Lectin microarray. **PROTEOMICS - Clinical Applications**, v. 3, p. 148 – 154, 2009.

INCA. Coordenação nacional de controle de tabagismo – CONTAPP. "**Falando sobre câncer e seus fatores de risco**". Rio de Janeiro, 1996. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=81>. Acesso em: 12 dez 2014.

INCA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf. Acesso em: 19 nov 2014.

INCA. **Diretrizes para a vigilância do câncer relacionado ao trabalho**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/diretrizes_vigilancia_cancer_trabalho.pdf>. Acesso em: 12 jun de 2014.

INCA. **Revista rede câncer**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/revistaredecancer/site/home/n17/revista_17. Acesso em: 21 nov 2014.

INCA. **Estimativa 2014: incidência de câncer no brasil**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>. Acesso em: 21 nov 2014.

IPEA. **Biodiversidade - Nossos bosques têm mais vida**, 2006. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&view=article&id=965:reportagens-materias&Itemid=39>. Acesso em jun 2014.

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

KISS, R. et al. *In vitro* influence of *Phaseolus vulgaris*, *Griffonia simplicifolia*, concanavalin A, wheat germ, and peanut agglutinins on HCT-15, LoVo, and SW837 human colorectal cancer cell growth. **Gut**, v. 40, p. 253 – 261, 1997.

KOMPELLA, U. B.; LEE, V. H. L. Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: design considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 211 – 245, 2001.

KUMADA, Y.; OHIGASHI, Y.; EMORI, Y.; IMAMURA, K.; OMURA, Y.; KISHIMOTO, M. Improved lectin ELISA for glycosylation analysis of biomarkers using PS-tag-fused single-chain Fv. **Journal of Immunological Methods**, v. 385, p. 15 – 22, 2012.

LAACK, E. et al. Lectin histochemistry of resected adenocarcinoma of the lung *Helix pomatia* agglutinin binding is an independent prognostic factor. **American Journal of Pathology**, v. 160, p. 1001 – 1008, 2002.

LEHLE, L.; STRAHL, S.; TANNER, W. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 45, p. 6802 – 6818, 2006.

LAL, P. G.; GHIRNIKAR, R. S.; ENG, L. F.; Astrocyte-astrocytoma cell line interactions in culture. **Journal Neuroscience Research**, v. 44, p. 216 – 222, 1996.

LEONG, A. S. Y.; LEE, A. K. C. Biological indices in the assessment of breast cancer. **Clinical Molecular Pathology**, v. 48, p. 221 – 238, 1995.

LI, Y.; CHEN, X. Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, p. 887 – 905, 2012.

LIMA, R. M. F. **Caracterização Fenotípica de Esp12, uma Nova Linhagem de Células Tumorais de Glioblastoma Humano, e Desenvolvimento de um Modelo *In Vitro* para Avaliar a Resistência de Gliomas a Quimioterápicos.** 170 f. il. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Annual Review in Biochemistry.** v. 55, p. 35 – 67, 1986.

LIMA, A. L. R. et al. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology,** v 2010, p. 1 – 6, 2010.

LORENZI, T. **Manual de hematologia.** 3ª ed., Rio de Janeiro: Medsi, p. 655, 2003.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathologica,** v.114, p. 97–109, 2007.

LU, C.; SHERVINGTON, A. Chemoresistance in gliomas. **Molecular and Cellular Biochemistry,** v. 312, p. 71 – 80, 2008.

LUCENA, R. C. G.; DE MELLO, R. J. V.; LESSA, J. R.; CAVALCANTE, G. M.; RIBEIRO, M. Correlação clínico-topográfica em glioblastomas multiformes nas síndromes motoras. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria,** v. 64, p. 44 – 445, 2006.

MALKIN, D. The role of *p53* in human cancer. **Journal of Neuro-Oncology,** v. 51, p. 231 – 243, 2001.

MISLOVIČOVÁ, D.; GEMEINER, P.; KOZAROVA, A.; KOŽÁR, T. Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins. **Biologia,** v. 64, p. 1 – 19, 2009.

MIYOSHI, E.; ITO, Y.; MIYOSHI, Y. Involvement of aberrant glycosylation in thyroid cancer. **Journal of Oncology,** p. 1 – 7, 2010.

MOACIR, P.; PIO, L. A. S.; OLIVEIRA, A. C. L.; SOARES, J. D. R. Flow cytometry applied in tissue culture. **Intech Open Access Publisher,** 2012. Disponível em: <<http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/40183.pdf>>. Acesso em: 10 ago 2014.

MOTA, M. H. G. **Lectinas da sub-tribo *Diocleinae* como Ferramentas Histoquímicas**. 108 f. il. Tese (Doutorado em Bioquímica Vegetal) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 168 – 178, 2007.

NEUMANNA, D.; LEHRB, C. M.; LENHOFA, H. P.; KOHLBACHERC, O. Computational modeling of the sugar-lectin interaction. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 437 – 57, 2004.

NIKIFOROVA, M. N.; HAMILTON, R. L. Molecular diagnostics of gliomas. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 135, p. 558 – 568, 2011.

NOBRE, V. M. T. et al. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (fabaceae) em eqüídeos no semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, 2004.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Research**, v. 20, p. 462, 1960.

NUNES, E. S. et al. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**, v. 59, p. 667 – 671, 2012.

OHGAKI, H.; KLEIHUES P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology's**, v. 64, p. 479 – 89, 2005.

OLIVEIRA, P. A. et al. Chemical carcinogenesis. **Academia Brasileira de Ciências**, v.79, p. 593 – 616, 2007.

ONCOGUIA. **Glioblastoma**, 2012. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/glioblastoma/895/293/>>. Acesso em: 20 nov 2014.

PACHECO, J. S.; SILVA-LÓPEZ, R. E. S. Genus *Crotalaria* L. (Leguminosae). **Revista Fitos**, v. 5, p. 1 – 10, 2010.

PADHIAR, A. A. et al. Upregulated β 1-6 branch *N*-glycan marks early gliomagenesis but exhibited biphasic expression in the progression of astrocytic glioma. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, p. 1101 – 1116, 2015.

PANDO, L. A. et al. Purification and characterization of a lectin from *Crotalaria paulina* seeds. **The Protein Journal**, v. 23, p. 437 – 444, 2004.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 347 – 352, 1998.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347 – 352, 1995.

PFEIFFER, S. E.; HERSCHMAN, H. R.; LIGHTBODY, J.; SATO, G. Synthesis by a clonalline of rat glial cells of a protein unique to the nervous system. **Journal of Cellular Physiology**, v. 75, p. 329 – 339, 1970.

PINHEIRO, A. M. et al. Astroglial cells in primary culture: a valid model to study *Neospora caninum* infection in the CNS. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, p. 243 – 247, 2006.

PINTO, L. W.; CHIMELLI, L. Componente oligodendroglial e neuronal em glioblastomas: possível relação com o prognóstico. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 62, p. 1074 – 1078, 2004.

PITTELLA, J. E. H. Biópsia estereotáxica no diagnóstico de tumores cerebrais e lesões não-neoplásicas: indicações, acurácia e dificuldades diagnósticas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, p. 343 – 354, 2008.

PLAVINA, T.; WAKSHULL, E.; HANCOCK, W. S.; HINCAPIE, M. Combination of abundant protein depletion and multilectin affinity chromatography (*M-LAC*) for plasma protein biomarker discovery. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 662–671, 2007.

POTAPENKO, I. O. et al. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. **Molecular Oncology**, v. 4, p. 98 – 118, 2010.

POVINELI, K. L.; FINARDI FILHO, F. The multiple functions of plant lectins. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 24, p.135 – 156, 2002.

QUEIROZ, G. R.; RIBEIRO, R. C. L.; FLAIBAN, K. K. M. C.; BRACARENSE, A. F. R. L.; LISBÔA, J. A. N. Intoxicação espontânea por *Crotalaria incana* em bovinos no norte do Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, p. 823 – 832, 2013.

QUINONES-HINOJOSA, A.; CHAICHANA, K. The human subventricular zone: a source of new cells and a potential source of brain tumors. **Experimental Neurology**, v. 205, p. 313 – 324, 2007.

REGO, E. J. L. **Purificação e Caracterização de uma Lectina Isolada das Sementes de *Crotalaria pallida* Aiton**. 91 f. il. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia, 2000.

REGO, E. J. L.; DE CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; DE OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). **Phytochemistry**, v. 60, p. 44 – 446, 2002.

REYA, T.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F.; WEISSMAN, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, p. 105 – 111, 2001.

RIBEIRO-SILVA, A.; ZUCOLOTO, S. O papel do vírus Epstein-Barr na tumorigênese humana. **Medicina**, v. 36, p. 16 – 23, 2003.

RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CORLETA, H. V. E.; DA SILVA, I. S. B. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, p. 179 – 184, 2001.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. V. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8^a ed. Brasil: Elsevier, p. 1480, 2010.

ROSENFELD, R. et al. A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 415 – 426, 2007.

RUDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate**, v.18, p. 589 – 613, 2001.

SANAI, N.; ALVAREZ - BUYLLA, A.; BERGER, M.S. Neural stem cells and the origin of gliomas. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 811 – 22, 2005.

SANTANA, M. A. **Isolamento, propriedades bioquímicas e estudos biológicos da lectina de sementes da *Macrotyloma auxillare* (E. Meyer)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2004.

SCAPIN, F. **Genética e câncer**, 2013. Disponível em: <http://genetica.ufcspa.edu.br/revisaogenecan.htm>. Acesso em 19 nov. 2014.

SCHUMACHER, U.; BROOKS, S. A.; MESTER, J. The lectin *Helix pomatia* agglutinin as a marker of metastases – clinical and experimental studies. **Anticancer Research**, v. 25, p. 1829 – 1830, 2005.

SCHWARTZBAUM, J. A.; FISHER, J. L.; ALDAPE, K. D.; WRENSCH, M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, p. 1 – 10, 2006.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, p. 433 – 445, 1997.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, p. 949 – 959, 1972.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins — a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**, v. 4, p. 3198 – 3208, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 4, p. 53 – 62, 2004.

SIEBZEHRUBL, F. A.; REYNOLDS, B. A.; VESCOVI, A.; STEINDLER, D. A.; DELEYROLLE, L. P. A the origins of glioma: e pluribus unum?. **Glia**, v. 59, p. 1135 – 1147, 2011.

SILVA, A. C. et al. Monitoramento por imagem de ressonância magnética do crescimento tumoral no modelo c6 de glioblastoma com perspectivas de avaliação da terapia de magnetohipertemia. **Einstein**, v.1, p. 11 – 5, 2012.

SILVA, E. F. **Identificação de Células Leucêmicas por Citometria de Fluxo Utilizando Lectinas Conjugadas**. 102 f. il. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

SILVA, M. R.; DA SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, v. 13, 2000.

SINGH, S. K. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, v. 432, p. 396 – 401, 2004.

SOUSA, G. et al. Glioblastoma multiforme com apresentação multifocal. **Acta Médica Portuguesa**, v. 15, p. 321 – 324, 2002.

SPANOA, D.; HECKC, C.; DE ANTONELLISA, P.; CHRISTOFORI, G.; ZOLLOA, N. Molecular networks that regulate cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, p. 234 – 249, 2012.

STILLMARK, H. **Über Ricin, eines gifiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und anderen *Euphorbiacen***. Dorpat: Facultat der Kaiserlichen Universität, 1988. 63p. Tese (Doutorado em Medicina). Kaiserlichen Universität, Dorpat, 1988.

SUMI, S.; ARAI, K.; KITAHARA, S.; YOSHIDA, K. Serial lectin affinity chromatography demonstrates altered asparagine-linked sugar-chain structures of prostate-specific antigen in human prostate carcinoma. **Journal of Chromatography**, v. 688, p. 9 –14, 1999.

TAO, S. C. et al. Lectin microarrays identify cell-specific and functionally significant cell surface glycan markers. **Glycobiology**, v. 18, p. 761 – 769, 2008.

TRAN, B.; ROSENTHAL, M. A. Review survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 17, p. 417– 421, 2010.

THANH, T. T.; PHUONG, N. T. M.; NHI, N. B.; CHI, V. P. Changes of serum glycoproteins in lung cancer patients. **Journal of Proteomics & Bioinformatics**, v. 1, p. 11 – 16, 2008.

VAN DAMME, E. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. The NeuAc(α -2,6)-Gal/GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark, a type-2 ribosome-inactivating protein with an unusual specificity and structure. **European Journal of Biochemistry**, v. 235, p. 128 – 137, 1996.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.17, p. 575 – 692, 1998.

VARKI, A. et al. **Essentials of Glycobiology**, 2^a ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 207, 2009.

VISVADER, J. E. Cells of origin in cancer. **Nature**, v. 469, p. 20, 2011.

WALKER, N. et al. Isolation and characterization of a secretory component of *Echinococcus multilocularis* Metacestodes potentially involved in modulating the host-parasite interface. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 527 – 536, 2004.

WANG, Y.; JIANG, T. Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management. **Cancer Letters**, v. 331, p. 139 – 146, 2013.

WATKINS, W. M.; MORGAN, W.T.J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, v. 169, p. 825 – 826, 1952.

WILLINGHAM, M. C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 47, p. 1101 – 1109, 1999.

WU, J. T. Serum α -fetoprotein and its lectin reactivity in liver diseases: a review. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 20, p. 98–105, 1990.

WUHRER, M. Glycosylation profiling in clinical proteomics: heading for glycan biomarkers. **Expert Review Proteomics**, v. 4, p. 135 – 136, 2007.

ZANETTI, G. D. **Lectina dos Rizomas de *Arundo Donax* L.: Purificação, Determinação de Características e Propriedades, Imuno-Histoquímica e Separação de suas Isoformas.** 262 f. il. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

ZATTA, P. F.; CUMMINGS, R. D. Lectins and their uses as biotechnological tools. **Biochemical Education**, v. 20, p. 1 – 8, 1992.

ZHENG, H. et al. *p53* and *Pten* control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. **Nature**, v. 455, p. 1129 – 1133, 2008.