

Ingrid Alessandra Victoria Wolin

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DAS LECTINAS
LEGUMINOSAS *Dioclea reflexa* I E *Canavalia brasiliensis* EM
CULTURAS CELULARES DAS LINHAGENS
C6 (*Rattus norvegicus*) E U87 (*Homo sapiens*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Florianópolis, SC
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Wolin, Ingrid Alessandra Victoria
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DAS LECTINAS
LEGUMINOSAS Dioclea reflexa I E Canavalia
brasiliensis EM CULTURAS CELULARES DAS LINHAGENS
C6 (Rattus norvegicus) E U87 (Homo sapiens). /
Ingrid Alessandra Victoria Wolin ; orientador,
Rodrigo Bainy Leal - SC, 2017.
128 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

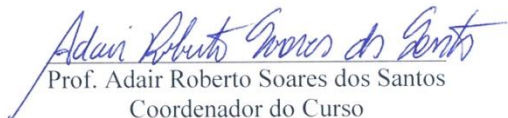
1. Neurociências. 2. Glioma. 3. Lectinas . 4.
DrfL I e ConBr. 5. Mecanismos de muerte celular. I.
Leal, Rodrigo Bainy. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Neurociências. III. Título.

INGRID ALESSANDRA VICTORIA WOLIN

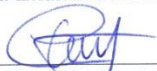
**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DAS
LECTINAS LEGUMINOSAS *DIOCLEA REFLEXA* I E
CANAVALIA BRASILIENSIS EM CULTURAS
CELULARES DAS LINHAGENS C6 (*RATTUS
NORVEGICUS*) E U87 (*HOMO SAPIENS*)”**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina


Florianópolis, 10 de fevereiro de 2017.


Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso


Banca Examinadora:


Prof. Rodrigo Baimy Leal
Orientador – UFSC


Prof. Alexandra Susana Latini
Membro - UFSC


Prof. Débora K. R. Venske
Membro - UFSC


Prof. Evelise Maria Nazari
Membro - UFSC


Dr. Mark William Lopes
Membro - suplente

Este trabalho é dedicado aos meus amados pais, meus irmãos e meu companheiro da vida, Herber, por serem meus portos seguros.

AGRADECIMENTOS

Quando se faz coisas na vida que se convertem numa conquista pessoal mais que em qualquer tipo de meta, a satisfação é infinita. Quero aproveitar este espaço para fazer-lhes partícipe desta alegria e agradecer a todas as pessoas que formaram parte desta jornada. Embora o fato de exibir uma lista de pessoas e/ou entidades carregue um risco de esquecer algumas, mas gostaria de fazer uma menção especial:

Ao Professor Rodrigo Bainy Leal por me possibilitar trabalhar em seu laboratório, concedendo a execução deste trabalho. Pelos ensinamentos que contribuíram para o meu progresso e por seus conselhos diários.

Aos colegas do laboratório Neuroquímica 3: Isabella, Jhônatas, Ana, Priscilla, Josiane, Leandra, Mark, Filipe e Igor, pelas dicas, amizade e convivência. Particularmente ao Jhônatas por me ensinar as técnicas da cultura, a Ana e Priscilla pelos acompanhamentos nos experimentos e a Isabella por sempre estar quando a gente precisa de um sustento! Muito obrigada por tudo, foi um enorme prazer conhecê-los e trabalhar com vocês....

Ao Professor Benildo Sousa de Cavada e seus alunos do Laboratório de Biología Molecular, pela purificação das lectinas.

Aos demais laboratórios, colegas, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica que de diversas formas contribuíram na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, em especial a Nivaldo pela simpatia e conselhos.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), por promover um ótimo ambiente de estudo e trabalho. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A meus pais, Gloria e Victor, por estarem sempre me apoiando e brindando amor, educação e sobre tudo por serem exemplos de responsabilidade, dignidade e integridade. Sem vocês nada seria igual...

A meus irmãos, Julien e Ralph, por sempre estarem quando mais preciso e por fazer parte de cada etapa da minha vida. Infinitamente obrigada Julien por todas as vezes que solucionaste meus problemas informáticos apesar da distância...

A meu grande amigo Alberto, por ser sempre meu conselheiro da vida.

À minha amada família como um todo (avós, tios, tias, primos e primas) por todos os momentos compartilhados, dando forças sempre. Principalmente a meu tio Hugo que sempre estará no meu coração! Minha Leli e Tia Flaca por sempre estarem presentes...

A Blanca Lia, Rulo, Tivi e Gumi: pelo carinho e força!!

À minha família de argentinos em Floripa, Ana, Mauro, Lucia e a encantadora Martina! Pelos bonitos momentos compartilhados, por me acompanhar, aconselhar, dar apoio e contenção.

A todos os meus amigos (de infância, do colégio, da graduação) que representaram parceria nos mais diversos momentos da minha vida e contribuíram muito para a minha formação pessoal e profissional. Em especial Sabi e sua maravilhosa família, Meli, Silvi, Dario e a pequena Sofi por sempre me esperar com um abraço e um sorriso!

A minha comadre e amiga Antonella e minha afiliada Briana, por estar sempre quando volto à Argentina!

Em fim a Herber, por ser meu companheiro da vida! Por roubar-me um sorriso nos tempos difíceis e alegrar-se com minhas conquistas, incentivando sempre a seguir adiante. E sobre tudo, por sua bonita família, que desde sempre me tornaram parte dela.

A todos, Muchas Gracias!!! Fueron y serán siempre muy importantes...

RESUMO

Os gliomas representam 50-80 % dos tumores cerebrais primários classificados como um dos tipos de neoplasia com maiores desafios na sua terapia. Dentre eles o glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo mais agressivo, com um prognóstico pouco favorável, sendo a sobrevida média dos pacientes de aproximadamente 12 meses. Considerando a limitada eficiência das terapias disponíveis, têm sido investigadas novas moléculas bioativas. Lectinas são proteínas que ligam glicanos, apresentando diversas atividades biológicas. Estudos recentes têm indicado a capacidade de algumas lectinas isoladas de plantas, especialmente ConA, poderem induzir morte de células tumorais com certa seletividade, considerando que essas células podem apresentar alterações no padrão de glicosilação. Dentro desses paradigmas, o presente trabalho teve como objetivo central investigar o efeito citotóxico das lectinas purificadas das sementes de *Dioclea reflexa* (DrfL I) e de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) sobre culturas celulares de glioma das linhagens C6 (rato) e U87 (humana), caracterizando o possível mecanismo dessa ação. Os resultados demonstraram que as lectinas DrfL I e ConBr (30 e 50 µg/mL) diminuem a viabilidade (avaliada pelo ensaio de MTT) e induzem alterações morfológicas (avaliada por microscopia de luz e de fluorescência) sobre células da linhagem C6. As lectinas também demonstraram a capacidade de inibir a migração celular e sobrevivência clonogênica, especialmente na concentração mais elevada (50 µg/mL). Além disso, ConBr e DrfL I causaram indução significativa do processo de autofagia na linhagem C6, avaliado através da coloração com laranja de acridina (LA). Notavelmente, a ação das lectinas foi dependente da integridade de sua estrutura terciária/quaternária, bem como do domínio de interação com carboidratos (CRD), considerando que a desnaturação térmica e o bloqueio do CRD (com α -metil-manosídeo), respectivamente, levaram a perda da atividade das lectinas. Quando avaliada a ação de DrfL I e ConBr sobre a linhagem U87 (humana) foi observado que apenas DrfL I apresentou atividade citotóxica sobre esta linhagem, sendo sua ação similar ao observado sobre as células da linhagem C6. Dessa forma, nosso estudo sugere um potencial antitumoral para a lectina DrfL I, considerando sua ação sobre a linhagem de glioma U87, que deverá ser avaliada com mais profundidade em futuros estudos.

Palavras-chaves: Glioma, lectinas, DrfL I, ConBr, autofagia

ABSTRACT

Gliomas represent 50-80 % of the primary brain tumors and it is one of the most challenging types of neoplasia for therapy. Glioblastoma multiform (GBM) is the most aggressive type of glioma, with unfavorable prognosis and average survival of patients approximately 12 months. Taken in account a limited therapy available, new bioactive molecules have been investigated. Lectins are proteins that bind glycans on cell surface displaying a diversity of biological activities. The capability of plant lectins to induce selective tumoral cell death has been reported, since the tumoral cells may express modifications in the glycosilation pattern. Taken these paradigms, the present work aimed to investigate the citotoxicity of the lectins purified from *Dioclea reflexa* (DrfL I) and *Canavalia brasiliensis* (ConBr) seeds against gliomas lineages C6 (rat) and U87 (human), characterizing a possible mechanism for this action. The results showed that DrfL I and ConBr lectins (30 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) decreased cell viability (measured by MTT assay) and induced morphological changes (assessed by optic and fluorescence microscopy) on C6 cells. The lectins also induced inhibition of cell migration and clonogenic survival, especially at highest concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Moreover, both ConBr and DrfL I were able to induce autophagy of C6 cells, as evaluated by acridin orange stain. Noteworthy, the lectin actions were dependent of terceary/quaternary structure and carbohydrate recognition domain (CRD) since both, thermal denaturation as well as CRD blockage (by α -methyl-manoside), respectively, impaired the lectin activity. The action of DrfL I and ConBr on the U87 lineage (human) was also evaluated. However, only DrfL I demonstrated activity against this lineage, which was very similar that observed against C6 cells lineage. In conclusion, our study suggests an antitumor potential for DrfL I lectin, considering its activity against U87 gliomas lineage. Moreover, future studies will be necessary in order to ascertain the DrfL I mechanisms using in vitro and in vivo models of gliomas.

Keywords: Glioma, lectins, DrfL I, ConBr, autophagy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAL - Lectina da *Andira anthelmia*
ACNU - Nimustine
AFL - Lectina da *Andira fraxinifolia*
APAF-1 - Fator Ativador de Protease Apoptótica
ASL - Lectina da *Andira surinamensis*
BAX - Proteína 4 tipo BcL-2
BcL-2 - Célula-B de Linfoma 2
BCNU - Carmustina
CaBo - Lectina da *Canavalia bonariensis*
CCNU - Lomustina
CDK - Proteína quinase dependentes ciclina
CI50 - Concentração que inibe 50% da proliferação celular
ConA - *Concanavalina A*
ConBr – Lectina da *Canavalia brasiliensis*
ConM - Lectina da *Canavalia maritima*
ConV - Lectina da *Canavalia virosa*
COX-2 - Enzima Ciclooxygenase-2
CRD - Domínio de reconhecimento de carboidrato
CTL - Lectina da *Centrolobium tomentosum*
CXCR - Receptores de Quimiocinas
DGL - Lectina da *Dioclea grandiflora*
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
DrfL – Lectina da *Dioclea reflexa*
DvL - Lectina da *Dioclea violacea*
DwL - Lectina da *Dioclea wilsonni*
EC – Eficiência clonogénica
EGF - Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
EGFRvIII - Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Constitutivamente Ativo
FasL - Ligando Fas
GABA - Ácido γ -aminobutírico
GABRA1 - Subunidade Alfa 1 do Receptor GABA
GalNac - N-acetilgalactosamina
GFAP – Proteína glial fibrilar ácida
GBM - Glioblastoma Multifforme
GSCs - Células Tronco de Glioblastoma
HIF-1 α - Fator Induzível de Hipóxia
IKK – Quinase I κ B

INCA – Instituto Nacional de Câncer no Brasil
IP - Iodeto de Propídio
LaL - Lectina da *Lonchocarus araripensis*
LDH - Lactato Desidrogenase
MB - Membrana Basal
MEC - Matriz Extracelular
MLKL - Proteína quinase de domínio de linhagem mista
MMP - Metaloproteases de Matriz Extracelular
MT1-MMP - Metaloproteinase de Matrix Tipo-1
mTOR - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MTT - sal de tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio
NEFL - Polipeptídeo de Neurofilamento Leve
NF1 - gene supressor de Tumor Neurofibromatose 1
NSCs - Células Tronco Neurais
O-GINac - Enzima N-acetil glicosamina transferase
OMS - Organização Mundial da Saúde
PBS - Tampão fosfato-salino
PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PDGFRA - Receptor A do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PI3K - Fosfoinositol-3-quinase
PIP3 - Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifostato
PTEN - Fosfatase Homóloga a Tensina
Ras - Proteína Oncogênica p21
RIPK1 - Proteína quinase 1 de interação ao receptor
RTKs - Receptores Tirosina quinase
SFB - Soro Fetal Bovino
SNC - Sistema Nervoso Central
SOX - Família genes altamente conservados que codificam fatores de transcrição
SYT-1 - Sinaptotagmina 1
TAM – Macrófagos associados ao tumor
TGF- β - Fator de Crescimento Transformante β
TLR – Receptor do tipo Toll
TMRE - Tetrametilrodamina-etil-ester
TMZ - Temozolomida
TNF - Fator de Necrose Tumoral
TNFR – Receptor do TNF

TRAIL – Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral

VEGF - Fator de Crescimento Vascular Endotelial

VML - Lectina da *Vatairea macrocarpa*

ZSG - Zona subgranular

ZSV - Zona Subvebtricular

$\Delta\Psi_m$ - Potencial de membrana mitocondrial

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Resumo da atuação dos genes envolvidos no desenvolvimento do câncer..	25
Figura 2. Etapas do Desenvolvimento do Câncer..	27
Figura 3. Ação dos macrófagos associados ao tumor (TAM) na progressão e invasão do glioma.....	32
Figura 4. Estrutura cristalográfica da lectina ConA.....	35
Figura 5. Estrutura cristalográfica da lectina ConBr.....	36
Figura 6 Estrutura cristalográfica da lectina ConV.....	37
Figura 7 Estrutura cristalográfica da lectina DrfL I.....	37
Figura 8. Fatores envolvidos no processo de Apoptose.....	40
Figura 9. Fatores envolvidos no processo de Autofagia.....	42
Figura 10. Fatores envolvidos no processo de Necroptose.....	43
Figura 11. Tratamento para ensaio de Resistencia.....	57
Figura 12. Avaliação do Potencial Citotóxico de lectinas leguminosas.....	60
Figura 13. Avaliação do efeito citotóxico concentração/tempo dependente da lectina DrfL I na linhagem C6.....	62
Figura 14. Avaliação do efeito citotóxico concentração/tempo dependente da lectina ConBr na linhagem C6.....	63
Figura 15. Avaliação do efeito citotóxico concentração/tempo dependente da lectina DrfL I na linhagem U87.....	65
Figura 16. Contagem de células da linhagem U87.....	66
Figura 17. Avaliação do efeito citotóxico da lectina ConBr na linhagem U87.....	67
Figura 18. Avaliação do efeito citotóxico da lectina rConBr na linhagem U87.....	68
Figura 19. Comparação do tratamento com DrfL I desnaturada, nativa e bloqueada.....	69
Figura 20. Comparação do tratamento com ConBr desnaturada, nativa e bloqueada.....	70
Figura 21. Fluorescência laranja de acridina do tratamento com DrfL I na linhagem C6.....	72
Figura 22. Fluorescência laranja de acridina do tratamento com ConBr na linhagem C6.....	73
Figura 23. Microscopia de fluorescência com laranja de acridina do tratamento com DrfL I na linhagem U87.....	74
Figura 24. Fluorescência iodeto de propídio/hoechs do tratamento com DrfL I na linhagem C6.....	76

Figura 25. Quantificação de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura da linhagem C6 tratadas com DrfL I.....	77
Figura 26. Fluorescência iodeto de propídio/ hoechts do tratamento com ConBr na linhagem C6.....	78
Figura 27. Quantificação de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura da linhagem C6 tratadas com ConBr..	79
Figura 28. Fluorescência iodeto de propídio/ hoechts do tratamento com DrfL I na linhagem U87.....	80
Figura 29. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial pelo método de TMRE na linhagem C6.....	81
Figura 30. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial pelo método de TMRE na linhagem U87. ...	81
Figura 31. Efeito da lectina DrfL I na migração celular na linhagem C6.	83
Figura 32. Efeito da lectina ConBr na migração celular na linhagem C6.	84
Figura 33. Efeito da lectina DrfL I na migração celular na linhagem U87.	85
Figura 34. Resistência ao tratamento por 24 h com DrfL I nas células C6.	87
Figura 35. Resistência ao tratamento por 24 h com ConBr nas células C6.	87
Figura 36. Resistência ao tratamento por 48h com DrfL I nas células C6.	88
Figura 37. Resistência ao tratamento por 48h com ConBr nas células C6.	89
Figura 38. Eficiência clonogénica da linhagem C6 após tratamento com DrfL I.....	90
Figura 39. Eficiência clonogénica da linhagem C6 após tratamento com ConBr.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação dos tumores tipo Glioma pela Organização Mundial da Saúde.....	29
Tabela 2. IC ₅₀ das lectinas avaliadas.	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 CÂNCER.....	24
1.2 GLIOMA.....	28
1.3 LECTINAS.....	33
1.4 MECANISMOS DE MORTE CELULAR.....	38
1.4.1 Apoptose.....	38
1.4.2 Autofagia.....	40
1.4.3 Necroptose.....	42
1.5 LINHAGENS CELULARES COMO MODELOS DE ESTUDO DO GBM.....	44
1.5.1 Linhagem celular C6.....	44
1.5.2 Linhagem celular U87.....	45
2. JUSTIFICATIVA	47
3. OBJETIVOS	49
3.1 OBJETIVO GERAL.....	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 CULTURA CELULAR.....	51
4.2 LECTINAS.....	51
4.3 DILUIÇÃO, BLOQUEIO E DESNATURAÇÃO DAS LECTINAS.....	51
4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	52
4.5 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	53
4.6 ATIVIDADE DE LACTATO DESIDROGENASE.....	54
4.7 ENSAIO DE MIGRAÇÃO.....	54
4.8 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	55
4.8.1 Ensaio com Laranja de acridina.....	55
4.8.2 Ensaio com Iodeto de propídio.....	56
4.9 ENSAIO DE RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO.....	56
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
5. RESULTADOS	59
5.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE LECTINAS ISOLADAS DE SEMENTES DE LEGUMINOSA.....	59
5.2 LECTINAS DRfL I E CONBr APRESENTAM EFEITOS CITOTÓXICOS CONCENTRAÇÃO/TEMPO DEPENDENTES.....	61
5.3 A AÇÃO DAS LECTINAS DRfL I E CONBr É DEPENDENTE DA SUA ESTRUTURA TERCIÁRIA E DO SÍTIO DE LIGAÇÃO A CARBOIDRATOS (CRD).....	68

5.4 AS LECTINAS DRFL I E CONBR AUMENTAM PROCESSOS DE AUTOFAGIA NAS CÉLULAS CANCERÍGENAS LEVANDO A DIMINUIÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	71
5.5 O TRATAMENTO DE CÉLULAS DE GLIOMA COM AS LECTINAS DRFL I E CONBR PODERIAM LEVAR À MORTE CELULAR PROGRAMADA POR NECROSE.....	75
5.6 AS LECTINAS DRFL I E CONBR NÃO INTERFEREM NO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EM CURTOS PERÍODOS DE EXPOSIÇÃO	80
5.7 DRFL I E CONBR APRESENTAM EFEITOS CITOSTÁTICOS NAS CULTURAS CELULARES INIBINDO A MIGRAÇÃO CELULAR	82
5.8 ALTAS CONCENTRAÇÕES DAS LECTINAS DRFL I E CONBR INIBEM A RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA NA LINHAGEM C6.....	86
5.9 ALTAS CONCENTRAÇÕES DAS LECTINAS DRFL I E CONBR INIBEM A SOBREVIVÊNCIA APÓS A CLONAGEM DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA DA LINHAGEM C6	89
6. DISCUSSÃO	93
7. CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	101

1. INTRODUÇÃO

A membrana celular é crucial para a vida da célula, define seus limites e mantém as diferenças essenciais entre seu interior e o espaço extracelular (ALBERS *et al.*, 2010). Apesar de apresentar diferenças, todas as membranas biológicas compartilham uma estrutura geral comum formada por uma fina camada de lipídeos e proteínas, unidas principalmente por interações não covalentes. Enquanto a bicamada lipídica atua como barreira relativamente permeável, as proteínas transmembrana medeiam quase todas as funções da membrana celular, atuando como transportador de moléculas específicas, catalisador de reações e como receptores que respondem a sinais extracelulares (YOU *et al.*, 2016).

Cada monocamada da membrana apresenta uma composição lipídica distinta, sendo esta assimetria importante na sua função (ALBERTS *et al.*, 2010). Um dos fatores envolvidos na produção da assimetria na bicamada é o processo de adesão de açúcares a proteínas ou lipídeos no lúmen do aparelho de Golgi, conhecido como glicosilação. Este processo produz proteínas ou lipídeos principalmente N-glicosilados, que são alocados na membrana plasmática, sendo os resíduos de açúcares expostos na superfície celular (ALBERTS *et al.*, 2010; CAO *et al.*, 2013; DRAKE e BALL, 2015). O funcionamento normal deste processo é fundamental, pois está envolvido em mecanismos de adesão célula-célula (GUMBINER, 1996; CAO *et al.*, 2013; ROY *et al.*, 2016), mobilidade celular (CAO *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2015), diferenciação celular (AMANO *et al.*, 2010; NAIRN *et al.*, 2012), inflamação (ZHAO *et al.*, 2010; CAO *et al.*, 2013), transdução de sinais (CAO *et al.*, 2013) e na infecção viral (CAO *et al.*, 2013). Por outro lado, alteração nesses processos está relacionada com diversos processos patológicos, incluindo processos oncogênicos e progressão do câncer (HALTIWANGER e LOWE, 2004).

As células dos organismos multicelulares se encontram em contínua interação, de forma a mantê-las unidas para formar os tecidos. A adesão celular depende de dois elementos principais: a matriz extracelular (MEC), uma estrutura secretada pelas células e composta por uma rede complexa de proteínas fibrosas (colágeno, laminina, fibronectina, elastina) e cadeias de polissacarídeos (NUTT *et al.*, 2001; LUQUE *et al.*, 2006; ALBERTS *et al.*, 2010); as integrinas, que são proteínas constituídas por um domínio intracelular, que se une aos filamentos de actina do citoesqueleto no interior da célula, e um domínio extracelular que apresentam afinidade pelos receptores de

células vizinhas permitindo às adesões célula-célula e pelas proteínas da MEC propiciando a adesão célula-matriz (ALBERTS *et al.*, 2010; KOLKHOF *et al.*, 2016). Essas interações encontram-se alteradas em processos cancerígenos, o que confere à célula seu caráter invasivo, cumprindo um importante papel nos processos de metástase do câncer (PROULX-BONNEAU *et al.*, 2011).

1.1 Câncer

O câncer é uma das principais causas de morte em nível mundial. Em 2012 as estatísticas apontaram cerca de 14 milhões de pacientes com câncer no mundo (NIH 2016). Segundo os dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), no ano de 2016 existiriam uma estimativa de taxa bruta de incidência de 590 pacientes por cada 100 mil habitantes (Instituto Nacional de Câncer, Brasil, 2016).

O câncer pode ser considerado uma doença genética, que se desenvolve em organismos superiores, podendo acometer à maioria dos tecidos e todo tipo de célula somática (COOPER, 2000; GARRAWAY e LANDER, 2013; SOON *et al.*, 2013; NIK-ZAINAL *et al.*, 2012; SHENDURE e LIEBERMAN, 2012; TUNA e AMOS, 2012). Caracteriza-se por ser um processo constituído de três etapas: iniciação, promoção e progressão tumoral. A iniciação e promoção tumoral representam um período em que ocorrem as primeiras alterações genéticas, que levam uma célula normal à transformação (HANAHAN e WEINBERG, 2000; YATES e CAMPBELL, 2012). Estas mutações podem surgir por dois mecanismos:

- **Mudanças epigenéticas**, que afetam a expressão de genes, podendo permanecer em estado latente durante toda a vida da célula. Esse tipo de alteração pode ocorrer em resposta a agentes mutagênicos que alteram a arquitetura nuclear e composição cromática da célula (TUNA e AMOS, 2012; FEINBERG *et al.*, 2016).

- **Mudanças gênicas**, induzidas por mutações. Onde a célula afetada divide-se em taxa acima do normal, com muita rapidez e sem controle (YATES e CAMPBELL, 2012).

São denominados **agentes carcinogênicos** os responsáveis pela produção de mutações nos proto-oncogenes e genes oncosuppressores, que são os dois tipos de genes cujas mutações estão relacionadas com o progresso do câncer, resumidas na figura 1.

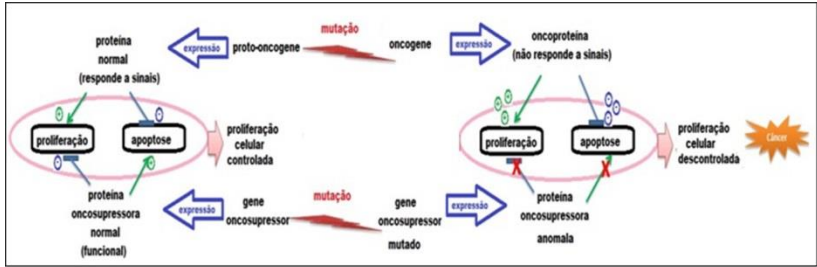


Figura 1. Resumo da atuação dos genes envolvidos no desenvolvimento do câncer. (Adaptado de LUQUE *et al.*, 2006). *Proto-oncogenes* são genes que codificam proteínas geralmente relacionadas com a proliferação celular e apoptose e atuam somente quando recebem sinais específicos. Entretanto, sua forma mutada dá lugar a um *oncogene*, o qual como resultado expressa uma proteína anômala que se mantém ativa mesmo na ausência de estímulos reguladores. Os genes *onco-supressores* codificam proteínas que atuam diminuindo a proliferação celular ou induzindo a apoptose. Quando uma mutação conduz à síntese de uma destas proteínas não funcional ou impede sua síntese, ocorre perda do controle da proliferação celular e dos mecanismos de morte, levando a uma proliferação excessiva, sendo que o acúmulo de danos ou alterações gênicas acaba conduzindo ao câncer.

Como resultado das mutações produzidas os genes podem não expressar determinadas proteínas ou podem expressar proteínas alteradas. Além disso, pode ocorrer a superexpressão de proteínas normais. Essas alterações modificam as funções celulares básicas, como controle de divisão, levando a uma proliferação excessiva e contínua. Adicionalmente, ocorre diminuição de mecanismos de morte celular programada. Em conjunto esses eventos levam a formação do tumor (COOPER, 2011; LUQUE *et al.*, 2006; OGATA *et al.*, 2006; JAMARILLO *et al.*, 2010; DE BARROS PONTES *et al.*, 2012; GOFFART *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2015; AROUI *et al.*, 2016; ROY *et al.*, 2016). Outro aspecto evidenciado são alterações na glicosilação de proteínas em função de alteração da regulação da enzima N-acetilglicosamina transferase (O-GINAc), que catalisa processos O-N-acetilglicosilação, apresentando papéis cruciais na proliferação e invasão tumoral (KAMATSU *et al.*, 2001; FUSTER *et al.*, 2005; SALGIA, 2014; BALDINI e LEFEBVRE, 2016).

A fase de progressão do tumor pode ser dividida em etapas fisiopatológicas de desenvolvimento resumidas na figura 2. Neste sentido as neoplasias podem ser divididas em: **1) tumor primário** ou **benigno**, o qual se inicia com uma célula progenitora (célula tronco

26 INTRODUÇÃO

cancerosa) que forma uma massa de células anormais que crescem e proliferam fora de controle, caracteriza-se por apresentar as mesmas características do tecido onde foi originado e não possuir propriedade invasiva, podendo-se extirpar com ressecção cirúrgica (se sua localização não é crítica) tendo, em geral, um prognóstico favorável; **2) tumor maligno** ou **câncer propriamente dito**, no qual as suas células adquiriram capacidade de invadir tecidos adjacentes tornando quase impossível sua erradicação (COOPER, 2000; YATES e CAMPBELL, 2012).

Para o tumor poder crescer além de um determinado tamanho, precisa recrutar um suplemento de sangue adequado para ter a quantidade desejável de oxigênio e nutrientes, mediante a formação de novos vasos sanguíneos. Este processo é denominado angiogênese, desenvolvido frente a sinais de hipóxia produto de resposta das células afetadas pelo crescimento do tumor. A hipóxia ativa o suprimento de sangue pelo aumento do nível do fator induzível de hipóxia (HIF-1 α) (LE MERCIER *et al.*, 2010; NOWACKA e OBUCHOWICZ, 2012) que ativa a transcrição de genes que codificam fatores pró-angiogênicos como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (GOFFART *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2015), o qual por sua vez estimula o crescimento de novos vasos sanguíneos que ajudam no suprimento de oxigênio e nutrientes, apresentando-se como uma via de escape de células cancerosas para formarem metástase (BENDAS e BORSIG, 2012; ROY *et al.*, 2016).

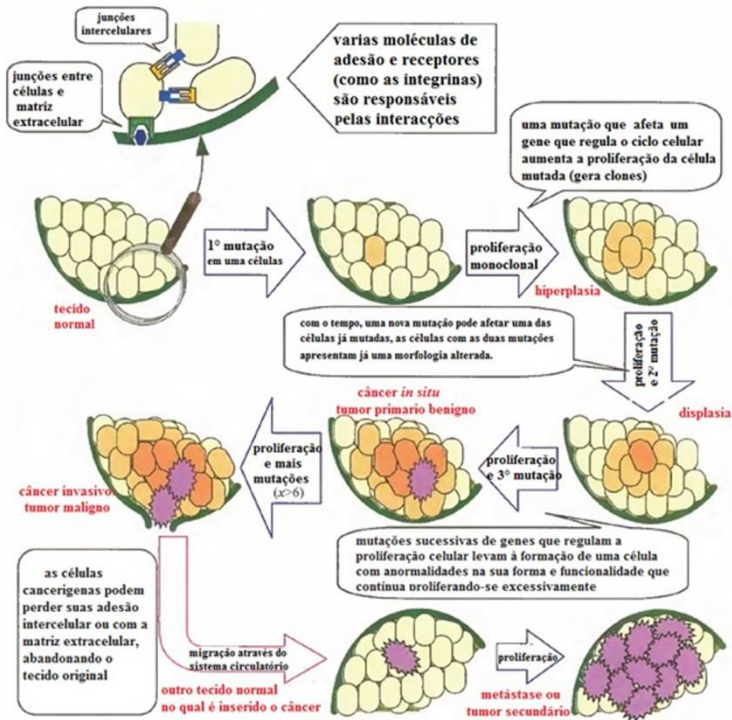


Figura 2. Etapas do Desenvolvimento do Câncer. (Adaptado de LUQUE *et al.*, 2006). O diagrama mostra como a partir de repetidos ciclos de mutação e proliferação de uma primeira célula que sofreu mutação, se origina um clone de células cancerosas malignas. Em cada etapa, as células do clone continuam sofrendo mutações que potencializam a proliferação celular ou diminuem os mecanismos de morte celular programada. A etapa final mostra a invasão de células cancerígenas em tecidos adjacentes e a etapa inicial da metástase.

A metástase é a etapa responsável por 90 % das mortes associadas ao câncer sólido (TALMADGE e FIDLER, 2010; JIANG *et al.*, 2015), sendo impossível sua erradicação mediante cirurgia ou irradiação localizada, por encontrar-se disseminado por vários tecidos e órgãos. A metástase representa um processo com várias etapas: as células devem se desprender do tumor primário, penetrar a membrana basal (MB) e o revestimento endotelial de um vaso sanguíneo ou linfático, mover-se através da circulação, para sair do vaso em um ponto distante do corpo, fixando-se e crescendo no novo sítio. Esta liberação das células tumorais é consequência da ação de enzimas proteolíticas ou

proteases que degradam a matriz extracelular, sendo as mais estudadas as metaloproteases de matriz extracelular (MMP) (PROULX-BONNEAU *et al.*, 2011; RESENDE *et al.*, 2016, AROUI *et al.*, 2016). Este processo permite a formação de um grumo de células primeiramente, denominada micrometástase, que produzem células que sobrevivem e proliferam no novo ambiente o qual é conhecido como colonização (RESENDE *et al.*, 2016).

Os cânceres são denominados de acordo com o tipo de célula e tecido do qual foi originado, conhecendo-se mais de 200 tipos. Os tumores primários do sistema nervoso central (SNC) contribuem significativamente na morbidade de todos os grupos de idade, representando 20 % das neoplasias em crianças e 2 % em adultos (American Cancer Society 2016; eacc 2017). Os tumores cerebrais são classificados como um dos tipos de neoplasia com maiores desafios na sua terapia (RIOS MARCO *et al.*, 2015), sendo os gliomas responsáveis por 80 % dos tumores primários do SNC (CHERRY e STELLA, 2014).

1.2 Glioma

Os gliomas representam entre 50 e 80 % dos tumores cerebrais primários classificados como malignos em adultos (LEFRANC *et al.*, 2005; LE MERCIER *et al.* 2010; RIOS MARCO *et al.*, 2015) e recebem o nome dependendo do tipo de células a partir das quais se desenvolvem: astrocitomas (astrócitos), oligodendrogliomas (oligodendrócitos), ependimomas (células ependimais) e oligoastrocitoma (mistura de varias células gliais) (LOUIS *et al.*, 2007; LE MERCIER *et al.*, 2010).

Com o fim de padronizar a comunicação e o plano de tratamento dos tumores do tipo glioma, a Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu um sistema de classificação em quatro graus, baseado na malignidade segundo a histologia, localização, distribuição, comportamento e características genéticas (CAIRNCROSS *et al.*, 2006; LOUIS *et al.*, 2007; ROUSSEAU *et al.*, 2008; FORSHEW *et al.*, 2009; SANSON *et al.*, 2009; D'HAENE *et al.*, 2014; YANG *et al.* 2016), resumido na tabela 1. Os gliomas de grau I em geral são circunscritos e apresentam um comportamento benigno comparado com os de Grau II até IV, classificados como malignos por seu comportamento invasivo no cérebro (LOUIS *et al.*, 2007; LE MERCIER *et al.*, 2010).

Graus OMS	Sobrevida média	Tipos Histológico
1	Possível cura	Astrocitoma policístico (crianças)
2	10-16 anos	Oligodendoglioma
2	6-8 anos	Atrocitoma
3	3 anos	Astrocitoma anaplásico Oligodendoglioma anaplásico
4	3-24 meses	Glioblastoma Multiforme

Tabela 1 Classificação dos tumores tipo Glioma pela Organização Mundial da Saúde. Classificação dos tumores tipo glioma em graus, estimativa de vida e tipo histológico.

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo de glioma mais agressivo representando 55 % dos casos de tumores cerebrais malignos (OSTROM *et al.*, 2015). Apresenta-se como um tumor heterogêneo por ser constituído por células de diferentes origens, classificado pela OMS como grau IV (NUTT *et al.*, 2001; STRIK *et al.*, 2012; WOJTON *et al.*, 2016). Ocorre com uma incidência aproximada de 3,2 a cada 100.000 pessoas por ano nos Estados Unidos, enquanto segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) no Brasil estimam-se, entre os anos 2016-2017, 5.400 novos casos em homens e 4.830 em mulheres (OSTROM *et al.*, 2015; Instituto Nacional de Câncer, Brasil, 2016).

A taxa de incidência é mais comum em idosos entre os 75 e 84 anos de idade (OSTROM *et al.*, 2015). Afetando comumente os lóbulos temporal (31%), parietal (24%), frontal (23%), occipital (16%) bem como em combinação fronto-temporal (CHOTAI *et al.*, 2012). Os sintomas mais comuns incluem: dor de cabeça, tontura, mudanças na cognição e personalidade, perda de equilíbrio, diminuição sensorial e incontinência segundo a área afetada (WOJTON *et al.*, 2016).

A massa tumoral do GBM encontra-se construída por uma população densa de células monomórficas pequenas, arredondadas e ligeiramente alongadas com núcleo grande e hiper cromático (LOUIS *et al.*, 2007; KHASRAW *et al.*, 2010; CHERAY *et al.*, 2011; STRIK *et al.*, 2012). Diferenciando-se dos demais graus por seu rápido crescimento, sua potente habilidade de invasão e migração no tecido cerebral, sua frequente recidiva pós-cirurgia, e sua alta resistência à

quimioterapia e radioterapia (JARAMILLO *et al.*, 2010; DE BARROS PONTES *et al.*, 2012; THEELER e GILBERT, 2015; CHEN *et al.*, 2015; AROUI *et al.*, 2016).

O GBM apresenta multipotencialidade e habilidade de auto-renovação pela presença de células tronco de glioblastoma (GSCs), que são muito similares as das células tronco neurais (NSCs) encontradas na zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais e zona subgranular (ZSG) do hipocampo, existindo inclusive hipóteses de que estas poderiam dar origem às células tumorais (SANAI *et al.*, 2005; LIM *et al.*, 2007; MARTIN *et al.*, 2014; LIU e SONG, 2016).

Tem sido indicado que a desregulação de genes relacionados a cascatas de sinalização que controla o funcionamento das NSCs desempenha um papel importante na modulação das GSCs (GARROS-REGULEZ *et al.*, 2016). Assim por exemplo, o gene SOX2 (pertencente a uma família de fatores de transcrição altamente conservada) necessário nos estágios de desenvolvimento neural durante a embriogênese e na neurogênese adulta, é inativado uma vez diferenciada a NSC (SARKAR e HOCHEDLINGER, 2013; GARROS-REGULEZ *et al.*, 2016), conferindo às células tronco seu caráter de pluripotência e reprogramação (AVILION *et al.*, 2003; FAVARO *et al.*, 2009; TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006; HAN *et al.*, 2012). Surpreendentemente, foi observado um aumento da expressão de SOX2 tanto em linhagem celular de GBM (IKUSHIMA *et al.*, 2009; GANGEMI *et al.*, 2009; GARROS-REGULEZ *et al.*, 2016) quanto em amostras de tecido de pacientes (ANNOVAZZI *et al.*, 2011; BRENNAN *et al.*, 2013). Esse fato parece estar relacionado com a autorregeneração celular, manutenção das GSCs e progressão do GBM, além de conferir resistência á quimioterapia com temozolomide (GARROS-REGULEZ *et al.*, 2016).

Verhaak e colaboradores em 2010 dividiram o GBM em quatro subtipos. O **subtipo clássico**, representando 27 % desses cânceres, caracteriza-se por apresentar deleções nos genes PTEN (fosfatase homóloga a tensina; que degrada PIP3, sendo um gene supressor tumoral) e um aumento na expressão do EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal) juntamente com uma mutação originando um receptor constitutivamente ativo, o EGFRvIII, que conduz a ativação de vias de sinalização pró-migratórias e proliferativas, exercendo um papel crucial no desenvolvimento de varias neoplasias (ALDAPE *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2007). O **subtipo mesenquimal**, compreende 29 %, caraterizado pela mutação e deleção de NF1 (gene supressor do tumor de neurofibromatose 1) um regulador negativo da proteína RAS e

PTEN, um antagonista fosfoinositol-3-quinase (PI3K), ambos importantes na via *downstream* dos RTKs (receptores tirosina quinase) (VERHAAK *et al.*, 2010). E no **subtipo pró-neural**, representando 28 % dos cânceres tipo GBM, possui uma mutação no gene supressor de tumor TP53 e uma amplificação do receptor A do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRA), o qual leva a ativação de vias de crescimento mitogênicas (CHERRY *et al.*, 2014). Por último, o **subtipo neural**, compreendendo apenas 16 % dos GBM, é definido pela presença de marcadores neurais como NEFL (polipeptídeo de neurofilamento leve), subunidade $\alpha 1$ de receptor GABA (GABRA1) e sinaptotagmina 1 (SYT-1) (CHERRY *et al.*, 2014). Como podem ser observados, os diferentes subtipos apresentam desregulação na sinalização RTK, representando marcadores adquiridos de malignidade (CHERRY *et al.*, 2014).

Além das mutações nos RTK, foi observado que receptores de quimiocinas do tipo 4 e 7 (CXCR 4 e CXCR7) encontram-se superexpressos em diversas linhagens tumorais incluindo as de GBM, nas quais medeiam respostas proliferativas e migratórias (RUBIN *et al.*, 2003; CHERRY *et al.*, 2014). Em tecidos extraídos de pacientes com GBM (CALATOZZOLO *et al.*, 2011) CXCR4 aumenta sua expressão na área de hipóxia favorecendo a angiogênese (EHTESHAM *et al.*, 2013).

Estudos prévios demonstram, que os mecanismos biosintéticos das glicosil transferases, glicosil hidrolases e os genes que regulam a sua expressão, experimentam uma significativa alteração na transformação oncogênica nas GSCs (DALL'OLIO *et al.*, 2001; BURCHELL *et al.*, 2003; CHAKRABORTY *et al.*, 2003; DRINNAN *et al.*, 2003; MOSKAL *et al.*; 2009). Nestas quando comparadas com células normais de cérebro, observa-se um incremento significativo de galactosilação nas glicoproteínas do glicocálix; principalmente β -galactose e/ou β -GalNac (XU *et al.*, 2001; MOSKAL *et al.*; 2009; HE *et al.*, 2010). Este padrão de glicosilação alterado modula a função de receptores de morte celular, por dificultar estéricamente a união de seu ligante (MORIWAKI *et al.*, 2011; SHATNYEVA *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2013; LICHTENSTEIN e RABINOVICH, 2013)

Porém, não são somente as características biológicas das células de glioma que contribuem na progressão do tumor. Existem dados na literatura mostrando que o microambiente onde o GBM se encontra apresenta funções importantes para a progressão e metástase. Assim, a ativação da micróglia e ação de macrófagos (HAMBARZDUMYAN *et al.*, 2016; RESENDE *et al.*, 2016) ajuda na degradação da MEC e da

membrana basal (MB), principalmente pela ativação de MMP-2 e MMP-9 (KUMAR *et al.*, 2010; STRIK *et al.*, 2012; AROUI *et al.*, 2016; NAMBIAR *et al.*, 2016), conforme apresentado resumidamente na figura 3.

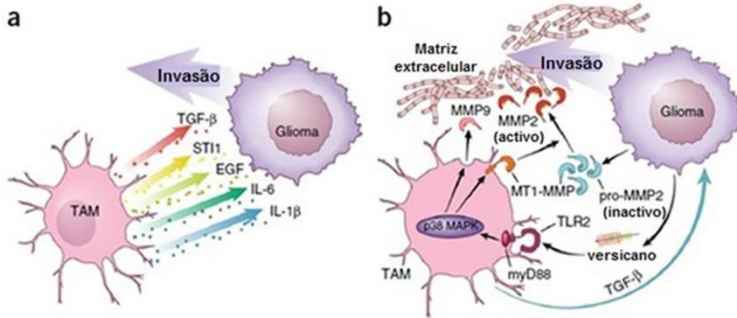


Figura 3. Ação dos macrófagos associados ao tumor (TAM) na progressão e invasão do glioma. (HAMBARDZUMAY *et al.*, 2016) (a) TAM secreta fatores que promovem a invasão das células de glioma. (b) A micróglia secreta TGF- β , que desencadeia a liberação de pro-MMP2 pelas células de glioma. A pro-MMP2 é clivada e ativada a MMP2 pela MT1-MMP expressa na membrana da micróglia. A micróglia expressa MT1-MMP pela ativação de TLR2 e sinais dependentes de P38-MAPK, o qual também leva à liberação de MMP9.

Por todo o exposto, o GBM apresenta prognóstico pouco favorável e apesar dos consideráveis esforços terapêuticos a sobrevida média dos pacientes é de aproximadamente 12 meses (LOUIS *et al.*, 2007; STRIK, *et al.*, 2012). A ressecção cirúrgica e a radioterapia aplicada no tratamento oferecem geralmente um benefício paliativo (JURATLI, 2013). As drogas anticancerígenas sintéticas mais utilizadas são agentes alquilantes como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), nimustina (ACNU) ou temozolomida (TMZ). Essas drogas são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, mas apresentam pouca eficiência e muitas vezes induzem morte celular pouco seletiva, não aumentando a sobrevida média dos pacientes por mais de 17 meses (JARAMILLO *et al.*, 2010; STRIK, *et al.*, 2012; THEELER e GILBERT, 2015; YAN *et al.*, 2016).

Dentro desses paradigmas, têm sido investigadas novas moléculas bioativas tais como as lectinas, que são proteínas com alta especificidade pelos glicanos. Diversos estudos demonstraram que possuem a capacidade de inibir a proliferação e adesão celular, assim como de induzir efeitos citotóxicos em células tumorais humanas (DE

MEJÍA e PRISECARU, 2005; FAHEINA *et al.*, 2011). O fato é relacionado à sua capacidade de interagir com o estado de glicosilação anormal de glicolípidos e/ou glicoproteínas nas células tumorais, assim como pelas disposições e/ou alterações dos receptores de lectinas na superfície destas células, estando estas modificações envolvidas no processo de metástase (HAKOMORI, 2002; DAWSON *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2008; SHARON, 2007; REIS *et al.*, 2010; JIANG, 2015; YAU, 2015).

1.3 Lectinas

As lectinas representam um grupo de proteínas ubiquamente distribuídas em plantas, animais e microorganismos, e contêm pelo menos um domínio não catalítico de ligação a carboidratos (CRD), através do qual são capazes de reconhecer e de se ligar reversivelmente, de maneira específica, a carboidratos complexos de glicoproteínas, proteoglicanos e glicolípidos, bem como a monossacáridos solúveis ou glicoconjugados, sem modificar a estrutura do açúcar ao qual se ligam (SINGH *et al.*, 1999; VAN DAMME *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2015). As lectinas não têm origem imune, ou seja, não são anticorpos anti-carboidratos (FUSTER e ESKO, 2005).

Tanto as lectinas ancoradas na membrana celular quanto as solúveis, possuem a capacidade de decodificar a informação contida no glicocálix da célula e podem regular a homeostase celular mediante a modulação de sinais, incluindo tráfego e endocitose de receptores (HERNANDEZ e BAUM, 2002; FUSTER e ESKO, 2005; LICHTENSTEIN e RABINOVICH, 2013).

As lectinas encontradas em animais são classificadas em lectinas tipo C, lectinas tipo R, galectinas e lectinas intracelulares pertencentes à família calnexina (tipo M, tipo L e tipo P) (GUPTA, 2012; ROY *et al.*, 2016). Essas lectinas animais, desempenham funções em diversos processos, incluindo: inflamação, resposta imune, infecção bem como na tumorigênese e metástase (DRICKAMER e TAYLOR, 1993; BERG *et al.*, 2002; D'HAENE *et al.*, 2014; ROY *et al.*, 2016). Há muitos dados na literatura mostrando aumento, particularmente das galectinas-1, -3, -4 e -8, em células de glioblastoma multiforme, contribuindo na migração e proliferação celular (STRIK *et al.*, 2001; RORIVE *et al.*, 2001; STRIK *et al.*, 2007; STRIK *et al.*, 2012).

As lectinas extraídas de plantas compreendem um grupo de proteínas homólogas, as quais apresentam funções que incluem proteção contra potenciais agentes patogênicos ou para evitar predadores (BERG

et al., 2002; YAU *et al.*, 2015). Possuem grande interesse farmacológico e biológico, considerando sua alta especificidade pelos glicanos e a capacidade de modular atividades celulares, como por exemplo, processos de morte celular por apoptose e autofagia (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; PRASANNA e VENKATESH, 2015; XIAO *et al.*, 2015.; PINNTO-JUNIOR *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2015). Dessa forma, as lectinas de plantas têm sido estudadas sob o ponto de vista estrutural bem como em relação às atividades biológicas de importância biomédica, incluindo: aglutinação de células, modulação de mitogenicidade, atividade insulino-mimética, ação anticancerígena e ação neuroprotetora. Além disso, mediante análises histoquímicas as lectinas podem servir de ferramenta para determinar a estrutura de oligossacarídeos do glicocálix da superfície celular, o qual representa uma das estratégias, utilizadas pelas células cancerígenas, para estimar o potencial de progressão, malignidade e poder metastático de alguns tipos de tumores (HE *et al.*, 2010; JQUES *et al.*, 2013; MILDE-LANGOSCH *et al.*, 2015).

As sementes de leguminosas são uma rica fonte de lectinas e vários gêneros da subtribo *Diocleinae* (tribo *Phaseoleae*) têm mostrado ser uma fonte importante de diversas lectinas, já isoladas e caracterizadas (CAVADA *et al.*, 1994; CORREIA *et al.*, 2011.; ROCHA *et al.*, 2009; PINNTO-JUNIOR *et al.*, 2015). Esta Subtribo compreende 13 principais gêneros, dos quais *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* estão presentes na biodiversidade brasileira e das quais têm sido purificadas e caracterizadas as lectinas ConBr da *Canavalia brasiliensis*, DGL da *Dioclea grandiflora*, DvL da *Dioclea violacea*, entre outras (CAVADA *et al.*, 2001). As mesmas compartilham os seguintes padrões: são compostas de dois ou quatro monômeros ligados por interações não covalentes; têm alta homologia, com massa molecular de 25-30 KDa onde cada monômero apresenta um CRD específico para glicose/manose; exibem um equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH e propriedades físico-químicas similares (BRINDA *et al.*, 2004). No entanto, apesar da alta homologia elas diferem marcadamente quanto à atividade biológica, sendo algumas delas metaloproteínas que necessitam dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} para exibir sua atividade (CAVADA *et al.*, 2001; ASSREUY *et al.*, 2009; BARROSO-NETTO *et al.*, 2014; PINNTO-JUNIOR *et al.*, 2015). As alterações nas sequências de aminoácidos relacionados com o CRD podem estar associadas com algumas das atividades das lectinas. Um exemplo disso é a substituição de Ser202 do CRD da *Concanavalina A* (ConA) por Pro202 na lectina *Canavalia maritima* (ConM) a qual muda sua afinidade por dissacarídeos (BEZERRA *et al.*, 2011; BARROSO-NETTO *et al.*, 2014).

A ConA isolada das sementes da leguminosa *Canavalia ensiformes*, foi a primeira lectina isolada, sequenciada e cuja a estrutura foi determinada por cristalografia de raios X (CAVADA *et al.*, 2001). ConA é uma lectina com afinidade glicose/manose dependente de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$, com uma estrutura tetramérica (Figura 4) cujos monômeros contem 237 resíduos de aminoácidos (LI *et al.*, 2011).

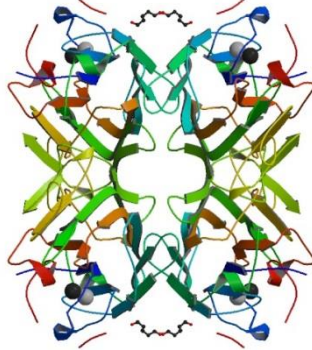


Figura 4. Estrutura cristalográfica da lectina ConA. Fonte: Protein Data Bank.

Numerosos estudos têm demonstrado que ConA pode induzir morte celular por meio da via mitocondrial em diversas células tumorais como, por exemplo, na linhagem celular A375 de melanoma humano, aumentando os níveis de citocromo c o qual estimula as caspases-3 e 9 levando a apoptose (LIU *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2015). Além disso, na linhagem U87 de glioblastoma multiforme humano, ConA via modulação de metaloproteinase de matriz tipo-1 (MT1-MMP) proporcionou aumento de expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), via IKK/ fator nuclear kappa B (NFκB), bem como uma concomitante inibição da fosforilação de AKT, sugestivo de morte celular (SINA *et al.*, 2010; PRATT e ANNABI, 2014). Outros estudos demonstraram que células das linhagens U87 de glioblastoma humano e HepG2 de carcinoma hepático humano tratadas com ConA exibiam aumento da expressão de BNIP-3, Atg3, Atg12 e Atg12-L1 o qual leva à morte celular mediante autofagia mitocondrial (PRATT e ANNABI, 2014; YAU *et al.*, 2015). Trabalhos realizados em um modelo murino de células hepáticas, sugerem que ConA poderia ser internalizada e ativar a autofagia por injúria mitocondrial (CHANG *et al.*, 2007; ROY *et al.*, 2014).

A partir do isolamento de ConA, diferentes lectinas com similaridades estruturais e propriedades físicas similares têm sido purificadas e caracterizadas, como ConBr uma lectina purificada a partir de sementes de *Canavalia brasiliensis*, também glucose/manose específica dependente de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$. A sua estrutura cristalográfica (Figura 5) revela que em comparação a ConA possui dois resíduos de aminoácidos substituídos não próximos ao CRD (GRANGEIRO *et al.*, 1997; SANZ-APARICIO *et al.*, 1997). Tem sido sugerido na literatura, que as substituições de aminoácidos fora do CRD podem ser responsáveis pelas diferenças na afinidade de ligação a açúcares e às atividades biológicas das lectinas (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997; GRANGEIRO *et al.*, 1997).

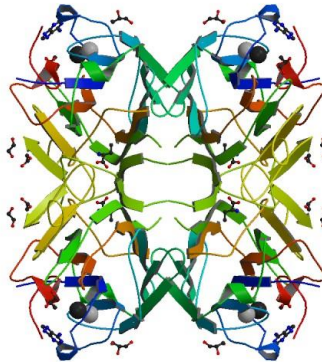


Figura 5. Estrutura cristalográfica da lectina ConBr. Fonte: Protein Data Bank.

Diversos estudos tem mostrado uma diversidade de ações biológicas de ConBr sobre células do sistema imune e sobre a cascata de resposta inflamatória, ações sobre o sistema nervoso, além de ter sido verificado um efeito anti-proliferativo sobre linhagens celulares B16F10 de melanoma da pele (BARBOSA *et al.*, 2001, CAVADA *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2005; BARAUNA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2011; FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2011; RUSSI *et al.*, 2012; JACQUES *et al.*, 2013; DE OLIVEIRA SILVA *et al.*, 2014; RIEGER *et al.*, 2014).

Recentemente nós demonstramos que ConV uma lectina purificada a partir de sementes de *Canavalia virosa*, presente na biodiversidade brasileira, possui a capacidade de reduzir a viabilidade e migração celular em modelo *in vitro* da linhagem C6 de glioblastoma; e que

apresenta similaridades estruturais á ConA, segundo a sua estrutura cristalografica (Figura 6) (OSTERNE *et al.*, 2017).

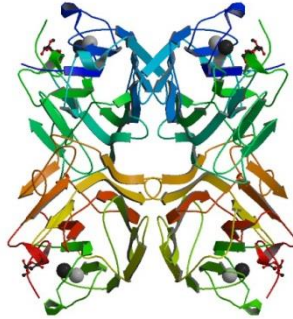


Figura 6 Estrutura cristalográfica da lectina ConV. Fonte: Protein Data Bank.

A lectina DrfL I, purificada das sementes da leguminosa *Dioclea reflexa*, também apresenta afinidade por glucose/manose e dependência por $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$, tendo sido caracterizada recentemente (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016). A sua estrutura cristalográfica (Figura 7) revela que diferente da ConA esta lectina possui uma histidina na posição 131 (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017). Na literatura não há estudos em relação ao possível efeito anti-tumoral da lectina DrfL, mas sim relacionando sua participação na resposta inflamatória, sua capacidade de causar uma inibição parcial na resposta edematogênica e de promover relaxamento de baixa intensidade nos anéis aórticos em modelos *in vivo* de rato Wistar (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017).

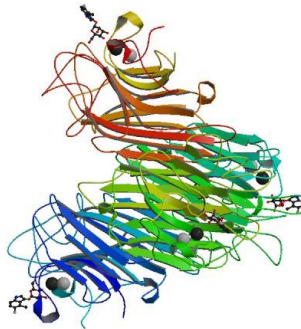


Figura 7 Estrutura cristalográfica da lectina DrfL I. Fonte: Protein Data Bank.

1.4 Mecanismos de Morte Celular

Da mesma forma que o crescimento e a proliferação celular, a morte celular programada apresenta um papel fundamental na homeostase de tecidos e organismos, tanto durante o desenvolvimento quanto na vida adulta (LOCKSHIN e WILLIAMS, 1965; FUSCHS e STELLER, 2011; LIN e BEAHRECKE, 2015). Por muito tempo, acreditou-se que a morte celular era um processo passivo de caráter degenerativo, produto de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento (MEIER *et al.*, 2000; GRIVICICH *et al.*, 2007). Hoje em dia, sabe-se que nem sempre os eventos de morte celular são passivos, e que as células são capazes de induzir a morte celular programada frente às condições patológicas ou morte celular regulada frente a agentes farmacológicos (YU e CHOI, 2000; HENGARTNER, 2000; GALLUZZI *et al.*, 2017).

Os mecanismos de morte celulares, tanto programados como reguladas, podem ser classificados segundo as suas características biológicas em: apoptose, autofagia e necroptose (SCHWEICHEL e MERKER, 1973; OKADA e MAK, 2004; CASTEDO *et al.*, 2004; LIN e BEAHRECKE, 2015). A regulação anormal desses processos é associada com uma variedade de doenças humanas incluindo o câncer. Por exemplo, é bem conhecido que a perda de respostas apoptóticas em uma célula pode ser responsável pelo desenvolvimento do tumor, mas ainda não se encontra bem estabelecida a contribuição dos mecanismos que regulam a autofagia na progressão do câncer (RICCI e ZONG, 2006; LIN e BEAHRECKE, 2015; CHEN *et al.*, 2016).

1.4.1 Apoptose

O termo apoptose deriva da palavra grega para cair (como folhas caindo de uma árvore), se caracteriza por ser um processo conservado evolutivamente com a finalidade de remover células danificadas ou um supérfluo de células, garantindo a homeostase e sobrevivência do organismo (JIANG *et al.*, 2015). A desregulação deste processo se associa a varias doenças incluindo o câncer (HUSSEIN *et al.*, 2003).

De modo geral é um fenômeno bastante rápido compreendendo uma retração da célula que causa perda da aderência com a MEC e células vizinhas, enquanto as organelas mantêm a sua morfologia (com exceção de algumas mitocôndrias); a cromatina se condensa e se

concentra junto à membrana nuclear. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo desintegra-se em fragmentos envoltos pela membrana nuclear, denominados corpos apoptóticos, os quais são fagocitados e removidos sem causar um processo inflamatório (GRIVICIVH *et al.*, 2007).

Geralmente a apoptose ocorre por duas vias (Figura 8): uma via mediante a união de ligantes específicos a receptores de membrana, como FasL de morte celular, também denominada via extrínseca; e a via mitocondrial, dependente do citocromo c, chamada de via intrínseca (TAIT e GREE, 2012; JIANG *et al.*, 2015).

Na via extrínseca, a ativação na superfície celular dos receptores de morte pode ocorrer mediante ligantes específicos como TNF, TRAIL ou FasL. Após esta ligação, os domínios intracelulares dos receptores interagem com o domínio de morte associado a Fas, resultando na associação de uma complexa cascata de sinalização de morte e recrutamento das caspase-8/caspase-10 iniciadoras (JIANG *et al.*, 2015).

A via intrínseca é regulada por proteínas encarregadas de manter a integridade mitocondrial (TAN e WHITE, 2008). Bcl-2 representa uma família de proteínas que regulam a apoptose, os membros Bcl-2 e Bcl-XL são proteínas antiapoptóticas que inibem a liberação de citocromo c ao citosol e a ação de Bax e Bak (proteínas pró-apoptóticas). Por outro lado, as proteínas Bad, Bik, Bid, Bim, PUMA e NOXA são sensores de estresse e de dano celular (GÓMEZ-FERNÁNDEZ, 2013; JIANG *et al.*, 2015), sendo proteínas pró-apoptóticas ativadas na ausência ou deficiência de fatores de sobrevivência, danos ao DNA, altas concentrações de Ca^{2+} intracelular entre outros eventos. Estas proteínas aumentam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria com subsequente liberação de citocromo c. Quando a concentração de citocromo c encontra-se aumentada no citosol, se liga a um fator ativador de protease apoptótica (Apaf-1) e a caspase-9, formando o apoptossomo que ativa a caspase-3 efetora (TAN e WHITE, 2008).

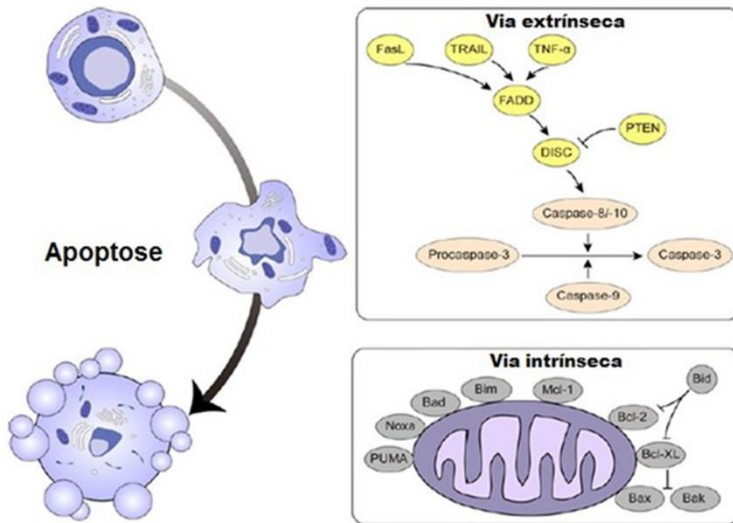


Figura 8. Fatores envolvidos no processo de Apoptose. (Fonte: JIANG *et al.*, 2015) A apoptose inicia-se com a ativação das proteínas caspases, produzindo uma cascata proteolítica que culmina com a hidrólise de proteínas estruturais, enzimas reparadoras do DNA e ativação de endonucleases. A via extrínseca, inicia-se por estímulos extracelulares como FasL, TRAIL ou TNF- α , que ativam caspase 8. Na via intrínseca ocorre a ativação de proteínas pro-apoptóticas (PUMA, Noxa, Bad, Bim, Mcl-1) e inibição de proteínas anti-apoptóticas (Bid, Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Bak). Este processo depende de estímulos intracelulares e da mitocôndria que levam a liberação do citocromo c o qual se liga a Apaf-1 ativando à caspase 9. Sendo em ambas vias, ativada a caspase-3 para levar a célula à morte.

1.4.2 Autofagia

A autofagia é um processo adaptativo conservado evolutivamente, que ocorre em resposta a um estresse metabólico resultando na degradação dos componentes celulares danificados (DANIAL e KORSMEYER, 2004; LUM *et al.*, 2005; OHSUMI, 2014; DEGTYAREV *et al.*, 2014). Existem três tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (DEGTYAREV *et al.*, 2014). Resumidamente, pode ser descrito como um processo de autodegradação e reciclagem dos componentes celulares mediante complexos lisossomais, cumprindo importantes funções na manutenção, diferenciação e defesa celular, remodelação de tecidos,

controle de crescimento e aclimação (OHSUMI, 2014). Em células de câncer, a autofagia atua mediando mecanismos fisiológicos de sobrevivência temporal, e leva a morte quando o estresse se apresenta contínuo ou induz a uma autofagia excessiva (LIU *et al.*, 2013; OHSUMI, 2014; SCHNEIDER e CUERVO, 2014; JIANG *et al.*, 2015).

O processo pode ser dividido em 5 etapas (Figura 9): indução, nucleação vesicular, alongação, docking e fusão, degradação e reciclagem (WEN *et al.*, 2013).

Bioquimicamente, a indução da autofagia se inicia pelo complexo ULK, composto por ULK1/2, mAtg13 e Atg101, que pode ser inibido negativamente pelo complexo mTORC1 (do inglês *mammalian target of rapamycin complex I*) (CHEN *et al.*, 2013; OHSUMI, 2014). Subsequentemente, proteínas e lipídeos são recrutados pela membrana do autofagossoma para a etapa de nucleação vesicular, incluindo a ativação do complexo PI3K/Beclin-1 (HE e LEVINE, 2010; FU *et al.*, 2013; OHSUMI, 2014). Seguido das etapas de alongação e conclusão das vesículas, que envolve formação de dois sistemas conjugados semelhantes à ubiquitina, a primeira via inclui a conjugação covalente de Atg12 e Atg5; enquanto a segunda via inclui a ativação de LC3/Atg4 (OHSUMI, 2014; JIANG *et al.*, 2015). O acoplamento (“docking”) e a fusão do autofagossoma com lisossoma leva a maturação do autolisossomo, com eventual repartição dos conteúdos autofagossômicos (OHSUMI, 2014; NAGELKERKE *et al.*, 2015).

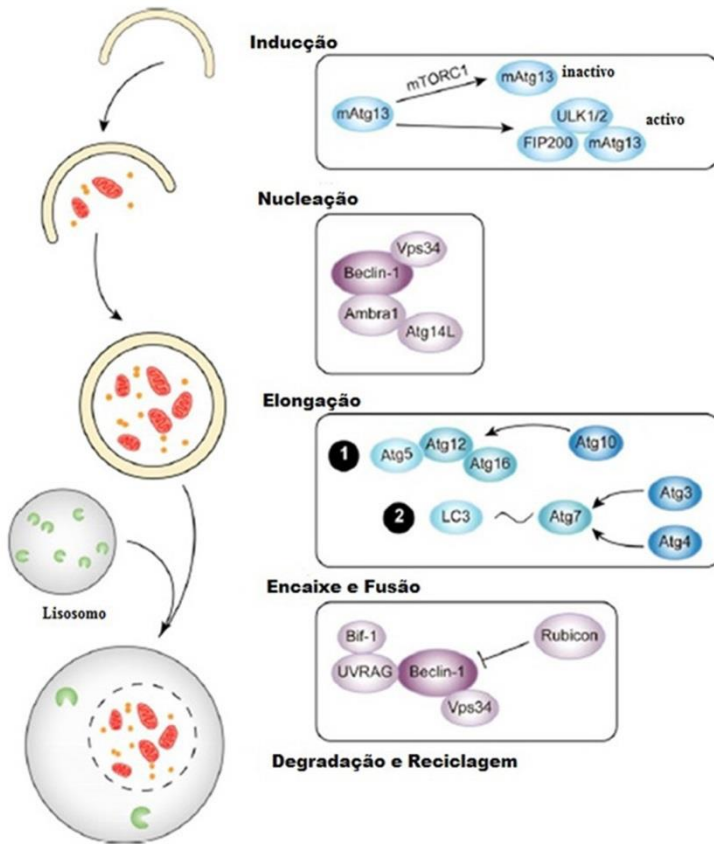


Figura 9. Fatores envolvidos no processo de Autofagia. (Fonte: JIANG *et al.*, 2015). A formação do autofagossomo requer a ativação de proteínas envolvidas com a autofagia, as Atgs, que medeiam as etapas principais da autofagia: iniciação, nucleação, alongação, encaixe (docking) e degradação. A proteína LC3 é uma das Atgs mais importantes que ajudam no processo de alongação e encaixe; sua forma lipídica (LC3-II) encontra-se em ambas superfícies do autofagossomo e é degradada quando o autofagossomo se liga com o lisossomo. A autofagia é regulada principalmente por modificações post-traducionais e modificações lipídicas das proteínas Atgs, ajudado por Atg5 ou Atg12.

1.4.3 Necroptose

A necroptose é o tipo de morte celular na qual as células sofrem um insulto celular, agregação da cromatina, desorganização do

citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular, com liberação do conteúdo causando danos às células vizinhas, com produção de inflamação local (ZIEGLER e GROSCURTH, 2004; GRIVICICH *et al.*, 2007). Observa-se que neste tipo de morte celular, diferente dos demais, não há requisição de energia (WANG, 2014).

Este processo encontra-se conectado com outros tipos de morte celular programada, sendo que os mecanismos moleculares envolvidos no processo de necroptose, apresenta similaridade com a via extrínseca da apoptose. Entretanto, é independente da ativação de caspases e não envolve fragmentação de DNA (WU *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2016).

O protótipo deste tipo de morte é representado pela ação de TNF, que ativa TNFR1 levando à ativação da proteína quinase 1 de interação ao receptor (RIPK1), uma serina/treonina quinase que é ativada por fosforilação e que recruta e ativa a proteína quinase 3 de interação ao receptor (RIPK3) (CHO *et al.*, 2009). RIPK3 promove a ativação da proteína quinase de domínio de linhagem mista (MLKL), que por sua vez se associa a membrana plasmática provocando danos e morte da célula, sendo esta forma regulada de necrose, conhecida como necroptose (NEWTON *et al.*, 2014; GALLUZZI *et al.*, 2017), resumido na figura 10.

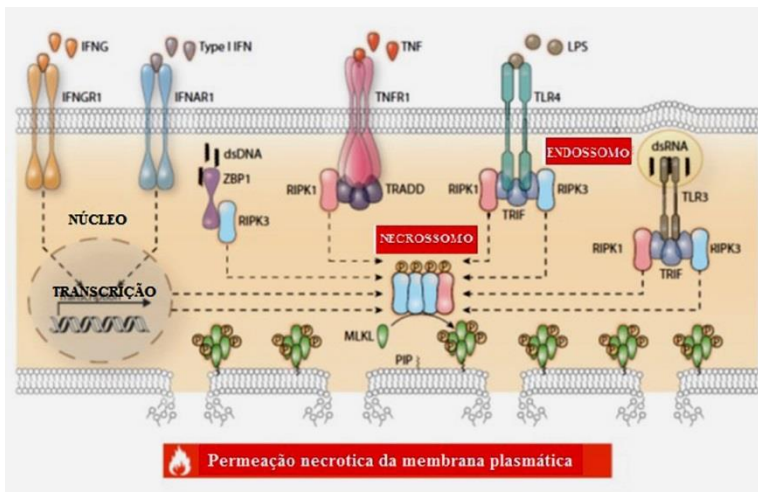


Figura 10. Fatores envolvidos no processo de Necroptose. (Fonte: GALLUZZI *et al.*, 2017). A necroptose depende criticamente da proteína quinase 3 de interação com receptor (RIPK3), que é uma serina/treonina quinase

que medeia a ativação, via fosforilação, da proteína quinase com domínio similar a proteína quinase de linhagem mista (MLKL), resultando na oligomerização de MLKL, translocação ao interior da membrana plasmática e subsequentemente morte celular. A formação do complexo RIPK1/RIPK3, denominado necrossomo, seguido da ativação de MLKL, leva a necroptose como resultado de sinalização extracelular ou intracelular. A cascata que resulta na morte celular por necroptose inicia-se pela ligação de TNF ao TNFR1 na presença de inibidores de caspase e/ou SMAC, sendo criticamente dependente da fosforilação de RIPK3 pela RIPK1.

1.5 Linhagens celulares como modelos de estudo do GBM

A proliferação descontrolada, característica das células cancerígenas *in vivo*, pode ser imitada em condições *in vitro* (COOPER, 2000). Assim, numerosos modelos de linhagens celulares cancerígenas foram estabelecidos e utilizados ao longo dos anos, entre elas as de GBM. Para a realização deste trabalho, nos escolhemos as linhagens C6 (rato Wistar) e U87 (humano), a fim de caracterizar a base molecular do mecanismo de ação das lectinas DrfL I e ConBr.

1.5.1 Linhagem celular C6

A linhagem celular C6 (ATCC CCL-107) de glioma, foi originalmente isolada de um tumor cerebral de rato Wistar, induzido pela injeção de N-nitrosometilurea, sendo uma linhagem celular com característica astrocitárias parcialmente diferenciada, e apresentando elevada expressão da proteína S100 (BENDA *et al.*, 1968; DONTA, 1973; WOLFF *et al.*, 1997). As células C6 caracterizam-se por ser uma linhagem homogênea do tipo aderente de uma rápida proliferação e que não expressa GFAP (proteína glial fibrilar ácida) (NAGANO *et al.*, 1993; WHITTLE *et al.*, 1198). Notavelmente, quando injetadas no cérebro de ratos neonatos estas células reproduzem um tumor que apresenta similaridades morfológicas com o glioblastoma humano, incluindo: polimorfismo nuclear, altas taxas mitóticas, focos de necrose, infiltração linfocitária (BENDA *et al.*, 1968; AUER *et al.*, 1981; GROBBEN *et al.*, 2002) e neovascularização (WHITTLE *et al.*, 1998; SAN-GALLI *et al.*, 1989).

1.5.2 Linhagem celular U87

A linhagem U87 (ATCC HTB-14) é derivada de um tumor maligno de um paciente de 44 anos pela técnica de explante (POTÉN *et al.*, 1968), sendo muito utilizada como modelo de estudo de glioma grau IV ou GBM (CLARK *et al.*, 2010). Esta linhagem se caracteriza por apresentar heterogeneidade de populações celulares, onde algumas são aderentes e outras capazes de formar esferas ou pequenos aglomerados (POTÉN *et al.*, 1968). As esferas são ricas em células tronco neurais e possuem a capacidade de formar tumores com características típicas de GBM, quando implantadas em camundongos imunocomprometidos (YU *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

As estatísticas atuais apontam que a mortalidade relacionada com o câncer tem aumentado nos últimos anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil), 2014; BRASIL-MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2014). Dentro desse espectro os gliomas correspondem ao terceiro tipo de câncer; sendo o mais comum dos tumores primários do SNC e apresentando a maior taxa de mortalidade (HEISIGER, 1992; URTASUN *et al.*, 2006; LE MERCIER *et al.*, 2008). Um aspecto que se destaca é que os tratamentos convencionais como a ressecção cirúrgica e radioterapia oferecem um benefício paliativo no controle do GBM. Além disso, as drogas anticancerígenas disponíveis e utilizadas no tratamento parecem ter pouca eficiência e baixa especificidade, causando dano celular não específico e levando a uma série de efeitos colaterais (JURATLI, 2013; REDDY *et al.*, 2003; JARAMILLO *et al.*, 2010; THEELER e GILBERT, 2015). Portanto, estudos de novos compostos que sejam capazes de interagir com alta especificidade sobre as células tumorais e que de forma seletiva possam levar à morte ou inibição da proliferação dessas células representam um desafio.

Dessa forma, baseado nos estudos apresentados, formulamos a seguinte pergunta: as lectinas isoladas de plantas poderiam induzir efeitos citotóxicos seletivos em linhagens de glioblastoma? Lembrando que nas últimas décadas as lectinas de plantas têm sido apresentadas como uma classe de proteínas de grande interesse biológico e farmacológico, possuindo a capacidade de induzir morte celular com mais seletividade sobre células tumorais; considerando a especificidade do CRD e o estado de glicosilação anormal de glicolípidos e/ou glicoproteínas expressas nas células tumorais.

Nesse sentido, o presente trabalho foi desenvolvido para investigar o efeito citotóxico e o possível mecanismo de ação das lectinas ConBr, obtida das sementes de *Canavalia brasiliensis*, e DrfL I, obtida das sementes de *Dioclea reflexa*, sobre culturas celulares de glioma das linhagens C6 (rato) e U87 (humana).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial anticancerígeno relativo à migração, ação antiproliferativa e indutora de morte celular das lectinas leguminosas da subtribo *Diocleinae* (tribo *Phaseoleae*), ConBr e DrfL I, sobre culturas celulares de glioma das linhagens C6 (rato) e U87 (humano).

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar o efeito citotóxico das lectinas ConBr e DrfL I, relativo a diminuição da viabilidade celular, nas culturas celulares de glioma.
- Elucidar o papel do domínio de ligação a carboidratos (CRD) das lectinas, em relação a sua capacidade de reduzir a viabilidade celular, nas culturas celulares de glioma.
- Determinar o mecanismo de morte celular induzido pelas lectinas ConBr e DrfL I nas culturas celulares de glioma.
- Investigar o efeito citostático relativo a migração/proliferação das lectinas sobre as culturas celulares de glioma.
- Avaliar a sobrevivência clonogênica e resistência das culturas celulares de glioma frente ao tratamento com as lectinas ConBr e DrfL I.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura Celular

Foram utilizadas células de glioma de rato Wistar (*Rattus norvegicus*) da linhagem C6 e células de glioma de humano (*Homo sapiens*) da linhagem U87. As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), a 37°C em atmosfera com 5 % de CO₂. Ao atingirem a confluência de 80 % as células eram repicadas. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas células entre a 3^a a 18^a passagem, sendo padronizado o número de células para os ensaios mediante a contagem em câmara de Neubauer.

4.2 Lectinas

As lectinas utilizadas foram isoladas de sementes de leguminosas da família *Fabaceae* pertencentes às seguintes tribos e gêneros: **i**) tribo *Phaseoleae*, gêneros - *Dioclea reflexa* (DrfL I), *Dioclea wilsonni* (DwL), *Canavalia bonariensis* (CaBo), *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Canavalia virosa* (ConV); **ii**) tribo *Mimoseae*, gênero - *Plathymenia foliolosa*; **iii**) tribo *Dalbergieae*, gêneros - *Vatairea macrocarpa* (VML), *Centrolobium tomentosum* (CTL), *Andira anthelmia* (AAL), *Andira fraxinifolia* (AFL), *Andira surinamensis* (ASL); **iv**) tribo *Millettieae*, gênero - *Lonchocarpus araripensis* (LaL).

O isolamento e o fracionamento das lectinas seguiram os métodos clássicos descritos por Moreira e Cavada em 1984, mediante precipitação com sulfato de amônia e cromatografia por afinidade em Sephadex G-50. Posteriormente para verificar a pureza do isolado, foi realizado um gel de SDS-PAGE, mostrando uma única banda. A lectina ConBr também foi produzida mediante engenharia genética em *Escherichia coli* a partir de clones do DNAc expresso no vector de pET15b. A lectina recombinante (rConBr) foi purificada por cromatografia de afinidade através do tag hexahistidina presente na extremidade amino-terminal, sendo verificada a sua pureza pelos métodos clássicos já descritos (NOQUEIRA *et al.*, 2002). A purificação das lectinas, bem como a produção recombinante foi realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular (BioMol-Lab) da Universidade Federal do Ceará (UFC), coordenado pelo professor Dr. Benildo Sousa Cavada.

4.3 Diluição, Bloqueio e Desnaturação das lectinas

As lectinas utilizadas para os tratamentos foram diluídas em tampão HEPES-salina sem glicose composto por NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 1.2 mM, HEPES 25 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.4. A fim de avaliar se seu efeito é dependente da sua estrutura proteica, as lectinas diluídas foram previamente desnaturadas por aquecimento (100°C) em banho seco durante 10 minutos e posteriormente utilizadas para o tratamento das linhagens. Para determinar se a ação das lectinas era dependente do seu domínio de ligação a carboidrato (CRD) este foi bloqueado, através da diluição da lectina em tampão HEPES-salina sem glicose contendo 0,1 M de seu açúcar ligante específico (α -metil-D-manosídeo) e mantida durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente foram utilizadas para o tratamento nas linhagens mencionadas anteriormente.

4.4 Ensaio de Viabilidade Celular

Para avaliar a viabilidade celular após o tratamento, foi utilizado o teste colorimétrico com sal de tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), conforme Mosmann (1983). Para a avaliação na linhagem C6, placas de 96 poços foram semeadas com 0,1 mL de meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), em uma densidade de 50.000 células/mL. As placas foram incubadas por 24 h, em estufa a 37°C numa atmosfera umidificada com 95 % O₂ e 5 % CO₂ até confluência de 80 %. Após este período, o meio foi substituído por um novo meio isento de soro e acrescido de veículo (controle) ou lectina nas concentrações de 1, 10, 30 e 50 μ g/mL e incubadas em estufa por 3, 6, 12 ou 24 h dependendo do tempo de tratamento. Passado o período de tratamento, o conteúdo de cada poço foi substituído por 0,1 mL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL em tampão HBSS). As placas foram incubadas por 1 h a 37°C ao abrigo da luz. Em seguida, foi retirada a solução de MTT e adicionou-se 0,1 mL de DMSO em cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. Após um período de 30 min, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 TECAN) no comprimento de onda de 540 nm.

Para a avaliação na linhagem U87, placas de 96 poços foram semeadas com 0,1 mL de suspensão de células na densidade de 500.000 células/mL. As placas foram incubadas nas mesmas condições citadas anteriormente. Após 24 h, o meio foi substituído por novo meio isento de soro, acrescido de veículo (controle) ou lectina nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 μ g/mL e incubadas em estufa por 12, 24, 48 e 72 h de

acordo com o tempo de tratamento que se pretendia analisar. Passado o tempo de tratamento, foram adicionadas as células 0,1 mL da solução de MTT e incubado por 4 h a 37°C ao abrigo da luz. Em seguida, foi retirado, todo o meio existente na placa e adicionado 0,15 mL de DMSO em cada poço, permanecendo incubado por 1 h também ao abrigo da luz a 37°C (HONG *et al.*, 2016). A leitura da absorbância foi realizada nas mesmas condições utilizadas para a linhagem C6.

Os valores de absorbância foram transformados em porcentagens de viabilidade celular, em relação à média dos controles celulares, considerados 100 % viáveis. Realizando-se 4 experimentos independentes em triplicata para cada lectina e tempos testados.

Os percentuais de viabilidade referente às diferentes concentrações de cada lectina utilizada nos tratamentos, foram organizados na forma de gráfico, e através de análise de regressão logarítmica foi calculado o IC₅₀ (concentração de lectina que inibiu a viabilidade celular em 50 %, quando comparado ao controle não tratado). Este procedimento foi realizado utilizando o Software de análises estatísticas GraphPad Prism, versão 6.0.

4.5 Potencial de Membrana Mitocondrial

O potencial transmembrana mitocondrial foi mensurado por meio da sonda fluorescente tetrametilrodamina-etil-ester (TMRE) (EHRENBERG *et al.*, 1988; LI *et al.*, 2015). Para a avaliação do efeito das lectinas nas linhagens celulares C6 e U87, as mesmas foram plaqueadas e incubadas em iguais condições ao ensaio de MTT. As células da linhagem C6, foram tratadas com ConBr e U87 nas mesmas concentrações já citadas por 6 h; em quanto as células U87 foram tratadas com DrfL por 6 e 12 h, também nas mesmas concentrações já citadas. Passado o período de tratamento, o meio foi substituído por 0,1 mL de uma solução de TMRE (10 nM). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 20 min, ao abrigo da luz. Após esse período, as células foram lavadas 1 vez com PBS, composto por 0,14 M de NaCl, 0,003 M de KCl, 0,01 M de Na₂HPO₄ e 0,002 M KH₂PO₄, seguido da adição de 0,1 mL/poço desse mesmo tampão. Realizou-se leitura da fluorescência por espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 TECAN) utilizando os comprimentos de onda de excitação de 550 nm e emissão 590 nm. Os valores da fluorescência foram transformados em porcentagens, em relação à média dos controles celulares, considerados como 100 %. Os ensaios foram realizados em 4 experimentos independentes em triplicata para cada lectina e tempo testado.

4.6 Atividade de Lactato Desidrogenase

A atividade da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) foi medida através do método descrito por Rosa *et al.* em 1997. Para a avaliação na linhagem C6, as células foram semeadas, incubadas e posteriormente tratadas nas condições já citadas. Passado o período de tratamento 0,05 mL de meio de cada poço foi transferido para outra placa de 96 poços. Nessa nova placa, adicionou-se 0,2 mL do tampão fosfato de potássio 0,5 M acrescido de 0,002M de piruvato, 0,003 M de NaHCO_3 e 0,001M de NADH. A leitura da cinética da atividade enzimática foi realizada por espectrofotômetro. Como controles positivos, células foram incubadas em estufa a 37°C por 15 min com Triton-X100 0,02 % antes de retirar os 0,05 mL de meio. Os valores da variação de fluorescência do NADH, medidos para cada poço, foram transformados em porcentagens, em relação à média dos controles positivos, considerados como 100 %. Os ensaios foram realizados em 4 experimentos independentes e em triplicata para cada lectina e tempo testados.

4.7 Ensaio de Migração

Para avaliar se as lectinas apresentam efeito citostático e ou anti metastático nas linhagens C6 e U87 de glioblastoma, foi utilizado o ensaio de migração previamente descrito (LIANG *et al.*, 2007; HONG *et al.*, 2016; OSTERNE *et al.*, 2017). Para isso, células da linhagem C6 foram semeadas em placas de 48 poços com 0,2 mL de meio DMEM suplementado com 10 % de SFB, em uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células/mL. As placas foram incubadas por 24 h, em estufa a 37°C numa atmosfera umidificada com 95 % O_2 e 5 % CO_2 até confluência de 80 %. Após este período, o meio foi retirado e realizou-se um risco no meio de cada poço da placa de 48 poços com o diâmetro da ponta de uma ponteira de volume de 200 μL . Posteriormente, os poços foram lavados com PBS para remover as células fracamente aderidas, sendo a seguir adicionado novo meio de cultivo isento de soro, contendo veículo ou as lectinas ConBr e DrfL I nas concentrações de 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Para análise na linhagem U87, as células foram plaqueadas nas mesmas condições citadas acima e tratadas com DrfL I nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. As imagens dos experimentos foram capturadas nos tempo 0 h, 24 h e 48 h com a utilização da técnica de microscopia óptica convencional, através do equipamento Nikon Eclipse T2000-U.

Com auxílio do Software livre ImageJ, foi calculada a área dos riscos de cada tratamento ao longo dos períodos analisados, sendo expressos em porcentagens de fechamento em relação às áreas obtidas no tempo 0 h, sendo comparado as porcentagens de cada tempo de tratamento com os controles celulares.

4.8 Microscopia de Fluorescência

4.8.1 Ensaio com Laranja de acridina

A fim de analisar a existência de aumento do processo de autofagia induzido pelo tratamento com as lectinas ConBr e DrfL I foi realizado o ensaio de Laranja de acridina (LA) em 4 experimentos independentes realizadas em triplicado, o qual detecta a presença de vesículas ácidas (Singh *et al.*, 2016; OSTERNE *et al.*, 2017). Para isso, as células de glioma da linhagem C6 foram semeadas em placa de 48 poços, com 0,2 mL de médio DMEM suplementado com 10 % de SFB, uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células/mL. As placas foram incubadas por 24 h, em estufa a 37°C numa atmosfera umidificada com 95 % O₂ e 5 % CO₂ até confluência de 80 %. Após este período, o meio foi substituído por novo meio sem soro acrescido de veículo (controle) ou lectina nas concentrações de 1, 10, 30 e 50 µg/mL e incubadas em estufa por 24 ou 48 h dependendo do tempo de tratamento. Para a linhagem U87 utilizaram-se as mesmas condições sendo as células tratadas com a lectina DrfL I nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 µg/mL. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS a 37°C e fixadas com paraformaldeído na concentração de 3,7 % a 37°C por 5 min, posteriormente, os poços foram lavados com PBS a 37°C. Adicionou-se então 0,1 mL de LA (10 µg/mL, Sigma Chemicals, EUA) a qual permaneceu incubada durante 20 min ao abrigo da luz. As células foram visualizadas pela técnica de microscopia de fluorescência através do aparelho Nikon Eclipse microscópio invertidos T2000-U usando conjuntos de filtros, 470 nm excitação e 525 nm emissão para o análise da integridade da cromatina, e 350 nm excitação e 615 nm emissão para o análise da presença de vesículas ácidas. A fluorescência da microscopia foi quantificada pelo Software livre ImageJ. Os valores foram convertidos em porcentagens da média de fluorescência AVO (vesículas ácidas, em vermelho) pela média de CR (cromatina, em verde), e comparadas às porcentagens de cada tratamento em relação à média dos controles celulares.

4.8.2 Ensaio com Iodeto de propídio

Com o objetivo de analisar a indução de necrose pelo tratamento com as lectinas ConBr e DrfL I foi realizado ensaio com o corante iodeto de propídio em 4 experimentos independentes realizadas em triplicado (Singht *et al.*, 2016). Sendo as células C6 e U87 semeadas, incubadas e tratadas baixo as mesmas condições utilizadas para o ensaio com LA. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e incubadas durante 15 min no escuro com tampão de ligação (composto por 0,01 M de HEPES (pH 7,4), 140 mM de NaCl, 25 mM de CaCl₂), contendo Hoechst (1 g/mL; Sigma Chemicals, EUA) e iodeto de propídio (IP; 14 g/mL, Sigma Chemicals, EUA). As células foram analisadas pela técnica de microscopia de fluorescência também com auxílio do equipamento com Nikon Eclipse, modelo T2000-U usando conjuntos de filtros, 488 nm excitação e 560 nm emissão para IP e 353 nm excitação e 483 nm emissão para Hoeschst. A fluorescência da microscopia foi quantificada pelo Software livre ImageJ. Os valores foram transformados em porcentagens da média de fluorescência de IP pela média de fluorescência de Hoechst, e comparadas às porcentagens de cada tratamento em relação à média dos controles celulares.

4.9 Ensaio de Resistência ao Tratamento

Para analisar se as células da linhagem C6 de glioblastoma apresentam a capacidade de regeneração após tratamento com as lectinas ConBr e DrfL I nos períodos de 24 e 48 h de tratamento. Placas de 96 poços foram semeadas com 0,1 mL de células C6 na densidade de 5000 células/mL e incubadas a 37°C em estufa de 5 % de CO₂ por 24 h até confluência de 80 %. Após esse período, o meio foi acrescido de veículo (controle) ou as lectinas DrfL I e ConBr nas concentrações 1, 10, 30 e 50 µg/mL sendo incubadas em estufa por 24 ou 48 h dependendo do tratamento. Após o período, visualizou-se o efeito do tratamento mediante a técnica de microscopia de luz convencional através do aparelho Nikon Eclipse T2000-U; sendo posteriormente trocado o meio por um novo (sem o tratamento) e incubada nas mesmas condições por 24 ou 48 h. Posteriormente, as placas foram observadas a fim de analisar a capacidade de regeneração das células na ausência da lectina. Novamente as células foram tratadas com lectinas ou veículo nas mesmas concentrações e período, para avaliar se uma segunda

exposição ao tratamento teria o mesmo efeito nas células resistentes anteriormente (Figura 11).

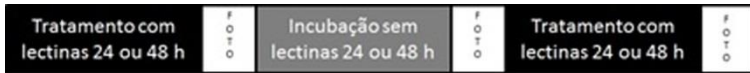


Figura 11. Tratamento para ensaio de Resistencia. Diagrama do tratamento intermitente com as lectinas DrfL I e ConBr nas células C6.

4.9 Ensaio de Clonagem Celular

Para analisar a sobrevivência clonogênica (SHEN *et al.*, 2014) da linhagem C6, placas de 96 poços foram semeadas com 0,1 mL de meio DMEM suplementado com 10 % de SFB, na densidade de 50.000 células/mL. As placas foram incubadas por 24 h, em estufa a 37°C numa atmosfera umidificada com 95 % O₂ e 5 % CO₂ até confluência de 80 %. Após este período, o meio foi substituído por novo meio isento de soro acrescido de veículo (controle) ou lectina nas concentrações de 1, 10, 30 e 50 µg/mL e incubadas em estufa por 24 ou 48 h. Logo após o tratamento, as células foram tripsinizadas e contadas com câmara de Neubauer e submetidas à técnica de diluição limitante, até a concentração final de 1/2 célula/200 µL de cada tratamento, que foi semeado em placa de 48 poços e incubadas em estufa nas mesmas condições já citadas durante 2 semanas. As colônias foram visualizadas através da técnica de microscopia conforme descrito anteriormente. Os poços de cada tratamento que continham uma colônia foram tripsinizados e as células foram contadas em câmara de Neubauer, a fim de calcular a Eficiência Clonogênica (EC) em comparação ao controle celular.

$$(EC) = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células contadas}}{\text{n}^\circ \text{ de células semeadas}} \times 100.$$

4.10 Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo programa Graph Pad Prism versão 6.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Os dados apresentados possuem distribuição normal, de acordo com o teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via seguido por teste pos-hoc de Bonferroni. Os resultados foram expressos

58 MATERIAIS E MÉTODOS

com média \pm erro padrão da média (E. P. M.). Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do potencial citotóxico de lectinas isoladas de sementes de leguminosa

O potencial citotóxico de 12 lectinas, isoladas de sementes de leguminosas oriundas do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas da Universidade Federal do Ceará (UFC), foram avaliadas através do método de redução do MTT. Para isso, células da linhagem C6 de glioblastoma de rato foram tratadas por 24 h com veículo (controle; HEPES/salina) ou lectina nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, conforme os dados apresentados na figura 12.

Como pode ser observado, as lectinas Cabo, ConV, DWL, DrfL I e ConBr induziram diminuição da viabilidade celular, medida através do ensaio do MTT, nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ no período de 24 h de tratamento. Entretanto, as lectinas DrfL I e ConBr também causaram redução da viabilidade celular em concentrações menores, a partir de 30 $\mu\text{g/mL}$.

60 RESULTADOS

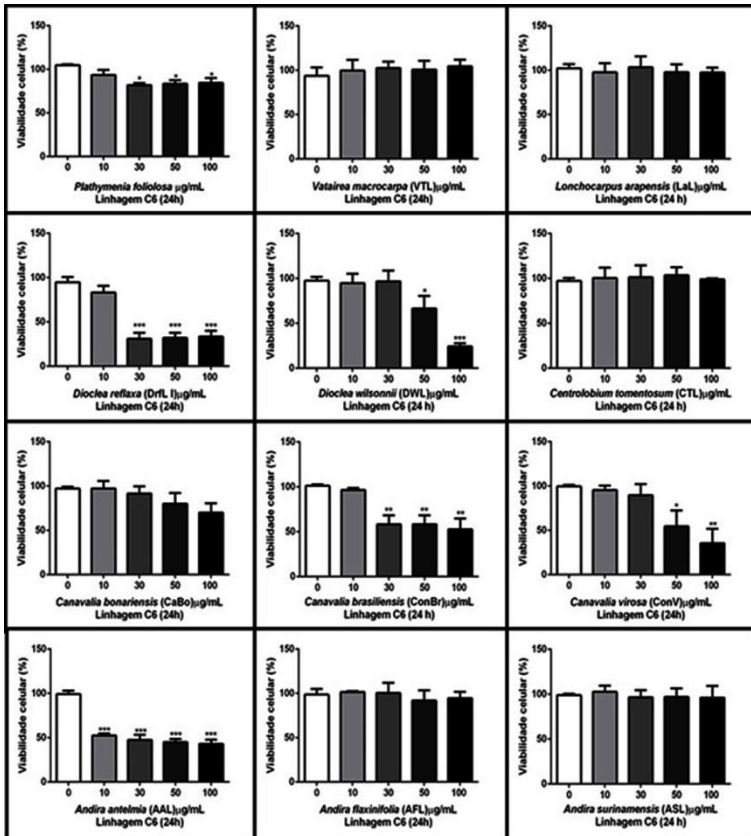


Figura 12. Avaliação do Potencial Citotóxico de lectinas leguminosas. A citotoxicidade das lectinas foi avaliada pela viabilidade celular mediante o ensaio de MTT. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram tratadas com veículo (HEPES) ou lectinas nas concentrações 10, 30, 50 e 100 µg/mL por 24 h. Os dados foram expressos em porcentagem (o controle foi considerado 100 %), e os valores são apresentados como média ± SEM de quatro experimentos independentes em triplicata. * p<0.1, ** p<0.01 e *** p<0.001 quando comparado com o controle. ANOVA de uma via seguida do teste pos-hoc de Bonferroni.

Utilizando os dados apresentados na figura 12 foi calculado o IC₅₀ para cada uma das lectinas, concentração que inibiu a viabilidade celular em 50 % em relação ao controle (grupo veículo). Os valores de IC₅₀ são apresentados na Tabela 2.

Lectina	Leguminosa	IC ₅₀	Intervalo 95% de confiança	Tribo
ConBr	<i>Canavalia brasiliensis</i>	84,35	50,61 - 140,6	Phaseoleae
DwL	<i>Dioclea wilsonii lectin</i>	66,16	57,65 - 75,94	Phaseoleae
DrfL I	<i>Dioclea reflexa Lectin I</i>	25,91	18,08 - 37,12	Phaseoleae
CaBo	<i>Canavalia bonariensis Lectin</i>	207,2	93,42 - 459,4	Phaseoleae
ConV	<i>Canavalia virosa lectin</i>	66,54	52,17 - 84,86	Phaseoleae
VML	<i>Vaiteare macrocarpa</i>	x	x	Daibergieae
LaL	<i>Lonchocarpus arapensis lectin</i>	x	x	Millettieae
PfL	<i>Plathymenia foliolosa</i>	x	x	Mimoseae
AFL	<i>Andira flaxinifolia</i>	x	x	Daibergieae
ASL	<i>Andira surinamensis lectin</i>	x	x	Daibergieae
AAL	<i>Andira anteiimia</i>	17,17	8,855-33,29	Daibergieae
CTL	<i>Centrobium tomentosum</i>	x	x	Daibergieae

Tabela 2. IC₅₀ das lectinas avaliadas. “X” quando a lectina não apresentou efeito de redução da viabilidade celular pelo método de MTT.

Considerando estes resultados iniciais, foram escolhidas as lectinas ConBr e DrfL I, ambas da Tribo *Phaseoleae* e com afinidade pelos glicanos D-glucose e D-manose para aprofundar a avaliação do mecanismo de ação, considerando que apresentaram baixo IC₅₀ aliado a uma ação eficiente, em termos de diminuição da viabilidade celular, em concentrações mais baixas (a partir de 30 µg/mL).

Cabe destacar que a lectina AAL apresentou uma aparente capacidade de reduzir a viabilidade celular, medida pelo ensaio do MTT, em 24 h a partir da concentração de 10 µg/mL. Entretanto, não foram observadas alterações morfológicas frente à microscopia de luz, desse modo essa lectina não foi considerada nesse estudo, devendo esse efeito ser mais bem avaliado em estudos posteriores.

5.2 Lectinas DrfL I e ConBr apresentam efeitos citotóxicos concentração/tempo dependentes

Sabendo que as lectinas DrfL I e ConBr apresentam efeitos citotóxicos na linhagem C6 após 24 h de tratamento, foi desenvolvido um estudo mais detalhado. Nesse sentido, foram realizadas curvas para determinar a dependência de concentração e tempo na resposta citotóxica das lectinas. Para isso, as células C6 foram tratadas com concentrações de 1, 10, 30 e 50 µg/mL de DrfL I e ConBr, nos tempos

62 RESULTADOS

3, 6, 12 e 24 h. Observamos que as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram ações estatisticamente diferentes sobre a redução de viabilidade, no período de 24 h de tratamento. Dessa forma, a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ não foi incluída no estudo, sendo a concentração máxima de lectina utilizada de 50 $\mu\text{g/mL}$. Os ensaios de MTT foram acompanhados por microscopia convencional para avaliar se existiam mudanças morfológicas nas células pelo efeito do tratamento com DrfL I e ConBr, conforme ilustrado nas figuras 13 e 14, respectivamente.

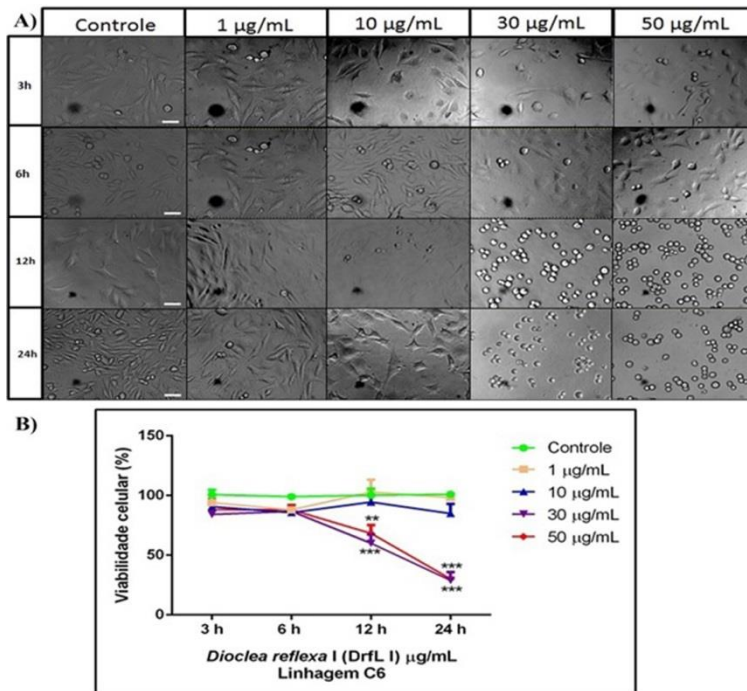


Figura 13. Avaliação do efeito citotóxico concentração/tempo dependente da lectina DrfL I na linhagem C6. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou DrfL I nas concentrações 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ pelos períodos de 3, 6, 12 e 24 h. A) Ilustra as mudanças morfológicas das células mediante microscopia invertida (aumento de 20X). A barra de escala representa 50 μm . B) Avaliação da viabilidade celular mediante o ensaio de MTT frente ao tratamento com lectina DrfL I. Os dados foram expressos em porcentagem (o controle foi considerado 100 %), e os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em

triplicata. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ quando comparado com o controle. ANOVA de uma via seguida do teste pos-hoc de Bonferroni.

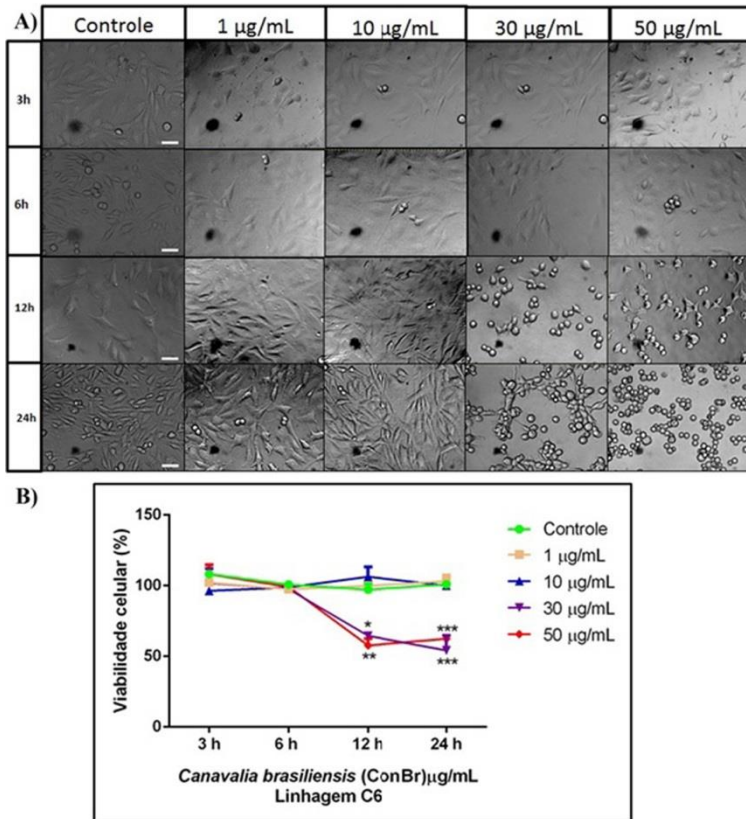


Figura 14. Avaliação do efeito citotóxico concentração/tempo dependente da lectina ConBr na linhagem C6. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram tratadas com veículo (HEPES) ou ConBr nas concentrações 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ pelos períodos de 3, 6, 12 e 24 h. A) Ilustra as mudanças morfológicas das células mediante microscopia invertida (aumento de 20X). A barra de escala representa 50 μm . B) Avaliação da viabilidade celular mediante o ensaio de MTT frente ao tratamento com lectina ConBr. Os dados foram expressos em porcentagem (o controle foi considerado 100 %), e os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0.1$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ quando comparado com o controle. ANOVA de uma via seguida do teste pos-hoc de Bonferroni.

64 RESULTADOS

Como pode ser observado, o efeito citotóxico das lectinas DrfL I (Figura 13) e ConBr (Figura 14), inicia-se após 12 h de tratamento na concentração 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sendo acompanhada por mudanças morfológicas de retração dos prolongamentos citoplasmáticos, provavelmente resultante da perda de adesão. Apesar do tratamento com DrfL I na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (24 h) não ter apresentado uma diminuição da viabilidade celular significativo estatisticamente, pode-se observar que já existe um comprometimento da morfologia celular, que não foi observado no tratamento com a lectina ConBr. Isso pode ser um indicativo de uma ação mais potente de DrfL I em perturbar este parâmetro.

Os mesmos ensaios foram realizados na linhagem celular U87 de glioblastoma humano, com o objetivo de comparação da ação das lectinas nesta linhagem. Como se observa na figura 15, a lectina DrfL I causou um efeito citotóxico concentração/tempo dependentes, acompanhado de mudanças morfológicas. No entanto, as concentrações utilizadas no tratamento das células U87 tiveram que ser aumentadas, utilizando-se as concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Da mesma forma, o período de exposição à lectina foi ampliado para 12, 24, 48 e 72 h. Os resultados mostram que a viabilidade celular só sofreu alterações após 24 h de tratamento a partir da concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, enquanto a concentração de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ só foi efetiva a partir de 48 h de tratamento.

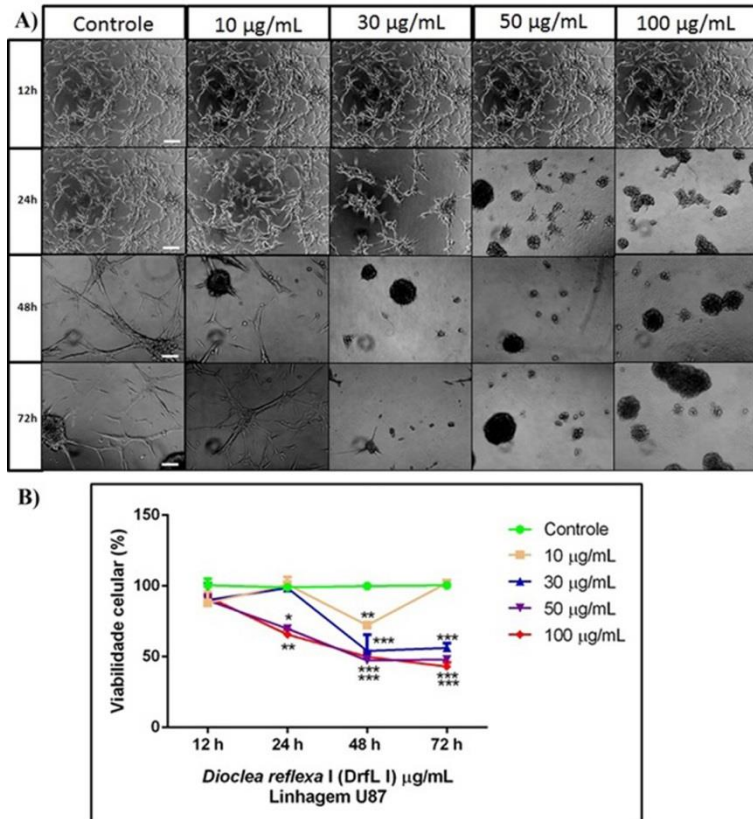


Figura 15. Avaliação do efeito citotóxico concentração/tempo dependente da lectina DrfL I na linhagem U87. Células da linhagem U87 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou DrfL I nas concentrações 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ pelos períodos de 12, 24, 48 e 72 h. A) Ilustra as mudanças morfológicas das células mediante microscopia invertida (aumento de 10X). A barra de escala representa 100 μm . B) Avaliação da viabilidade celular mediante o ensaio de MTT frente ao tratamento com lectina DrfL I. Os dados foram expressos em porcentagem (o controle foi considerado 100 %), e os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0.1$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ quando comparado com o controle. ANOVA de uma via seguida do teste pos-hoc de Bonferroni.

Considerando que os períodos de tratamento foram até 72 h e que o meio de cultura não foi trocado, uma vez adicionado a lectina, foi realizada uma contagem de células para descartar a possibilidade de que

66 RESULTADOS

os dados obtidos no ensaio do MTT não estariam refletindo uma diminuição no número de células pelas condições de incubação. Os resultados apresentados na figura 16 mostram que houve uma diminuição de aproximadamente 50 % do número de células no controle de 24 para 48 h de tratamento, mas não se observa diferença na contagem celular de 48 para 72 h de tratamento. Esses dados sugerem que embora ocorra uma alteração significativa no número de células em 48 h, quando comparado a 24 h de incubação, a redução da viabilidade celular obtida pelo método de MTT é produto da ação da lectina e não um artefato em função do longo tempo de incubação.

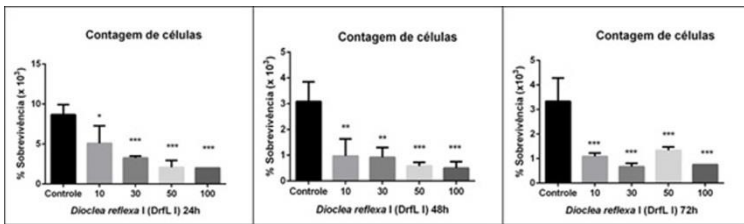


Figura 16. Contagem de células da linhagem U87. Células da linhagem U87 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou Drfl. I nas concentrações 10, 30, 50 e 100 µg/mL pelos períodos de 24, 48 e 72 h. Os dados foram apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0.1$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0.001$ quando comparado com o controle. ANOVA de uma via seguida do teste pos-hoc de Bonferroni.

A respeito da lectina ConBr, observou-se que ela não apresentou efeito citotóxico sobre a linhagem U87, avaliado pelo ensaio do MTT, nem tampouco induziu mudanças na morfologia, como pode ser observado na figura 17.

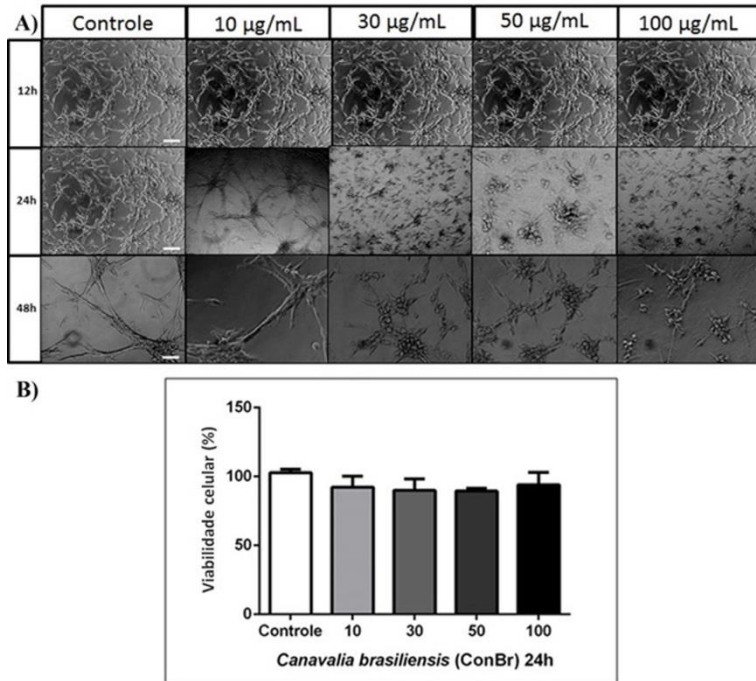


Figura 17. Avaliação do efeito citotóxico da lectina ConBr na linhagem U87. Células da linhagem U87 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou ConBr nas concentrações 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. A) Acompanhamento das mudanças morfológicas das células, tratadas por 12, 24 e 48 h, mediante microscopia invertida (aumento 10X). A barra de escala representa 100 μm . B) Avaliação da viabilidade celular mediante o ensaio de MTT, no período de 24 h. Os dados foram expressos como porcentagem do controle (considerado 100 %), e os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

A fim de garantir que a lectina ConBr realmente não apresenta efeitos citotóxicos na linhagem U87, foi sintetizada ConBr recombinante mediante técnica de expressão heteróloga, realizada no Laboratório de Biologia Molecular (BioMol-Lab) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Esta técnica visa evitar as interferências sazonais nos produtos purificados, bem como garante que o tetrâmero seja composto por apenas uma das cadeias (no caso foi utilizado um gene sintético que codificava somente a cadeia alfa), acentuando o grau de pureza. Porém, como apresentado na figura 18, ConBr recombinante

68 RESULTADOS

(rConBr) também não induziu efeito citotóxico na linhagem U87, mesmo utilizando períodos de incubação mais longos e concentrações maiores da lectina (dados não mostrados).

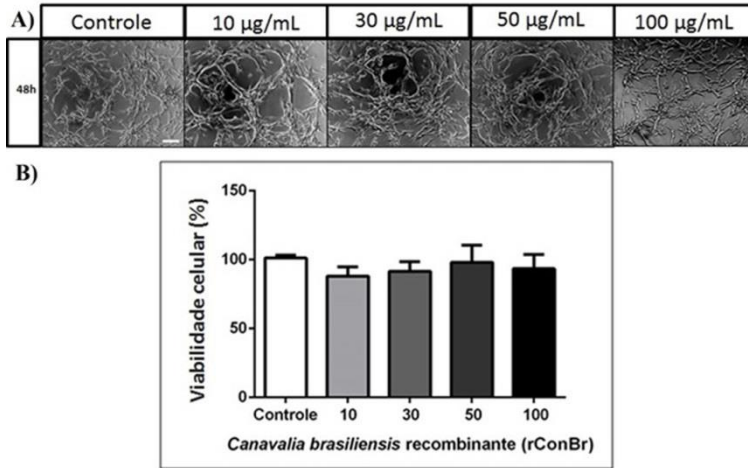


Figura 18. Avaliação do efeito citotóxico da lectina rConBr na linhagem U87. Células da linhagem U87 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou rConBr nas concentrações 10, 30, 50 e 100 µg/mL pelo período de 48 h. A) Ilustra a avaliação morfológica das células mediante microscopia invertida frente ao tratamento com lectina (10X). A barra de escala representa 100 µm. B) Avaliação da viabilidade celular mediante o ensaio de MTT frente ao tratamento com rConBr. Os dados foram expressos em porcentagem do controle (considerado 100 %), e os valores são apresentados como média ± SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

Através dos dados obtidos, podemos concluir que a lectina DrfL I apresenta efeitos citotóxicos concentração/tempo dependentes em ambas as linhagens avaliadas, enquanto a lectina ConBr apresenta efeitos citotóxicos concentração/tempo dependentes somente nas células C6.

5.3 A ação das lectinas DrfL I e ConBr é dependente da sua estrutura terciária e do sítio de ligação a carboidratos (CRD).

Com o objetivo de determinar se a ação das lectinas é dependente de sua estrutura terciária e do sítio de ligação a glicanos (CRD), as lectinas foram submetidas à desnaturação térmica e ao bloqueio do CRD, mediante a pré-incubação com α -metil-D-manosídeo.

Conforme observado nas figuras 19 e 20, as lectinas DrfL I e ConBr, submetidas ao bloqueio causaram diminuição da viabilidade celular e mudanças morfológicas somente na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em 24 h de tratamento. Observa-se ainda que essa ação das lectinas sobre a viabilidade foi bastante reduzida pelo bloqueio quando comparado com a lectina em seu estado nativo.

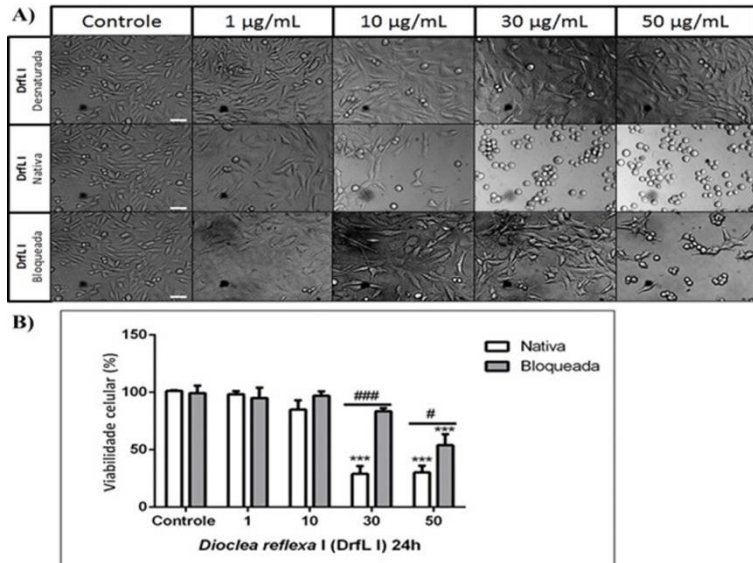


Figura 19. Comparação do tratamento com DrfL I desnaturada, nativa e bloqueada. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram expostas por 24 h ao veículo ou às concentrações de 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DrfL I nativa, desnaturada ou bloqueada com α -metil-D-manosídeo. A) Acompanhamento das mudanças morfológicas das células mediante microscopia invertida (aumento de 20X) frente à lectina desnaturada, nativa e bloqueada. A barra de escala representa 50 μm . B) Efeito citotóxico da lectina DrfL I avaliado pelo ensaio de MTT nas condições nativa ou bloqueada. A lectina desnaturada não alterou a viabilidade em nenhuma condição testada (dados não mostrados). Os dados foram expressos em porcentagem do controle (considerado 100 %), e os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0.001$ quando comparado cada tratamento a seu controle. # $p < 0.01$ e #### $p < 0.001$ em relação ao tratamento com a lectina nativa. ANOVA de uma via seguida de teste pos-hoc de Bonferroni, para cada estado da lectina. E múltiplo t teste para comparações entre efeitos dos estados da lectina.

70 RESULTADOS

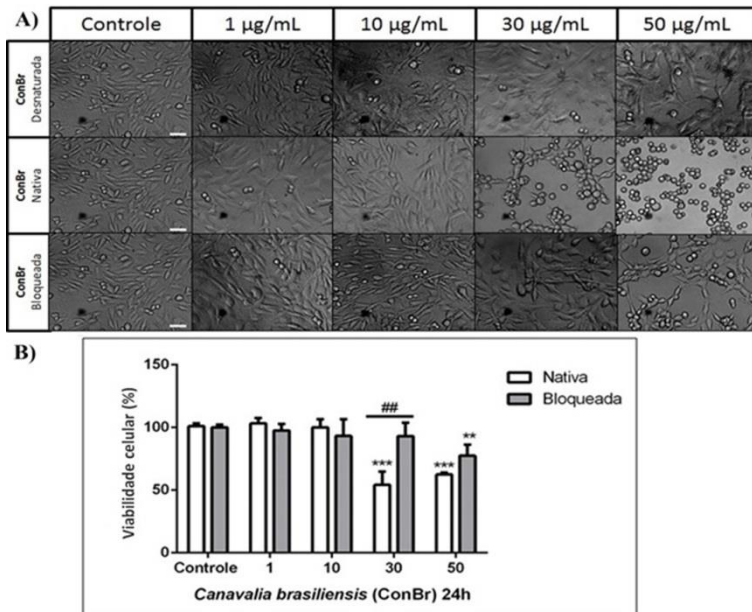


Figura 20. Comparação do tratamento com ConBr desnaturada, nativa e bloqueada. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram expostas por 24 h ao veículo ou às concentrações de 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de ConBr nativa, desnaturada ou bloqueada com α -metil-D-manosídeo. A) Acompanhamento das mudanças morfológicas das células mediante microscopia invertida (aumento de 20X) frente à lectina desnaturada, nativa e bloqueada. A barra de escala representa 50 μm . B) Efeito citotóxico da lectina ConBr avaliado pelo ensaio de MTT nas condições nativa ou bloqueada. A lectina desnaturada não alterou a viabilidade em nenhuma condição testada (dados não mostrados). Os dados foram expressos em porcentagem do controle (considerado 100 %), e os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado cada tratamento a seu controle. ## $p < 0,01$ em relação ao tratamento com a lectina nativa. ANOVA de uma via seguida de teste pos-hoc de Bonferroni, para cada estado da lectina. E múltiplo t teste para comparações entre efeitos dos estados da lectina.

As lectinas, não apresentaram efeitos sobre a viabilidade celular (dados não mostrados) e sobre a morfologia (Figuras 19 A e 20 A) da linhagem celular C6 no estado desnaturado. Pelo qual, concluímos a necessidade de integridade da estrutura terciária/quaternária das lectinas, bem como a dependência do CRD para sua ação sobre a viabilidade.

Isso reforça que a interação das lectinas com a célula e/ou matriz encontra-se intimamente relacionada com sua estrutura e seu sítio de ligação ao glicano.

5.4 As lectinas DrfL I e ConBr aumentam processos de autofagia nas células cancerígenas levando a diminuição da viabilidade celular

Baseando na literatura, que mostra a ocorrência de processos autofágicos em condições basais, como mecanismo de sobrevivência, e em condições de estresse levando a morte celular, foi analisado se o tratamento com as lectinas DrfL I e ConBr poderia induzir aumento no processo autofágico e se isso poderia se relacionar aos efeitos citotóxicos.

Para isso, células da linhagem C6, após tratamento por 24 e 48 h com as lectinas DrfL I e ConBr (1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e seus respectivos controles, foram submetidas a ensaio com o corante LA. Como pode se observar nas figuras 21 e 22, enquanto a cromatina permaneceu intacta (CR; verde), frente às diferentes concentrações e tempos testados, é evidente o aumento das organelas vesiculares ácidas (AVO; vermelho) em resposta ao tratamento com as lectinas quando comparado ao controle.

72 RESULTADOS

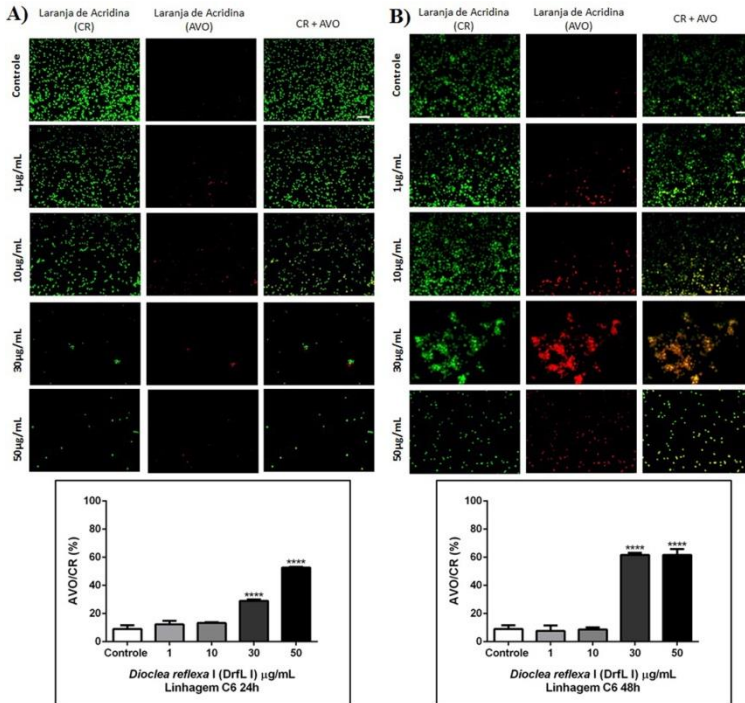


Figura 21. Fluorescência laranja de acridina do tratamento com DrfL I na linhagem C6. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram expostas por 24h (A) ou 48h (B) à veículo ou às concentrações de 1, 10, 30 e 50µg/mL de DrfL I. Após o período de tratamento as células foram coradas e a fluorescência observada (aumento 10 X). A barra de escala representa 100 µm. A fluorescência foi quantificada pelo ImageJ sendo expressos em porcentagem, e os valores apresentados como média ± SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. **** p<0.0001 quando comparado cada tratamento a seu controle. ANOVA de uma via seguida do teste pos-hoc de Bonferroni.

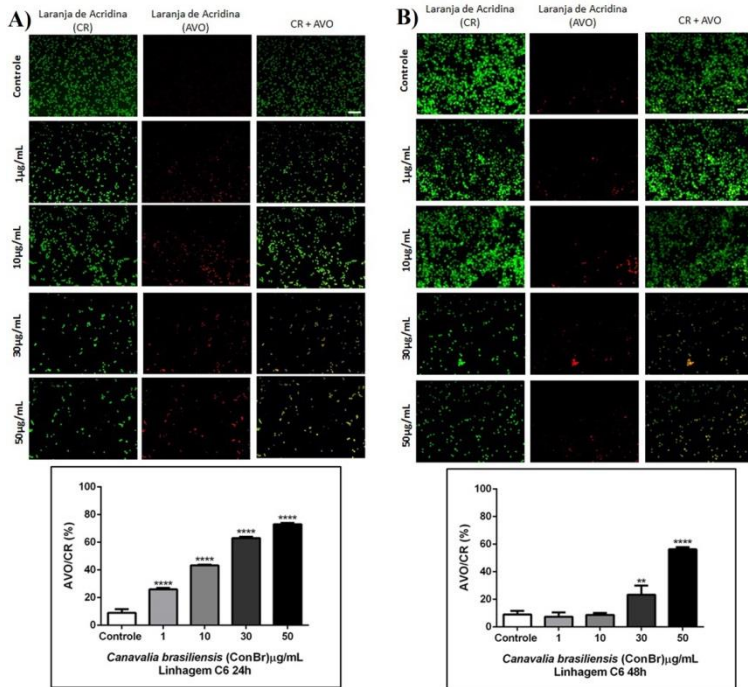


Figura 22. Fluorescência laranja de acridina do tratamento com ConBr na linhagem C6. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram expostas por 24h (A) ou 48h (B) ao veiculo ou às concentrações de 1, 10, 30 e 50µg/mL de ConBr. Após o período de tratamento as células foram coradas e a fluorescência observada (aumento 10 X). A barra de escala representa 100 µm. A fluorescência foi quantificada pelo ImageJ sendo expressos em porcentagem, e os valores apresentados como média ± SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. ** p<0.01 e **** p<0.0001 quando comparado cada tratamento a seu controle. ANOVA de uma via seguida do teste pos-hoc de Bonferroni.

Na quantificação da intensidade de fluorescência, se observa que no tratamento por 24 h das células C6 com a lectina DrfL I há um incremento da marcação das AVO nas concentrações de 30 e 50 µg/mL, tendo um efeito aparentemente concentração-resposta. Entretanto, na exposição por 48 h esse efeito concentração-resposta é perdido e se observa que ambas as concentrações causam um aumento de AVO na ordem de 70 %. Diferentemente, o tratamento das células C6 por 24 h com ConBr causa um aumento de AVO concentração dependente,

74 RESULTADOS

começando com a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, após tratamento por 48 h observa-se uma redução do percentual de AVO, sendo que nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de ConBr o percentual de AVO é similar ao controle, só apresentando aumentos estatísticos nas concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Cabe destacar, que o aumento de AVO no tratamento de 24 h nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ não foi acompanhado de um efeito citotóxico sobre as células C6 como descrito em ensaios anteriores.

Quando analisado este processo nas células U87, como se pode observar na figura 23, novamente enquanto a cromatina permaneceu inalterada (CR) nas diferentes concentrações e tempos testados, foi evidente o aumento da marcação de AVO no tratamento com DrfL I em relação ao controle.

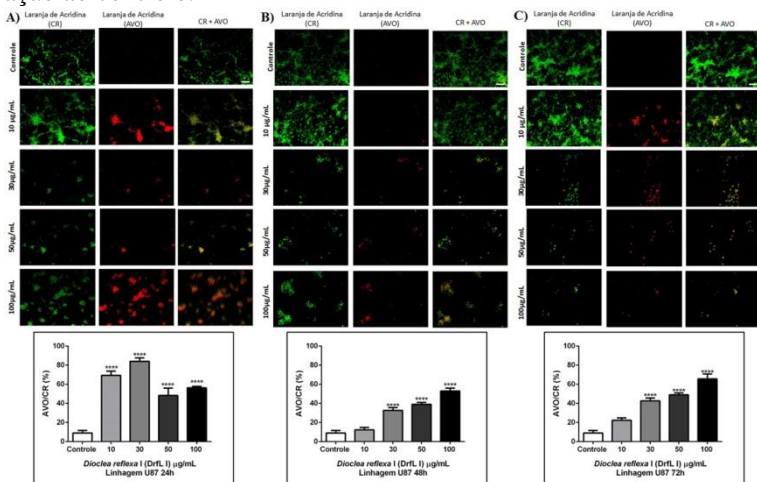


Figura 23. Microscopia de fluorescência com laranja de acridina do tratamento com DrfL I na linhagem U87. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram expostas por 24h (A), 48h (B) e 72h (C) ao veículo ou às concentrações de 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I. Após o período de tratamento as células foram coradas e a fluorescência observada (aumento 10 X). A barra de escala representa 100 μm . A fluorescência foi quantificada pelo ImageJ sendo expressos em porcentagem, e os valores apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. **** $p < 0.0001$ quando comparado cada tratamento a seu controle. ANOVA de uma via seguida do teste pos-hoc de Bonferroni.

Embora a quantificação da fluorescência indique a ocorrência de um aumento significativo de AVO nas células U87 tratadas por 24 h

com DrfL I na concentração de 10 µg/mL, este não está associado a um efeito citotóxico sobre as células, como demonstrado nos ensaios anteriores. Além disso, nos períodos de 48 e 72 h de tratamento com DrfL I não ocorreu alteração significativa de AVO na concentração de 10 µg/mL. No entanto, o aumento da marcação nas concentrações de 30, 50 e 100 µg/mL poderiam estar relacionados ao efeito citotóxico da lectina nas células. O tratamento com 30 µg/mL da DrfL I por 24 h causou um incremento na marcação de AVO superior ao observado em 48 e 72 h. Entretanto, a porcentagem da marcação de AVO na concentração de 50 e 100 µg/mL se manteve similar nos três tempos testados, existindo um aumento significativo na concentração de 100 µg/mL no período de 72 h de tratamento. Este fato poderia se correlacionar com a diminuição abrupta da viabilidade celular e alto comprometimento na morfologia das células, já destacado anteriormente (Figura 15).

Baseado nessas evidências, concluímos que as lectinas DrfL I e ConBr aumentam processos de autofagia nas células de glioma, bem como podem levar a diminuição da viabilidade celular. Entretanto, a correlação entre a autofagia e a perda de viabilidade, embora possa ocorrer, não foi claramente determinada neste estudo.

5.5 O tratamento de células de glioma com as lectinas DrfL I e ConBr poderiam levar à morte celular programada por necrose

Com o objetivo de avançar a compreensão dos mecanismos pelo qual as lectinas DrfL I e ConBr estariam diminuindo a viabilidade celular, observada pelo ensaio de MTT, foi avaliado se o tratamento das células da linhagem C6 por 24 e 48 h poderia induzir morte celular por necrose. Para isso as células foram coradas com hoechst e iodeto de propídio, bem como foi medida a atividade de LDH no sobrenadante, para determinar a possível ruptura da membrana celular em resposta aos tratamentos.

Como é apresentado na figura 24, o tratamento durante 24 h com DrfL I ocasiona um aumento dependente na coloração de IP, o qual pode ser verificado através da quantificação de fluorescência. Observa-se que na concentração de 50 µg/mL um percentual de marcação de 40 % de IP. Porém, em 48 h de tratamento observa-se um incremento abrupto na coloração com IP das células tratadas com as concentrações de 30 e 50 µg/mL, chegando a um percentual de 60 e 80 %, respectivamente. Por sua vez, mediante o ensaio de LDH, observou-se um aumento significativo da atividade da enzima no sobrenadante nas

76 RESULTADOS

concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em 12 e 24 h de tratamento, passando de cerca de 5 % no controle para cerca de 15-20 % em resposta a lectina (Figura 25).

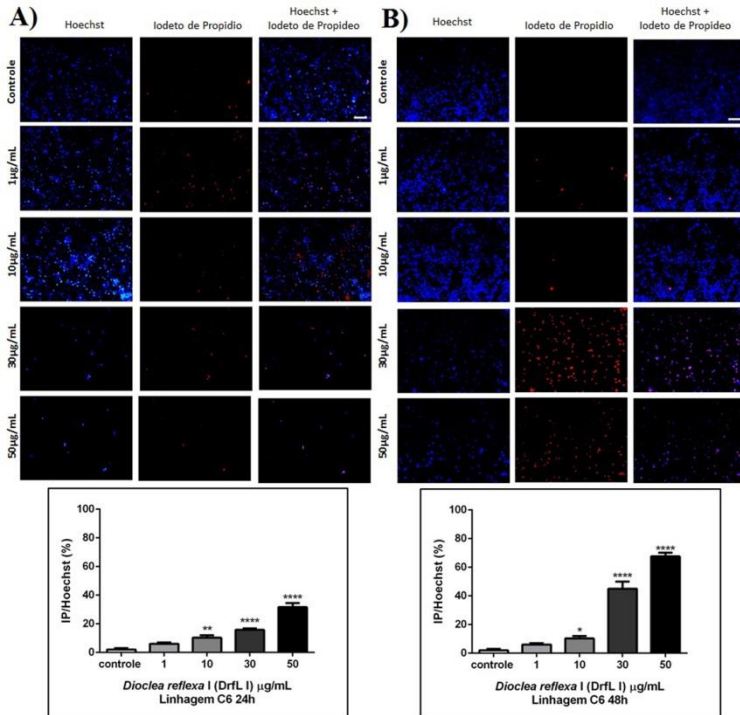


Figura 24. Fluorescência iodeto de propídeo/hoechts do tratamento com DrfL I na linhagem C6. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram expostas por 24h (A) ou 48h (B) ao veículo ou às concentrações de 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DrfL I. Após o período de tratamento as células foram coradas e a fluorescência observada (aumento 10 X). A barra de escala representa 100 μm . A fluorescência foi quantificada pelo ImageJ sendo expressos em porcentagem, e os valores apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ quando comparado cada tratamento a seu controle. ANOVA de uma via seguida do teste pos-hoc de Bonferroni.

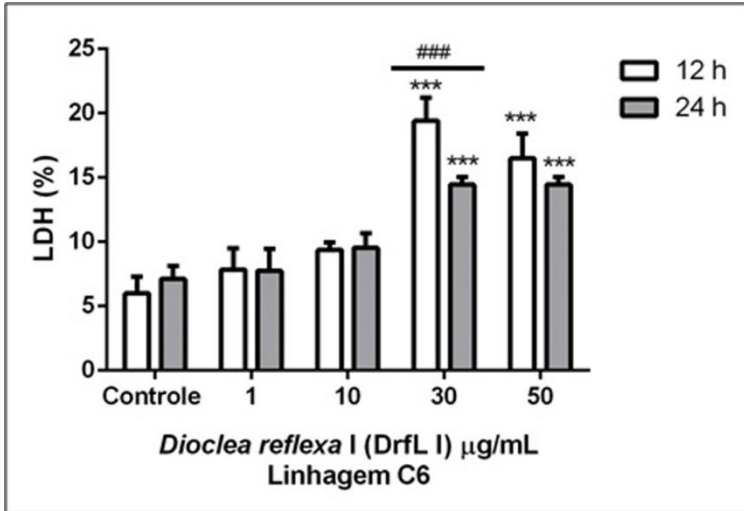


Figura 25. Quantificação de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura da linhagem C6 tratadas com DrfL I. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram expostas por 12 ou 24h ao veículo ou às concentrações de 1, 10, 30 e 50µg/mL de DrfL I. A atividade foi expressa como percentual do controle positivo, Triton X-100 (0,2%), considerado 100 %. Os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ quando comparado cada tratamento ao seu controle. ## $p < 0,01$ em relação às diferenças nos períodos de tratamentos. ANOVA de uma via seguida de teste pos-hoc de Bonferroni, para cada tempo testado. E múltiplo t teste para comparações entre tempos.

Quando foi analisado o efeito do tratamento das células C6 com ConBr (Figura 26) observa-se que a concentração de 1 µg/mL durante 24 h induz um aumento significativo na incorporação de IP de aproximadamente 20 % e na concentração de 50 µg/mL este percentual aproximou-se de 40 %. No período de 48 h observa-se um aumento na concentração de 50 µg/mL de cerca de 70 % enquanto as outras concentrações mantêm resultados similares aos observados em 24 h de exposição à lectina.

Ao analisar o efeito de ConBr sobre a viabilidade pelo método de LDH (Figura 27), observou-se que somente as concentrações de 30 e 50 µg/mL, a partir de 12 h, causaram um aumento significativo da atividade de LDH próximos a 15 %.

78 RESULTADOS

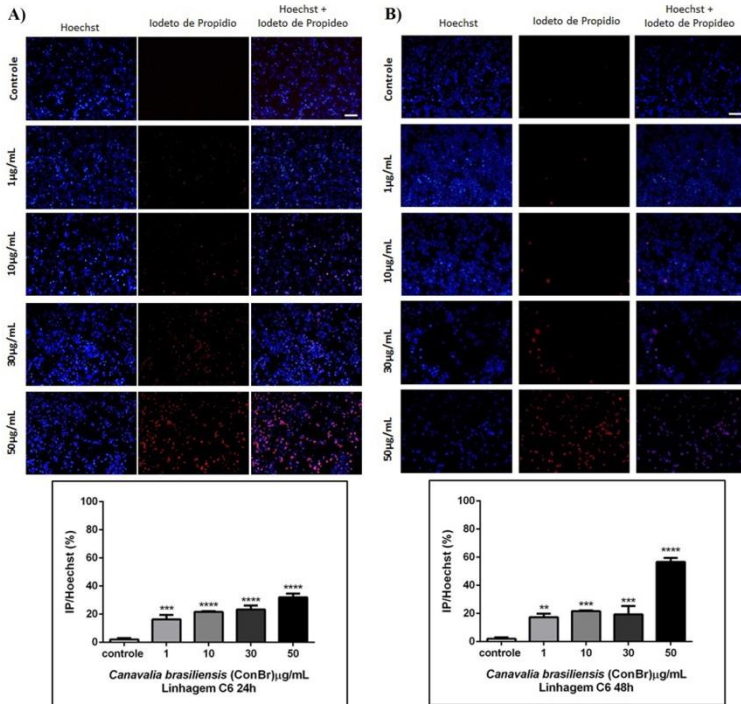


Figura 26. Fluorescência iodeto de propídio/ hoechts do tratamento com ConBr na linhagem C6. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram expostas por 24h (A) ou 48h (B) ao veículo ou às concentrações de 1, 10, 30 e 50µg/mL de ConBr. Após o período de tratamento as células foram coradas e a fluorescência observada (aumento 10 X). A barra de escala representa 100 µm. A fluorescência foi quantificada pelo ImageJ sendo expressa em porcentagem, e os valores são apresentados como média ± SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * p<0.1, ** p<0.01, *** p<0.001 e **** p<0.0001 quando comparado cada tratamento a seu controle. ANOVA de uma via seguida do teste pos-hoc de Bonferroni.

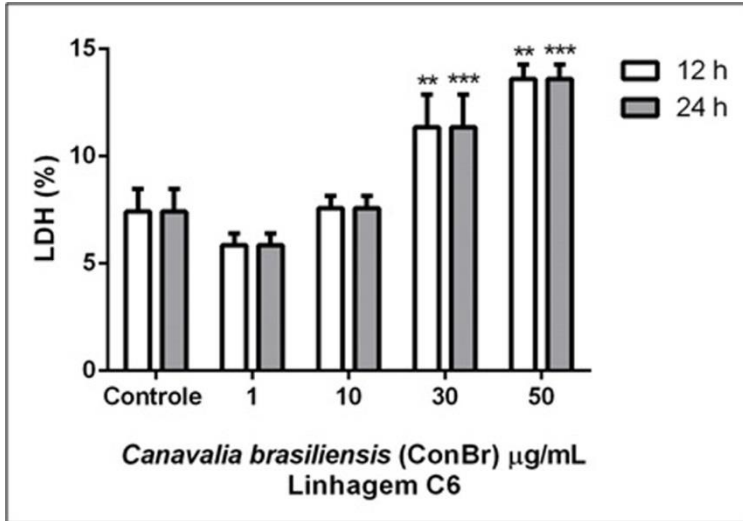


Figura 27. Quantificação de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura da linhagem C6 tratadas com ConBr. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram expostas por 12 ou 24h ao veículo ou às concentrações de 1, 10, 30 e 50µg/mL de ConBr. A atividade foi expressa como percentual do controle positivo, Triton X-100 (0,2%), considerado 100 %. Os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ quando comparado cada tratamento a seu controle. ANOVA de uma via seguida de teste pos-hoc de Bonferroni, para cada tempo testado. E múltiplo t teste para comparações entre tempos.

A análise do efeito de DrfL I na linhagem U87 em relação ao rompimento da membrana celular sinalizado pela coloração com IP também foi realizado (Figura 27). Os resultados mostram que no período de 24 h não se observa um efeito concentração dependente, havendo um aumento significativo nas concentrações de 30 e 50 µg/mL quando comparado com o controle. Após 48 h de tratamento praticamente não se observa efeito da lectina sobre a incorporação de IP. Entretanto, após 72 h de tratamento pode ser observado um efeito concentração dependente, sendo que na concentração de 100 µg/mL a marcação foi próxima a 60 %.

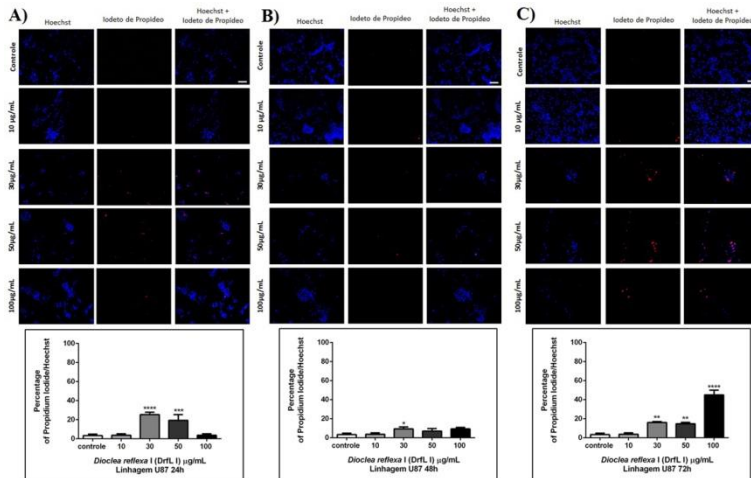


Figura 28. Fluorescência iodeto de propídio/ hoechts do tratamento com DrfL I na linhagem U87. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram expostas por 24h (A), 48h (B) ou 72h (C) ao veículo ou às concentrações de 10, 30, 50 e 100µg/mL de DrfL I. Após o período de tratamento as células foram coradas e a fluorescência observada (aumento 10 X). A barra de escala representa 100 µm. A fluorescência foi quantificada pelo ImageJ sendo expressos em porcentagem, e os valores apresentados como média ± SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * p<0.1 ** p<0.01, *** p<0.0001 quando comparado cada tratamento a seu controle. ANOVA de uma via seguida do teste pos-hoc de Bonferroni.

Em conjunto os dados sugerem que o tratamento de células de glioma com as lectinas DrfL I e ConBr podem levar à morte celular programada por necrose, sendo um dos possíveis mecanismos relacionados à diminuição da viabilidade observada no ensaio do MTT.

5.6 As lectinas DrfL I e ConBr não interferem no potencial de membrana mitocondrial em curtos períodos de exposição

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é responsável pela força motriz na produção de ATP na cadeia respiratória e pelo qual é utilizado como indicador de distúrbio mitocondrial precursor de injúria celular. Para sua determinação foram avaliadas as intensidades da fluorescência do TMRE o qual reflete sensivelmente às mudanças no

$\Delta\Psi_m$ em resposta à alteração precoce da fisiologia mitocondrial ou efeitos citotóxicos. Dessa forma, os ensaios foram realizados em tempos precoces, anteriores aos que apresentaram redução da viabilidade celular pelo método de MTT.

Como pode ser observado na figura 29, as células C6 tratadas com DrfL I e ConBr por 6 h, não apresentaram mudanças no $\Delta\Psi_m$ assim como as células U87 tratadas com DrfL I durante 6 ou 12 h como observado na figura 30.

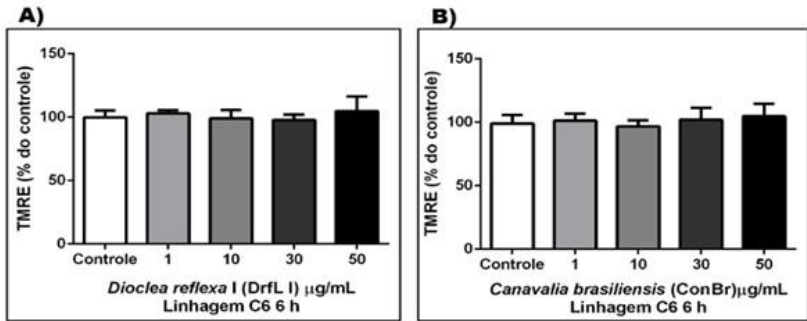


Figura 29. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial pelo método de TMRE na linhagem C6. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram expostas por 6 h ao veículo ou às concentrações de 10, 30, 50 e 100µg/mL das lectinas DrfL I (A) e ConBr (B). Após o período de tratamento as células foram coradas e a fluorescência observada.. Os dados foram expressos em porcentagem (o controle foi considerado 100 %), e os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

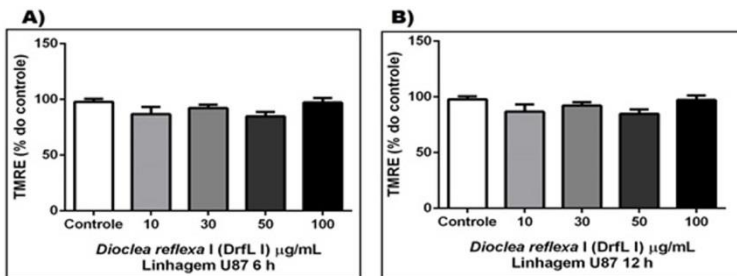


Figura 30. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial pelo método de TMRE na linhagem U87. Células da linhagem U87 de glioblastoma foram expostas por 6 e 12 h ao veículo ou às concentrações de 10, 30, 50 e 100µg/mL de DrfL I durante 6h (A) ou 12h (B). Após o período de tratamento as células

82 RESULTADOS

foram coradas e a fluorescência observada. Os dados foram expressos em porcentagem do controle (considerado 100 %), e os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

Os dados apresentados sugerem que as lectinas DrfL I e ConBr não interferem no potencial de membrana mitocondrial das linhagens C6 e U87 em períodos precoces, anteriores a alteração de viabilidade, medido pela capacidade celular de promover a redução do MTT.

5.7 DrfL I e ConBr apresentam efeitos citostáticos nas culturas celulares inibindo a migração celular

A mobilidade celular é um fator importante na regulação do processo de metástase. Por este motivo foi avaliada a inibição da migração das células C6 e U87 expostas por 24 e 48 h às lectinas ConBr e DrfL I.

Como podemos observar na figura 31, as células C6 tratadas com DrfL I apresentaram uma diminuição significativa da migração celular, apresentando uma redução na migração/proliferação de 50 % na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, 70 % na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ e aproximadamente 90 % nas concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ comparadas ao controle onde há um aumento da densidade celular chegando ao fechamento total da fissura em apenas 24 h após o tratamento. O efeito citostático da lectina DrfL I nas concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ se mantém, mesmo no período de 48 h de tratamento.

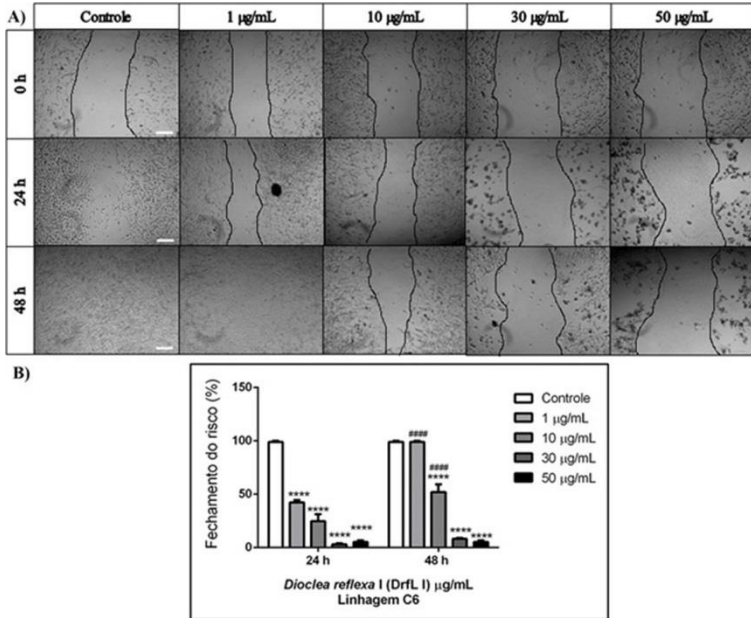


Figura 31. Efeito da lectina DrfL I na migração celular na linhagem C6. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou DrfL I nas concentrações 1, 10, 30 e 50 µg/mL, sendo a migração analisada nos tempos 0, 24 e 48 h. A) Acompanhamento do fechamento do risco mediante microscopia invertida (aumento de 5X). A barra de escala representa 200 µm. B) Os dados foram expressos em porcentagem de fechamento do risco e os valores são apresentados como média ± SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. **** p<0.0001 quando comparado com o controle. ##### p<0,0001 em relação aos períodos de tratamento. ANOVA de duas vias seguida de teste pos-hoc de Bonferroni.

Quando analisado o efeito da lectina ConBr na linhagem celular C6, como apresentado na figura 32, foi observado um efeito muito semelhante no período de 24 h ao que foi obtido frente ao tratamento com DrfL I. Contudo, em 48 h de tratamento somente a concentração de 50 µg/mL de ConBr manteve seu efeito citostático similar ao observado no período de 24 h, ou seja, diminuição de cerca de 90 % da migração celular. As concentrações de 1, 10 e 30 µg/mL apresentaram diminuição na eficiência de inibição da migração no período de 48 h de tratamento, quando comparado ao período de 24 h. Entretanto, cabe observar que a concentração de 1 µg/mL de ConBr continua exercendo inibição no

84 RESULTADOS

período de 48 h, em contraste ao observado com a DrfL I, que nessa concentração não apresenta capacidade inibitória sobre a migração após 48 h.

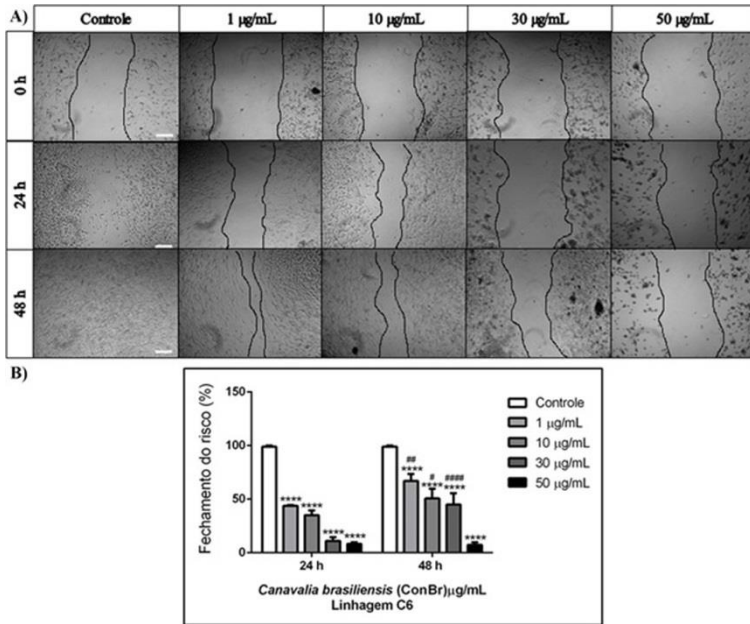


Figura 32. Efeito da lectina ConBr na migração celular na linhagem C6. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou ConBr nas concentrações 1, 10, 30 e 50 µg/mL, sendo a migração analisada nos tempos 0, 24 e 48 h. A) Acompanhamento do fechamento do risco mediante microscopia invertida (aumento de 5X). A barra de escala representa 200 µm. B) Os dados foram expressos em porcentagem de fechamento do risco e os valores são apresentados como média ± SEM de quatro experimentos independentes e realizados em triplicata. **** p<0,0001 quando comparado com o controle. ## p<0,001 e ##### p<0,0001 em relação aos períodos de tratamento. ANOVA de duas vias seguida de teste pos-hoc de Bonferroni.

Na linhagem U87 o tratamento com a lectina DrfL I (Figura 33) nas concentrações de 30, 50 e 100 µg/mL causou uma surpreendente diminuição na migração celular próximo a 90 % no período de 24 h. Notavelmente, este efeito se manteve por 48 h. A concentração mais baixa de 10 µg/mL também causou diminuição da migração. Entretanto, esta ação foi menos proeminente, na ordem de 60 e 40 % em 24 e 48 h, respectivamente. Outro ponto relevante é o aparente comprometimento

da MEC nos tratamentos de 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ já no período de 24 h de tratamento.

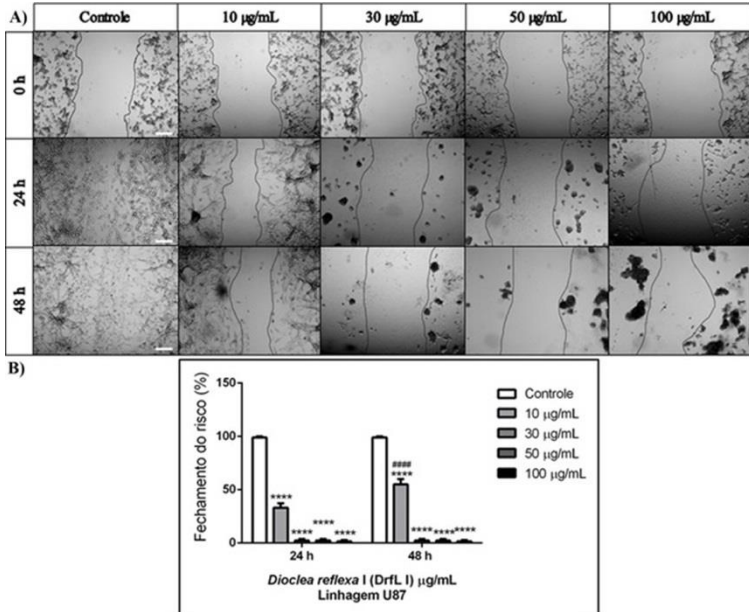


Figura 33. Efeito da lectina DrfL I na migração celular na linhagem U87. Células da linhagem U87 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou DrfL I nas concentrações 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo a migração analisada nos tempos 0, 24 e 48 h. A) Acompanhamento do fechamento do risco mediante microscopia invertida (aumento de 5X). A barra de escala representa 200 μm . B) Os dados foram expressos em porcentagem de fechamento do risco e os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. **** $p < 0.0001$ quando comparado com o controle. ##### $p < 0.0001$ em relação aos períodos de tratamento. ANOVA de duas vias seguida de teste pos-hoc de Bonferroni.

Com base nesses dados, pode ser sugerido que as lectinas DrfL I e ConBr apresentam efeitos citostáticos sobre as células de glioma, inibindo a migração celular, evento crucial para o desenvolvimento de metástases.

5.8 Altas concentrações das lectinas DrfL I e ConBr inibem a resistência ao tratamento de células de glioblastoma na linhagem C6

Uma das características mais importantes das células de GBM é sua resistência frente aos agentes terapêuticos disponíveis para o tratamento. Considerando esse importante aspecto dos gliomas, células da linhagem C6 foram submetidas a tratamentos intermitentes durante 24 h (Figuras 34 e 35) e 48 h (Figuras 36 e 37) com as lectinas DrfL I (Figuras 34 e 36) e ConBr (Figuras 35 e 37). A viabilidade das células foi monitorada através de microscopia ótica.

Os resultados mostram que as concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I (Figura 34) e de ConBr (Figura 35) induziram significativas mudanças na morfologia celular em 24 h de tratamento. No entanto, se após esse período o meio for trocado e as células mantidas por 24 h sem o tratamento se observa que ocorre uma recuperação da morfologia celular na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$, principalmente nas células tratadas com ConBr. Interessantemente, uma nova exposição de 24 h às lectinas nessa concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ não parece ser eficiente na indução de alterações morfológicas das células C6. Já na concentração mais alta de 50 $\mu\text{g/mL}$ as lectinas mostraram manter uma boa eficiência na indução das alterações morfológicas, tanto durante o intervalo de 24 h quanto na repetição do tratamento. As concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ das lectinas DrfL I e ConBr não causaram significativas alterações morfológicas, demonstrando uma resistência das células C6 nessas concentrações mais baixas.

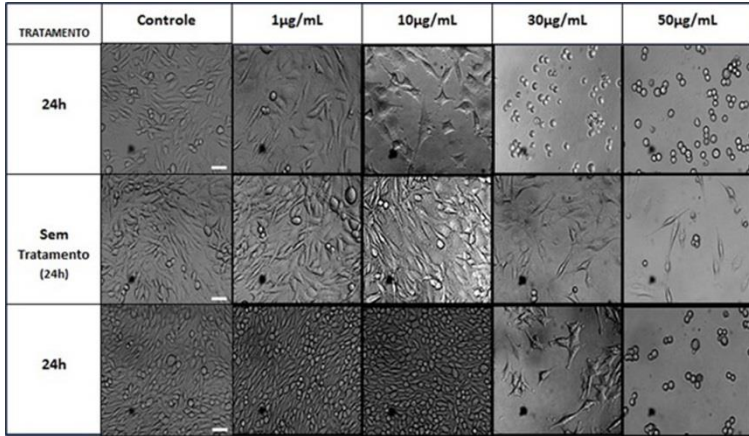


Figura 34. Resistência ao tratamento por 24 h com DrfL I nas células C6. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou DrfL I nas concentrações 1, 10, 30 e 50 μ g/mL por 24 h. As mudanças morfológicas das células foram acompanhadas sequencialmente, mediante microscopia de luz (aumento de 20X), nos seguintes períodos: 24 h após o tratamento, período de recuperação (após 24 h sem tratamento) e período de re-exposição ao tratamento (24 h após a segunda exposição a lectina). A barra de escala representa 50 μ m.

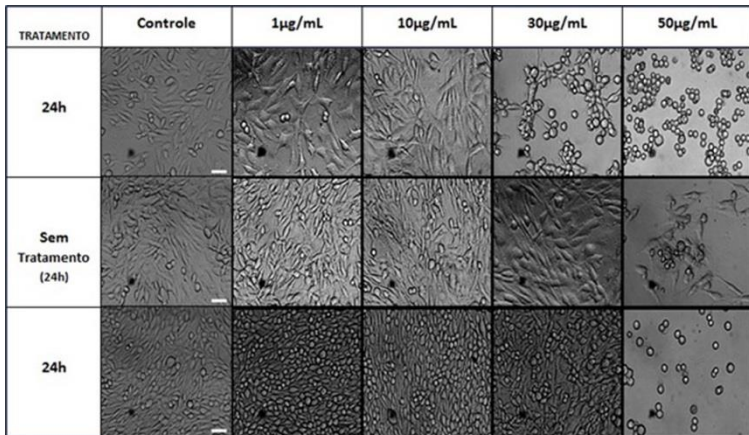


Figura 35. Resistência ao tratamento por 24 h com ConBr nas células C6. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou ConBr nas concentrações 1, 10, 30 e 50 μ g/mL por 24 h. As mudanças morfológicas das células foram acompanhadas sequencialmente, mediante microscopia de luz (aumento de 20X), nos seguintes períodos: 24 h após o tratamento, período de

88 RESULTADOS

recuperação (após 24 h sem tratamento) e período de re-exposição ao tratamento (24 h após a segunda exposição a lectina). A barra de escala representa 50 μm .

Considerando os tratamentos intermitentes mais longos (48 h) com as lectinas DrfL I (Figura 36) e ConBr (Figura 37) observa-se uma intensa alteração morfológica, compatível com perda de viabilidade celular, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ em 48 h de tratamento. Surpreendentemente, este efeito não foi revertido após um período de recuperação de 48 h e pela repetição do tratamento com as lectinas. Entretanto, de forma similar ao observado nos tratamentos intermitentes de 24 h, a concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ não parece ser eficiente, visto que aparentemente as células se recuperam e não parecem responder bem a uma nova exposição (24-48 h) de tratamento.

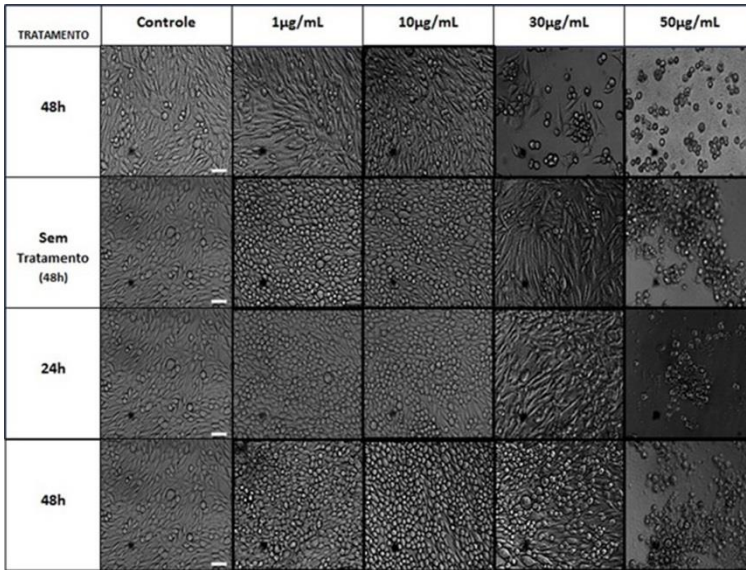


Figura 36. Resistência ao tratamento por 48h com DrfL I nas células C6. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou DrfL I nas concentrações 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ por 48 h. As mudanças morfológicas das células foram acompanhadas sequencialmente, mediante microscopia de luz (aumento de 20X), nos seguintes períodos: 48 h após o tratamento, período de recuperação (após 48 h sem tratamento) e período de re-exposição ao tratamento (24 e 48 h após a segunda exposição a lectina). A barra de escala representa 50 μm .

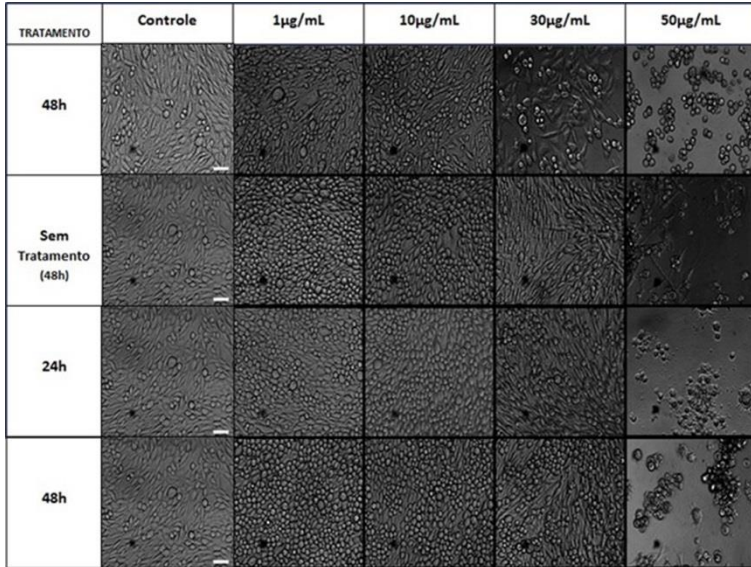


Figura 37. Resistência ao tratamento por 48h com ConBr nas células C6. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou ConBr nas concentrações 1, 10, 30 e 50 µg/mL por 48 h. As mudanças morfológicas das células foram acompanhadas sequencialmente, mediante microscopia de luz (aumento de 20X), nos seguintes períodos: 48 h após o tratamento, período de recuperação (após 48 h sem tratamento) e período de re-exposição ao tratamento (24 e 48 h após a segunda exposição a lectina). A barra de escala representa 50 µm.

Os dados obtidos destes ensaios, sugerem que altas concentrações das lectinas DrfL I e ConBr (a partir de 50 µg/mL) inibem a resistência ao tratamento das células de glioblastoma da linhagem C6, sendo este efeito bem evidente nos tratamentos mais longos (48 h).

5.9 Altas concentrações das lectinas DrfL I e ConBr inibem a sobrevivência após a clonagem de células de glioblastoma da linhagem C6

Um dos aspectos que limita a eficiência dos tratamentos utilizados atualmente frente ao GMB é a sobrevivência de algumas células, em função de características específicas, que retornam a proliferar e/ou diferenciar, regerando ou mesmo expandindo o tumor. Isso faz com que os tratamentos tenham um efeito paliativo e não sejam

90 RESULTADOS

capazes de conter a evolução tumoral. Dessa forma, o ensaio de sobrevivência celular clonogênica auxilia a determinar a habilidade de uma célula de proliferar e/ou de reter a sua capacidade reprodutiva, bem como de formar colônias ou clones, mesmo após ter sido exposta a alguma condição ou tratamento.

Sabendo que as concentrações mais elevadas das lectinas DrfL I e ConBr foram aparentemente capazes de bloquear a viabilidade das células e vencerem a resistência ao tratamento, foi analisado a capacidade clonogênica das células C6 após o tratamento com as lectinas nos períodos de 24 e 48 h.

Os resultados dos tratamentos com DrfL I e ConBr, são apresentados nas figuras 38 e 39, respectivamente. Pode ser observado que 24 h de tratamento com as lectinas não foi capaz de ocasionar perda da capacidade das células formarem clônese. Entretanto, períodos de 48 h de tratamento com as lectinas na concentração de 50 µg/mL causou inibição da eficiência clonogênica.

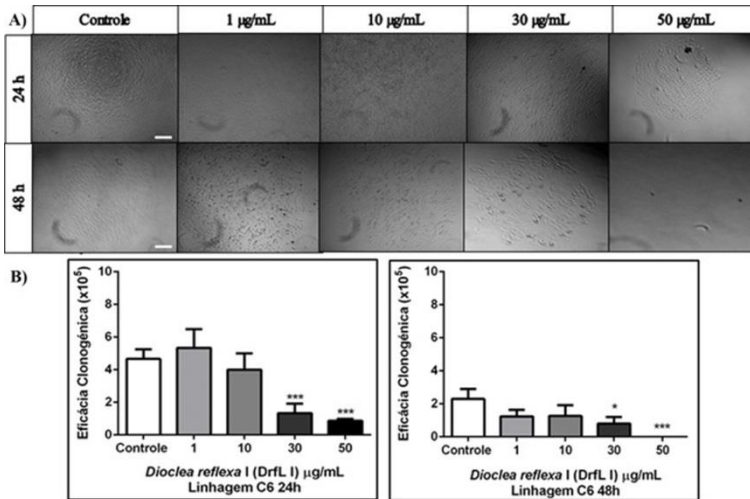


Figura 38. Eficiência clonogênica da linhagem C6 após tratamento com DrfL I. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou DrfL I nas concentrações 1, 10, 30 e 50 µg/mL pelos períodos de 24 e 48 h. A) Acompanhamento da capacidade de formação de clones das células mediante microscopia invertida no aumento de 5X. A barra de escala representa 200 µm. B) Cálculo da eficiência clonogênica das células, os valores são apresentados como média ± SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * p<0.1 e *** p<0.001 quando comparado com o controle.

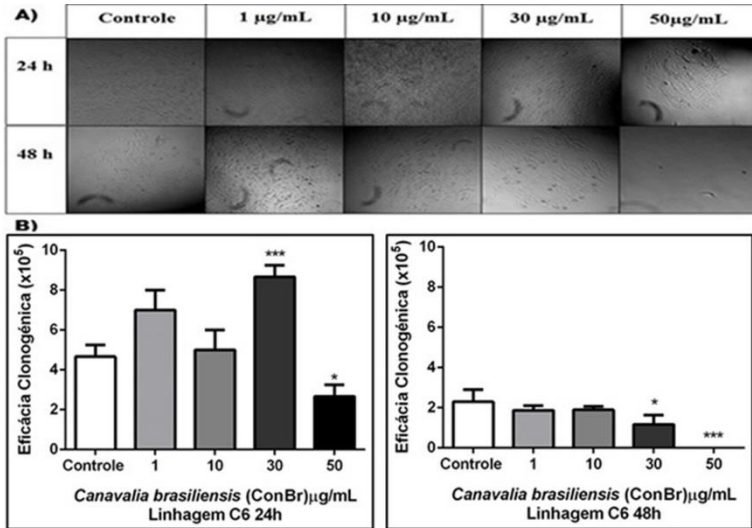


Figura 39. Eficiência clonogénica da linhagem C6 após tratamento com ConBr. Células da linhagem C6 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou ConBr nas concentrações 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ pelos períodos de 24 e 48 h. A) Acompanhamento da capacidade de formação de clones das células mediante microscopia invertida no aumento de 5X. A barra de escala representa 200 μm . B) Cálculo da eficiência clonogénica das células, os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0.1$ e *** $p < 0.001$ quando comparado com o controle.

Os dados obtidos neste conjunto de experimentos, nos permite inferir que a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ das lectinas DrfL I e ConBr podem inibir a capacidade de formação de clones pelas células de glioblastoma da linhagem C6 após tratamento por um período de 48 h.

6. DISCUSSÃO

O glioblastoma multiforme (GBM), um dos tipos de glioma classificado pela Organização Mundial da Saúde como grau IV, representa 55 % dos casos de tumor cerebral maligno (OSTROM *et al.*, 2015) e caracteriza-se como uma doença clínica e patologicamente heterogênia, com um prognóstico pouco favorável, apesar dos esforços terapêuticos (LOUIS *et al.*, 2007, STRIK *et al.*, 2012). Existe um interesse crescente no estudo de novos compostos capazes de interagir com alta especificidade com as células tumorais e subsequentemente produzir morte ou inibição da proliferação destas células.

As lectinas são uma classe de proteínas de origem não imune, capazes de reconhecer e de se ligar reversivelmente e de maneira específica a carboidratos complexos (SINGH *et al.*, 1999; VAN DAMME *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2015). Nas últimas décadas as lectinas têm sido utilizadas como ferramentas para diferenciação entre tumores malignos e benignos, especialmente pela capacidade de reconhecerem padrões de glicosilação específicos, sendo alguns associados ao processo de metástase (AUGUSTIN *et al.*, 2005; VALENTINER *et al.*, 2003; GROSSARTH-MATICEK, 2006; JIANG, 2015; YAU, 2015). Além disso, existem estudos relacionando possíveis efeitos citotóxicos e o potencial anti-tumoral de lectinas isoladas de plantas sobre células cancerígenas (JIANG *et al.*, 2015).

No presente trabalho um dos objetivos foi avaliar os efeitos citotóxicos das lectinas Drfl I e ConBr, isoladas de sementes de leguminosas da subtribo *Diocleinae*, sobre culturas celulares das linhagens C6 e U87.

ConBr e Drfl I são lectinas isoladas de sementes de leguminosas da subtribo *Diocleinae*, caracterizadas por apresentar similaridades estruturais entre as sequências de aminoácidos (BEZARRA *et al.*, 2013), mas apesar da altíssima homologia e especificidade pelos mesmos glicanos, glicose/manose, são observadas diferenças em relação a ação delas. Por exemplo, a lectina ConBr não apresentou atividade biológica sobre a linhagem U87, enquanto a lectina Drfl I mostrou um efeito significativo já em 24 h. Por outro lado, na linhagem C6 as lectinas Drfl I e ConBr causaram uma redução similar de cerca de 50 % na viabilidade celular em 12 h de tratamento nas concentrações de 30 e 50 µg/mL. Notavelmente, esse efeito se mantém em 24 h de tratamento com ConBr, enquanto com Drfl I essa ação cai para cerca de 30 % nesse mesmo período.

Este mesmo efeito concentração-tempo dependente na ação das lectinas da subtribo *Diocleinae*, foi observado frente ao tratamento de células da linhagem C6 com ConA e DvL (*Dioclea violacea*), nos mesmos períodos utilizados (KNAUT, 2016); mas surpreendentemente, ConV, uma lectina que pertence a mesma subtribo, só apresenta efeito citotóxico na linhagem C6 a partir do período de 24 h na concentração de 100 µg/mL (OSTERNE *et al.*, 2017).

Comparações da sequência de aminoácidos e estrutura cristalográfica entre a lectina ConBr e ConA (que foi a primeira lectina isolada e caracterizada), revela que na ConBr existem dois resíduos de aminoácidos substituídos distantes do domínio de ligação a carboidrato (CRD) em relação a ConA (GRANGEIRO *et al.*, 1997; SANZ-APARICIO *et al.*, 1997; CAVADA *et al.*, 2001). Esse aspecto tem sido discutido na tentativa de explicar as diferenças na potência de efeitos biológicos destas lectinas. A lectina DrfL I, foi isolada e caracterizada recentemente (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016) e segundo a sua estrutura cristalográfica, apresenta uma maior similaridade à DGL purificada da *Dioclea grandiflora* (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017). Dessa forma, pode ser cogitado que as diferenças de ação ou potência de ConBr e DrfL I reside nas diferenças de suas estruturas; além das características dos modelos utilizados.

A diminuição da viabilidade celular indicada pelo ensaio de MTT pode ser produto de morte das células, diminuição da proliferação celular e/ou atraso do ciclo celular. Por tal motivo, avaliou-se qual poderia ser o mecanismo de ação das lectinas que estaria levando a queda de viabilidade e se as mudanças morfológicas seriam compatíveis com processos de morte celular.

O primeiro mecanismo de morte celular programada a ser avaliado foi autofagia por meio de coloração das células com LA, o qual tem sido aceito como um marcador de vesículas ácidas ou autofagolisossomos (CHANG *et al.*, 2007; FAN *et al.*, 2008). A autofagia é considerada um mecanismo de dupla função tanto protegendo as células da morte como sendo mecanismo associado a este processo. Por exemplo, em tecidos saudáveis a autofagia apresenta uma função citoprotetora mantendo a homeostase mediante a degradação de constituintes citotóxicos e impedindo que a célula se torne disfuncional ou cancerígena. Entretanto, uma vez formado o tumor, a autofagia pode contribuir para a sobrevivência celular em áreas de hipóxia, além de ajudar na progressão, resistência à terapia e na metástase. Por outro lado, a autofagia também pode levar a morte das células como resultante de estresse contínuo ou quando ocorre em uma escala muito elevada

(REUTER *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2013; SCHNEIDER e CUERVO, 2014; JIANG *et al.*, 2015).

Os resultados de quantificação da fluorescência das vesículas ácidas (AVO) em relação à fluorescência emitida pela cromatina (CR), não revelaram diferença estatística da marcação de AVO das células C6 expostas ao veículo (controle) ou à DrfL I nas concentrações de 1 e 10 µg/mL (Figura 21). Indicando que uma taxa em torno de 15 % de marcação pode representar uma condição basal que a célula utiliza para sobrevivência. Entretanto, há um incremento concentração resposta da marcação de AVO, frente à exposição com DrfL I nas concentração de 30 e 50 µg/mL em 24 h. Já na exposição por 48 h as concentrações de 30 e 50 µg/mL igualam-se em 70 % de AVO. Nas células U87 (Figura 23), observamos que o tratamento com DrfL I durante 24 h propicia um aumento significativo de AVO na concentração de 10 µg/mL. Entretanto esse efeito não parece estar associado a um efeito citotóxico sobre as células, como demonstrado nos ensaios de viabilidade. Por outro lado, a porcentagem da marcação de AVO na concentração de 50 e 100 µg/mL se mantém constante em 24 e 48 h, existindo um aumento significativo na concentração de 100 µg/mL, de quase 80 %, no período de 72 h de tratamento. Este efeito, poderia se correlacionar com uma diminuição abrupta da viabilidade celular e alto comprometimento na morfologia das células, como observado na figura 15.

O tratamento com ConBr (Figura 22) por 24 h proporciona um aumento, concentração dependente de AVO comparado com o controle. Entretanto, em 48 h observa-se uma redução da porcentagem de AVO, mas apresentando cerca de 70 % na concentração de 50 µg/mL. Essas diferenças não são claras, mas deve ser destacado que o processo de autofagia é dinâmico e a meia vida dos vacúolos autofágicas pode ser curta (DEGTYAREV *et al.*, 2014), motivo pelo qual poderíamos estar observando variações na presença de AVO nos diversos tempos frente a mesma concentração de lectina. Além disso, um estudo recente (HAN *et al.*, 2016) demonstrou que fatores extrínsecos e nutricionais derivados do microambiente da cultura, teriam um efeito crucial na ativação ou inibição de mTORC1, enzima reguladora do processo autofágico. Dessa forma, serão importantes futuros estudos da atividade desta enzima e outras proteínas envolvidas na execução da autofagia frente ao tratamento com as lectinas.

Com o objetivo de continuar avaliando quais poderiam ser os mecanismos utilizados pelas lectinas para conduzir a morte das células, foram também realizados ensaios de determinação de necrose, mediante a dupla coloração com hoescht (cora núcleos) e IP (cora células com

membranas plasmáticas rompidas), além de ensaios de liberação de LDH.

Como apresentado na figura 24, a exposição das células C6 por 24 h à DrfL I (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mostrou um aumento de 40 % na marcação para IP. Entretanto, em 48 h de tratamento as concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ elevam esse percentual para cerca de 60 e 80 %, respectivamente. Esses resultados condizem com o ensaio de LDH (Figura 25), que mostra que a partir de 12 h de tratamento nas concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se registra um percentual de aproximadamente 20 % de liberação da enzima no meio de cultura. O tratamento da linhagem C6 com a lectina ConBr na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 26) mostra um aumento na marcação com IP de 40 e 70 % em 24 e 48 h, respectivamente. Por outro lado, as concentrações de 1-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ causam incrementos bem mais modestos na ordem de 20 %. Em conjunto esses dados reforçam o que foi observado na figura 27, na qual a partir de 12 h de tratamento ConBr 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ promove uma elevação de 15 % de LDH no meio de cultura. O tratamento das células da linhagem U87 (Figura 28) não mostra efeito concentração dependente na marcação com IP. Entretanto, após 72 h de tratamento observa-se um efeito bastante significativo na marcação das células com IP (próximo a 60 %) em resposta a DrfL I 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Em conjunto os dados de avaliação de necrose frente às lectinas sugerem que ConBr e DrfL I poderiam desencadear mecanismos de morte celular tipo necroptótica, que ocorre muitas vezes frente a fatores externos tóxicos (BARNES *et al.*, 2013; WANG, 2014). Entretanto deve ser realçado que a marcação com IP também pode ser um evento verificado no processo de apoptose tardio.

Morfologicamente o mecanismo de apoptose se caracteriza por alterações na morfologia da célula como presença de corpos apoptóticos, alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial entre outras (ELMORE, 2007; WANG, 2014). Na marcação de cromatina (CR) com laranja de acridina (LA) (Figuras 21, 22 e 23) não se observou a presença de corpos apoptóticos. Da mesma forma não foi observado alterações no potencial de membrana mitocondrial (Figuras 29 e 30), avaliado pela intensidade da fluorescência do TMRE que reflete sensivelmente às mudanças no $\Delta\Psi\text{m}$ (LI *et al.*, 2015). Como as mudanças desta sonda podem ser devidas a mudanças na morfologia, localização ou massa mitocondrial (PERRY *et al.*, 2011) os ensaios não foram realizados nos tempos onde há redução da viabilidade celular pelo método de MTT, por apresentar menos células vivas podendo dar um falso positivo de redução da fluorescência do TMRE.

Geralmente a apoptose ocorre por duas vias: uma mediante a união de ligantes específicos aos receptores da membrana plasmática, também denominada via extrínseca; outra mediante alteração mitocondrial (via intrínseca) num processo dependente do citocromo c (TAIT e GREE, 2012; JIANG *et al.*, 2015). Para caracterizar com maior clareza a indução de apoptose em resposta as lectinas DrfL I e ConBr será importante, no futuro, avaliar a possível ativação de caspase 3 que é a caspase efetora do processo.

Outro fator importante a ser avaliado na busca de novos compostos com ação anticancerígena é a capacidade de produzirem efeitos citostáticos nas culturas, tendo em conta que a mobilidade celular é um fator importante na regulação do processo de metástase. Particularmente, as células de GBM se caracterizam por apresentar uma potente habilidade de invasão e migração no tecido cerebral (CHEN *et al.*, 2015; AROUI *et al.*, 2016), sendo portanto muito importante caracterizar uma ação citostática das lectinas sobre estas células.

Dessa forma, foi avaliada a capacidade de inibição da migração celular frente ao tratamento com as lectinas nas linhagens C6 e U87. Nas figuras 31 e 33, a lectina DrfL I apresenta um efeito citostático nas linhagens C6 e U87, respectivamente, com uma marcada inibição da migração celular e destruição da matriz extracelular na linhagem U87. Notavelmente, nas concentrações de 30, 50 e 100 µg/mL DrfL I propiciou uma inibição de migração constante de aproximadamente 90 % em 24 e 48 h sobre as células U87. Na linhagem C6 as concentrações de 30 e 50 µg/mL propiciaram efeitos similares. Enquanto isso, ConBr mantém a inibição da migração das células C6 em cerca de 90 % somente na concentração de 50 µg/mL (Figura 32).

Outra característica importante no GBM é sua frequente recidiva pós-cirurgia, e sua alta resistência à quimioterapia e radioterapia (JARAMILLO *et al.*, 2010; DE BARROS PONTES *et al.*, 2012; THEELER e GILBERT, 2015; CHEN *et al.*, 2015; AROUI *et al.*, 2016). Sendo esta multipotencialidade e habilidade de auto-renovação das GSCs, muito similares das células tronco neurais (NSCs), existindo hipóteses inclusive de que estas poderiam dar origem às células tumorais (SANAI *et al.*, 2005; LIM *et al.*, 2007; MARTIN *et al.*, 2014; LIU e SONG, 2016).

Quando avaliamos a capacidade de resistência e a eficiência clonogênica de auto-renovação da linhagem C6 frente ao tratamento com as lectinas, foi observado que ConBr ou DrfL I na concentração de 50 µg/mL, por um período de 48 h, inibe totalmente a viabilidade celular e o aparecimento de clones, sugerindo a capacidade destas lectinas de

inviabilizar de forma bastante eficiente a grande maioria das células tumorais.

Dessa forma, tomando o conjunto dos dados pode ser inferido que exposição das células de glioma a baixas concentrações de lectinas repercute com uma baixa ou flutuante percentagem de AVO e com a ausência de uma ação anti-tumoral evidente (considerando prejuízos sobre a migração e viabilidade celular), sugerindo que a autofagia em nível baixo ou moderado pode representar um mecanismo de sobrevivência ou até mesmo associado a progressão do tumor (REUTER *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2013; SCHNEIDER e CUERVO, 2014; JIANG *et al.*, 2015; KEULERS *et al.*, 2016). Nessa direção, tem sido demonstrado que MMP, que degradam a MEC durante processos fisiológicos e patológicos, podem ser ativadas pela IL-8, um produto do processo de autofagia. Notavelmente, à medida que degradam a MEC e a MB podem cumprir importantes funções para a progressão tumoral e formação de metástase (NAMBIAR *et al.*, 2016; KEULERS *et al.*, 2016).

Diferentemente, nas concentrações mais elevadas as lectinas testadas apresentaram um efeito de elevar a porcentagem de AVO, diminuir a viabilidade celular, alterar a morfologia, inibir a resistência celular e diminuir a eficiência clonogênica, além de propiciarem uma relevante inibição da migração celular. Embora ainda não se tenha claro a inter-relação destes eventos, deve ser salientada que em situações de elevado estresse com indução de uma excessiva taxa de autofagia frente a agentes citotóxicos, ocorre morte celular mediante um mecanismo independente do processo de apoptose (REUTER *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2013; SCHNEIDER e COUERVO, 2014; JIANG *et al.*, 2015; OKADA e MAK, 2004).

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que ambas lectinas apresentam efeitos citotóxicos sobre as células da linhagem C6 (rato) e DrfL I também causa este efeito sobre as células da linhagem U87 (humana). Esse efeito ocorre a partir da concentração de 30 µg/mL, sendo dependente do CRD e da manutenção da estrutura tridimensional das lectinas.

Em relação aos possíveis mecanismos de morte celular associados à diminuição da viabilidade celular, destaca-se o processo de necrose e o processo de autofagia nas altas concentrações das lectinas. Entretanto, também parece evidente que a autofagia pode ocorrer em resposta ao tratamento das lectinas nas concentrações mais baixas, sem paralela alteração da viabilidade, morfologia ou capacidade de migração celular.

Nas concentrações de 30 e 50 µg/mL a lectina DrfL I, apresenta um efeito citostático significativo sobre as células C6 e U87, inibindo a proliferação/migração celular em cerca de 90 %, enquanto a lectina ConBr apresenta este efeito sobre as células C6 na concentração de 50 µg/mL.

Na concentração de 50 µg/mL as lectinas DrfL I e ConBr, apresentam a capacidade de inibir a resistência ao tratamento e a eficiência clonogénica das células de glioblastoma da linhagem C6, sendo o efeito mais evidente após 48 h de tratamento.

Em conjunto conclui-se que a lectina DrfL I apresenta um potencial terapêutico, demonstrado pelo seu significativo efeito citotóxico e inibidor de migração/proliferação tanto na linhagem de glioma de ratos como na linhagem de glioma humana.

Por fim, salienta-se que para diminuir a probabilidade de reincidência dos gliomas é fundamental a atuação não somente sobre as células que proliferam rapidamente (mecanismo de ação utilizado pelos quimioterápicos atuais) como também sobre as células tronco tumorais. Dentro deste paradigma, concluímos a necessidade de aprofundar a compreensão da ação de DrfL I sob esta ótica e a necessidade de estender os estudos para outras linhagens celulares e outros modelos de gliomas *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

aecc (Asociación Española Contra el Cáncer). Atualizado 5 de janeiro do 2017.

<https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/SistemaNerviosoCentral/Paginas/Incidencia.aspx>

ALBERT; JOHNSON; LEWIS; RAFF; ROBERTS; WALTER.
Biologia Molecular da Célula. 5ed. **ABDR**. 2010.

ALBUQUERQUE L. P.; PONTUAL, E. V.; SANTANA, G. M. S.; SILVA, L. R. S.; AGUIAR, J. S.; COELHO, L. C. B. B.; RÊGO, M. J. B. M.; PITTA, M. G. R.; SILVA, T. G.; MELO, A. M.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**. V. 138, p. 23–27; 2014.

ALDAPE, K. D.; BALLMAN, K.; FURTH, A.; BUCKNER, J. C.; GIANNINI, C.; BURGER, P. C.; SCHEITHAUER, B. W.; JENKINS, R. B.; JAMES, C. D. Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**. V. 63, p. 700-707; 2004.

ALONSO, M. M.; DIEZ-VALL, R.; MANTEROLA, L.; RUBIO, A.; LIU, D.; CORTES-SANTIAGO, N.; URQUIZA, L.; JAUREGI, P.; LOPEZ DE MUNAIN, A.; SAMPRON, N.; ARAMBURU, A.; TEJADA-SOLIS, S.; VIENTE, C.; GOMEZ-MANZANO, C. Genetic and Epigenetic Modifications of SOX2 Contribute to the Invasive Phenotype of Malignant Gliomas. **PLoS One**. V. 6 (11), p. e26740; 2011.

AMANO, M.; YAMAGUCHI, M.; TAKEGAWA, Y.; YAMASHITA, T.; TERASHIMA, M.; FURUKAWA, J.; MIURA, Y.; SHINOHARA, YASURO, IWASAKI, N.; MINAMI, A.; NISHIMURA, S. I. Threshold in stage-specific embryonic glycotypes uncovered by a full portrait of dynamic N-glycan expression during cell differentiation. **Molecular & Cellular Proteomics**. V. 9 (3), p. 523-537; 2010.

american Cancer Society. Atualizado 22 de Janeiro do 2016.
www.cancer.org

102 REFERÊNCIAS

- ANNOVAZI, L.; MELLAI, M.; CALDERA, V.; VALENTE, G.; SCHIFFER, D. SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. **Cancer Genomics Proteomics**. V. 8 (3), 139-147; 2011.
- AROUI, S.; AOUEY, B.; CHTOUROU, Y.; MEUNIER, A. C.; FETOUI, H.; KENANI, A. Naring supresses cell metastasis and the expression. Of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMO-9) via the inhibition of ERK-P38-JNK signaling pathway in human glioblastoma. **Chemico-Biological Interactions**. V. 244, p. 195-203; 2016.
- ASSREUY, A. M.; FONTENELE, S. R.; PIRES, A. F.; FERNANDES, D. C.; RODRIGUES, N. V.; BEZERRA, E. H.; MOURA, T. R.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the Canavalia genus. **Naunyn Schmiedeberg's Archives Pharmacology**. V. 6, p. 509–521; 2009.
- AUER, R.; DEL MAESTRO, R. F.; ANDERSON, R. A simple and reproducible experimental *in vivo* glioma model. **Canadian Journal of Nerological Sciences**. V. 8, p. 325-331; 1981.
- AVILION, A. A.; MICOLIS, S. K.; PEVNY, L. H.; PEREZ, L.; VIVIAN, N.; LOVEL-BADGE, R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX 2 funtion. **Genes & Development**. V. 17 (1), p. 126-140; 2003.
- BALDINI, S. F.; LEFEBVRE, T. O-GlcNAcylation and the Metabolic Shift in High-Proliferation Cells: All the Evidence Suggests that Sugars Dictate the Flux of Lipid Biogenesis in Tumor Processes. **Frontiers in Oncology**. V. 6, Article 6; 2016.
- BARAUNA, S. C.; KASTER, M. P.; HECKERT, B. T.; DO NASCIMENTO, K. S.; ROSSI, F. M.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B. S.; RODRIGUES, A. L. S.; LEAL, R. B. Antidepressant-like Effect Lectin from Canavalia Brasiliensis (ConBr) Administered Centrally in Mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. V. 85 (1), p. 160-169; 2006.
- BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T. B.; DE FREITAS, L. A.; BARRAL-NETTO, M. In vivo lymphocyte

activation and apoptosis by lectins of Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 96, p. 673-673; 2001.

BARNES, M. A.; MCMULLEN, M. R.; ROYCHOWDHURY, S.; PISANO, S. G.; LIU, X.; STAVITSKY, A. B.; BUCALA, R.; NAGY, L. E. Macrophage migration inhibitory factor contributes to ethanol-induced liver injury by mediating cell injury, steatohepatitis, and steatosis. **Hepatology**. P. 57 (5), p. 1980-1991; 2013.

BARROSO-NETO, I. L.; SIMÕES, R. C.; ROCHA, B. A. M.; BARBOSA BEZERRA, M. J.; PEREIRA-JUNIOR, N. F.; SILVA OSTERNE, V. J.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; DELATORRE, P.; GONÇALVES PEREIRA, M.; FREITAS PIRES, A.; SAMPAIO, A. H.; SAMPAIO ASSREUY, A. M.; CAVADA, B. S. Vasorelaxant activity of *Canavalia grandiflora* seed lectin: A structural analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. V. 543, p. 31-39; 2014.

BENDA, P.; LIGHTBODY, J.; SATO, G.; LEVINE, L.; SWEET, W. Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. **Science**. V. 161, p. 370; 1968.

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

BENDAS, G. e BORSIG, L. Cancer cell adhesion and metastasis: selections, integrins, and the inhibitory potential of heparins. **International Journal of Cell Biology**. V. 2012, p. 676-731; 2012.

BERG, J. M; TYMOCZKO, J. L; STRYER, L. Section 11,4, Lectins Are Specific Carbohydrate-Binding Proteins. In *Biochemistry* 5th ed; W. H. Freeman: New York, N. Y, USA, 2002.

BEZERRA, E. H. S.; ROCHA, B. A. M.; NAGANO, C. S.; DE ARRUDA BEZERRA, G.; ROCHA DE MOURA, T.; BARBOSA BEZERRA, M. J.; BENEVIDES, R. G.; SAMPAIO, A. H.; SAMPAIO ASSREUY, A. M.; DELATORRE, P.; CAVADA, B. S. Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain in endothelial NO synthase activation.

Biochemical and Biophysical research Communications. V. 408, p. 566-570; 2011.

BEZERRA, M. J. B.; RODRIGUES, N. V. F. C.; PIRES, A. F.; BEZERRA, G. A.; NOBRE, C. B.; ALENCAR, K. L. L.; SOARES, P. M. G.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; MARTINS, J. L.; GRUBERC, K.; SAMPAIO, A. H.; DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S. Crystal structure of Dioclea violácea lectina and a comparative study of vasorelaxant properties with Dioclea rostrata lectina. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** V. 45, p. 807-815; 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Informática do SUS (Datasus). Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205> Acesso em: 14/11/2015.

BRENNAN, C. W.; VERHAAK, R. G. W.; MCKENNA, A.; CAMPOS, B.; NOUSHMEHR, H.; SALAMA, S. R.; ZHENG, S.; CHAKRAVARTY, D.; SANBORN, J. Z.; BERMAN, S. H.; BEROUKHIM, R.; BERNARD, R.; WU, C. J.; GENOVESE, G.; SHMULEVICH, I.; BARNHOLTZ-SLOAN, J.; ZOU, L.; VEGESNA, R.; SHUKLA, S. A.; CIRIELLO, G.; YUNG, W. K.; ZHANG, W.; SOUGNEZ, C.; MIKKELSEN, T.; ALDAPE, K.; BIGNER, D. D.; VAN MEIR, E. G.; PRADOS, M.; SLOAN, A.; BLACK, K. L.; ESCHBACHER, J.; FINOCCHIARO, G.; FRIEDMAN, W.; ANDREWS, D. W.; GUHA, A.; IACOCCA, M.; O'NEILL, B. P.; FOLTZ, G.; MYERS, J.; WEISENBERGER, D. J.; PENNY, R.; KUCHERLAPATI, R.; PEROU, C. M.; D. HAYES, N.; GIBBS, R.; MARRA, M.; MILLS, G. B.; LANDER, E.; SPELLMAN, P.; WILSON, R.; SANDER, C.; WEINSTEIN, J.; MEYERSON, M.; GABRIEL, S.; LAIRD, P. W.; HAUSSLER, D.; GETZ, G.; CHIN, L. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. **Cell.** V. 155 (2); 462-477; 2013.

BRINDA, K. V.; MITRA, N.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Determinants of quaternary association in legume lectins. **Protein Science.** V. 13, p. 1735-1749; 2004.

- BURCHELL, B. Genetic variation of human UDP-glucuronosyltransferase: implications in disease and drug glucuronidation. **American Journal of Pharmacogenomics**. V. 3 (1), p. 37-52; 2003.
- CAIRNCROSS, G.; BERKEY, B.; SHAW, E.; JENKINS, R.; SCHEITHAUER, B.; BRACHMAN, D.; BUCKNER, J.; FINK, K.; SOUHAMI, L.; LAPERIERRE, N. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. **Journal of Clinical Oncology**. V. 24, p. 2707-2714; 2006.
- CAO, J.; GUO, S.; ARAI, K.; LO, E. H.; NING, M. M. Studying Extracellular Signaling Utilizing a Glycoproteomic Approach: Lectin Blot Surveys, a First and Important Step. **Methods of Molecular Biology**. V. 1013, p. 227-233; 2013.
- CASTEDO, M.; PERDETTINI, J. L.; ROUMIER, T.; ANDREAU, K.; MEDEMA, R.; KROEMER, G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**. V. 23, p. 2825-2837; 2004.
- CATALOZZOLO, C.; CANAZZA, A.; POLLO, B.; DI PIERRO, E.; CIUSANI, E.; MADERNA, E.; SALCE, E.; SPONZA, V.; FRIGERIO, S.; DI MECO, F.; SCHINELLI, S.; SALMAGGI, A. Expression of the new CXCL12 receptor, CXCR7, in gliomas. **Cancer Biology & Therapy**. V. 11, p. 242-253; 2011.
- CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science**. V. 2, p.123-135; 2001.
- CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; CRISOSTOMO, C. V.; SILVA, L. M. A.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Lectin from *Dioclea guianensis* var. *lasiophylla* Duke seeds mobilization during germination and seedling growth in the dark. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. V. 6, p. 21-25; 1994.

- CHAKRABORTY, A. K.; PAWELEK, J. M. GnT-V, macrophage and cancer metastasis: a common link. **Clinical and Experimental Metastasis**. V. 20 (4), p. 365-373; 2003.
- CHANG, C. P.; YANG, M. C.; LIU, A. S. LIN, Y. S.; LEI, H. Y. Cancavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine *in situ* hepatoma model. **Hapatology**. V. 45, p. 286-296; 2007.
- CHEN, D.; YU, J.; ZHANG, L. Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**. V. 1865 (2), p. 228-236; 2016.
- CHEN, W. L.; BARSCZYK, A.; TURLOVA, E.; DEURLOO, M.; LIU, B.; YANG, B. B.; RUTKA, J. T.; FENG, Z. P.; SUN, H. S. Inhibition of TRPM7 by carvacrol suppresses glioblastoma cell proliferation, migration and invasion. **Oncotarget**. V. 6 (18), p. 16321-16340; 2015.
- CHENG, Y.; REN, X.; HAIT, W. N.; YANG, J. M. Therapeutic targetinf of autophagy in disease: biology and pharmacology. **Pharmacology Review**. V. 65, p. 1162-1197; 2013.
- CHERAY, M.; PETIT, D.; FORESTIER, L.; KARAYAN-TAPON, L.; MAFTAH, A.; JAUBERTEAU, M. O.; BATTU, S.; GALLET, F. P.; LALLOUÉ, F. Glycosylation-related gene expression is linked to differentiation status in glioblastomas undifferentiated cells. **Cancer Letters**. V. 312, p. 24-32; 2011.
- CHERRY, A. E.; STELLA, N. G protein-coupled receptors as oncogenic signals in glioma: emerging therapeutic avenus. **Neuroscience**. V. 278, p. 222-236; 2014.
- CHO, Y. S.; CHALLA, S.; MOQUIN, D.; GENGA, R.; RAY, T. D.; GUILDFORD, M.; CHAN, F. K. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed recrosis and virus-induced inflammation. **Cell**. V. 137, P. 1112-1123; 2009.
- CHOTAI, S. P.; MOON, H. J.; KIM, J. H.; KIM, J. H.; KWON, T. H. Primary glioblastoma multiforme of medulla oblongata: Case report and review of literature. **Asian Journal of Neurosurgery**. V. 7 (1), p. 36-38; 2012.

CLARK, M. J.; HOMER, N.; O'CONNOR, B. O.; CHEN, Z.; ESKIN, A.; LEE, H.; MERRIMAN, B.; NELSON, S. F. U87MG Decoded: The Genomic Sequence of a Cytogenetically Aberrant Human Cancer Cell Line. **PlosGenetics**. V. 6, e1000832; 2010.

COLLINS, V. P. Brain tumors: Classifications and genes. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**. V. 75 (2), p.11; 2004.

COOPER, G. M. The cell. A Molecular Approach. 2° Ed. **Sinauer Associates**. 2000. ISBN-10: 0-87893-106-6.

CORREIA, J. L.; DO NASCIMENTO, A. S.; CAJAZEIRAS, J. B.; GONDIM, A. C.; PEREIRA, R. I.; DE SOUSA, B. L.; DA SILVA, A. L.; GARCIA, W.; TEIXEIRA, E. H.; DO NASCIMENTO, K. S.; DA ROCHA, B. A.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. Molecular characterization and tandem mass spectrometry of the lectin extracted from the seeds of *Dioclea sclerocarpa* Ducke. **Molecules**. V. 16, p. 9077–9089; 2011.

D'HAENE, N.; MARIS, C.; RORIVE, S.; DECAESTECKER, C.; LE MERCIER, M.; SALMAN, I. Galectins and neovascularization in central nervous system tumors. **Glycobiology**. V. 24 (10), p. 892-898; 2014.

DAGTYAREV, M.; DE MAZIERE, A.; KLUMPERMAN, J.; LIN, K. Autophagy, na Achilles's heel AKTing against cancer? **Autophagy**. V. 5, p. 415-418; 2009.

DALL'OLIO, F.; CHIRICOLO, M. Sialyltransferases in cancer. **Glycoconjugate Journal**. V. 18 (11-12), p. 841-850; 2001.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**. V. 116, p. 205-219; 2004.

DAWSON, G.; MOSKAL, J. R.; DAWSON, S. A. Transfection of 2,6 and 2,3-sialyltransferase genes and GlcNac-transferase genes into human glioma cell line U-373 MG affects glycoconjugate expression and enhances cell death. **Journal of Neurochemistry**. V. 89, p. 1436-1444; 2004.

108 REFERÊNCIAS

DE BARROS PONTES, L.; KARNAKIS, T.; FLEURY MALHEIROS, S. M.; WELTMAN, E.; BRANDT, R. A.; GUENDELMANN, R. A. K. Glioblastoma: approach to treat elderly patients. **Einstein**. V. 10(4), p. 512-518; 2012.

DE MEJÍA, E. C.; PRISECARU, V. I. Lectins as Biocative Plant Proteins: A Potential in câncer Treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. V. 45, p. 425-445; 2005.

DE OLIVEIRA SILVA, F.; DAS NEVES SANTOS, P.; DE OLIVEIRA FIGUEIROA, E.; LAGOS DE MELO, C. M.; DE ANDRADE LEMOINE NEVES, J. K.; SOUSA ARRUDA, F. V.; CAJAZEIRAS, J. B.; DO NASCIMENTO, K. S.; TEIXEIRA, E. H.; SOUSA CAVADA, B.; FIGUEIREDO PORTO, A. L.; ALVES PEREIRA, V. R. Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cell. **Research in Veterinary Science**. V. 96, p. 276-282; 2014.

DEGTYAREV, M.; REICHEL, M.; LIN, K. Novel Quantitative Autophagy Analysis by Organelle Flow Cytometry after Cell Sonication. **Plos One**. V. 9, p. 1-14; 2014.

DONTA, S. T. The growth of funcional rat glial cells in a serumless medium. **Experimental Cell Research**. V. 82, p. 119-124; 1973.

DRAKE, R. R.; BALL, L. E. Glycosylation and cancer. 5ed. **Copyright**. 2015.

DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Biology of animal lectins. **Annau Review of Cell Biology**. V. 9, p. 237-264; 1993.

DRINNAN, N. B.; HALLIDAY, J.; RAMSDALE, T. Inhibitors of sialyltransferases: potential roles in tumor growth and metastasis. **Mini Reviews in Medical Chemistry**. V. 3 (6), p. 501-517; 2003.

EHRENBERG, B.; MONTANA, V.; WEI, M. D.; WUSKELL, J. P.; LOEW, L. M. Membrane potential can be determined in individual cells from the nerstian distribution of cationic dyes. **Biophysical Journal**. V. 53, p. 785-794; 1988.

EHTESHAM, M.; MIN, E.; ISSAR, N. M.; KASL, R. A.; KHAN, I. S.; THOMPSON, R. C. The role of the CXCR4 cell surface chemokine

receptor in glioma biology. **Journal of Neuro-Oncology**. V. 113, p. 153-162; 2013.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicology and Pathology**. V; 35, p. 495-516; 2007.

FAHEINA-MARTINS, G. V.; DA SILVEIRA, A. L.; RAMOS, M. V.; MARQUES*SANTOS, L. F.; MACHADO ARAUJO, D. A. Influence of Fetal Bovine Serum on Cytotoxic and Genotoxic Effects of Lectins in MCF-7 Cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. V. 25(5), p. 290-297; 2011.

FAN, C. D.; ZHAO, B. X.; ZHANG, G. H.; DONG, W. L.; MIAO, J. L. Synthesis and discovery of autophagy inducers for A549 and H460 lung cancer cells, novel 1-(2'-hydroxy-3'-aroxypopyl)-3-aryk-1H-pyrazole-5-carbohydrazide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. V. 18, p. 3860-3864; 2008.

FAVVORO, R.; VALOTTA, M.; FERRI, A. L.; LATORRE, E.; MARIANI, J.; GIACHINO, C.; LANCINI, C.; TOSETTI, V.; OTTOLENGHI, S.; TAYLOR, V.; NICOLIS, S. K. Hippocampal development and neural stem cell maintenance require SOX2-dependent regulation of Shh. **Nature Neuroscience**. V. 12 (10), p. 1248-1256; 2009.

FEINBER, A. P.; KOLDOBSKIY, M. A.; GÖNDOÖR, A. Epigenetic modulator, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. **Nature Reviews Genetics**. V. 17 (5), p. 284-299; 2016.

FORSHEW, T; TATEVOSSIAN, R.G; LAWSON, A.R; MA J, NEALE, G; OGUNKOLADE, B.W; JONES, T.A; AARUM, J; DALTON, J; BAILEY, S. Activation of the ERK/MAPK pathway: A signature genetic defect in posterior fossa pilocytic astrocytomas. **The Journal of Pathology**. V. 218, p. 172–181; 2009.

FU, L. L.; CHENG, Y.; LIU, B. Beciclin-1: autophagic regulator and therapeutic target in cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. V. 4, p. 921-924; 2013.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Programmed cell death in animal development and disease. **Cell**. V. 147, p. 742-458; 2011.

110 REFERÊNCIAS

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

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; CHAN, F. K. M.; KROEMER, G. Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. **Annual Reviews Further**. V. 12, p. 103-130; 2017.

GANGEMI, R. M.; GRIFFERO, F.; MARUBBI, D.; PERERA, M.; CAPRA, M. C.; MALATESTA, P.; RAVETTI, G. L.; ZONA, G. L.; DAGA, A.; CORTE, G. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. **Stem Cells**. V. 27 (1), p. 40-48; 2009.

GARRAWAY, L. A.; LANDER, E. S. Lessons from the cancer genome. **Cell**. V. 153, p. 17-37; 2013.

GARROS-REGULEZ, L.; ALDAZ, P.; ARRIZABALAGA, O.; MONCHO-AMOR, V.; CARRASCO-GARCIA, E.; MANTEROLA, L.; MORENO-CUGNON, L.; BARRENA, C.; VILLANUA, J.; RUIZ, I.; POLLARD, S.; LOVELL-BADGE, R.; SAMPRON, N.; GARCIA, I.; MATHEU, A. mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**. V. 20 (4), p. 393-405; 2016.

GOFFART, N.; KROONEN, J.; ROGISTER, B. Glioblastoma-Initiating Cells: Relationship with Neural Stem Cells and the Micro-Environment. **Cancers**. V. 5, p. 1049-1071; 2013.

GOMEZ-FERNANDEZ, J. C. Functions of the C-terminal domains of apoptosis-related proteins of the BCL-2 family. **Chemistry and Physics of Lipids**. V. 183, p. 77-90; 2014.

GRANGEIRO, T. B.; SCHRIEFER, A.; CALVETE, J. J.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; BARRAL-NETTO, M.; CAVADA, B. S. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **European Journal of Biochemistry**. V. 15, p. 43-48; 1997.

- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; BRONDANI DA ROCHA, A. Apoptosis: Programmed Cell Death. **Revista Brasileira de Cancerologia**. V. 53 (3), p. 335-343; 2007.
- GROBBEN, B., DE DEYN, P. P., SLEGGERS, H. Rat C glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. **Cell Tissue Research**. V. 310, p. 257-270; 2002.
- GUMBINER, B. M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**. V. 84, p. 345-357; 1996.
- GUPTA, G. Animal Lectins: From, Function and Clinical Applications. **Springer Sciences & Business Media**. 2012.
- HAKOMORI, S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. **Proceeding of National Academy Sciences**. V. 99 p.10231-10233; 2002.
- HALTIWANGER, R. S.; LOWE, J. B. Role of glycosylation in development. **Annual Review of Biochemistry**. V. 73, p. 491-537.
- HAMBARDZUMYAN, D.; GUTMANN, D. H.; KETTENMANN, H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. **Nature Neuroscience**. V. 19 (1), p. 20-27; 2016.
- HAN, D. W.; TAPIA, N.; HERMANN, A.; HEMMER, K.; HÖING, S.; ARAÚZO-BRAVO, M. J.; ZAEHRES, H.; WU, G.; FRANK, S.; MORITZ, S.; GREBER, B.; YANG, J. H.; LEE, H. T.; SCHAMBORN, J. C.; STORCH, A.; SCHÖLER, H R. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. **Cell Stem Cell**. V. 10 (4), p. 465-472; 2012.
- HAN, Y. P.; ENOMOTO, A.; SHIRAKI, Y.; WANG, S. Q.; WNAG, X.; TOYOKUNI, S.; ASAI, N.; USHIDA, K.; ARA, H.; OHKA, F.; WAKABAYASHI, T.; MA, J.; NATSUME, A.; TAKAHASHI, M. Significance of low mTORC1 activity in defining the characteristics of brain tumor stem cells. **Neuro-Oncology**. V. 20 (20), p. 1-12; 2016.
- HE, C.; LEVINE, B. The Beclin 1 interactome. **Current Opinion in Cell Biology**. V. 22, p. 140-149; 2010.

112 REFERÊNCIAS

- HE, J.; LIU, Y.; XIE, X.; ZHU, T.; SOULES, M.; DIMECO, F.; VESCOVI, A. L.; FAN, X.; LUBMAN, D. M. Identification of cell surface glycoprotein markers for glioblastoma-derived stem-like cells using a lectin microarray and LC-MS/MS approach. **Journal of Proteome Research**. V. 9 (5), p. 2565-2572; 2010.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**. V. 407, p. 770-776; 2000.
- HERNANDEZ, J. D.; BAUM, L.G. Ah, sweet mystery of death! Galactins and control of cell fate. **Glycobiology**. V. 12, p. 127-136; 2002.
- HONG, J. F.; SONG, Y. F.; LIU, Z.; ZHENG, Z. C.; CHEN, H. J.; WANG, S. S. Anticancer activity of taraxerol acetate in human glioblastoma cells and a mouse xenograft model via induction of autophagy and apoptotic cell death, cell cycle arrest and inhibition of cell migration. **Molecular Medicine Reports**. V. 13 (6), p. 4541-4548; 2016.
- HUSSEIN, M. R.; HAEMEL, A. K.; WOOD, G. S. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. **Journal of Pathology**. V. 199, p. 275-288; 2003.
- IKUSHIMA, H.; TODO, T.; INO, Y.; TAKAHASHI, M.; MIYAZONO, K. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. **Cell Stem Cell**. V. 5 (5), p. 504-514; 2009.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2016. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2016.
- JACQUES, A. V.; REIGER, D. K.; MAESTRI, M.; LOPES, M. W.; PERES, T. V.; GONÁLVES, F. M.; PEDRO, D. Z.; TASCA, C. L.; LÓPEZ, M. G.; EGEEA, J.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; LEAL, R. B. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochemistry International**. V. 62 (6), p. 836-842; 2013.

JARAMILLO, S; OSORIO, W, ESPILLA, J. C. Advances in the treatment of glioblastoma multiforme. **Universitas Médica**. V. 51(2), p.186-203; 2010.

JIANG, Q. L.; ZHANG, S.; TIAN, M.; ZHANG, S. Y.; XIE, T.; CHEN, D. Y.; CHEN, I. J.; HE, J.; LIU, J.; OUYANG, L.; JIANG, X. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. **Cell Proliferation**. V. 48, p.17-28; 2015.

JIANG, W. C.; SANDERS, A. J.; KATOH, M.; UNGEFROREN, H.; GIESELER, F.; PRINCE, M.; THOMPSON, S. K.; ZOLLO, M.; SPANO, D.; DHAEAN, P.; SLIVA, D.; SUBBARAYAN, P. R.; SARKAR, M.; HONOKI, K.; FUJII, H.; GEORGAKILAS, A. G.; AMEDEI, A.; NICCOLAI, E.; AMIN, A.; ASHRAF, S. S.; YE, L.; HELFERICH, W. C.; YANG, X.; BOOSANI, C. S.; GUHA, G.; CIRIOLO, M. R.; AQUILANO, K.; CHEN, S.; AZMI, A. S.; KEITH, W. N.; BILSLAND, A.; BHAKTA, D.; HALICKA, D.; NOWSHEEN, S.; PANTANO, F.; SANTINI, D. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. **Seminars in Cancer Biology**. V. 35, p. S244-S275; 2015.

JURATLI, T. A.; SCHACKERT, G.; KREX, D. Current status of local therapy in malignant gliomas - a clinical review of three selected approaches. **Pharmacology & Therapeutics**. V. 139(3), p. 341-358;2013.

KAMATSU, M.; JEPSON, S.; ARANGO, M. E.; CAROTHERS CARRAEAY, C. A.; CARRAWAY, K. L. Muc4/sialomucin complex, an intramembrane modulator of Erb B2/HER2/Neu, potentiates primary tumor growth and suppresses apoptosis in a xenotransplanted tumor. **Oncogene**. V. 20, p. 461-470; 2001.

KEULERS, T. .; SCHAAF, M. B. E.; ROUSCHOP, K. M. A. Autophagy-Dependent Secretion: Contribution to Tumor Progression. **Fontiers in Oncology**. V. 6, article 251; 2016.

KHASRAW, M.; LASSMAN, A. B. Advances in the Treatment of Malignant Gliomas. **Current Oncology Reports**. V. 12(1), p. 26-33; 2010.

KNAUT, Jhônatas Luís. Avaliação do efeito citotóxico de lectinas extraídas de leguminosas sobre células de glioma C6. 2016. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KOLKHOFF, P.; WERTHEBACH, M.; VAN DE VENN, A.; POSCHMANN, G.; CHEN, L.; WELTE, M.; STUHLER, K.; BELLER, M. A luciferase-fragment complementations assay to detect lipid droplet-associated protein-protein interaction. **Molecular and Cellular Proteomics**. Manuscript M116.061499; 2016.

KUMAR, A.; EL OSTA, A.; HUSSAIN, A. A.; MARSHALL, J. Increased sequestration of matrix metalloproteinases in ageing human Bruch's membrane: implications for ECM turnover. **Investigation Ophthalmology & Visual Science**. V. 51, p. 2664-2670; 2010.

LE MERCIER, M.; FORTIN, S.; MATHIEU, V.; KISS, R.; LEFRANC, F. Galectins and Gliomas. **Brain Pathology ISSN**. V. 20 (1), p.17-27; 2010.

LEFRANC, F.; BROTCCHI, J.; KISS, R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. **Journal of Clinical Oncology**. V. 23, p. 2411-2422; 2005.

LI, W. W.; YU, J. Y.; XU, H. L.; BAO, J. K. Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochim. Biophys.** V. 414, p. 282-286; 2011.

LI, Y.; HONDA, S.; IWAMI, K.; OHTA, Y.; UMEDA, N. Analysis of mitochondrial mechanical dynamics using a confocal fluorescence microscope with a bent optical fibre. **Journal of Microscopi**. V. 260 (2), p. 140-151; 2015.

LI, W.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; YANG, Y.; DAN, S.; SU, T.; SHE, S.; DONG, W.; ZHAO, Q.; JIA, J.; YAO, H.; ZHENG, M.; KANG, B.; WANG, Y. J. Dual inhibiting OCT4 and AKT potently suppresses the propagation of human cancer cells. **Scientific Reports**. 7:46246.

- LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. V. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**. V. 2 (2), p. 329-333; 2007.
- LICHTENSTEIN, R. G.; RABINOVICH, G. A. Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. **Cell Death and Differentiation**. V. 20, p. 976-986; 2013.
- LICHTENSTEIN, R. G.; RABINOVICH, G. A. Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. **Cell Death and Differentiation**. V. 20, p. 976-986; 2013.
- LIM, D. A.; CHA, S.; MAYO, M. C.; CHEN, M-H.; KELES, E.; VANDENBERG, S.; BERGER, M. S. Relationship of glioblastoma multiforme to neural stem cell regions predicts invasive and multifocal tumor phenotype. **Neuro-Oncology**. V. 9, p. 424-429; 2007.
- LIN, L.; BAEHRECKE, E. H. Autophagy, cell death, and cancer. **Molecular & Cellular Oncology**. V. 2 (3), p. e985913; 2015.
- LIU, B.; MIN, M. W.; BAO, J. K. Induction of apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. **Autophagy**. V. 5, p. 432-433; 2009.
- LIU, B.; WEN, X.; CHENG, Y. Survival or death: disequilibrating the oncogenic and tumor suppressive autophagy in cancer. **Cell Death & Disease**. V. 4, e892; 2013.
- LIU, H.; SONG, N. Molecular Mechanism of Adult Neurogenesis and its Association with Human Brain Diseases. **Journal of Central Nervous System Disease**. V. 8, p. 5-11; 2016.
- LIU, Z; LUO, Y; ZHOU, T. T; ZHANG, W. Z. Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? **Cell Proliferation**. V. 46, p. 509-515; 2013.
- LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death-I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkh. **Journal of Insect Physiology**. V. 11, p. 123-133; 1965.

116 REFERÊNCIAS

- LOPES, F. C.; CAVADA, B. S.; PINTO, V. P.; SAMPIO, A. H.; GOMES, J. C. Differential effect of plant lectins on mast cells of diferente origins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 38, p. 935-941; 2005.
- LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTER, O. D.; CAVANEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**. V. 114(2), p. 97-109; 2007.
- LUI, F. T.; YANG, R. Y.; HSU, D. K. Galectins in acute and chronic inflamation. **Annals of the New York Academy of Sciences**. V. 1253, p. 80-91; 2012.
- LUM, J. J.; DEBERARDINIS, R. J.; THOMPSON, C. B. Autophagy in metazoans> cell survival in the land of plenty. **Nature Review Molecular Cell Biology**. V. 6, p. 439-448; 2005.
- LUQUE, J.; HERRÁEZ, A. Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. 3 ed. **Elsevier Science**. 2006.
- MARTIN, V.; SANCHEZ-SANCHEZ, A. M.; PUENTE-MONCADA, N.; GOMEZ-LOBO, M.; ALVAREZ-VEGA, M. A.; ANTOLIN, I.; RODRIGUEZ, C. Involvement of autophagy in melatonin-induced cytotoxicity in glioma-initiating cells. **Journal of Pineal Research**. V. 57, p. 308-316; 2014.
- MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**. V. 407, p. 796-801; 2000.
- MILDE-LANGOSCH, K.; SCHÜTZE, D.; OLIVEIRA-FERRER, L.; WIKMAN, H.; MÜLLER, V.; LEBOK, P.; PANTEL, K.; SCHÖDER, C.; WITZEL, I.; SCHUMACHER, U. Relevance of β Gal- β GalNac-containing glycans and the enzymes involved in their synthesis for invasion and survival in breast cancer patients. **Breast Cancer Research and Treatment**. V. 151 (3); p. 55-528; 2015.
- MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum Praga-Cecoslov**. V. 26 (26), p. 113-20, 1984.

MORIWAKI, K.; SHINZAKI, S.; MIYOSHI, E. GDP-mannose-4,6-dehydratase (GMDS) deficiency renders colon cancer cells resistant to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor-and CD95-mediated apoptosis by inhibiting complex II formation. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 286, p. 43123-43133; 2011.

MOSKAL, J. R.; KROES, R. A.; DAWSON, G. the Glycobiology of brain tumors: disease relevance and therapeutic potential. **Expert Reviews**. V. 9 (10), p. 1529-1545; 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. V. 65, p. 55-63, 1983.

NAGANO, N.; SASAKI, H.; AOYAGI, M.; HIRAKAWA, K. Invasion of experimental rat brain tumor: early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells. **Acta Neuropathology**. V. 86, p. 117-125; 1993.

NAGELKERKE, A.; SWEEP, F. C.; GEURTS-MOESPOOT, A.; BUSSINK, J.; SPAN, P. N. Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part I: molecular pathways controlling autophagy. **Current Opinion in Cell Biology Journal Impact & Description**. V. 31, p. 89-98; 2015.

NAIRN, A. V.; AOKI, K.; DELA ROSA, M.; PORTERFIELD, M.; LIM, J. M.; KULIK, M.; PIERCE, J. M.; WELLS, L.; DALTON, S.; TIEMEYER, M.; MOREMEN, K. W. Regulation of glycan structures in murine embryonic stem cells: Combined transcript profiling of glucan-related genes and glycan structural analysis. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 287 (45); p. 37835-37856; 2012.

NAMBIAR, J.; BOSE, C.; VENUGOPAL, M.; BANERJI, A.; PATEL, T. B.; KUMAR, G. B.; NAIR, B. G. Anacardic acid inhibits gelatinase through the regulation of Spry2, MM₋₁₄, EMMPRIN and RECK. *Experimental Cell Research*. V. 349, p. 139-151; 2016.

NEWTON, K.; DUGGER, D. L.; WICKLIFFE, K. E.; KAPOOR, N.; DE ALMAGRO, M. C.; VUCIC, D.; KOMUVES, L.; FERRANDO, R.

E.; FRENCH, D. M.; WEBSTER, J.; ROOSE-GIRMA, M.; WARMING, S.; DIXIT, V. M. Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. **Science**. V. 343 (6177), p. 1357-1360; 2014.

NIH (National Cancer Institute at the National Institute of Health). Estatística do câncer. Atualizado 14 de março do 2016. <https://www.cancer.gov/spanol/cancer/naturaleza/estadisticas>.

NIK-ZAINAL, S.; ALEXANDROV, L. V.; WEDGE, D. C.; VAN LOOP, P.; GREENMAN, C. D.; RAINE, K.; JONES, D.; HINTON, J.; MARSHALL, J.; STEBBINGS, L. A.; MENZIES, A.; MARTIN, S.; LEUNG, K.; CHEN, L.; LEROY, C.; RAMAKRISHNA, M.; RANCE, R.; LAU, K. W.; MUDIE, L. J.; VARELA, I.; MCBRIDE, D. J.; BIGNELL, G. R.; COOKE, S. L.; SHLIEN, A.; GAMBLE, J.; WHITMORE, I.; MADDISON, M.; TARPEY, P. S.; DAVIES, H. R.; PAPAEMMANUIL, E.; STEPHENS, P. J.; MCLAREN, S.; BUTLER, A. P.; TEAGUE, J. W.; JÖNSSON, G.; GARBER, J. E.; SILVER, D.; MIRON, P.; FATIMA, A.; BOYAUULT, S.; LANGERØD, A.; TUTT, A.; MARTENS, J. W.; APARICIO, S. A.; BORG, Å.; SALOMON, A. V.; THOMAS, G.; BØRRESEN-DALE, A. L.; RICHARDSON, A. L.; NEUBERGER, M. S.; FUTREAL, P. A.; CAMPBELL, P. J.; STRATTON, M. R.; BREAST CANCER WORKING GROUP OF THE INTERNATIONAL CANCER GENOME CONSORTIUM. Multitational processes molding the genomes of 21 breast cancers. **Cell**. V. 149, p. 979-993; 2012.

NOQUEIRA, N. A.; GRANGEIRO, M. B.; DE CUNHA, R. M.; RAMOS, M. V.; ALVES, M. A.; TEIXEIRA, E. H.; BARRAL-NETTO, M.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B. Expression and purification of the recombinant ConBr (*Canavalia brasiliensis* lectin) produced in *Escherichia coli* cells. **Protein & Peptide Letters**. V. 9(1), p. 59-66, 2002.

NOWACKA, M. M.; OBUCHIWICZ, E. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in the central nervous system: A new element in the neurotrophic hypothesis of antidepressant drug action. **Neuropeptides**. V. 46, p. 1-10; 2012.

- NUTT, C. L.; MATTHEWS, R. T.; HOCKFIELD, S. Glial Tumor Invasion: A Role for the Upregulation and Cleavage of BEHAV/Brevican. **The Neuroscientist**. V. 7 (2), p. 113-123; 2001.
- OGATA, M.; HINO, S.; SAITO, A.; MORIKAWA, K.; KONDO, S.; KANEMOTO, S.; MURAKAMI, T.; TANIGUCHI, M.; TANII, I.; YOSHINAGA, K.; SHIOSAKA, S.; HAMMARBACK, J. A.; URANO, F.; IMAIZUMI, K. Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress. **Molecular and Cellular Biology**. V. 26 (24), p. 9220-9231; 2006.
- OHSUMI, Y. Historical landmarks of autophagy research. **Cell Research**. V. 24, p. 9-23; 2014.
- OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Review Cancer**. V. 4, p. 592-512; 2004.
- OSTERNE, V. J. S.; SILVA-FILHO, J. C.; SANTIAGO, M. Q.; PINTO-JUNIOR, V. R.; ALMEIDA, A. C.; BARRETO, A. A. G. C.; WOLIN, I. A. V.; NASCIMENTO, A. P. M.; AMORIM, R. M. F.; ROCHA, B. A. M.; DELATORRE, P.; NAGANO, C. S.; LEAL, R. B.; ASSEREUY, A. M. S.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Structural characterization of the lectina from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International Journal of Biological Macromolecules**. V, 94, p. 271-282; 2017.
- OSTROM, Q. T.; GITTLEMAN, H.; FULOP, J.; LIU, M.; BLANDA, R.; KROMER, C.; WOLINSKY, Y.; KRUCHKO, C.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. **Neuro-Oncology**. V. 17, p. 1-62; 2015.
- PERILLO, N. L.; MARCUS, M. E.; BAUM, L. G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **Journal of Molecular Medicine**. V. 76, p. 402-412; 1998.
- PINNTO-JUNIOR, V. R.; CORREIA, J. L. A.; PEREIRA, R. I.; PEREIRA-JUNIOR, F. N.; SANTIAGO, M. Q.; OSTERNE, V. J. S.; MADEIRA, J. C.; CAJAZEIRAS, J. B.; NAGANO, C. S.; DELATORRE, P.; ASSEREUY, A. M. S.; NASCIMIENNTO, K. S.; CAVADA, B. S. Purification and molecular characterization of a novel

120 REFERÊNCIAS

monnosse-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds whit inflammatory activity. **Journal of Molecular Recognition**, V. 29, p. 134-141; 2016.

PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; SANTIAGO, M. Q.; CORREIA, J. L. A.; PEREIRA-JUNIOR, F. N.; LEAL, R. B.; PEREIEA, M. G.; CHICAS, L. S.; NAGANO, C. S.; ROCHA, B. A. M.; SILVA-FILHO, J. C.; FERREIRA, W. P.; ROCHA, C. R. C.; NASCIMENTO, K. S.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S. Estructural studies of a vasorelaxant lectina from *Diocleia reflexa* Hook seeds: Crystal structure, molecular docking and dynamics. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 98, p. 12-23; 2017.

POTÉN, J.; MACITYRE, E. H. Long Tern Culture of Normal and Neoplastic Human Glia. **Acta Pathologica Microbiologica Sabdinavica**. V. 74, p. 465-486;1968.

PRASANNA, V.K.; VENKATESH, Y. P. Characterization of onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) as an immunomodulatory protein inducing Th1-type immune response in vitro. **International Immunopharmacology**. V. 26, p. 304–313; 2015.

PRATT, L.; ANNABI, B. Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAKS2/STAT3 and MT1-MMP signalin interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells. **Cellular Signalling**. V. 26, p. 917-924; 2014.

PROULX-BONNEAU, S.; PRATT, J.; ANNABI, B. A role for MT1-MMO as a cell death sensor/effector through the regulation of endoplasmic reticulum stress in U87 glioblastoma cells. **Journal Neurooncology**. V. 104, p. 33-43; 2011.

REIS, C. A.; OSORIO, H.; SILVA, L.; GOMES, C.; DAVID, L. Alterations in glycosylation as biomarkers for câncer detection. **Journal of Clinical Pathology**. V. 63, p. 322-329; 2010.

RESENDE, F. F. B.; BAI, X.; DEL-BEL.; E. A.; KIRCHHOFF, F.; SCHELLER, A.; TITZE-DE-ALMEIDA, R. Evaluation of TgH(CX3CR1-EGFP) mice implanted with mCherry-GL261 cells as an

in vivo model for morphometrical analysis of glioma-microglia interaction. **BMC Cancer**. V. 16, p. 72-84; 2016.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer> how are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**. V. 49, p. 1603-1616; 2010.

RICCI, M. S.; ZONG, W. X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**. V. 11, p. 342-357; 2006.

RIEGER, D. K.; COSTA, A. P.; BIDNI, J.; MORETTI, M.; ROCHA BARBOSA, S. G.; NASCIMENTO, K. S.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B. S.; RODRIGUES, A. L.; LEAL, R. B. Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. V. 122, p. 53-60; 2014.

RIOS-MARCO, P.; RIOS, A.; JIMÉMEZ-LÓPEZ, J. M.; CARRASCO, M. P.; MARCO, C. Cholesterol homeostasis and autophagic flux in perifosine-treated human hepatoblastoma HepG2 and glioblastoma U-87 MG cell lines. **Biochemical Pharmacology**. V. 96, V. 10-19; 2015.

ROCHA, B. A. M.; MORENO, F. B.; DELATORRE, P.; SOUZA, E. P.; MARINHO, E. S.; BENEVIDES, R. G.; RUSTIGUEL, J. K. R.; SOUZA, L. A. G.; NAGANO, C. S.; DEBRA, Y. H.; SAMPAIO, A. H.; AZEVEDO-JUNIOR, W. F.; CAVADA, B. S. Purification, characterization, and preliminary x-ray diffraction analysis of a lactose-specific lectin from *Cymbosema roseum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 152, p. 383-393; 2009.

RORIVE, S.; BELOT, N.; DECAESTECKER, C.; LEFRANC, F.; GORDOWER, L.; MICIK, S.; MAURAGE, C.; KALTNER, H.; RUCHOUX, M. M.; DANGUY, A.; GABIUS, H. J.; SALMON, I.; KISS, R.; CAMBY, I. Galectin-1 is highly expressed in human gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into the brain parenchyma. **Glia**. V. 33, p. 241-255; 2001.

ROSA, R.; SANFELIU, C.; RODRIGUEZ-FARRE, E.; FRANDBSEN, A.; SCHOUSBOE, A.; SUÑOL, C. Properties of ryanodine receptors in cultured cerebellar granule neurons: effects of hexachlorocyclohexane isomers and calcium. *Journal of Neuroscience Research*. V. 47, p. 27-33; 1997.

- ROUSSEAU, A.; MOKHTARI, K.; DUYCKAERTS, C. The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system - what has changed? **Current Opinion in Neurology**. V. 21, p. 720-7; 2008.
- ROY, B.; PATTANAIK, A. K.; DAS, J.; BHUTIA, S. K.; BEHERA, B.; SINGH, P.; MAITI, T. P. Role of PI3K/Akt/mTOR and MER/ERK pathway in Concavalin A induced autophagy in HeLa cells. **Chemico-Biological Interactions**. V. 210, p. 96-102; 2014.
- ROY, D.; DAS, K.; MONDAL, S.; BHOWMICK, D.; DEY, S.; MAJUMDER, G. C.; MUKHERJEE, B.; BHATTACHARYYA, D. Epididymal protein ASF is a D-galactose-specific lectin with apoptotic effect on human breast cancer cell line MCF7. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 84, p. 208-220; 2016.
- RUBIN, J. B.; KUNG, A. L.; KLEIN, R. S.; CHAN, J. A.; SUN, Y.; SCHMIDT, K.; KIERAN, M. W.; LUSTER, A. D.; SEGAL, R. A. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. V. 100, p. 13513-13518; 2003.
- RUSSI, M. A.; VANDRESEN-FILHO, S.; RIEGER, D. K.; COSTA, A. P.; LOPES, M. W.; CUNHA, R. M. S.; TEIXEIRA, E. H.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; TASCA, C. L.; LEAL, R. B. ConBr, a lectina from Canavalia brasiliensis seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. **Neurochemical Research**. V. 37 (2), p. 288-297; 2012.
- SALGIA, R. Fibroblast growth factor signaling and inhibition in non-small cell lung cancer and their role in squamous cells tumor. **Cancer Medicine**. V. 3, p. 681-692; 2014.
- SANAI, N.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; BERGER, M. S. Neural Stem Cells and the Origino of Gliomas. **The New England Journal of Medicine**. V. 353; p. 811-822; 2005.
- SAN-GALLI, F.; VRIGNAUD, P.; ROBERT, J.; COINDRE, J.M.; COHADON, F. Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma in Wistar rats. **Journal Neurooncology**. V. 7, p. 299-304; 1989.

- SANSON, M.; MARIE, Y.; PARIS, S.; IDBAIH, A.; LAFFAIRE, J.; DUCRAY, F.; EL HALLANI, S.; BOISSELIER, B.; MOKHTARI, K.; HOANG-XUAN, K.; DELATTRE, J. Y. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. **Journal of Clinical Oncology**. V. 27, p. 4150–4154; 2009.
- SANZ-APARCIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T. B.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B. S. The Crystal Structure of Canavalia Brasiliensis Lectin Suggests a Correlation Between Its Quaternary Cobformation and Its Distinct Biological Properties from Canavalin A. **FEBS Letters**. V. 405 (1), p. 114-118; 1997.
- SARKAR, A.; HOCHEDLINGER, K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. **Cell Stem Cell**. V. 12 (1), p. 15-30; 2013.
- SCHNEIDER, J. L.; CUERVO, A. M. Autophagy and human disease: emerging themes. **Curren Opinion in Genetics & Development**. V. 26, p. 16-23; 2014.
- SCHWEICHEL, J. U.; MERKER, H. J. The morphology of various types of cell death prenatal tissues. **Teratology**. V. 7, p. 253-266; 1973.
- SCHWORER, S. A.; SMIENOVA, I. I.; KURBATOVA, I.; BAGINA, U.; CHUROVA, M.; FOWLER, T.; ROY, A. L.; DEGTEREV, A.; POLTORAK, A. Toll-like receptor-mediated down-regulation of the deubiquitinase cylindromatosis (CYLD) protects macrophages from necroptosis in wild-derived mice. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 289 (20), p. 1422-1433; 2014.
- SHARON, N. Lectins: caarbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 282 (5), p. 2753-2764; 2007.
- SHATNYEVA, O. M.; KUBARENKO, A. V.; WEBER, C. E.; PAPPA, A.; SCHWARTZ-ALBIEZ, R.; WEBER, A. N. R.; KRAMMER, P. H.; LAVRIK, I. N. Modulation of the CD95-Induced Apoptosis: The Role of CD95 N-Glycosylation. **PLoS ONE**. V. 6 (5), e19927; 2011.
- SHEN, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, R.; TU, X.; GONG, X. Ursolic acid induces autophagy in U87MG cells via ROS-dependent endoplasmic

124 REFERÊNCIAS

reticulum stress. **Chemico-Biological Interactions**. V. 218, p. 28-41; 2014.

SHENDURE, J.; LIEBERMAN AIDEN, E. The expanding scope of DNA sequencing. **Nature Biotechnology**. V. 30, p. 1084-1094; 2012.

SILVA, F. O.; SANTOS, P. N.; MELO, C. M. L.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B. S.; ARRUDA, F. V.; CAJAZEIRAS, J. B.; ALMEIDA, A. C.; PEREIRA, V. R. A.; PORTO, A. L. F. Immunostimulatory activity of BonBr: a focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. **Cell and Tissue Research**. V. 346, p. 237-244; 2011.

SINA, A.; PROULX-BONNEAU, S.; ROY, A.; POLIQUIN, L.; CAO, J.; ANNABI, B. The lectin concavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK γ /NF- κ B-dependent pathway. *Journal of Cell Communication and Signalling*. V. 4 (1), p. 31-38; 2010.

SINGH, R.; NAWALE, L.; SARKAR, D.; SURESH, C. G. Two chitotriose-specific lectins show anti-angiogenesis, induced caspase-9-mediated apoptosis and early arrest of pancreatic tumor cell cycle. **PLoS One**. V. 11 (1), p. e0146110; 2016.

SINGH, S.; SINGH, D. K. Effect of molluscicidal components of *Abrus precatorius*, *Argemone mexicana* and *Nerium indicum* on certain biochemical parameters of *Lymnaea acuminata*. **Phytotherapy Research**. V. 3, p. 210-213, 1999.

SOON, W. W.; HARIHARAN, M.; SNYDER, M. P. High-throughput sequencing for biology and medicine. **Molecular Systems Biology**. V. 9, p. 640; 2013.

STRIK, H. M.; DEININGER, M. H.; FRANK, B.; SCHLUESENER, H. J.; MEYERMANN, R. Galectin-3: cellular distribution and correlation with WHO-grade in human gliomas. **Journal Neurooncology**. V. 53, p. 13-20; 2001.

STRIK, H. M.; KOLODZIEJ, M.; OERTEL, W.; BÄSECKE, J. Glycobiology in Malignant Gliomas: Expression and Functions of

Galectins and Possible Therapeutic Options. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. V. 12, p. 2299-2307; 2012.

STRIK, H. M.; SCHMIDT, K.; LINGOR, P.; TONGES, L.; KUGLER, W.; NITSCHKE, M.; RABINOVICH, G. A.; BÄHR, M. Galectin-1 expression in human glioma cells: modulation by ionizing radiation and effects on tumor cell proliferation and migration. **Oncology Reports**. V. 18, p. 483-488; 2007.

TAIT, S. W.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell signaling. **Journal of Cell Science**. V. 125, p. 807-815; 2012.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**. V. 126 (4), p. 663-676; 2006.

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR centennial series: the biology cancer metastasis: historical perspective. **Cancer Research**. V. 70, p. 5649-5669; 2010.

TAN, T. T.; WHITE, E. Therapeutic targeting of death pathways in cancer: mechanisms for activating cell death in cancer cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. V. 615, p. 81-104; 2008.

THEELER, B. J. E.; GILBERT, M. R. Advances in the treatment of newly diagnosed glioblastoma. **BioMed Central Medicine**. V. 13, p. 293-304; 2015.

TUNA, M.; AMOS, C. I. Genomic sequencing in cancer. **Cancer Lett**. 2012.

VAN DAMME, E. J.; LANNOO, N.; FOUQUAERT, E.; PEUMANS, W. J. The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins. **Glycoconjugate Journal**. V. 20, p. 449-460; 2004.

VAN NOORT, V. V.; SCHOLCH, S.; ISKAR, M.; ZELLER, G.; OSTERTAG, K.; SCHWEITZER, C.; WERNER, K.; WEITZ, J.; KOCH, M.; BORK, P. Novel drug candidates for the treatment of

126 REFERÊNCIAS

metastatic colorectal cancer through global inverse gene expression profiling. **Cancer Research**. V. 74, p. 5690-5699; 2014.

VERHAAK, R. G.; HOADLEY, K. A.; PURDOM, E.; WANG, V.; QI, Y.; WILKERSON, M. D.; MILLER, C. R.; DING, L.; GOLUB, T.; MESIROV, J. P.; ALEXE, G.; LAWRENCE, M.; O'KELLY, M.; TAMAYO, P.; WEIR, B. A.; GABRIEL, S.; WINCKLER, W.; GUPTA, S.; JAKKULA, L.; FEILER, H. S.; HODGSON, J. G.; JAMES, C. D.; SARKARIA, J. N.; BRENNAN, C.; KAHN, A.; SPELLMAN, P. T.; WILSON, R. K.; SPEED, T. P.; GRAY, J. W.; MEYERSON, M.; GETZ, G.; PEROU, C. M.; HAYES, D. N. Cancer Genome Atlas Research Network (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**. V. 17, p. 98-110; 2010.

WANG, K. Molecular mechanisms of live injury: apoptosis or necrosis. **Experimental and Toxicology Pathology**. V. 66 (8), p. 351-356; 2014

WEN, X.; WU, J.; WANG, F.; LIU, B.; HUANG, C.; WEI, Y. Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. **Free Radical Biology & Medicine**. V. 65, p. 402-410; 2013.

WHITTLE, I. R.; MACARTHUR, D. C.; MALCOM, G. P.; LI, M.; WASHINGTON, K.; IRONSIDE, J. W. Can experimental models of rodent implantation glioma be improved? A study of pure and mixed glioma cell line tumors. **Journal Neurooncology**. V. 36, p. 231-242; 1998.

WILLEY e SONS. Cell and Molecular Biology. 4 ed; 2005.

WOJTON, J.; MEISEN, W. H.; KAUR, B. How to train glioma cells to die: molecular challenges in cell death. **Journal Neurooncology**. V. 126, p. 377-34; 2016.

WOLFF, J. E., MOLENKAMO, G.; HOTFILDER, M.; LATERRA, J. Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary-like structure in vitro and angiogenesis in vivo. **Klinische Padiatrie**. V. 209, p. 275-277; 1997.

WOLPFE, R. A.; SATO, G. H.; MCCLURE, D. B. Continuous Culture of Rat C6 Glioma in Serum-free Medium. **The Journal of Cell Biology**. V. 87, p. 434-441; 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>>. Acesso em: 18/11/2015.

WU, N. L.; LEE, T. A.; TSAI, T. L.; LIN, W. W. TRAIL-induced keratinocyte differentiation requires caspase activation and p63 expression. **Journal of Investigative Dermatology**. V. 131, p. 874-883; 2011.

XIAO, X.; HE, H.; DING, X.; YANG, Q.; LIU, X.; LIU, S.; RANG, J.; WANG, T.; ZUO, M.; XIA, L. Purification and cloning of lectin that induce cell apoptosis from *Allium chinense*. **Phytomedicine**. V. 22, p. 238-244; 2015.

XU, S.; ZHU, X.; ZHANG, S.; YIN, S.; ZHOU, L.; CHEN, C.; GU, J. Over-expression of beta-1,4-galactosyltransferase I, II, and V in human astrocytoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. V. 127 (8), 502-506; 2001.

YAN, Y.; XU, Z.; DAI, S.; QIAN, L.; SUN, L.; GONG, Z. Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. V. 35, p. 23-37; 2016.

YANG, P.; LIANG, T.; ZHANG, C.; CAI, J.; ZHANG, W.; CHEN, B.; QIU, X.; YAO, K.; LI, G.; WANG, H.; JIANG, C.; YOU, G.; JIANG, T. Clinicopathological factors predictive of postoperative seizures in patients with gliomas. **Seizure**. V. 35, p. 93-99; 2016.

YANG, R. Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F. T. galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. V. 10, p. e17; 2008.

YATES, L. R.; CAMPBELL, P. J. Evolution of the cancer genome. **Nature Reviews Genetics**. V. 13, p. 795-806; 2012.

YAU, T.; DAN, X.; WING, C. C.; BUN, T. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. **Molecules**. V. 20, p. 3791-3810; 2015.

128 REFERÊNCIAS

YOU, C.; MARQUEZ-LAGO, T. T.; RICHTER, C. P.; WILMES, S.; MORAGA, I.; GARCIA, K. C.; LIER, A.; PIEHLER, J. Receptor dimer stabilization by hierarchical plasma membrane microcompartments regulates cytokine signaling. **Science Advances**. V. 2 (12):e1600452; 2016.

YU, S. C.- PING, Y. F.- YI, L.- ZHOU, Z. H.- CHEN, J. H.- YAO, X. H.- GAO, L.- WANG, J. M.- BIAN, X. W. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U8. **Cancer Letters**. V. 265, p. 124-134; 2008.

YU, S. P.; CHAI, D. W. Ions, cell volume, and apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 97, p. 9360-9362; 2000.

ZAIA, J. At last, functional glycomics. **Nature methods**. V. 8 (1), p. 55-57; 2011.

ZHAO, J.; LIU, Y. H.; REICHERT, P.; PFLANZ, S.; PRAMANIK, B. Glycosylation analysis of interleukin-23 receptor: elucidation of glycosylation sites and characterization of attached glycan structures. **Journal of Mass Spectrometry**. V. 45, p. 1416-1425; 2010.

ZHAO, Y. Y.; TAKAHASHI, M.; GU, J. G.; MIYOSHI, E.; MATSUMOTO, A.; KITAZUME, S.; TANIGUCHI, N. Functional roles of N-glycans in cells signaling and cell adhesion in cancer. **Cancer Science**. V. 99, p. 1304-1310, 2008.

ZHANG, H.; BEREZOV, A.; WANG, Q.; ZHANG, G.; DREBIN, J.; MURALLI, R.; GREENE, M. I. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. **Journal of Clinical Investigation**. V. 117, p. 2051-2058; 2007.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **Newa Physiology Sciences**. V. 19, p. 124-128; 2004.