

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Purificação e avaliação de novas lectinas como ferramenta no reconhecimento de epitopos celulares glicosilados, em células tumorais do cancro do cólon.**

**António Filipe Ribeiro Nunes**

Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

2014



Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Purificação e avaliação de novas lectinas como ferramenta no reconhecimento de epitopos celulares glicosilados, em células tumorais do cancro do cólon.**

**António Filipe Ribeiro Nunes**

**Dissertação de mestrado orientada pela Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Cristina Conceição Ribeiro (FFUL)**

Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

Lisboa, 2014

*“O essencial é invisível para os olhos.”*

De Saint-Exupéry, A. (1946). O Príncipezinho. 19.<sup>a</sup> Edição, 74.

Dedico este trabalho de dissertação aos meus progenitores, destacando a super mulher que generosamente cedeu o cromossoma X, pela luta estóica contra as adversidades da vida. Não é fácil tentar verter em palavras o reconhecimento que lhes é devido, pelo seu apoio incondicional ao longo de uma vida repleta de recordações e afectos.

Reverencio Armindo da Silva Rico (*In memoriam*) pela sua abnegação, dando tudo em troca de um inocente sorriso. O tempo é muito lento para os que esperam e muito rápido para os que têm medo, mas para os que amam, o tempo é eterno. Descanse em paz.

## Agradecimentos

---

Relativamente às inúmeras pessoas cuja ajuda foi preponderante em todo este trabalho, vêm-me à memória as palavras de Álvaro de Campos, quando dizia que “Citar é ser injusto. Enumerar é esquecer. Não quero esquecer ninguém de quem não me lembre”. Tenho para mim que, no quadro de um trabalho de investigação, os agradecimentos são sempre um espaço de injustiça, esquecendo ou não dando o devido destaque a todos quantos para ele contribuíram.

Tudo o que nesta dissertação se apresenta não é obra de um só. Possui o carimbo do conhecimento que me foi transmitido por diferentes pessoas, a sabedoria do *saber - fazer* que não se retira de livros ou artigos científicos. Por isso, vale a pena correr o risco dos condicionalismos da memória, para sublinhar, em primeiro lugar os contributos profundos e inestimáveis da Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Cristina Conceição Ribeiro, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, e do Prof. Doutor Ricardo Boavida Ferreira, do Instituto Superior de Agronomia, da Universidade de Lisboa, cujo trabalho de orientação e de co-orientação, respectivamente, serão certamente para mim uma referência e um exemplo nada fácil de seguir na vida, porque me possibilitou desbravar saberes numa área nos antípodas da minha formação académica. Para além da enorme admiração, não poderia deixar de reconhecer a confiança que a minha orientadora depositou em mim e o seu incentivo aliado às suas características humanas, principalmente nas alturas menos boas, de forma a tornar este trabalho bem mais aliciante e deixando evoluir em técnicas, para mim, totalmente desconhecidas.

Gostaria de destacar a disponibilidade e agradecer o precioso contributo prestado pela Doutora Ana Lima na orientação dos ensaios relativos à actividade tumoral, sem este auxílio não conseguiria obter resultados cruciais neste âmbito.

A concretização deste trabalho seria certamente bem mais difícil se não fosse o acolhimento e a disponibilidade demonstrada igualmente pelo corpo técnico e administrativo do Departamento de Recursos Naturais, Ambiente e Território, do Instituto Superior de Agronomia, a todos, sem excepção, o meu profundo agradecimento.

Numa nota mais intimista, gostaria de proferir as últimas palavras de profundo agradecimento para o Prof. Pedro Manuel da Costa Coimbra, por ter viabilizado o início do meu percurso no ciclo de estudos superiores, não podendo deixar de invocar uma profunda gratidão pelo seu gesto altruísta. *The last but not least*, para os meus amigos de toda a vida, um até já.

A todos aqueles que me desejaram êxito, o meu muito obrigado!

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.  
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”.*

Antoine de Saint-Exupéry



## Resumo

---

O conhecimento sobre o valor terapêutico das plantas sempre tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. Várias plantas endémicas da flora Portuguesa, têm sido estudadas pela sua riqueza e elevada constituição em compostos bioactivos, não só com actividade anticancerígena, como também, na prevenção da doença.

As lectinas são uns dos vários componentes extraídos das plantas e representam uma família de proteínas ubiquitárias, existentes na forma livre ou associadas às células, podendo ser encontradas na superfície ou no interior destas, exibem uma afinidade para hidratos de carbono, não apresentam actividade catalítica, nem são resultado de resposta imune. O estudo das lectinas justifica-se pela importância dos hidratos de carbono na identidade celular, promovendo mecanismos envolvidos na interacção entre células, assim como uma variedade de processos biológicos.

São pontos cruciais na investigação actual, a descoberta de novas lectinas, assim como o estudo da sua especificidade de ligação ao hidrato de carbono. Para o efeito, neste estudo foram seleccionadas quatro espécies endémicas da flora portuguesa, *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* e *Corema album*.

A caracterização do perfil polipeptídico das espécies em estudo, a actividade hemaglutinante dos extractos obtidos, frente a grupos sanguíneos humanos e eritrócitos de coelho, além da especificidade de ligação aos hidratos de carbono, associada à detecção de proteínas glicosiladas, revelou a existência de potenciais proteínas do tipo lectina nos quatro extractos proteicos.

A actividade antitumoral foi testada em linhas celulares tumorais humanas derivada de carcinoma do cólon (HT29). A incubação dos respectivos extractos com as membranas das células HT29, revelaram, por análise bidimensional (2D), ligação de péptidos com especificidade para epitopos glicosilados das membranas HT29. Esta ligação foi efectiva para as quatro espécies em estudo.

O potencial antitumoral dos quatro extractos demonstraram actividades distintas na inibição da invasão celular em células HT29, ficando patente uma forte capacidade de inibição apresentada pelas espécies *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Arbutus unedo*. Seguiu-se, para as duas espécies com maior poder de inibição da invasão celular, a avaliação da sua actividade inibitória para as metaloproteinases MMP9 e MMP2. Verificou-se uma inibição na produção destas enzimas, sendo um excelente prognóstico para a aplicação destas espécies na inibição da actividade tumoral.

**Palavras Chaves:** Lectinas; Cancro; Células HT29; Actividade Antitumoral; MMP9; MMP2; *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* e *Corema album*.



## Abstract

---

The knowledge about the therapeutic value of plants always has followed the evolution of man through the ages. Several endemic plants of Portuguese flora, have been studied for their wealth and high constitution in bioactive compounds with anticancer activity, but also in the prevention of the disease.

The lectins are some of the various components extracted from plants and represent a family of ubiquitous proteins, they exist in free form or associated to the cells, which can be found on the surface or inside of these, display an affinity for carbohydrates, do not exhibit catalytic activity, nor are they a result of immune response. The study of lectins is justified by the importance of carbohydrates in cell identity, promoting mechanisms involved in the interaction between cells, as well as a variety of biological processes.

Are crucial points in the current investigation, the discovery of new lectins, as well as the study of its specificity of carbohydrate binding. To that end, in this study were selected four endemic species of Portuguese flora, *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* and *Corema album*.

The polypeptide profile characterization of the species under study, the haemagglutinating activity of the extracts obtained against the human blood groups and rabbit erythrocytes, in addition to the binding specificity to carbohydrates, coupled with the detection of glycosylated proteins, revealed the existence of potential proteins of type lectin in the four protein extracts.

The antitumor activity was tested in human tumor cell lines derived from colon carcinoma (HT29). Incubation of extracts with HT29 cells membranes by two-dimensional (2D) analysis, revealed the binding of peptides with specificity for epitopes glycosylated HT29 membranes. This results was effective for the four species under study.

The potential antitumor of four distinct extracts demonstrated different activities on inhibition of cellular invasion on HT29 cells, getting a strong inhibition capacity by *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* and *Arbutus unedo* species. This was followed, for the two species with greater power of inhibition of cell invasion, the evaluation of its inhibitory activity for the Metalloproteinases MMP9 and MMP2. There has been an inhibition on the production of these enzymes, being an excellent prognosis for the application of these species in the inhibition of tumoral activity.

**Key Words:** Lectins; Cancer; HT29 Cells; Antitumor Activity; MMP9; MMP2; *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* and *Corema album*



# Índice Geral

---

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice Geral	xi
Índice de Figuras	xvii
Índice de Tabelas	xxi
Lista de Abreviaturas	xxiii

## Capítulo I – Introdução

1. Contextualização e estrutura da dissertação	1
2. Revisão bibliográfica	2
2.1. Lectinas	2
2.1.1. Lectinas. Historial	2
2.1.2. Etimologia e definição	4
2.1.3. Classificação das lectinas	5
2.1.3.1. Classificação com base nos centros de ligação ao hidrato de carbono	5
2.1.3.2. Classificação com base na especificidade de ligação ao hidrato de carbono	6
2.1.3.3. Classificação em famílias evolutivamente relacionadas	8
2.1.4. Funções biológicas das lectinas de plantas	9
2.1.5. Interacção lectina-hidrato de carbono	10
2.1.6. Aplicações biotecnológicas das lectinas	13
2.2. Cancro	14
2.2.1. Carcinoma Colo-rectal	17
2.2.1.1. Caracterização da aberração glicómica nas células cancerígenas do cancro colo-rectal	18

## Índice Geral

2.2.1.1.1 - Alterações na expressão e glicosilação das mucinas	18
2.2.1.1.1.1 - T e Tn antigénios	19
2.2.1.1.1.2. Alteração na expressão do ácido siálico - SLe <sup>x</sup> e SLe <sup>a</sup> antigénios	20
2.2.1.2. Matriz extracelular	21
2.2.1.2.1. Metaloproteínas de matriz	21
2.2.1.2.1.1. Gelatinases	22
2.2.1.3. Linha celular do cancro do cólon humano HT29	23
2.2.2. Terapia anti-tumoral	24
2.2.2.1. Actividade anti-tumoral das lectinas	24
2.2.2.2. Mecanismos de Acção Anti-tumoral	26
2.2.2.2.1. Apoptose celular	27
2.2.2.2.2. Autofagia celular	29
2.3. Novas Lectinas de Plantas	31
2.3.1. Espécies de plantas da flora Portuguesa alvo de estudo	32
2.3.1.1. <i>Juniperus Oxycedrus</i>	32
2.3.1.1.1. Distribuição e descrição botânica do <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	33
2.3.1.1.2. Distribuição e descrição botânica do <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i>	34
2.3.1.1.3. Compostos bioactivos	35
2.3.1.2. <i>Arbutus unedo</i>	35
2.3.1.2.1 Distribuição e descrição botânica	36
2.3.1.2.2 Compostos bioactivos	38
2.3.1.3. <i>Corema album</i>	38
2.3.1.3.1 Distribuição e descrição botânica	39
2.3.1.3.2 Compostos bioactivos	40
3. Objectivos do trabalho de dissertação	41

**Capítulo II – Caracterização do perfil polipeptídico de quatro espécies da flora endémica de Portugal, *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* e *Corema album***

1. Material e Métodos	43
1.1. Material biológico	43
1.1.1. Material biológico vegetal	43
1.1.2. Material biológico humano	43
1.2. Métodos	44
1.2.1. Análise do perfil polipéptidico	44
1.2.1.1. Obtenção dos extractos de proteínas totais de folhas	44
1.2.1.1.1. Método de extracção com tampão de Jacobs	44
1.2.1.1.2. Método de extracção com tampão contendo glicerol a 5% e triton a 1%	45
1.2.1.2. Determinação do teor proteico pelo Método de Bradford	46
1.2.1.3. Separação da proteína por electroforese	47
1.2.1.3.1. SDS-PAGE NR e SDS-PAGE R	48
1.2.1.4. Detecção de polipeptídeos em gel de poliacrilamida	49
1.2.1.4.1 Coloração pelo nitrato de prata	50
1.2.2. Determinação do carácter glicosídico dos extractos de proteína total	51
1.2.2.1. Imobilização de proteínas para glicodetecção em membrana de nitrocelulose	51
1.2.2.2. Detecção de glicoproteínas imobilizadas na membrana de nitrocelulose	52
1.2.3. Pesquisa de proteínas com actividade hemaglutinante	53
1.2.3.1. Determinação da actividade hemaglutinante	53
1.2.3.1.1. Sistema AB0 Humano	53
1.2.3.1.1.1. Preparação da suspensão de eritrócitos humanos	54
1.2.3.1.2. Preparação da suspensão de eritrócitos de coelho	54
1.2.3.1.3. Ensaio de hemaglutinação	55
1.2.3.2. Determinação da inibição da actividade hemaglutinante pelos hidratos de carbono	56

2. Resultados e Discussão	57
2.1. Análise do perfil polipeptídico do <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i> , <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i> , <i>Arbutus unedo</i> e <i>Corema album</i>	57
2.1.1. Extracção de proteínas totais de folhas	57
2.1.2. Determinação do teor proteico dos extractos	58
2.1.3. Estudo do perfil polipeptídico	59
2.1.3.1. Avaliação do registo polipeptídico dos extractos mediante SDS-PAGE	60
2.1.4. Determinação do carácter glicosídico dos extractos totais de proteínas	61
2.2. Pesquisa de proteína com actividade hemaglutinante e avaliação da inibição de actividade hemaglutinante pelos hidratos de carbono	63
2.2.1. Estudo das propriedades hemaglutinantes do extracto de proteína total das espécies em estudo em grupos sanguíneos humanos	63
2.2.1.1. Determinação da actividade hemaglutinante frente a grupos sanguíneos humanos	63
2.2.1.1.1. Grupo sanguíneo ARH+	64
2.2.1.1.2. Grupo sanguíneo ARH-	64
2.2.1.1.3. Grupo sanguíneo ORH+ e BRH-	65
2.2.1.2. Determinação da unidade hemaglutinante (U.H.)	67
2.2.1.3. Identificação dos hidratos de carbono inibidores da actividade hemaglutinante para os grupos ARH+ e ARH-	68
2.3.1. Determinação da actividade hemaglutinante frente a eritrócitos de coelho	71
<b>Capítulo III – Selecção dos polipéptidos/lectinas envolvidas no reconhecimento dos epitopos glicosilados em células tumorais HT29</b>	
1. Material e Métodos	73
1.1. Material biológico	73
1.1.1. Material biológico vegetal	73
1.1.2. Material biológico humano	74

## Índice Geral

1.2. Métodos	74
1.2.1. Linha celular HT29 de carcinoma do cólon humano	74
1.2.1.1. Cultura de células	74
1.2.1.2. Manutenção da viabilidade da cultura celular	75
1.2.1.3. Contagem celular	76
1.2.2. Isolamento da membrana das células HT29	77
1.2.3. Ligação de proteínas do tipo lectina à membrana das células HT29	77
1.2.3.1. Avaliação do Potencial de ligação de proteína do tipo lectina, à membrana das células HT29	78
1.2.3.1.1. Eluição sequencial das lectinas ligadas às membranas por diferentes hidratos de carbono	78
1.2.3.2. Avaliação da ligação de proteína do tipo lectina à membrana das células HT29	79
1.2.3.2.1. SDS-PAGE	80
1.2.3.2.2. Separação Bidimensional	80
1.2.3.2.2.1. Focagem Isoelectrica (1D - IEF)	80
1.2.3.2.2.2. Separação bidimensional (2D - IEF / SDS-PAGE R)	82
2. Resultados e Discussão	83
2.1. Avaliação da ligação por afinidade de proteínas do tipo lectina aos receptores glicosilados das membranas de células HT29	83
 <b>Capítulo IV – Avaliação da Actividade antitumoral em extractos de <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i> e <i>Arbutus unedo</i></b>	
1. Material e Métodos	91
1.1. Material biológico	91
1.1.1. Material biológico vegetal	91
1.1.2. Material biológico animal	91
1.2. Métodos	91
1.2.1. Ensaio de inibição da invasão celular em células HT29	91

## Índice Geral

1.2.2. Análise da actividade proteolítica	93
1.2.2.1. Actividade gelatinolítica por Zimografia	93
1.2.2.1.1. Separação electroforética	93
1.2.2.1.2. Detecção da actividade de gelatinase	94
2. Resultados e Discussão	95
2.1. Análise da inibição da invasão celular em células HT29	95
2.2. Análise por zimografia da actividade de proteolítica/gelatinolítica dos extractos de proteína total de <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i> e <i>Arbutus unedo</i>	97
2.2.1. Inibição da actividade gelatinolítica pelo extracto de proteína total de <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i> e <i>Arbutus unedo</i>	98
<b>Capítulo V – Conclusões Finais</b>	<b>103</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>109</b>

# Índice de Figuras

---

## Capítulo I – Introdução

I.1 - A perspectiva do cartoonista relativo aos benefícios associados ao uso de lectinas na separação das células.	5
I.2 - Representação 3D de uma célula	10
I.3 - Interação lectina com glicoconjugado presente na membrana celular	11
I.4 - Esquema da síntese dos antigénios T e Tn	20
I.5 - Esquema da síntese do antigénios SLe <sup>a</sup> e SLe <sup>x</sup> e das cadeias tipo 1 e 2	20
I.6 - Estrutura básica dos domínios das MMP2 e MMP9	22
I.7 - Linha celular de adenocarcinoma de cólon humano (HT29)	23
I.8 - Ilustração representativa das vias intrínseca e extrínseca da apoptose	28
I.9 - Mecanismos de acção das lectinas de planta	30
I.10 - <i>Juniperus oxycedrus</i>	32
I.11 - Distribuição do <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i> no território de Portugal Continental	33
I.12 - Representação esquemática da morfologia, folha, gábulos e semente do <i>Juniperus oxycedrus</i> Subsp. <i>badia</i>	34
I.13 - <i>Arbutus unedo</i>	35
I.14 - Distribuição do <i>Arbutus unedo</i> no território de Portugal Continental	36
I.15 - Representação esquemática da morfologia, flores e fruto do <i>Arbutus unedo</i>	37
I.16 - <i>Corema album</i>	39
I.17 - Distribuição da <i>Corema album</i> no território de Portugal Continental	39
I.18 - Representação esquemática da morfologia, flores e frutos da <i>Corema album</i>	40

## Capítulo II – Caracterização do perfil polipeptídico de quatro espécies da flora endémica de Portugal

II.1 - Padrões dos depósitos dos eritrócitos	56
II.2 - Padrão utilizado no método de Bradford	59

## Índice de Figuras

II.3 - Perfil polipeptídico dos extractos proteicos de folhas das espécies <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i> , <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>Badia</i> , <i>Arbutus unedo</i> e <i>Corema album</i> , após coloração pelo AgNO <sub>3</sub>	61
II.4 - Transferência polipeptídica dos extractos proteicos de folhas das espécies <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i> (Joox), <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i> (Joba), <i>Arbutus unedo</i> (Aun) e <i>Corema album</i> (Cal)	62
II.5 - Avaliação da actividade hemaglutinante dos extractos proteicos totais de folha de <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i> (Joox) e <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i> (Joba) em solução eritrocitária a 4 % (v/v) do grupo sanguíneo ARH+	64
II.6 - Avaliação da actividade hemaglutinante dos extractos proteicos totais de folha de <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i> , <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i> , <i>Arbutus unedo</i> e <i>Corema album</i> em solução eritrocitária a 4 % (v/v) do grupo sanguíneo ARH-	65
II.7 - Avaliação da actividade hemaglutinante dos extractos proteicos totais de folha de <i>Juniperus oxycedrus oxycedrus</i> (Joox), <i>Juniperus oxycedrus badia</i> (Joba), <i>Arbutus unedo</i> (Aun) e <i>Corema album</i> (Cal) em soluções eritrocitárias a 4 % (v/v) do grupo sanguíneo ORH+ e BRH-	66
II.8 - Ensaio de inibição da actividade hemaglutinante dos extractos de proteína total de <i>Juniperus oxycedrus</i> Subsp. <i>oxycedrus</i> e <i>Juniperus oxycedrus</i> Subsp. <i>badia</i> , pelos hidratos de carbono, frente a solução eritrocitária do grupo sanguíneo ARH+	69
II.9 - Ensaio de inibição da actividade hemaglutinante dos extarctos de proteína total de <i>Juniperus oxycedrus badia</i> , pelos hidratos de carbono, em solução eritrocitária do grupo sanguíneo ARH-	70
II.10 - Avaliação da actividade hemaglutinante dos extractos proteicos totais de folha de <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i> (Joba) e <i>Arbutus unedo</i> (Aun) em solução eritrocitária de coelho a 4% (v/v)	71
<b>Capítulo III – Selecção dos polipéptidos/lectinas envolvidas no reconhecimento dos epitopos glicosilados em células tumorais HT29</b>	
III.1 - Curva de calibração de BSA	83
III.2 - Perfil proteómico de membrana das células HT29	84
III.3 - Análise bidimensional da membrana após incubação	86
III.4 - Análise da ligação de proteína do tipo lectina de <i>Corema album</i> às membranas das células HT29 após Incubação e eluição pelos hidratos de carbono por SDS-PAGE R	87
III.5 - Análise bidimensional de proteínas do tipo lectinas ligadas a membrana de células HT-29	89

**Capítulo IV – Avaliação da Actividade antitumoral em extractos de *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Arbutus unedo***

IV.1 - Esquema representativo do “wound assay“	92
IV.2 – Registo fotográfico do ensaio de invasão celular com células HT29	96
IV.3 - Percentagem de invasão celular do corte após 48 horas de exposição	97
IV.4 - Actividade gelatinolítica dos extractos totais de folhas de <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i> e <i>Arbutus unedo</i> realizados em gel SDS-PAGE NR.	99
IV.5 – Actividade gelatinolítica da MMP2 e MMP9, após incubação com os os extractos proteicos das espécies <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i> e <i>Arbutus unedo</i>	100



# Índice de Tabelas

---

## Capítulo I – Introdução

I.1 - Classificação das lectinas de plantas baseada na filogenia	8
I.2 - Função biológica das lectinas com actividade externa.	10
I.3 - Aplicação das lectinas de plantas como ferramenta nas ciências da vida.	14
I.4 - Etapas da carcinogénese e proteínas relacionadas em cada etapa.	17
I.5 - Comparação das alterações morfológicas dos diferentes tipos de morte celular.	26

## Capítulo II – Caracterização do perfil polipeptídico de quatro espécies da flora endémica de Portugal

II.1 – Teor proteico dos extractos em estudo	59
II.2 - Detecção da actividade de hemaglutinação em grupos sanguíneos humanos	67
II.3 - Avaliação da actividade de hemaglutinação em grupos sanguíneos humanos pela determinação da unidade hemaglutinante	68
II.4 - Resultados dos ensaios de inibição da actividade hemaglutinate pelos hidratos de carbono	71

## Capítulo III – Selecção dos polipéptidos/lectinas envolvidas no reconhecimento dos epitopos glicosilados em células tumorais HT29

III.1 - Valores representativos dos pesos moleculares e dos respectivos pontos isoeléctricos das membranas das células HT29, de acordo com a análise da figura III.2	85
--	----

## Capítulo IV – Avaliação da Actividade antitumoral em extractos de *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Arbutus unedo*

IV.1 – Algumas características moleculares das MMP2 e MMP9	98
--	----



## Lista de Abreviaturas

---

Abs	Absorvância
ACA	<i>Amaranthus caudatus agglutinin</i>
Ag	Antigénio
Aun	<i>Arbutus unedo</i>
BAX	Gene que codifica para a proteína pro-apoptótica Bax, da família Bcl-2
Bax	do inglês, <i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL-2	Gene que codifica para a proteína anti-apoptótica Bcl-2, da família Bcl-2
Bcl-2	do inglês, <i>B-cell lymphoma protein 2</i>
bisacrilamida	<i>N',N' – metilenobisacrilamida</i>
BSA	Albumina do Soro Bovino, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
Cal	<i>Corema album</i>
Caspase	Protease de cisteína, do inglês <i>Cysteine-aspartic protease</i>
CBB G250	Coomassie Brilliant Bleu G250
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Con A	<i>Concanavalina A</i>
CRD	Domínio de Reconhecimento, do inglês <i>Carbohydrate-Recognition Domain</i>
Da; kDa	Dalton (Unidade de medida de massa, correspondente à massa do átomo de hidrogénio); QuiloDalton (10 <sup>3</sup> Da)
DTT	<i>Ditiotreitol</i>
DMSO	Sulfóxido de dimetilo, do inglês <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético, do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FBS	Soro Fetal Bovino, do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>
HeLa	Linha celular humana do adenocarcinoma cervical
HEPES	Ácido <i>N</i> -2-hidroxietil-piperazina- <i>N'</i> -2-etanossulfónico
HT29	Linha celular humana do adenocarcinoma do cólon

## Lista de Abreviaturas

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
Joba	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i>
Joox	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>
MMP	Metaloproteinase de Matriz
MEC	Matriz extracelular
MLs	<i>Mistletoe</i> Lectins
NaCl	Cloreto de sódio
p53	Proteína supressora tumoral p53
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida, do inglês <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PBS	Tampão de Fosfato Salino, do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCL	<i>Polygonatum cirtonema</i> lectin
pH	Potencial de Hidrogénio Iónico (Escala Sorensen)
PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>
RCA	<i>Ricinus communis</i> agglutinin
Rh	<i>Rhesus</i>
RIP tipo II	Ribossoma tipo II
RPMI	<i>Roswell park memorial institute</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil sulfato de sódio
TAE	Tampão Tris-Acetado-EDTA
TBA	Ácido tiobarbitúrico, do inglês <i>thiobarbituric acid</i>
TBST	Solução salina tamponada com Tris acrescida de Tween 20
TCA	Ácido tricloroacético, do inglês <i>trichloroacetic acid</i>

## Lista de Abreviaturas

TEMED	<i>N,N,N',N'</i> - tetrametiletenodianaíma
TNF	Factor de necrose tumoral, do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TP53	Gene supressor de tumores que codifica a proteína p53
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano (2-Amino-2-hidroxymethyl-propane-1,3-diol)
TRIS-HCl	<i>Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride</i>
Tween	Monolaurato de polioxilenossorbitano
U.H.	Unidade Hemaglutinante
VEGF	Factor de crescimento vascular endotelial, do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Vero	African Green Monkey Kidney
WGA	<i>Wheat Germ</i> Agglutinin

## Lista de símbolos

A; mA	Ampere; Miliampere ( $10^{-3}$ A)
g; mg; $\mu$ g	Gramas; miligrama ( $10^{-3}$ g); micrograma ( $10^{-6}$ g)
H; min; s	Horas; minutos; segundos
L; mL; $\mu$ L	Litro; mililitro ( $10^{-3}$ L); microlitro ( $10^{-6}$ L)
Log	Logaritmo
m/v	Massa/Volume
M; mM; $\mu$ M	Molar (mol/L); milimolar ( $10^{-3}$ M); micromolar ( $10^{-6}$ M)
v/v	Volume/Volume
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem

### 1. Contextualização e estrutura da dissertação

Os componentes bioactivos, principalmente derivados de plantas, são dos compostos mais pesquisados e estudados. A medicina natural tem sido utilizada para o tratamento de diversas patologias, sendo os extractos de plantas, desde há muito tempo, considerados como uma importante fonte de novos fármacos. Como resultado, muitos compostos utilizados na medicina moderna actual são extraídos de plantas. As Lectinas são uns dos vários componentes extraídos das plantas e representam proteínas sem função catalítica e origem não imunológica que se ligam especificamente aos hidratos de carbono. As lectinas têm mostrado um elevado interesse da comunidade científica desde que foi reportado serem um potencial agente anticancerígeno. As lectinas têm sido testadas no tratamento e diagnóstico do cancro. Neste contexto urge valorizar o património endémico vegetal, com a sustentação dos vários compostos derivados de plantas com fins medicinais.

O âmago do presente trabalho conducente à dissertação de natureza científica, assenta na recolha de informação de índole científica, relevante e possível, sobre o tema proposto, intitulado *“Purificação e avaliação de novas lectinas como ferramentas no reconhecimento de epítomos celulares glicosilados, em células tumorais do cancro do cólon”*. Em complemento da vertente expositiva do trabalho, desenvolveu-se uma análise metodológica e técnica, abordando aspectos bioquímicos e funcionais das lectinas (suportada pela proteómica versus glicómica), com ênfase na caracterização molecular e na aplicação biotecnológica destas proteínas, através do conhecimento da especificidade das interacções proteína-hidrato de carbono. O conhecimento actual ajuda a esclarecer o papel fisiológico das lectinas, os mecanismos internos de protecção e a acção tóxica sobre células cancerígenas, bem como, permite o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico.

A dissertação está dividida em 5 capítulos. No capítulo I revêem-se os conhecimentos actuais sobre as principais matérias deste trabalho. No capítulo II, III e IV encontram-se descritas as metodologias utilizadas na execução do trabalho experimental, bem como, os resultados obtidos durante a execução do trabalho de dissertação, discutindo-se as suas implicações à luz dos conhecimentos actuais. Por último, no capítulo V são apresentadas as principais conclusões deste trabalho e indicadas algumas sugestões de perspectivas futuras, enquadradas no âmbito do presente trabalho.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Lectinas

As proteínas têm a seu cargo, uma variedade surpreendente de funções essenciais ao organismo humano. São responsáveis por funções dinâmicas como a catálise de transformações químicas, transporte de oxigénio e nutrientes, controlo metabólico e contracção muscular (Jones & Thornton, 1996). São as proteínas que fornecem os blocos básicos que permitem aos tecidos transmitirem mensagens, repararem danos e desencadearem reacções que são essenciais à vida.

As lectinas são proteínas ubiquitárias na natureza, estando presente em todas as classes de seres vivos, exibem uma afinidade por hidratos de carbono e um potencial para codificar informações biológicas. As mensagens codificadas nas estruturas dos hidratos de carbono complexos podem ser decifradas através de domínios de reconhecimento (epítomos).

O estudo das lectinas justifica-se pela importância dos hidratos de carbono nos processos bioquímicos, na medida em que elucida os mecanismos envolvidos na interacção entre células, participando numa variedade de processos biológicos.

#### 2.1.1. Lectinas. Historial

Até à primeira metade do século XX, as lectinas eram designadas por “hemagglutinins” ou mais comum por “phytohemagglutinins”. No ano de 1898, Elfstrand propôs o termo “hemagglutinins” para proteínas vegetais, como a ricina, caracterizada pela actividade hemaglutinante que manifestava, obtendo-se a primeira aglutinação de eritrócitos por extractos de plantas em 1888, por Stillmark, com uma fracção proteica de *Ricinus communis* (Stillmark, 1888; Olsnes & Kozlov, 2001). As denominações anteriores ao termo Lectina, foram introduzidas, antes do mecanismo causador da hemaglutinação, visível macroscopicamente, ser interpretado ao nível molecular. Apenas em 1952, Watkins e Morgan demonstraram que esta propriedade estava fundamentada na actividade específica da ligação de uma lectina a um hidrato de carbono (Watkins & Morgan, 1952; Van Damme *et al.*, 1998). O estudo de Watkins e Morgan foi antecedido por relatos registados, desde 1936, com a Concanavalina A (Con A), cuja aglutinação desenvolvida por estas moléculas poderia ser inibida por hidratos de carbono específicos (Zatta & Cummings, 1992). Em 1908, Landsteiner e Raubitschek observaram que um mesmo extracto de planta apresentava diferentes propriedades de aglutinação com células sanguíneas de animais diferentes. A Con A foi a primeira aglutinina de planta obtida na forma pura a partir de sementes de

*Canavalia ensiformis*. Sumner e Howell (1936) demonstraram que além de aglutinar células, a Con A precipitava glicogénio e amido a partir de solução e que sua actividade hemaglutinante podia ser inibida pelo açúcar de cana (*Saccharum officinarum*), sugerindo que a aglutinação se dava através de uma reacção da proteína com hidratos de carbono presentes na superfície dos eritrócitos (Sumner & Howell, 1936; Lis & Sharon, 1981). Em 1945, William Boyd relatou que extractos salinos de *Phaseolus lunatos* ou *Phaseolus limensis* aglutinavam apenas eritrócitos humanos do tipo A e não os tipos B ou 0 (Boyd & Reguerd, 1949). Em 1950, estudos com lectinas específicas para tipo sanguíneo, mostraram que a actividade hemaglutinante específica para eritrócitos humanos do tipo A, B e 0 foi inibida por  $\alpha$ -N-acetil-galactosamina,  $\alpha$ -galactose e  $\alpha$ -L-fucose, respectivamente (Sharon & Lis, 1972; Kennedy *et al.*, 1995).

Desde a caracterização das primeiras lectinas até à proposta de Boyd e Sharpleigh, houve fundamentalmente duas alterações paradigmáticas, com o relato das primeiras lectinas não tóxicas no início do século XX, como as de *Pisum sativum* e *Lens culinaris*, sendo afastado o pensamento que estabelecia uma relação de que a toxicidade era uma propriedade deste tipo de proteína, e ainda o abandono da conjectura que estas proteínas eram exclusivas do reino vegetal.

Na década de 70 do século XX, o conceito de Lectina passou a ser aplicado às proteínas não imunes com capacidade de complexarem hidratos de carbono específicos. Alguns investigadores defendiam que a expressão “de origem não imune” não poderia ser utilizada, pelo facto, da possível função destas proteínas em animais e plantas envolver mecanismos de defesa imunológica contra antigénios de forma directa ou indirecta, porém, as lectinas não se assemelhavam estruturalmente a anticorpos, embora muitas imunoglobulinas se liguem a hidratos de carbono (Bird & Roy, 1980).

No início da década de 80, a maior preocupação com esta família de proteínas foi a de destacar a ausência de actividade enzimática. Goldstein, no ano de 1980, alvitrou uma definição para Lectinas, adoptada em 1981 pelo Comité de Nomenclatura da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), determinando que as lectinas são proteínas de origem não imunitária, ligantes de hidratos de carbono ou glicoproteínas, com competência de aglutinarem células e/ou precipitarem glicoconjugados (Van Damme *et al.*, 1998). Na obstante, esta definição, foi desde do início, sujeita a inúmeras críticas, pelo facto da função das lectinas no organismo vivo ser muito diversificada. Desta forma, o conceito é frágil e caracteriza-se apenas como uma definição que está alicerçada em ensaios de actividade biológico *in vitro*, demonstrando um perfil puramente prático, não avaliando estruturalmente os compostos que se propõe definir (Kocourek & Horejsi, 1981). Diversos conceitos foram sugeridos e, na metade da década de 90 do século XX, Peumans e Van

Damme estabeleceram uma definição para Lectinas, onde destacam-se questões estruturais de origem não imune, ao citarem a necessidade de um sítio não catalítico de interacção com o hidrato de carbono na molécula proteica e que, além deste, a mesma molécula poderia comportar outro tipo de sítios de natureza catalítica (Peumans & Van Damme, 1995).

Com o avanço do conhecimento, a definição de Lectina foi aperfeiçoada, sobressaindo aspectos da sua actividade em sistemas biológicos, sendo as únicas proteínas capazes de reconhecerem e de ligarem-se reversivelmente a hidratos de carbono ou glicoconjugados. Deve ser observado a particularidade das lectinas distinguirem-se de enzimas, como as glicosidases, as glucanases e as quitinases, porque não modificam a estrutura do hidrato de carbono ao qual se ligam, o que ocorre em processos enzimáticos. Também deve ser observado que, a origem não imune das lectinas as distinguem de anticorpos, os quais possuem hidratos de carbono como antígenos, agindo como aglutininas (Cummings, 1997; Singh *et al.*, 1999; Loris, 2002).

### **2.1.2. Etimologia e definição**

O termo lectina, do latim *legere*, foi proposto por Boyd e Sharpleigh em 1954, enfatizando a propriedade de algumas proteínas aglutinarem selectivamente distintos tipos de células, uma vez que o termo significa seleccionar (Zatta & Cummings, 1992; Van Damme *et al.*, 1998).

Em 1995, Peumans e Van Damme definiram lectinas como proteínas que possuem pelo menos um domínio não-catalítico, que se ligam especificamente e reversivelmente a mono ou oligossacáridos. A interacção entre hidratos de carbono e lectinas é obtida através de pontes de hidrogénio, coordenação metálica, interacção de Van der Waals e hidrofóbicas (Elgavish & Shaanan, 1997).

As lectinas consistem numa família de proteínas de origem não imunológica, de distribuição ubíqua na natureza e que reconhecem hidratos de carbono livres ou ligados a superfícies celulares através de centros de ligação nos quais a hidrofobicidade é a principal força de interacção (Goldstein *et al.*, 1980; Kennedy *et al.*, 1995; Peumans & Van Damme, 1995; Correia *et al.*, 2008). Têm capacidade de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados devido à sua capacidade específica de reconhecimento e ligação sem alterar a estrutura de nenhum ligando (Liener *et al.*, 1986).

As lectinas existem na forma livre ou associadas às células, podendo ser encontradas na superfície ou no interior destas e não apresentam actividade catalítica, nem são resultado de resposta imune. As lectinas são encontradas entre animais, plantas e microrganismos e a

ampla ocorrência das mesmas em diferentes espécies, tecidos ou células mostra a importância destas moléculas na natureza (Lis & Sharon, 1998).

Em princípio, qualquer população de células, seja de animais, plantas, ou de microrganismos, pode ser classificada em subpopulações com a ajuda de lectinas, desde que diferenciem-se pelos Hidratos de Carbono da membrana plasmática da célula, ilustrado na figura I.1 (Sharon, 1983)



**Figura I.1** - A perspectiva do cartoonista relativo aos benefícios associados ao uso de lectinas na separação das células. Cortesia Boehringer Mannheim.

### **2.1.3. Classificação das lectinas de plantas**

Estudos recentes, utilizando tecnologia de última geração, proporcionaram a identificação, isolamento e caracterização bioquímica de inúmeras proteínas classificadas como lectinas. As lectinas possuem algumas propriedades moleculares comuns, são estruturalmente compostas por 2 ou 4 subunidades, muitas são metaloproteínas e, de um modo geral, são glicosiladas (Sharon & Lis, 1990). Devido a uma grande variedade, a classificação das lectinas em famílias é um grande desafio para a comunidade científica. A mesma continua a evoluir, não tendo sido, ainda possível, chegar a um consenso.

#### **2.1.3.1. Classificação com base nos centros de ligação ao hidrato de carbono**

Baseado na estrutura global, nos centros de reconhecimento do Hidrato de carbono (CRDs), propriedades de aglutinação e precipitação, as lectinas de plantas são classificadas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Peumans & Van Dame, 1998).

As **merolectinas** possuem apenas **um centro de ligação** ao hidrato de carbono. Devido à sua natureza monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células, sendo um exemplo deste grupo a proteína que se liga à quitina, obtida do latex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) (Parijs *et al.*, 1991)

As **hololectinas** contêm pelo menos **dois centros de ligação** aos hidratos de carbono, idênticos ou muito similares. Devido à sua natureza bi ou multivalente aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas pertence ao grupo das hololectinas (Peumans &, Van Damme, 1995).

As **quimerolectinas** são proteínas que possuem **um ou mais centros de ligação** aos hidratos de carbono e outro centro com actividade catalítica (ou outra actividade biológica) que funciona independentemente daquele que liga aos Hidratos de carbono. Dependendo do número de centros para hidratos de carbono, as quimerolectinas agem como merolectinas ou hololectinas. Como exemplos de quimerolectinas existem as proteínas que inactivam ribossomas tipo 2 (Peumans & Van Damme, 1995).

As **superlectinas** possuem pelo menos **dois centros de ligação para hidratos de carbono diferentes**. Um exemplo de superlectina é a lectina do bolbo de tulipa, a qual possui dois centros de ligação a hidratos de carbono, sendo um específico para manose e outro para *N*-acetilgalactosamina (Peumans & Van Damme, 1998).

### 2.1.3.2. Classificação com base na especificidade de ligação ao hidrato de carbono

Inicialmente, as lectinas foram classificadas com base na especificidade para diferentes grupos sanguíneos provocando hemaglutinação e, subsequentemente, pelo poder com que um monossacárido poderia inibir a sua actividade aglutinante ou de precipitação de um glicoconjugado. A estrutura do hidrato de carbono é de importância fundamental no estabelecimento da ligação entre este e a proteína.

A especificidade a nível de monossacáridos parece dever-se a domínios de ligação conservados na lectina e, que se distribuem por vários “loops”. Ao nível dos loops, local de ligação ao hidrato de carbono, o comprimento da cadeia polipeptídica envolvida na ligação, tem bastante influência. Os catiões bivalentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  e os iões metálicos de transição, estão extremamente conservados ao nível do loop, assim como, o resíduo de aminoácido de asparagina. Também moléculas de água na interacção lectina – hidrato de carbono têm uma importância crucial, situando-se em posições definidas no centro de ligação. Muitos dos grupos polares do hidrato de carbono ligado à lectina, grupos hidroxilo e átomos de oxigénio do anel glucídico, participam na formação de ligações de hidrogénio com grupos carbonilo e amida do esqueleto central da cadeia polipeptídica. Apesar de os

hidratos de carbono serem moléculas altamente polares, a disposição espacial dos grupos hidroxilo deixa zonas hidrofóbicas na superfície dos hidratos de carbono, as quais contribuem para a afinidade e para a especificidade da lectina para o hidrato de carbono, através de interações não-polares, forças de Van der Waals (Toone, 1994).

As lectinas, principalmente as de plantas superiores, são classificadas de acordo com a estrutura geral e suas especificidades por hidratos de carbono (monossacáridos, oligossacáridos e derivados). A especificidade que as lectinas apresentam por hidratos de carbono é uma das características utilizadas para classificar as lectinas de plantas. Makela, no ano de 1957, apresentou uma classificação segundo a afinidade por oses. Goldstein e Poretz, no ano de 1986, ampliaram esta classificação e, Van Damme *et al.* (1998) propuseram uma classificação mais abrangente com seis grupos de lectinas de plantas:

(Grupo I) **Lectinas glucose/manose**

São o segundo grupo mais representativo. Neste tipo de lectinas, as interações com os monossacáridos envolvem ligações de hidrogénio com resíduos conservados (um aspartato (Asp208), no caso de Con A, e uma asparagina (Asn14), que interage directamente com o cálcio e com o grupo NH do resíduo Arg208). As interações Van der Waals são, também, essenciais na interacção com os resíduos aromáticos e o anel dos glícidos. O exemplo mais paradigmático deste grupo é a Con A.

(Grupo II) **Lectinas galactose/N-acetil-galactosamina**

São o grupo a que pertence a maioria das lectinas. São lectinas que têm em comum, no centro de ligação primário ao hidrato de carbono, um “loop” D com um comprimento superior ao existente na manose, glucose ou L-fucose.

(Grupo III) **Lectinas N-acetilglucosamina**

São poucas as lectinas que pertencem a este grupo; A BPA (*Bauhinia purpúrea aglutinina*), lectina da *Bauhinia purpúrea*, entre outros açúcares complexos, tem especificidade para  $\beta$ -gal-3-4-GlcNac (Wu *et al.*, 2004).

(Grupo IV) **Lectinas L-fucose**

Constituem um grupo muito reduzido. Nestas lectinas, apesar de existirem diferenças na sequência do “loop” D, a sua dimensão permanece conservada (Sharma & Surolia, 1997).

(Grupo V) **Lectinas ácido siálico (Ácido N-acetilneuraminico)**

São um número muito reduzido as que têm especificidade para este hidrato de carbono. Kim *et al.* (2004) relatam a purificação de uma lectina de uma leguminosa, *Maackia fauriei*, designada por MFA (*M. fauriei* aglutinina).

(Grupo VI) **Lectinas específicas de oligossacáridos e polissacáridos complexos**

São poucas as lectinas descritas que reagem unicamente com oligossacáridos. A VL2, VL3 e VL4 são isolectinas da *Acácia constricta* (Guzmán-Partida *et al.*, 2004), que não têm especificidade serológica para o sistema AB0, nem para hidratos de carbono simples, mas que são inibidos por hidratos de carbono complexos da fetuina e da tiroglobulina.

**2.1.3.3. Classificação em famílias evolutivamente relacionadas**

Diversas tentativas foram feitas para consolidar uma classificação entre as lectinas de plantas. O uso de classificação relacionadas com a especificidade por hidratos de carbono, auxiliou aqueles que trabalhavam com lectinas como ferramentas biológicas, mas dificultou os estudos entre a relação evolutiva das mesmas. O rápido progresso das análises proteômicas e a clonagem molecular têm revelado a sequência detalhada de lectinas vegetais. A análise destas sequências permitiu a distinção de doze famílias de acordo com suas especificidades a hidratos de carbono de acordo com a tabela I.1. (Van Damme *et al.*, 2008).

**Tabela I.1** - Classificação das lectinas de plantas baseada na filogenia.

Família	Lectina Representativa	Abreviat.	Especificidade
Domínio aglutinina <i>Agaricus bisporus</i>	<i>Agaricus bisporus</i> aglutinina	ABA	Galactose
Amarantinas	<i>Amaranthus caudatus</i> aglutinina	ACA	N-acetyl-D-glucosamina
Classe V ligantes de quitina	Aglutininas relacionadas com quitina	CRA	N-glicanos do tipo elevada-manose
Domínio Cianovirina	Cianovirina-N	CV-N	Manose
Domínio Aglutinina <i>Euonymus europaeus</i> (EEA)	Aglutinina <i>Euonymus europaeus</i>	EEA	Manose / Galactose
Domínio Aglutinina <i>Galanthus nivalis</i> (GNA)	Lectina <i>Polygonatum cyrtonema</i>	PCL	Manose / Acido siálico
Domínio de heveina	<i>Wheat germ</i> aglutinina	WGA	N-acetyl-D-glucosamina
Domínio Jacalina	Jacalina	JAC	Manose
Lectinas Leguminosas	Concanavalina A	Con A	Manose
Domínio Lisina			
Domínio Aglutinina <i>Nicotiana Tabacum</i>	<i>Cucurbitaceae phloem</i>	CPL	
Domínio Ricina-B	<i>European mistletoe</i>	ML-1	β-galactose

(Adaptado de Fu *et al.*, 2011)

#### 2.1.4. Funções biológicas das lectinas de plantas

As lectinas são normalmente encontradas em plantas, microrganismos e animais, estando envolvidas em numerosos processos celulares (Elgavish & Shaanan 1997; Hong *et al.*, 2001; Kawagishi *et al.*, 2001). As lectinas actuam como mediadores no reconhecimento celular numa vasta linha de sistemas biológicos (Katink-Prastowska, 1999). Desta forma, as diversas actividades biológicas das lectinas têm favorecido a utilização dessas proteínas em variadas funções como activação de respostas celulares específicas, relevantes na imunidade relativa aos fenómenos próprios da interacção do agente patogénico com o hospedeiro (Eichinger, 2001), como agentes de indução mitogénica e aglutinantes celulares (Kabir, 1998), na determinação de grupos sanguíneos humanos (Cummings, 1997), como citotoxinas na terapia do cancro (Thrush *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000), no reconhecimento célula-célula (Sharon & Lis, 1989; Sames *et al.*, 2001), na inibição do crescimento do número de células tumorais (Abdullaev & De Mejia, 1997; Rolim *et al.*, 2001) e na indução de apoptose (Costa-Barbosa, 1997).

As lectinas de plantas são abundantes em raízes, frutos, flores, cascas, folhas e sementes. Diferentes funções têm sido associadas às lectinas de planta, incluindo transporte de hidratos de carbono, mobilização de proteínas armazenadas (Ratanapo *et al.*, 2001), alongamento da parede celular, interacções entre plantas e microrganismos, defesa contra o ataque de fungos, vírus, bactérias e insectos (Liener *et al.*, 1986; Rudiger, 1998).

Para se entender as possíveis funções que as lectinas podem desempenhar, convém lembrar que as lectinas poderão manifestar a sua actividade, quer a nível externo, quer interno. Estas proteínas ligam-se a ligandos de diferentes fontes, como as animais, fúngicas e bacterianas, e por outro lado, poderão interactuar com ligandos da própria planta. Num sentido mais lato, a discussão sobre as funções das lectinas implica na capacidade de agir como moléculas de reconhecimento no interior das células, na superfície da célula e em fluidos fisiológicos (Sharon & Lis, 2004). Não existe, um papel tipo de função biológica desempenhada por este tipo de proteína. Cada lectina é um exemplo, podendo inclusivé, uma lectina particular ter diferentes funções, dependendo da sua ocorrência temporal e espacial, no ciclo de vida da planta.

Nos papéis biológicos detectáveis nas lectinas de plantas, podemos destacar a sua acção fungicida, antimicrobiana e insecticida (Freire, 2003), ilustrado na tabela I.2.

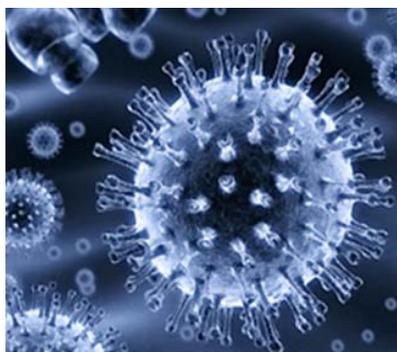
**Tabela I.2 - Função biológica das lectinas com actividade externa.**

Função Biológica	Referências
Protecção contra insectos	A GNA, lectina da monocotiledónea <i>Galanthus nivalis</i> , manose especifica, afecta afídeos (Down <i>et al.</i> , 1999), traças (Gatehouse <i>et al.</i> , 1997) e gafanhotos (Tinjuangui <i>et al.</i> , 2000).
Protecção contra fungos	Dum modo geral as lectinas ligam-se aos constituintes da parede celular do fungo, interferindo no seu crescimento.
Acção sobre bactérias	Algumas plantas, em particular as leguminosas, têm a capacidade de estabelecer simbiose com bactérias do solo do género <i>Rhizobium</i> , que permite fixar o azoto atmosférico.
Protecção contra predadores	Quando ingeridas por insectos e herbívoros ligam-se a receptores glicosilados ao longo do tracto intestinal provocando desconforto, repelindo assim o predador, produzindo um efeito antinutricional.
Efeito das lectinas no Homem	A ingestão de ricina, uma lectina RIP tipo 2 (proteína inactivadora do ribossoma), provoca morte após a ingestão. No que concerne a efeitos agudos, a PHA, fitohemaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i> , altera a permeabilidade da membrana intestinal provocando náuseas, vómitos e diarreias. Relativamente a efeitos crónicos, a PHA actua como mitogénio das células da cripta da vili, causando hiperplasia e hipertrofia do intestino delgado.

(adaptado Ribeiro, 2008)

### 2.1.5. Interação lectina-hidrato de carbono

Ao longo de muitas décadas os hidratos de carbono foram percebidos apenas como moléculas envolvidas em processos de ganhos de energia, na forma de mono ou polissacáridos, ou, ainda, como material estrutural, como a celulose nas plantas e a quitina dos exoesqueletos dos insectos. O interesse pelo estudo dos hidratos de carbono como moléculas de reconhecimento celular só surgiu por volta de 1968 (Sharon & Lis, 1993).

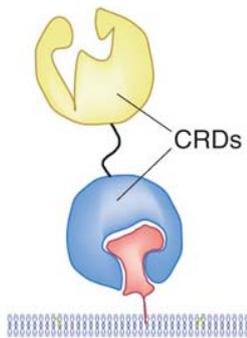


**Figura I.2 - Representação 3D de uma célula.**  
(<http://citologia.webnode.com>)

Como uma extensão da hipótese chave-fechadura, formulada por Emil Fischer em 1897, os bioquímicos geralmente aceitam que as células se reconhecem por meio de pares de estruturas complementares, presentes nas suas superfícies (Sharon & Lis, 1993; Karlsson, 1998). A diversidade química proporcionada pelos hidratos de carbono, resultado das diferentes formas como podem combinar entre si e com outras moléculas é biologicamente muito significativa (Sharon & Lis, 1989). Assim, os hidratos de carbono presentes na

superfície celular na forma de glicolípidos, glicoproteínas e polissacáridos são receptores naturais para vários vírus, bactérias, protozoários e toxinas (Jacobson & Doyle, 1996; Pacheco-Yépes *et al.*, 2000; Boettner *et al.*, 2002) (Figura I.2). Os microrganismos e toxinas reconhecem e ligam-se reversivelmente aos hidratos de carbono da superfície membranar com grande especificidade, processo denominado adesão, e, para muitos deles, esta interacção é o primeiro passo para sua endocitose, em indivíduos susceptíveis. Os microrganismos e toxinas que não têm esta habilidade são rapidamente eliminados por mecanismos naturais de defesa do organismo. Estes processos de adesão célula-célula e célula-toxina são mediados por lectinas, proteínas especializadas em reconhecer hidratos de carbono e que a eles se ligam de forma reversível e altamente selectiva (Kennedy *et al.*, 1995; Lis & Sharon, 1998; Wu *et al.*, 2008).

Os estudos com lectinas começaram a tornar alvo de maior atenção, com a demonstração de que as lectinas são ferramentas extremamente úteis para a investigação de hidratos de carbono na superfície das células, indicando as alterações que estas sofrem por malignidade, bem como, para isolamento e caracterização de glicoproteínas (Sharon & Lis, 2004). Em qualquer célula as proteínas de membrana são parte da interface entre o meio extra e intracelular ou entre o interior e o exterior de um organelo celular (Santoni, 2007). A identificação e caracterização de proteínas de membrana é um desafio crucial, já que muitas dessas proteínas estão envolvidas em funções celulares essenciais como transdução de sinais, interacção e reconhecimento célula-célula, célula-patógeno e célula-substrato, osmoregulação, nutrição e metabolismo, além de todas as possíveis modificações na funcionalidade celular que podem surgir posteriormente à actividade destas proteínas de membrana (Zhao *et al.*, 2004; Kashino *et al.*, 2007).



**Figura I.3** - Interacção lectina com glicoconjugado presente na membrana celular. (Adaptado de Liu & Bevins, 2010)

A interacção lectina-hidrato de carbono ocorre através de uma porção limitada da molécula proteica. É o segmento chamado de Domínio de Reconhecimento ou CRD (Carbohydrate-Recognition Domain) que consiste num domínio globular com uma alta conservação de resíduos de aminoácidos (Figura I.3). Os hidratos de carbono interagem com lectinas através de pontes de hidrogénio propiciadas pela disponibilidade de um grande número de hidroxilos nos hidratos de carbono, que agem como doadores ou receptores de hidrogénio. Também participam da interacção lectina-hidrato de carbono, as interacções hidrofóbicas e forças de Van der Waals (Elgavish & Shannan, 1997; Loris *et al.*, 1998).

Estudos exibiram que na interacção lectina-hidrato de carbono, o centro de reconhecimento dos monossacáridos tem um papel chave na ligação destas estruturas. Uma única unidade de monossacárido é reconhecida pelo centro de ligação da lectina, enquanto outras interacções não covalentes são estabelecidas, interacções hidrofóbicas e pontes de hidrogénio mediadas por molécula de água, e desta forma estabilizam o complexo lectina-ligando (Bourne *et al.*, 1992). Foi demonstrado que mesmo com especificidade semelhante por hidrato de carbono, a afinidade de cada proteína pelo ligando pode ser consideravelmente diferente, sugerindo que a diferença estrutural entre lectinas pode ocasionar diferenças de afinidade em cada complexo estabelecido lectina-ligando (Cavada *et al.*, 2001).

É importante realçar, independentemente das suas especificidades por monossacáridos, as lectinas geralmente apresentam diferenças nas suas estruturas quaternárias. Para a mesma lectina, alterações na estrutura terciária devido a mudanças de sequência, originam grandes variações na estrutura quaternária, o que representa consequências na ligação a hidratos de carbono. As diferenças espaciais entre os centros de ligação aos hidratos de carbono de diferentes lectinas, combina com as diferenças nos seus epitopos, em ligantes multivalentes, são, provavelmente, as razões pelas quais as lectinas com especificidades similares por monossacáridos, vislumbram diferentes actividades biológicas (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997).

Catiões bivalentes, como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , são requeridos pela maioria das lectinas para o reconhecimento do seu hidrato de carbono específico. Para estas lectinas, o catião bivalente participa de uma forma indirecta para ligação ao hidrato de carbono, pois estabiliza a ligação ao domínio de reconhecimento e fixa as posições dos aminoácidos que interagem com o hidrato de carbono ligante (Weis & Drickamer, 1996). Ficou demonstrado, da necessidade de iões  $\text{Ca}^{2+}$  para a Con A se ligar ao seu hidrato de carbono específico e que a lectina de *Erythrina speciosa* necessita de  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  para ligar ao hidrato de carbono para o qual tem afinidade (Konozy *et al.*, 2003). A ocupação dos centros de ligação por estes iões metálicos bivalentes provoca uma modificação na conformação estrutural da lectina, estabilizando a ligação ao centro activo. As lectinas que não requerem iões metálicos já possuem a conformação estrutural necessária para o reconhecimento dos hidratos de carbono (Sharon & Lis, 1990).

Com o passar do tempo, a disponibilidade de um número cada vez maior de lectinas com diferentes especificidades para hidratos de carbono, resultou numa crescente utilização destas versáteis proteínas como instrumentos de pesquisas biomédicas (Shinagawa & Andreson, 2000).

### 2.1.6. Aplicações biotecnológicas das lectinas

As lectinas de plantas foram as primeiras a serem estudadas, pelo facto, de serem abundantes na natureza e os processos de isolamento serem relativamente simples. A diversidade dos fenómenos em que estão envolvidas, tanto na própria planta, quanto em actividades *in vivo* e *in vitro*, propicia uma família de proteínas muito explorada em biotecnologia.

A capacidade para ligar especificamente a hidratos de carbono faz das lectinas ferramentas importantes na pesquisa biotecnológica e biomédica onde são amplamente utilizadas. Lectina de sementes de *Salvia bogotensis* mostrou alta afinidade pelo antigénio Tn, frequentemente encontrados em células tumorais, podendo ser usada como ferramenta de grande utilidade para estudos imunohistoquímicos e celulares (Vega & Perez, 2006). Devido a especificidade da lectina, que é comparável a especificidade dos anticorpos, estas proteínas podem ser aplicadas nos campos clínicos (Matsui *et al.*, 2001). A lectina Concanavalina A marcada com fluorescência é usada para visualização e caracterização bioquímica de polissacáridos em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (Strathmann *et al.*, 2002). A Lectina de *Musa basjoo* tem propriedades de estimular macrófagos e inibir a proliferação de células leucémicas (Wong & Ng, 2006). Uma lectina galactose específica de uma variedade do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) possui a capacidade de induzir a resposta mitogénica (Wong *et al.*, 2006). Essas duas lectinas inibem a transcriptase reversa do HIV-1 com perspectivas de aplicação clínica. Kaur e colaboradores, em 2005, purificaram uma lectina do rizoma de *Arundo donase* com actividade antiproliferativa para linha de células cancerígenas humanas (HT29, T47D, SiHa, SW620, SK-N-SH, Hep2, PC3 e OVCAR5) e actividade mitogénica para células mononucleares periféricas. A propriedade de ligação a células tumorais torna as lectinas potenciais ferramentas bioadesivas na entrega de fármacos (Gabor *et al.*, 2001).

Um vasto número de trabalhos tem sido dedicado aos estudos dos efeitos biológicos das lectinas de planta, influenciando inúmeras áreas biomédicas com a utilização destas proteínas como ferramentas biológicas com possíveis funções terapêuticas (ver tabela I.3).

As lectinas por apresentarem propriedades particularmente interessantes, têm sido utilizadas amplamente no campo da fisiologia, bioquímica e ciências biomédicas, no entanto, a propriedade mais sobejamente conhecida das lectinas é a sua capacidade de aglutinar eritrócitos de diferentes espécies, relacionando-as com diferentes actividades biológicas em geral, ligadas à interacção célula-célula, dependente da presença de glicoproteínas presentes nas superfícies celulares. Também, outras células podem ser aglutinadas por

lectinas, como células tumorais (Beuth *et al.*, 1995), possibilitando o desenvolvimento de trabalhos nos campos da oncologia.

**Tabela I.3** - Aplicação das lectinas de plantas como ferramenta nas ciências da vida.

Áreas do Conhecimento	Aplicações Comuns
<b>Bioquímica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Detecção de epitopos definidos para glicídios de glicoconjugados, em blots ou por cromatografia em camada fina;</li> <li>▪ Purificação de lectinas associadas a glicoconjugados, por cromatografia de afinidade;</li> <li>▪ Caracterização de glicanos por cromatografia de afinidade (lectinas) seriadas;</li> <li>▪ Análise glicómica;</li> <li>▪ Quantificação de lectinas associadas a glicoconjugados reactivos por ELLA (Enzyme-linked Lectin-binding assays);</li> <li>▪ Quantificação de actividades de glicosiltransferases/glicosidasas por lectinas, baseadas na detecção de produtos formados pela reacção enzimática.</li> </ul>
<b>Biologia Celular</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Análise dos mecanismos envolvidos na glicosilação correcta, mediante lectinas resistentes a variantes celulares;</li> <li>▪ Fraccionamento de populações de células;</li> <li>▪ Substrato modelo para o estudo da agregação e adesão celular.</li> </ul>
<b>Medicina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Detecção de doenças relacionadas com alterações de síntese dos glicanos;</li> <li>▪ Tipagem de grupos sanguíneos;</li> <li>▪ Quantificação de aberrações dos glicanos da superfície celular (malignidade);</li> <li>▪ Marcador celular, incluindo agentes infecciosos, com o objectivo de diagnostico (vírus, bactérias, fungos e parasitas).</li> </ul>

(Adaptado de Rüdiger & Gabius, 2001)

## 2.2. Cancro

O cancro é considerado a segunda causa de morte a nível mundial, registando cerca de 8 milhões de mortes por ano (WHO, 2012; Ferlay *et al.*, 2007; Jemal *et al.*, 2011). Na actualidade é um problema crescente ao nível de saúde pública, em países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento, sendo em parte o resultado de um processo global de industrialização e urbanização, que levou a alterações das condições ambientais e como tal a uma adequação de estilo de vida da população nem sempre considerados saudáveis (Surh, 2003; Anand *et al.*, 2008; Jemal *et al.*, 2011).

O cancro é considerado uma doença heterogénea resultante da aquisição de várias alterações genéticas e epigenéticas que resultam na típica desregulação da proliferação celular (Evan, 2001).

Os mecanismos de proliferação celular, durante os quais as células aumentam a sua biomassa, duplicando os cromossomas e dividindo-se de modo a originar células geneticamente iguais, desenvolvem-se de forma constante e controlada, de acordo com as necessidades gerais do organismo (Andreeff *et al.*, 2000). Sob condições normais, durante a proliferação celular são produzidas proteínas envolvidas no crescimento, utilizadas para estimular a propagação normal das células. Quando é atingido o número suficiente de células, estas fazem uso de inibidores de factores de crescimento, que regulam proteínas inibidoras do crescimento celular. Deste modo, a proliferação celular normal é controlada pela produção coordenada e equilibrada de factores e de inibidores de factores de crescimento (Azevedo, 1999).

Em tecidos normais a taxa de crescimento de novas células e morte celular por apoptose são mantidas em equilíbrio, mas em tumores malignos (ou cancro) este equilíbrio é quebrado e há um crescimento descontrolado de células. Tudo começa com alterações genéticas na célula cancerígena, sendo o desenvolvimento do tumor promovido pela sobrevivência e expansão clonal dessas células. A progressão do tumor engloba um crescimento substancial no tamanho do tumor primário (local onde teve origem), podendo culminar no aparecimento de tumores secundários através da migração de células cancerígenas do tumor primário, formando metástases. Para o crescimento tumoral e metástases, a angiogénese (crescimento de novos vasos sanguíneos) é um processo crucial (Folkman, 2002; Fidler, 2003).

O crescimento tumoral é um processo multifásico que conduz a uma série de mutações cromossómicas que progressivamente convertem as células normais a um estado pré-canceroso e finalmente a um estado canceroso. Consequentemente, formam-se tumores que, ao se desenvolverem, tornam-se intracelularmente desorganizados até adquirirem o fenótipo maligno. São as propriedades malignas do cancro que o diferencia dos tumores benignos (Goldsby *et al.*, 2002).

Os tumores malignos são classificados segundo a origem embrionária do tecido, a partir do qual o tumor derivou. Diferentes tipos de cancro, nomeadamente do cólon, mama, próstata e pulmões são carcinomas, os quais se formam em tecidos endodermis ou ectodermis, como a pele. Os sarcomas são outro tipo de tumor, que se originam frequentemente a partir de tecidos conectivos mesodermis, como ossos, músculos e cartilagem (Goldsby *et al.*, 2002).

A tumorigénese envolve a acumulação de pelo menos quatro a seis alterações genéticas não letais em genes essenciais, por exemplo, ao nível do controlo da proliferação celular, da estabilidade do genoma e da apoptose, o que confere à célula uma vantagem

selectiva (Chan *et al.*, 2004; Croce, 2008; Luo *et al.*, 2009). Em resultado ocorre a acumulação de mutações, favorecida por danos nas vias de reparação do DNA, que impedem a reparação destas alterações por parte da célula. Os genes envolvidos durante a tumorigénese são os oncogenes e os genes supressores de tumores. Nas células tumorais os oncogenes derivam de proto-oncogenes activados inadequadamente, o como consequência de mutações de ganho de função ou amplificação, e que codificam produtos que desencadeiam o processo tumoral. Por sua vez, os genes supressores de tumores encontram-se inibidos devido a mutações de perda de função, deleção, e/ou silenciamento epigenético, que à semelhança, também induzem a progressão do processo tumoral (Esteller *et al.*, 1999; Hanahan & Weinberg, 2000).

O processo tumorigénico compreende três fases: a iniciação, a promoção e a progressão (Surh, 2003). A fase de iniciação é irreversível e envolve a aquisição de danos na molécula de DNA, que por sua vez culminam na manutenção desses danos como uma mutação no genoma (Chan *et al.*, 2004). A fase de promoção é considerada uma fase de proliferação descontrolada (expansão clonal) destas células, inicialmente alteradas (células pré-neoplásicas). Esta fase permite a ocorrência de alterações em cascatas de sinalização, o que por sua vez conduz à alteração da expressão de um conjunto de genes com papéis importantes na regulação da proliferação e crescimento celular, bem como, no processo apoptótico e, desta forma, conferem uma vantagem selectiva às células iniciadas. Esta contínua expansão clonal cria o ambiente propício à aquisição de novas mutações que podem conduzir ao desenvolvimento das propriedades malignas, como a invasão e a metastização associadas à progressão do desenvolvimento tumoral (Chan *et al.*, 2004; Kundu, 2004).

As células tumorais adquirem um conjunto de características durante o processo de desenvolvimento tumoral, tais como: um potencial replicativo ilimitado; auto-suficiência de factores de crescimento; aberração glicómica; insensibilidade a inibidores de crescimento; evasão aos mecanismos de apoptose; indução da angiogénese; e, por fim, capacidade de invasão e metastização (Luo *et al.*, 2009; Hanahan & Weinberg, 2011).

A sustentação da sinalização da proliferação celular é uma das principais características adquiridas pelas células cancerígenas. Estas células apresentam uma sinalização e estimulação da proliferação celular independente do tecido normal circundante e coordenada pela produção dos seus próprios factores de crescimento (Hanahan & Weinberg, 2011). A proliferação contínua das células cancerígenas é igualmente promovida devido à capacidade destas células em não responderem aos inibidores de crescimento celular. Assim, a sinalização da proliferação aumenta devido a alterações dos mecanismos de controlo de crescimento celular (Hanahan & Weinberg, 2000). A progressão das células

tumorais depende ainda da inibição do mecanismo de apoptose, que pode ocorrer através do aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas ou pela diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas, sendo a principal alteração ao nível da inibição do gene supressor de tumores TP53 (Elmore, 2007).

A aquisição das características de invasão e metastização pelas células cancerígenas são consequência de mutações em genes envolvidos na adesão celular, que desencadeiam a perda da inibição por contacto e a promoção da migração destas células para locais distantes (Garrett, 2001; Hanahan e Weinberg, 2011). A formação de metástases está associada a 90 % de mortes por cancro em humanos (Hanahan e Weinberg, 2000).

**Tabela I.4** - Etapas da carcinogénese e proteínas relacionadas em cada etapa.

Etapas da Carcinogénese	Proteínas Relacionadas
<b>Proliferação Celular</b>	Cíclicas A, B, D1 e E
	p15
	p27
	p53
	Bcl - 2
<b>Angiogénese</b>	VEGF
	COX-2
	FGF
<b>Invasão</b>	Filamina
	Vilina
	Fibronectina
	Colagénio
<b>Migração</b>	Lectinas
	Integrinas
	Caderinas
	Metaloproteases

(Adaptado de Pinho, 2008)

### 2.2.1. Carcinoma Colo-rectal

O intestino grosso é composto pelo cólon e recto, sendo que a maior parte deste é composta pelo cólon, um tubo muscular de aproximadamente 1,5m de comprimento, dividido em quatro segmentos de acordo com suprimento vascular para cada parte: cólon ascendente, cólon transversal, cólon descendente e sigmóide (Yeatman, 2001).

O carcinoma colo-rectal é um dos tipos de tumor mais comum no mundo ocidental. É o carcinoma do aparelho digestivo com maior incidência a nível mundial e o segundo tipo de tumor responsável por maior taxa de mortalidade nos EUA (Kufe *et al.*, 2003).

O carcinoma colo-rectal tem origem nas células epiteliais do cólon ou recto do tracto gastrointestinal. O carcinoma colo-rectal está associado a um processo evolutivo numa sequência de estadios, que vão desde pequenas lesões e pequenos tumores benignos (pólipos adenomatosos) até cancros malignos (carcinomas) mais ou menos avançados. Desta forma é possível caracterizar o cancro numa sequência de estadios, começando no estadio 0 ou carcinoma *in situ*, quando o tumor apenas afecta a mucosa do intestino, ao estadio IV, quando já existem metástases à distância (Watson, 2006).

O cancro de cólon é, em geral, uma neoplasia maligna e, está relacionado com factores ambientais, especialmente dietéticos, à predisposição genética e à obesidade, entre outros factores (Dini & Koff, 2006). O desenvolvimento da neoplasia do cólon segue uma progressão clara, atribuída à transformação do epitélio normal da mucosa do cólon a pólipos adenomatosos e, por último, ao cancro invasivo (Palozza *et al.*, 2009).

#### **2.2.1.1. Caracterização da aberração glicómica nas células cancerígenas do cancro colo-rectal**

Vários estudos em tecidos tumorais demonstraram a existência de alterações dos glucidos da superfície celular, ao nível das  $\beta$ -1,6-GlcNAc oligossacáridos *N*-ligados, que se encontravam mais ramificados. Estes oligossacáridos são geralmente tri ou tetra ramificados e vão aumentar a superfície total da célula que está terminalmente sialilada. Esta alteração é frequentemente encontrada nas etapas iniciais, da formação de tumores devido a oncogenes (Park *et al.*, 2013).

Existem também evidências que níveis aumentados de sialilação  $\alpha$ -1,2, no Aparelho de Golgi, podem ser responsáveis por um potencial factor de metastização nestas células cancerígenas. O aumento de oligossacáridos  $\beta$ -1,6 *N*-ligados é devido a uma actividade aumentada da enzima,  $\beta$ -1,6-*N*-acetilglucosominiltransferase V (GlcNAc-TV), também conhecida por MGAT5. O aumento da actividade desta enzima parece resultar da sobreexpressão do seu gene que está correlacionada com uma transformação maligna (Park *et al.*, 2013).

#### **2.2.1.1.1 - Alterações na expressão e glicosilação das mucinas**

As glicoproteínas das células tumorais são com frequência anormais quer na sua estrutura quer na sua quantidade. Em particular nos O-glicanos presentes na mucina que é a maior componente proteica do muco que cobre o epitélio do tubo gastrointestinal (Crocker, 2005).

##### **2.2.1.1.1.1 - T e Tn antigénios**

As camadas de mucina do tecido normal do cólon têm uma grande variedade de estruturas O-glicanas e exibem uma elevada e diferenciada actividade enzimática, que sintetiza a estruturas comuns 1-4 dos cores, (figura I.4). A expressão de várias *N*-acetilgalactosiltransferases (ppGalNAcTs), que iniciam O-glicosilação e sintetizam o antígeno T e Tn estão aumentadas no cancro colo rectal (Shibao *et al.*, 2002).

Correlacionando a expressão de ppGalNAc-T3, com a diferenciação histopatológica dos tumores e, probabilidade da sobrevivência ao fim de 5 anos, conclui-se que tanto o antígeno Tn como STn são biomarcadores para um mau prognóstico e que o seu aumento está associado com estádios avançados de cancro, invasividade, alta proliferação e metástase pois, sabe-se que lectinas animais específicas para Gal/GalNAc são expressas por macrófagos e em nodulos linfáticos e, estão implicadas no trafico de metástases para o sistema linfático (Itzkowitz *et al.*, 1990).

O antígeno T (core 1), é prevalente no cancro do cólon enquanto a mucosa normal do cólon exhibe principalmente estruturas com core 3. A enzima GlcNAc-transferase, que actua ao nível da síntese do core 3, está reduzida no tecido canceroso (Brockhausen, 1999). Assim, como ambas as enzimas que sintetizam os cores 1 e 3 usam substratos peptídicos GalNAc, a redução da síntese do core 3 pode contribuir para a prevalência do antígeno T.

Também os níveis RNA mensageiro da enzima de Golgi ST6GalNAc-II, que é responsável pela modificação do antígeno T, estão sobreexpressos em casos de cancro colo rectal, com metástases em nodulos linfáticos, estando associados com uma baixa taxa de sobrevivência (Schneider *et al.*, 2001).

O antígeno T (core 1) é convertido na estrutura core 2 pela, C2GnT1 (L-enzima do tipo leucocitário) e pela C2GnT2 (M-enzima do tipo mucina). O tecido normal do cólon contém uma alta actividade de M-enzima, ao contrário de várias linhas celulares cancerígenas do colon (Vavasseur *et al.*, 1995). Existe também uma sobreexpressão da C2GnT1 na maioria dos tecidos cancerosos do cólon, que resulta da diminuição de estruturas core 4 e o relativo aumento das estruturas core 2 (figura I.4).

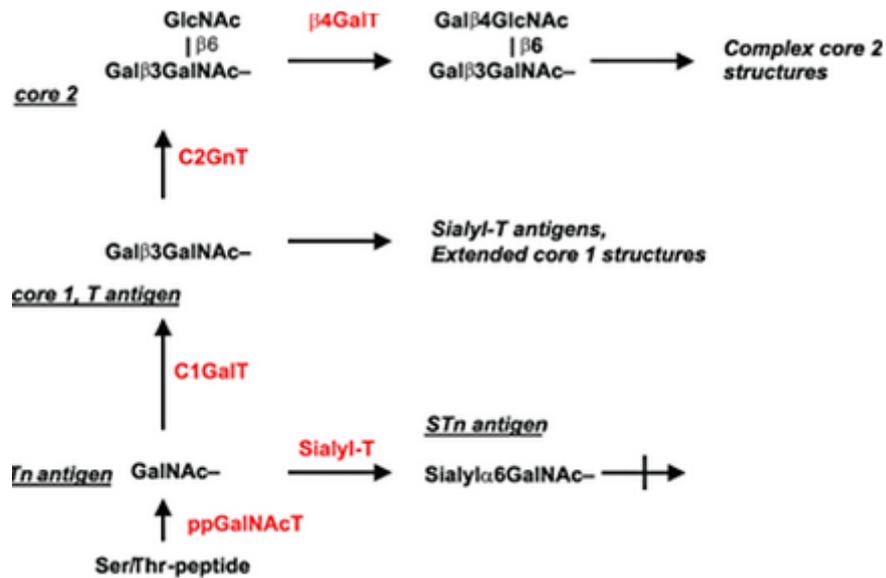


Figura I.4 - Esquema da síntese dos antígenos T e Tn (Adaptado de Brockhausen, 2006).

### 2.2.1.1.2. Alteração na expressão do ácido siálico - SLe<sup>x</sup> e SLe<sup>a</sup> antígenios

Sabe-se que células tumorais que expressam o SLe<sup>x</sup> e SLe<sup>a</sup> tem uma capacidade de adesão a células endoteliais que se pensa provir da acção das selectinas ELAM, que são moléculas indutivas da adesão de neutrófilos, como lectinas para estas estruturas.

A actividade aumentada das α3-sialiltransferases, contribuem para o aumento das quantidades de SLe<sup>x</sup> que se encontram nos tecidos do cancro colo-rectal. A síntese de SLe<sup>x</sup> é controlada pela α3-Fuc-transferase IV, que está significativamente elevada nestes tecidos (Kudo *et al.*, 1998).

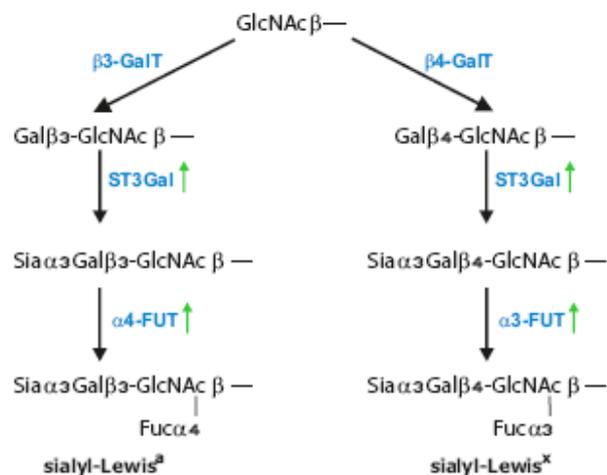


Figura I.5 - Esquema da síntese dos antígenos SLe<sup>a</sup> e SLe<sup>x</sup> e das cadeias tipo 1 e 2. (Adaptado de Häuselmann & Borsig, 2014).

Na mucosa normal do cólon as cadeias de extensão do tipo 1 e 2 estão presentes, mas apenas o terminal da cadeia tipo 2 é o precursor do SLe<sup>x</sup> (figura 1.5). Nas células cancerosas a actividade da  $\beta$ 4-Gal-transferases que está envolvida na sua síntese, encontra-se sobre expressa e membros específicos da família das  $\beta$ 3-Galtransferases estão infra expressas.

#### **2.2.1.2. Matriz extracelular**

A matriz extracelular tem inúmeras funções, para além de servir de suporte estrutural às células e tecidos. Regula diversos aspectos do comportamento celular, como o crescimento e a sobrevivência, ou pode servir como reservatório para uma variedade de moléculas biologicamente activas (Birkedal-Hansen, 1995).

A degradação controlada da matriz extracelular é uma função importante numa variedade de processos biológicos, como o desenvolvimento embrionário, a remodelação e a reparação do tecido celular. Por outro lado, esta degradação é uma parte essencial do crescimento, invasão e metastização dos tumores malignos (Liotta *et al.*, 1983; Ala-aho & Kähäri, 2005). As células tumorais aderem às membranas basais através de moléculas de adesão e certas proteases são posteriormente produzidas para degradar a matriz extracelular. As células tumorais finalmente adquirem mobilidade espontânea e migram da lesão primária através da matriz danificada. No decorrer da metastização, as gelatinases parecem ter um importante papel nesta degradação da matriz (Turpeenniemi-Hujanen, 2005).

##### **2.2.1.2.1. Metaloproteinases de matriz**

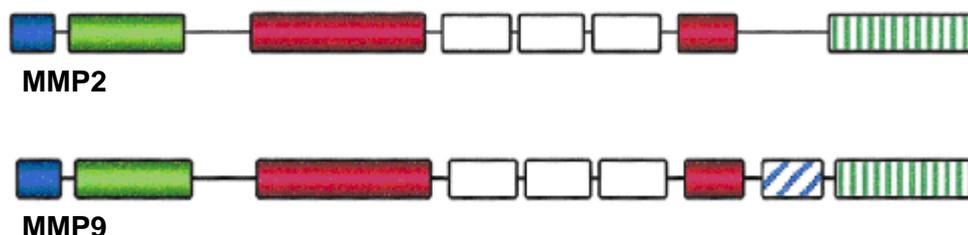
Metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas de uma família de metaloendopeptidases, dependentes de zinco, que fragmentam componentes protéicos da matriz extracelular (MEC) (Egeblad & Werb, 2002). Em geral, as MMPs fragmentam uma ligação peptídica antes de um resíduo com cadeia lateral hidrofóbica, como leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina ou tirosina, o que determina a especificidade do substrato (Visse *et al.*, 2003).

As MMPs têm o potencial de criar um ambiente que suporta o início e o crescimento de tumores primários, promovem a angiogénese e neovascularização tumoral e permitem a ruptura da arquitectura do tecido local e a penetração das barreiras do tecido conjuntivo para permitir a invasão das células neoplásicas e a disseminação por metastização (Szabo *et al.*, 2004).

As MMPs consistem numa família de mais de 20 endopeptidases e são classificadas de acordo com o seu domínio e organização estrutural, além dos substratos específicos que degradam, apresentando diversas classes (DeClerck, 2000; Visse & Nagase, 2003; Björklund & Koivunen, 2005). As MMP2 e MMP9, também designadas gelatinases, degradam entre outros, o colagénio desnaturado (gelatinas).

#### 2.2.1.2.1.1. Gelatinases

De acordo com a especificidade de substrato, similaridade de sequência e organização de domínios, as MMPs podem ser divididas em seis grupos. O Grupo de gelatinases, constituído pelas MMP2 e MMP9, apresenta uma estrutura básica de acordo com a figura I.6.



**Figura I.6** - Estrutura básica dos domínios das MMP2 e MMP9. O segmento a azul esta representado o peptídeo sinal, o verde é o pro-domínio, a vermelho o domínio catalítico, a branco o domínio semelhante a fibronectina tipo II, as riscas azuis diagonais, a região *hinge* e as riscas verdes verticais o domínio semelhante a hemopexina (adaptado de Massova *et. al.*, 1998).

A actividade das MMP-2 e MMP-9 foi fortemente associada com o fenótipo maligno. Ainda que tenham similaridades na degradação do substrato, estas duas enzimas têm diferentes mecanismos de activação e parecem ser reguladas por distintos mecanismos de sinalização intracelular (Gokalsan *et al.*, 1998).

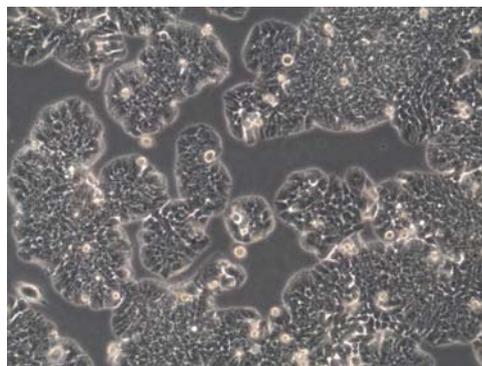
A MMP-2, também designada por gelatinase A, é uma proteína com uma massa molecular de com 72 kDa, é sintetizada e excretada nos humanos pelos fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, queratinócitos, condrócitos e macrófagos, bem como, por células transformadas (KerKelä & Saarialho-Kere, 2003; Björklund & Koivunen, 2005).

A MMP-9, também designada por gelatinase B, é uma proteína com 86 kDa e é expressa, em tecidos humanos, pelos leucócitos normais, monócitos e macrófagos, queratinócitos, bem como, por células transformadas (KerKelä e Saarialho-Kere, 2003; Björklund e Koivunen, 2005). A produção desta proteinase está relacionada com mau prognóstico em numerosos tumores humanos, de origem epitelial, mesenquimatosa e

hematopoiética (Barillé *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 2003; Morelli *et al.*, 2004). A expressão da MMP-9 é considerada um pré-requisito para a invasão tumoral (Morelli *et al.*, 2004).

### 2.2.1.3. Linha celular do cancro do cólon humano HT29

A célula é a unidade básica estrutural e funcional em todos os seres vivos. A linhagem celular HT29 foi derivada, em 1964, a partir do tumor de uma mulher de 44 anos de idade com adenocarcinoma de cólon (figura I.7). As HT29 são células epiteliais intestinais humanas, com característica aderente e tumorigénica. Suas estruturas morfológicas incluem microvilosidades, microfilamentos, mitocôndrias com grânulos escuros e lisos, retículo endoplasmático rugoso e ribossomos livres, gotículas lipídicas e muitos lisossomos secundários (Fogh *et al.*, 1977).



**Figura I.7** - Linha celular de adenocarcinoma de cólon humano (HT29) (<http://www.itqb.unl.pt/>).

As células HT29 expressam receptores de uroquinase, mas não possuem actividade detectável do factor activador de plasminogénio (Reiter *et al.*, 1993). São negativas para CD4, mas possuem uma expressão na superfície da célula de galactose ceramida (um possível receptor alternativo para o HIV). A linhagem HT29 expressa, ainda, os genes c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, Myb, sis e os oncogenes fos (Fogh, 1975; Chen *et al.*, 1987).

Na linhagem celular HT29 o antígeno da proteína p53 é produzido em excesso. Consequentemente, os efeitos de indução da apoptose, mediados pela proteína p53, estão inactivados garantindo a sobrevivência da célula (Fogh, 1975; Chen *et al.*, 1987).

No presente trabalho foi escolhido a linhagem celular de adenocarcinoma do cólon humano, HT29, para a detecção e ligação a epítomos glicosilados e estudo da actividade anti-tumoral dos extractos de proteínas totais das espécies seleccionadas. A escassez de trabalhos relacionados com a linha celular HT29 e os extractos das amostras em estudo, foram fundamentos determinantes para a sua escolha.

### 2.2.2. Terapia anti-tumoral

Os constantes avanços na medicina e na investigação científica têm sugerido diversas estratégias para a inibição da progressão do crescimento tumoral, nomeadamente:

- (i) remoção de tumores por cirurgia;
- (ii) exposição do organismo a radiação de raios X ou gama;
- (iii) quimioterapia, caracterizada pela administração de fármacos com a capacidade de inibir a proliferação celular ou induzir a morte celular por apoptose das células tumorais;
- (iv) estimulação do sistema imunológico contra as células cancerígenas, por administração de vacinas compostas por células cancerosas atenuadas, células cancerosas lisadas ou receptores cancerosos purificados. Esta terapia inclui também a administração de anticorpos que reconhecem de forma específica os receptores de células cancerosas;
- (v) terapia genética, caracterizada pela inserção de genes funcionais (transgenes) em células com genes defeituosos, conferindo um efeito terapêutico directo (Carvalho *et al.*, 2005).

De todas as estratégias na terapia do cancro, a quimioterapia é o método mais correntemente utilizado, que tem a desvantagem de a toxicidade do fármaco afectar as células tumorais e as células normais. No sentido de minimizar as lesões das células não tumorais têm sido desenvolvidos vários estudos, entre os quais se destacam experiências com várias espécies de plantas de elevado valor terapêutico, das quais são isoladas diferentes substâncias químicas usadas como drogas anti-tumorais.

Desde o aparecimento dos primeiros fármacos anti-tumorais, o tratamento do cancro tem vindo a melhorar substancialmente. Um número selectivo de doenças, como leucemias linfoblásticas, linfomas e cancro dos testículos, podem ser tratados com as terapêuticas actuais, aumentando o tempo de sobrevivência dos doentes. A identificação e desenvolvimento de compostos naturais e seus derivados têm contribuído muito para este progresso, estando muitos destes compostos a ser utilizados na prática clínica (Nobili *et al.*, 2009).

#### 2.2.2.1. Actividade anti-tumoral das lectinas de plantas

As lectinas só vieram despertar maior interesse a partir de 1960, sendo descobertas duas novas aplicações. A primeira descrita por Nowel, em 1960, que verificou a actividade mitogénica da lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) sobre linfócitos. A segunda, através dos estudos de Aub e colaboradores, em 1963, ao verificarem que a lectina do germe do trigo

(WGA) aglutinava muito mais intensamente células modificadas do que células normais, concluindo que alterações malignas eram acompanhadas por mudanças nas superfícies celulares (Aub *et al.*, 1963).

O mecanismo de reconhecimento molecular na superfície da célula, via receptores glicosilados, torna-a capaz de reconhecer células semelhantes e assim interagir com as mesmas mantendo a homeostasia, é afectado quando células normais sofrem neoplasia. O resultado é um crescimento e divisão incontrollados, devido às alterações nos mecanismos de reconhecimento que agem na membrana celular (De Robertis & De Robertis, 1993).

Modificações estruturais das glicoproteínas de membrana durante a divisão celular têm sido associadas com o potencial de malignidade dos tecidos. As variações na morfologia da superfície celular podem estar relacionadas a um estágio específico da doença e as lectinas podem ser ferramentas úteis no diagnóstico e prognóstico (Dall'Olio, 1996).

Investigações sobre as mudanças de expressão de oligossacarídeos complexos durante o desenvolvimento de carcinoma invasivo de células escamosas do colo do útero, através da ligação da lectina purificada de JFL (*Artocarpus integrifolia*), conjugada à peroxidase e comparada com controlos normais, mostraram intensa marcação da lectina nos tecidos neoplásicos (Sames *et al.*, 2001).

A glicosilação é a modificação pós-tradução mais frequente das proteínas e está associada com vários aspectos quer fisiológicos, quer patológicos, como: interacção entre o agente patogénico e hospedeiro, diferenciação, migração, invasão e metastização tumorais, tráfego e sinalização celulares (Reis *et al.*, 2010). As alterações, quer nos glicolipídios, quer nas glicoproteínas estão associadas a cancro (Hakomori, 1985 e 1996).

Como já foi descrito, a glicosilação, de proteínas, pode ocorrer sobe duas formas, *N*- e *O*- glicosilação de acordo com o resíduo aminoacídico ao qual os açúcares se ligam, e quer os *N*-glicanos, quer os *O*-glicanos que são sintetizados, podem estar afectados durante a progressão tumoral.

A glicosilação aberrante é o resultado de uma transformação oncogénica inicial, sendo um importante impulsionador na indução da invasão e metástase (Hakomori, 2002). A glicosilação aberrante define, a fase, direcção e o destino da progressão tumoral e expressão de epitopos específicos de hidratos de carbono em certos tumores, afecta o seu potencial invasivo e metástico (Numahata *et al.*, 2002).

As alterações da glicosilação são um potencial alvo para a descoberta de biomarcadores, pois estas acontecem na superfície das células cancerígenas, acessíveis a

anticorpos ou lectinas como biomarcadores teciduais, e são expressas na circulação após terem sido secretadas (biomarcadores séricos) (Reis *et al.*, 2010).

Num estudo realizado, os antígenos T, Tn e Sialil-Tn foram identificados como um grupo de antígenos associados a tumor, devido à sua reactividade na presença de anticorpos e lectinas (*Arachis hypogea*, PNA para antígeno T, *Vicia villosa*, VVA ou *Helix pomatia*, HPA para antígeno Tn) (Dall'Olio, 1996; Zhu *et al.*, 2009). Muitos destes antígenos são estruturas sialiladas e o aumento geral da sialilação de glicoproteínas da superfície celular é comumente observado nos oligossacarídeos N-ligados e O-ligados das células tumorais (Cazet *et al.*, 2010). A expressão do antígeno T verificou-se ao nível dos carcinomas da mama, do cólon, bexiga, próstata, fígado e estômago (Heimburg-Molinari *et al.*, 2011).

### 2.2.2.2. Mecanismos de Acção Anti-tumoral

Mecanismos de controlo da proliferação e morte celular estão envolvidos no desenvolvimento embrionário e na manutenção da homeostasia. Entre os principais mecanismos estão a divisão celular, reparação do DNA, mecanismos de bloqueio da proliferação como apoptose, necrose e autofagia, além de diferenciação celular. Os principais mecanismos de morte celular apresentam características peculiares e são apresentados na tabela I.5.

**Tabela I.5** - Comparação das alterações morfológicas dos diferentes tipos de morte celular.

Características	Apoptose	Autofagia	Necrose
Quantidade de células afectadas	Uma célula ou um pequeno grupo.	Pode-se encontrar muitas células contíguas ou não (pela libertação de produtos da autodigestão).	Em geral muitas células contíguas.
Morfologia geral da célula	Encolhimento celular e convulsão.	Aumento da granulosidade celular, sem padrão de alteração no tamanho.	Turgescência celular
Alterações da membrana	Membrana celular intacta	Ruptura e fragmentação da membrana no final do processo	Ruptura da membrana celular.
Alterações no citoplasma	Retenção do citoplasma em corpos apoptóticos	Maciça vacuolização do citoplasma (vesículas autofágicas com membrana dupla).	Vacuolização e degeneração organelar, seguido de libertação do citoplasma no meio extracelular.
Resposta imunitária	Sem resposta inflamatória	Sem resposta inflamatória	Resposta inflamatória

(Adaptado de Zamin, 2010)

O cancro é um exemplo onde a regulação dos mecanismos normais do ciclo celular está desregulada, e isso pode ocorrer tanto por um excesso de proliferação como por uma diminuição da eliminação de células disfuncionais. Aliás, a supressão da apoptose durante a carcinogénese parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão de determinados cancros. As células tumorais são capazes de suprimir a apoptose a partir de uma variedade de mecanismos moleculares. No caso do cancro, o crescimento celular resulta não só de uma proliferação descontrolada mas também de uma morte celular reduzida (Elmore, 2007).

A actividade anti-proliferativa de lectinas tem sido demonstrada *in vitro* e *in vivo*, sugerido que estas proteínas possuem potencial biotecnológico como agentes terapêuticos. As lectinas são capazes de se ligar a receptores glicosilados localizados na superfície de células cancerígenas promovendo citotoxicidade, inibição do crescimento tumoral e apoptose celular (Mejia & Prisecaru, 2005).

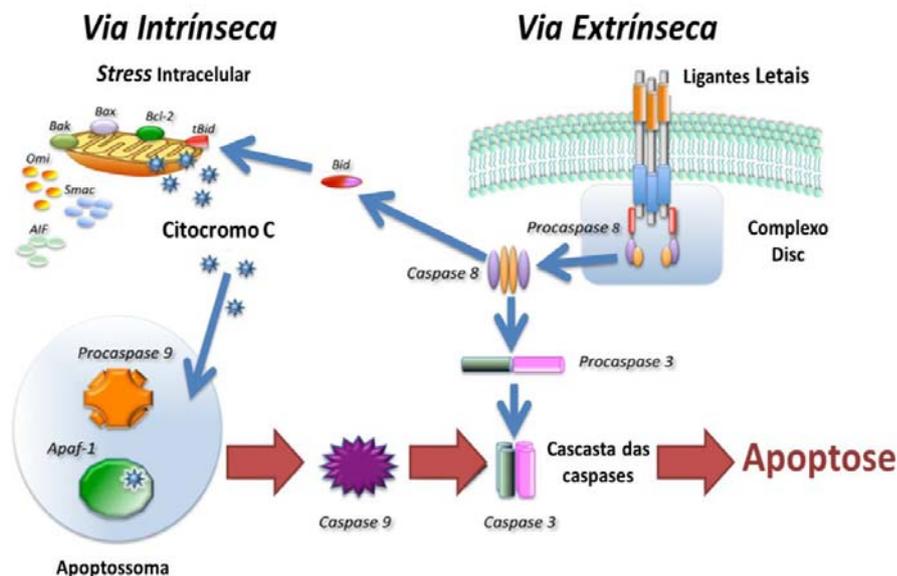
#### **2.2.2.2.1. Apoptose celular**

O termo apoptose ou morte celular programada foi proposto em 1972 por Kerr, Wyllie e Currie (Kerr *et al.*, 1993) para descrever uma forma distinta da morte celular que ocorre de forma programada. Esta forma de morte celular ocorre normalmente em diversas situações, como por exemplo, durante o desenvolvimento, na organogénese e hematopoiese normal e patológica, no envelhecimento, na resposta inflamatória e na eliminação de células após uma lesão celular, assumindo uma importância fundamental na homeostasia dos tecidos. Os mecanismos de apoptose são extremamente complexos e sofisticados, envolvendo uma cascata de acontecimentos moleculares dependentes de energia (Elmore, 2007).

A apoptose caracteriza-se por ocorrer em células individualizadas, geralmente rodeadas por células saudáveis, apresentando condensação do citoplasma e do núcleo, manutenção da integridade de organelos, convulsão da membrana celular seguida pela sua fragmentação e formação de corpos apoptóticos, sem libertação do conteúdo do citoplasma no meio extracelular (Horvitz, 2003).

A apoptose pode ser desencadeada por vários estímulos e condições, entre eles, ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, mutações do DNA, choque térmico, baixa concentração de factores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reactivas de oxigénio (ROS), podendo ser activada por duas vias principais: a via extrínseca e a via intrínseca ou via mitocondrial que convergem mutuamente através da cascata de reacções proteolíticas que envolvem a activação das caspases que são as executoras centrais da

apoptose (Igney & Krammer, 2002; Elmore, 2007). Ambos os caminhos da apoptose têm grupos de proteínas independentes de caspases iniciadoras, e o caminho converge para a utilização do mesmo grupo de caspases efectoras que executam o final do programa de morte celular (Adams, 2003) (figura I.7).



**Figura I.7** - Ilustração representativa das vias intrínseca e extrínseca da apoptose. A via extrínseca depende da ligação entre um receptor de morte celular e o seu ligando e encontra-se associada à via intrínseca através da proteína Bid, que por sua vez desencadeia a amplificação desta última via. A via intrínseca, por sua vez, é induzida dependendo da proporção entre a proteína anti-apoptótica Bcl-2 e pro-apoptótica Bax. Ambas as vias progredem até à etapa de execução que é gerida por caspases efectoras, como a caspase 3 (Adaptado de Favaloro *et al.*, 2012).

Liu *et al.* (2009) verificaram que a lectina extraída de *Polygonatum odoratum* induz apoptose em células L929 de fibrosarcoma de murganho, alterando o potencial mitocondrial transmembranar e libertando citocromo c, levando a activação das caspases 3, 8 e 9.

As caspases são proteases essenciais na apoptose celular, responsáveis por clivar substratos ricos em resíduos de aspartato, resultando na condensação e fragmentação nuclear e externalização de fosfolípidos de membrana, que irão desencadear sinais para que as células sejam fagocitadas por macrófagos. São conhecidas seis caspases humanas participantes na apoptose, nomeadamente as caspases 3, 6, 7, 8, 9 e 10 (Nicholson & Thornberry, 1997; Boatright & Salvesen, 2003).

A apoptose de células tumorais pode também ser regulada através dos genes supressores de tumores, os quais codificam para proteínas que possuem importante papel na regulação do ciclo celular e apoptose, inibindo a formação de tumores. O gene supressor

TP53 codifica uma fosfoproteína nuclear cuja disfunção contribui para a gênese e agressividade do tumor. A proteína p53 participa da regulação da fase G1, que tem fundamental importância na manutenção da integridade do genoma, pois permite a acção de mecanismo de reparação do DNA ou a remoção de células danificadas através de apoptose. Danos no DNA promovem a sobre-expressão e consequente activação da p53, resultando na paragem do ciclo celular em G1. Quando os danos do DNA não são passíveis de reparação, ocorre a activação da apoptose.

A indução da morte celular por apoptose é um dos principais mecanismos pelo qual a maioria dos agentes de quimioterapia exerce o seu efeito citotóxico sobre as células tumorais. Esta via de morte celular é altamente regulada e encontra-se frequentemente alterada em células tumorais, o que torna possível a sobrevivência e a proliferação de células com DNA danificado. Inúmeras proteínas reguladoras da apoptose têm a sua expressão alterada em células tumorais, o que resulta na desregulação do controlo da apoptose, desenvolvimento de resistência à terapia e progressão do cancro (Lowe & Lin, 2000; Pardal *et al.*, 2003; Diaz & Leon, 2011).

Foi demonstrado por Huyen *et al.* (2002) que extratos das lectinas de *Viscum album* induzem a apoptose de células endoteliais *in vitro*, o que poderia explicar o efeito que estas lectinas apresentam na regressão de tumores.

Peng *et al.* (2009) observaram que a lectina extraída da *Clematis Montana* exibiu actividade antitumoral por meio da indução da apoptose em células L929.

#### **2.2.2.2. Autofagia celular**

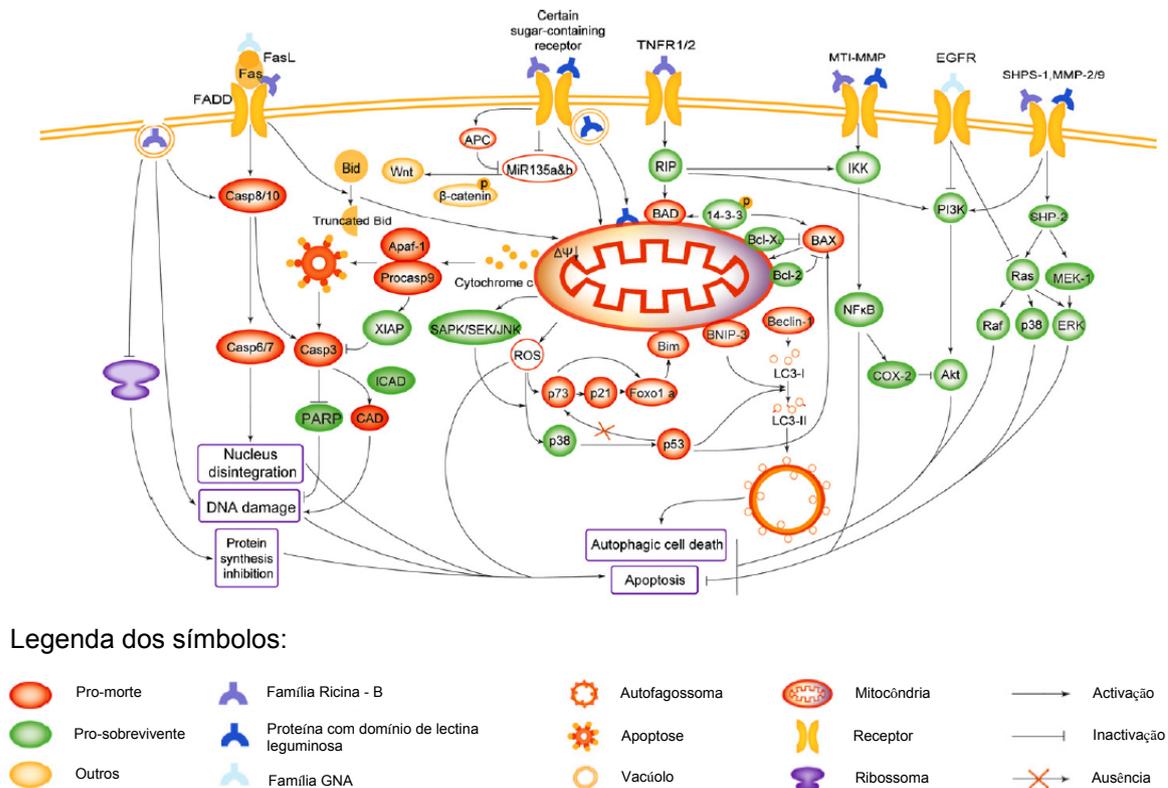
O funcionamento normal de uma célula requer a síntese de novas proteínas e a degradação de proteínas e organelos defeituosos. A presença de proteínas danificadas pode levar à agregação e acumulação das mesmas, causando stress do Reticulo Endoplasmático, que culmina na libertação de Cálcio do Reticulo para o citoplasma. Este processo pode levar à lesão celular, com stress metabólico e acumulação de radicais livres e de outros produtos intracelulares citotóxicos. Um dos mecanismos principais para a degradação proteica nas células eucarióticas é a autofagia, exercendo um papel importante na manutenção da homeostasia celular fisiológica (Mizushima *et al.*, 2008).

A autofagia é um processo catabólico conservado evolutivamente na degradação e reciclagem de componentes celulares. O mecanismo é encetado quando um sinal indutor de autofagia é percebido pela célula, tanto fisiologicamente como em contexto patológico. Autofagia é classicamente descrita como sendo induzida por privação de nutrientes e oxigénio, porém outros sinais pró-autofágicos estão também caracterizados como a

presença de organelos ou proteínas danificadas, a presença de toxinas extracelulares e compostos citotóxicos (Levine & Yuan, 2005).

Os mecanismos de autofagia e apoptose, em dissonância com o que sugeria nos primeiros trabalhos de caracterização, descritos como eventos distintos e sem relação directa, cada vez mais tem sido mostrado que estão intimamente ligados por vias de sinalização compartilhadas (Boya *et al.*, 2005).

Várias lectinas de plantas como as MLs (Mistletoe Lectins) e a Ricina mostraram ter actividade antiproliferativa e indutora de apoptose relativamente a células tumorais (Mejia & Prisecaru, 2005). Além disso, outras lectinas como a Con A e a PCL (*Polygonatum cirtonema* lectin) podem levar à morte da célula por autofagia após internalização ou ligação a receptores contendo hidratos de carbono na superfície das células cancerígenas (Lei & Chang, 2007). Estudos recentes demonstraram que a PCL também induz apoptose de células de melanoma A375, envolvendo a regulação das proteínas Bax, Bel-xl e Bcl-2 (Fig. I.9) que, por sua vez, causa o colapso do MMP levando à libertação do citocromo c e activação de caspases (Liu *et al.*, 2009). A acção da PCL abrange igualmente o sistema antioxidante da glutationa, e induz a mitocôndria a gerar a acumulação de ROS, resultando na activação da p53 e p38, o que sugere que esta lectina actua pela via da ROS-p38-p53 mediada pela mitocôndria (Liu *et al.*, 2009).



**Figura I.9** - Mecanismos de acção das lectinas de planta (adaptado Fu *et al.*, 2011).

Ao longo dos anos, muitos avanços foram alcançados no diagnóstico e tratamento do cancro, resultando num aumento da sobrevivência dos pacientes, porém, a busca por terapias mais eficientes permanece (Plattner *et al.*, 2008). Assim, é necessário investigar drogas citotóxicas com maior especificidade para as células tumorais, e nas abordagens disponíveis, a utilização de lectinas como mediadoras do ataque às células alvo, parece ser bastante promissora (Plattner *et al.*, 2008).

Tendo em conta que as células tumorais apresentam padrões de glicosilação aberrantes, poder-se-á tirar vantagem desta característica, escolhendo lectinas de plantas que tenham apenas especificidade para os glicanos das células tumorais, poupando assim, as células normais e consequentemente, alcançar novas abordagens terapêuticas mais eficientes e com menos efeitos adversos.

### **2.3. Novas Lectinas de Plantas**

O conhecimento sobre o valor terapêutico das plantas sempre tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. As primitivas civilizações cedo se aperceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maiores ou menores efeitos sobre o organismo desde efeitos tóxicos (venenos) até à intervenção sobre a doença, revelando muitas vezes, embora empiricamente, o seu potencial curativo.

A medicina natural tem sido utilizada para o tratamento de diversas patologias, sendo os extractos de plantas, desde há muito tempo, considerados como uma importante fonte de novos fármacos. Como resultado, muitos compostos utilizados na medicina moderna são extraídos de plantas (Lee, 2000). Tendo em conta este facto, não é de admirar que o estudo de potenciais plantas medicinais e seus compostos bioactivos tenha, nos dias de hoje, uma enorme relevância.

As lectinas apresentam funções importantes nas plantas, como fonte de armazenamento proteico e, adicionalmente, acções anti-patogénica e anti-predadora contra microrganismos, insectos e herbívoros, e acção antitumoral (De Hoff *et al.*, 2009). O facto de as lectinas terem larga distribuição em plantas, sugere alguma importância fisiológica para estas (Silva & Silva, 2000).

Aproveitando a capacidade de ligação específica das lectinas aos receptores glicosilados das membranas celulares, estas têm sido recentemente utilizadas para o reconhecimento das células tumorais (marcadores de superfície), adesão e localização celular, transdução de sinal através das membranas, estimulação mitogénica, aumento da resposta imunitária, citotoxicidade e apoptose (Bah *et al.*, 2013).

Mesmo tendo em conta toda a investigação até agora realizada, esta acaba por ser uma pequena parte do que até ao momento ainda está por averiguar, já que é grande o número de plantas ainda não estudadas, tanto no sentido de uma utilização directa, como na obtenção de novos constituintes activos ou, muito simplesmente, de novas moléculas que possam servir para preparar compostos activos (Cunha *et al.*, 2010).

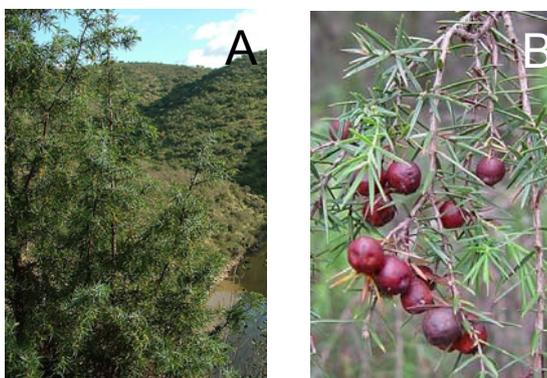
### 2.3.1. Espécies de plantas da flora Portuguesa alvo de estudo

As plantas, como todos os organismos vivos, possuem numerosos constituintes de natureza química bem definida, uns, normalmente presentes em todas as plantas, outros, sobretudo os do metabolismo secundário, podem, pela sua presença particular caracterizar uma dada espécie ou género.

Com o objectivo de avaliar a presença de novas lectinas e avaliar o seu tipo de actividade, abordou-se no presente trabalho experimental o estudo de quatro espécies de plantas endémicas Portuguesas, nomeadamente, *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus undedo* e *Corema album*.

#### 2.3.1.1. *Juniperus Oxycedrus*

O género *Juniperus* distingue-se de outras Cupressáceas pelas gábulas espessas com sementes ovóides e ápteras. Este género, constituído por árvores ou arbustos geralmente monóicos com folhas isomorfas ou dimorfas, compreendendo cerca de sessenta espécies com distribuição pelo território da Laurásia, com excepção *Juniperus procera*, cuja ocorrência se estende também ao hemisfério sul. O género engloba três secções, a *Caryocedrus*, representada por uma única espécie, *J. drupacea*, a secção *Oxycedrus*, que inclui dez espécies e a secção *Sabina*, que inclui cerca de cinquenta espécies (Figueiredo *et al.*, 2006).

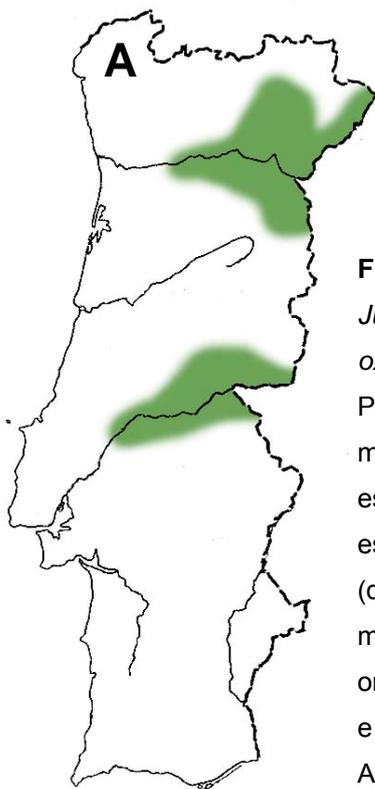


**Figura I.10** - *Juniperus oxycedrus*. **(A)** Exemplar e habitat onde se desenvolve a espécie. **(B)** Folhas e gábulos (Adaptado de <http://www.flora-on.pt>).

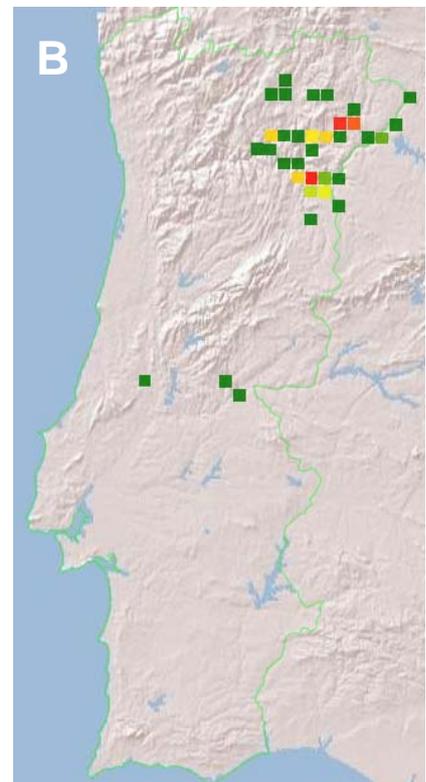
*Juniperus oxycedrus* é um arbusto ou árvore até 15 m, copa cônica ou ampla (figura I.10.A). Folhas aciculares de 8 a 25 mm de comprimento e espessura que pode variar entre 1 e 1,5 mm, atenuadas ou mucronadas no ápice, mais ou menos pungentes, patentes, com duas faixas estomáticas brancas na página inferior. Gálbula que varia entre os 8 e 15 mm de diâmetro, de globosa a piriforme, vermelha ou púrpura e escura na maturação, pruinosa ou não (figura I.10.B). São diploides ( $2n=22$ ). É uma espécie endêmica em toda a região mediterrânica (Figueiredo *et al.*, 2006). Em Portugal ocorre sobretudo em zonas de maior continentalidade em Trás-os-Montes, Nordeste da Beira Interior, Bacia do Alto-Tejo, Estremadura e Alentejo, crescendo numa variedade de locais rochosos desde os 50 até 800 m de altitude, raramente atingindo os 1.000 m, estabelecendo o seu habitat em matos, matagais e terrenos incultos. É conhecido pelos vernáculos de Cedro, Cedro-de-Espanha, Zimbro-Oxicedro e Zimbro-Bravo.

#### 2.3.1.1.1. Distribuição e descrição botânica do *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*

*Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* habitam regiões xerofitas, e desenvolve-se em planícies ou encostas soalheiras em aberto, matagais ou bosques, podendo ir até aos 1.000 m de altitude. Em Portugal habitam regiões interiores da Beira Alta, Beira Baixa e Trás-os-Montes (Castroviejo *et al.*, 1986; Adams, 2004) (figura I.11).



**Figura I.11** - Distribuição do *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* no território de Portugal Continental. **(A)** Zona mais adequada à plantaçao da espécie. **(B)** As áreas estimadas de ocupaçao (quadriculas) assinaladas no mapa, correspondem às zonas onde os técnicos observaram e descreveram a espécie. Adaptado de <http://flora-on.pt>.

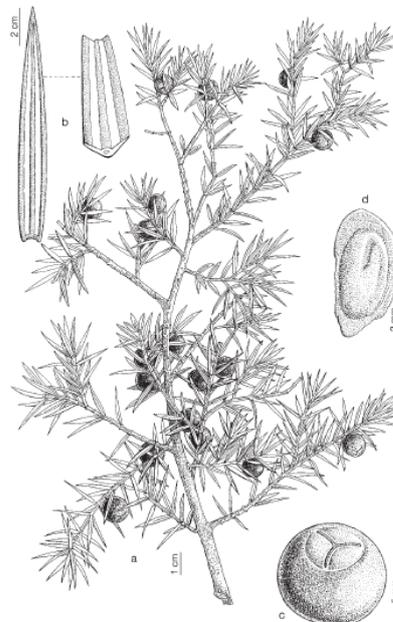


O *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* é um arbusto, podendo atingir 4 m de altura, com uma copa que pode variar de cônica a ovóide. Folhas aciculares e articuladas na base e gálbula frequentemente com apenas três escamas. As folhas e gálbulos de menores dimensões, relativamente à subsp. *badia*. Folhas com 1 a 1,5 mm de largura e gálbulos maduros que medem até 1 cm. Plantas dióicas, com folhas atenuadas ou mucronadas no ápice e com duas franjas estomáticas brancas no feixe (Castroviejo *et al.*, 1986).

#### 2.3.1.1.2. Distribuição e descrição botânica do *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*

*Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* habitam regiões xerofitas, e desenvolve-se em planícies ou encostas soalheiras em aberto, matagais ou bosques, podendo ir até aos 1.000 m de altitude. Em Portugal habitam regiões interiores da Beira Alta, Beira Baixa e Trás-os-Montes, também presentes no Ribatejo (Castroviejo *et al.*, 1986; Adams, 2004).

*Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* é uma árvore, podendo atingir 15 m de altura, com copa piramidal. Folhas aciculares e articuladas na base e gálbula frequentemente com apenas três escamas. As folhas e gálbulos de maiores dimensões, relativamente à subsp. *oxycedrus* (figura I.12). Folhas com 1,2 a 2 mm de largura e gálbulos maduros superiores a 1 cm. Plantas dióicas, com folhas atenuadas ou mucronadas no ápice e com duas franjas estomáticas brancas no feixe (Castroviejo *et al.*, 1986).



**Figura I.12** - Representação esquemática da morfologia, folha, gálbulo e semente do *Juniperus oxycedrus* Subsp. *badia*. **(a)** Ramo com gálbulos; **(b)** Folha; **(c)** Gálbulo; **(d)** semente (Adaptado de Castroviejo, 1986).

### 2.3.1.1.3. Compostos bioactivos

As espécies de *Juniperus* são utilizadas, tradicionalmente, para diversos fins, desde medicinais a culinários, entre outros. Elmastas e colaboradores (2006), demonstraram uma elevada actividade antioxidante em diversos ensaios *in vitro*, actividade essa, atribuída aos compostos fenólicos dos extractos aquosos e etanólicos.

As várias espécies pertencentes ao género *Juniperus*, representam uma fonte rica em compostos bioactivos com potencial de actividade anticancerígena. Estas apresentam catequinas, procianidinas, derivados de flavonoides, flavonas e biflavonas. Estes compostos presentes nas folhas das várias espécies de *Juniperus* demonstraram ter efeitos citotóxicos contra linhas e células cancerígenas de diferentes origens (Tavares *et al.*, 2012; Taviano *et al.*, 2013). Num estudo realizado por Moujir (2008), os extractos das folhas do *Juniperus brevifolia* demonstraram uma actividade promissora contra duas linhagens de células cancerígenas de origem epitelial, HeLa e Vero (Moujir *et al.*, 2008). A actividade de lectina, até à data, não foi estudada, não estando descrito nenhuma avaliação relativamente a este composto bioactivo.

### 2.3.1.2. *Arbutus unedo*

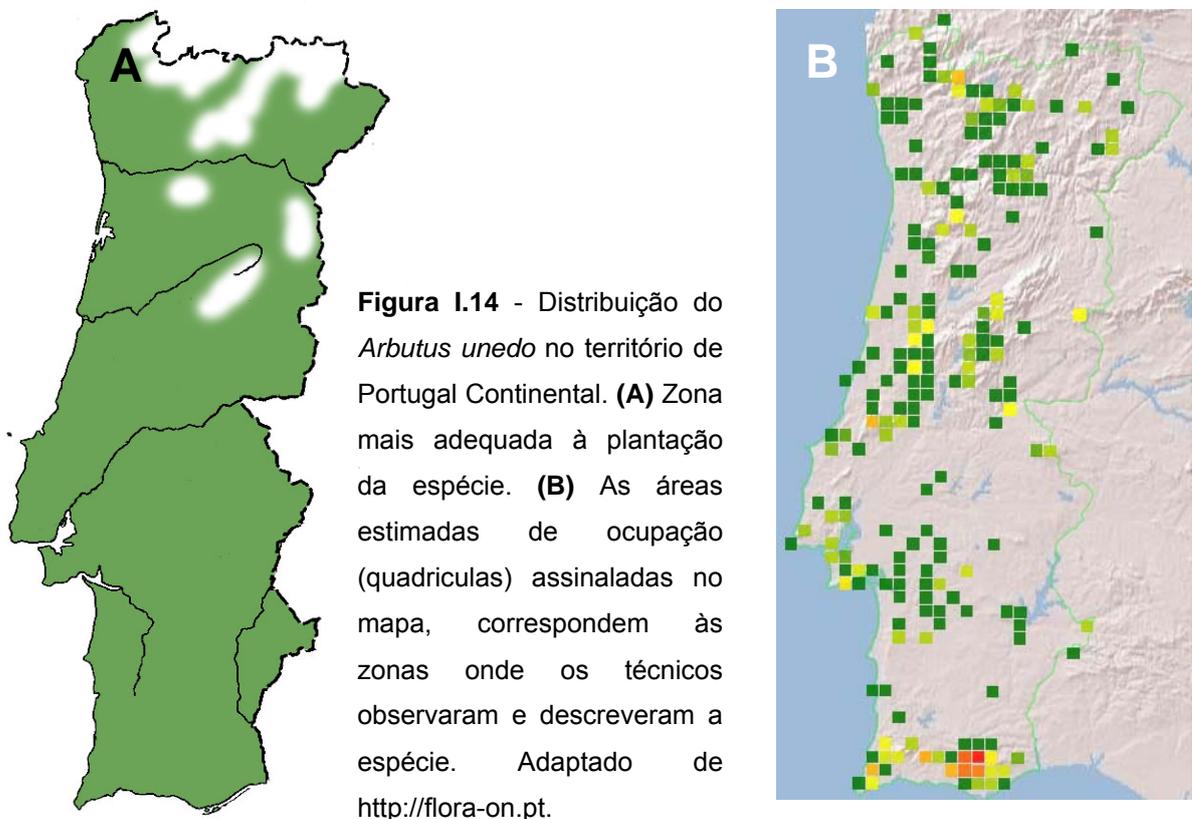
O *Arbutus unedo* é um arbusto ou pequena árvore espontânea, da família da *Ericaceae* (figura I.13.A). Sendo um dos elementos vegetais mais típicos do matorral mediterrâneo, a planta, conhecido pelo vernáculo de medronheiro, encontra-se em Portugal em quase todo o país, nos matos, bosques e pinhais, especialmente nas regiões costeiras mais quentes, com uma maior incidência no Algarve. O fruto (o medronho) possui a forma de baga, rugosa e avermelhada na maturação, ilustrado na figura I.13.C, são usados na produção de bebidas alcoólicas, compotas e gelatinas (Alarcão-e-Silva *et al.*, 2001; Pallauf *et al.*, 2008).



**Figura I.13** - *Arbutus unedo*. **(A)** Exemplar e habitat onde se desenvolve a espécie. **(B)** Folhas. **(C)** Fruto e Flor. (Adaptado de <http://www.flora-on.pt>).

### 2.3.1.2.1 Distribuição e descrição botânica

O medronheiro é uma das plantas mais comuns na bacia mediterrânea, sendo vulgar a sua ocorrência em Portugal, Espanha, França, sul de Itália e sul da Grécia, em quase todas as ilhas mediterrânicas, ilhas Canárias, Irlanda e Israel (Correia & Oliveira, 1999). É uma espécie típica dos matos e matagais mediterrânicos, podendo ser encontrada até 1200 m de altitude. O medronheiro desenvolve-se em bosques de *Quercus* e de *Pinus* ou em matos altos em mistura com outras espécies típicas do maquis mediterrânico (Prada & Arizpe, 2008). Na região do Mediterrâneo ocorrem naturalmente três espécies do género *Arbutus*: *A. unedo*, *A. andrachne* e *A. andrachnoides*, este último supõe-se que seja um híbrido entre os dois primeiros.



Relativamente a Portugal e citando Neto (2007), os medronheiros são particularmente abundantes nas colinas graníticas ou calcárias mediterrânicas, próximas do mar, como sucede na Arrábida, Grândola, Cercal, Monchique, Espinhaço de Cão, Caldeirão, Maciço Calcário Estremenho, entre outros. No Noroeste e no Nordeste montanhoso e ainda no Maciço Central, os medronhais praticamente não ocorrem, pois as baixas temperaturas invernais ultrapassam o valor mínimo de resistência da planta. No Noroeste apenas podemos vê-los em locais de solos profundos e sem geadas, nos vales do Homem, Cávado e Lima, nunca subindo muito em altitude. No Nordeste transmontano, os medronhais são frequentes nos territórios de média altitude, sobretudo associados ao vale do Douro.

Ocorrem também na Serra da Estrela, nas áreas de menor altitude (figura I.14). O medronheiro é de ocorrência rara ou inexistente nos locais mais quentes do mediterrâneo, preferindo situações mais amenas.

*Arbutus unedo* é uma espécie diploide ( $2n=26$ ), reproduz-se sexualmente por via seminal, ou vegetativamente através de rebentos de raiz (Sulusoglu *et al.*, 2011). É uma planta que pertence à Família das *Ericaceae* e género *Arbutus*. As Ericáceas são uma das famílias das dicotiledóneas constituídas maioritariamente por arbustos de folhas simples (Carvalho & Vasconcelos, 1977; Caixinhas, 1987).

O medronheiro é uma espécie perenifólia esclerófila. O hábito perenifólio é considerado como uma adaptação a ambientes pobres em nutrientes e/ou com pouca disponibilidade hídrica, devido à baixa razão recursos/perdas. As folhas do medronheiro são típicas da vegetação esclerófila, caracterizada por folhas pequenas, espessas e coriáceas. A dureza das folhas deve-se à presença de células com paredes lenhificadas que as impede de murchar em condições de secura (Alves *et al.*, 2012).



Figura I.15 - Representação esquemática da morfologia, flores e fruto do *Arbutus unedo*: (a) Ramo florido e frutificado; (b) Flor; (c) Secção longitudinal de uma flor; (d) Gineceu; (e) Estame; (f) Secção transversal de um fruto maduro (Adaptado Castroviejo *et al.*, 1993).

O medronheiro é um arbusto de folhagem persistente, de cor verde, com fortes ramificações que se dá bem em solos ácidos e, que em boas condições de vegetação, pode eventualmente atingir o porte de árvore de 5 a 6 m de altura. As folhas, alternas, persistentes, brilhantes, opostas, com haste e aspecto resistente, são de forma elíptica até forma oval invertida, quase sempre com uma pequena ponta saliente, nitidamente com nervuras, com cerca de 8 a 12 cm de comprimento (com a haste mede até 15 cm) e com 6

cm de largura. A parte superior da folha é verde escura até verde azeitona, com brilho fraco, sendo a parte inferior verde clara. A orla da folha, com base em forma de cunha é frequentemente lisa, em direcção à extremidade podendo ser mais ou menos dentada.

Os ramos são geralmente numerosos, de cor avermelhada, de casca áspera, gretada, com manchas pardo-acinzentadas (Tapum, 1980).

As flores são hermafroditas, em forma de sino, de coloração branca a cor-de-rosa escuro, com 6 a 8 mm de diâmetro, dispostas em cachos pendentes da extremidade dos ramos (Figura I.15). São auto-férteis e polinizadas por insectos. A floração dá-se, geralmente, de Outubro a Dezembro (Gratani & Ghia, 2002) e o amadurecimento dos frutos ocorre no Outono/Inverno do ano seguinte. Estes levam aproximadamente um ano a desenvolver-se, sendo vulgar encontrarem-se plantas ostentando flores e frutos simultaneamente. Florações em Maio e Junho são esporádicas e ocorrem relacionadas com o biótipo, independentemente das condições ambientais (Pinna, 2011).

#### **2.3.1.2.2 Compostos bioactivos**

Os frutos do medronheiro contêm várias classes de antioxidantes naturais, tais como, compostos fenólicos, vitamina C, vitamina E e caratenóides, que lhes conferem uma elevada capacidade antioxidante e acção quimiopreventiva através da actividade inibidora da cicloxigenase-2 (Fortalezas *et al.*, 2010). Os frutos de *Arbutus unedo* apresentam um elevado conteúdo em hidratos de carbono, proteínas, tocoferóis e flavonoides (Barros *et al.*, 2010).

Em relação às folhas, vários estudos demonstraram uma elevada quantidade de compostos fenólicos, como taninos, flavonóides e glocósidos fenólicos, assim como,  $\alpha$ -tocoferol (Males *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2011). Recentemente foi descrito ainda a presença de lectinas nas folhas de *Arbutus unedo*, sendo que, algumas amostras demonstraram ter actividade hemaglutinante em eritrócitos de coelho (Ribeiro *et al.*, 2012).

#### **2.3.1.3. *Corema album***

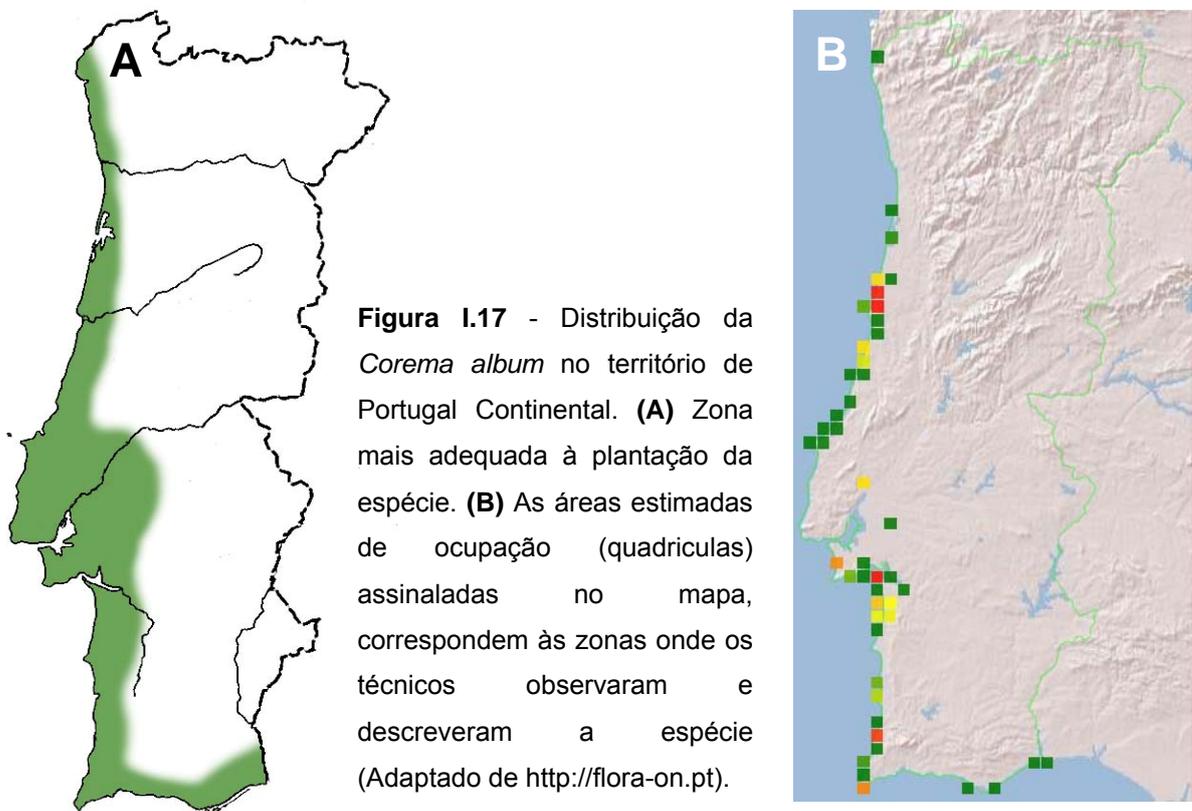
A *Corema album*, conhecida pelo vernáculo de Camarinha, é um arbusto da família *Ericaceae*, sendo uma das espécies endémicas mais características dos sistemas dunares da costa Atlântica da Península Ibérica (figura I.16.A). Os seus frutos são carnudos, bagas mais ou menos esféricas, varia entre 5 e 8 mm de diâmetro, de cor branca ou suavemente rosada, ilustrado na figura I.16.B, tradicionalmente consumidas no litoral Atlântico da Península Ibérica como antipiréticos (León-González *et al.*, 2012).



**Figura I.16 - *Corema album*.** (A) Exemplar e habitat onde se desenvolve a espécie. (B) Folha e fruto (Adaptado de <http://www.flora-on.pt>).

### 2.3.1.3.1 Distribuição e descrição botânica

O género *Corema* (*Empetraceae*) compreende duas espécies, com distribuição anfi-atlântica, a *C. album* é uma espécie endémica do oeste e sudoeste peninsular (*C. album* subsp. *album*) (Figura I.17), apresentando uma subespécie nos Açores, *C. album* subsp. *azoricum*. A outra espécie, *C. conradii*, distribui-se na costa oriental da América do Norte.



**Figura I.17 - Distribuição da *Corema album* no território de Portugal Continental.** (A) Zona mais adequada à plantação da espécie. (B) As áreas estimadas de ocupação (quadriculas) assinaladas no mapa, correspondem às zonas onde os técnicos observaram e descreveram a espécie (Adaptado de <http://flora-on.pt>).

Plantas dunares submetidas à instabilidade do solo e ventos fortes têm variação fenotípica da estrutura da canópis para resistir a estes factores ambientais e em *C. album*, a estrutura da canópis apresenta-se variável, dependendo da influência de factores ambientais locais tais como: velocidade do vento, competição com outras espécies e idade das populações e os *sex-ratios* constantes podem residir na morfologia e segregação temporal e espacial entre sexos, não obstante as diferenças no esforço reprodutivo. (Calvijo *et al.*, 2007).

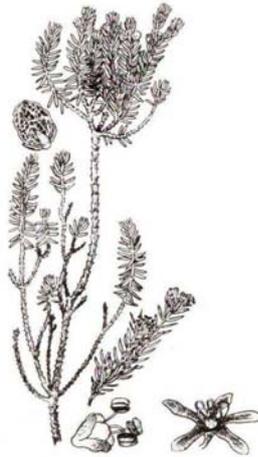


Figura 1.18 - Representação esquemática da morfologia, flores e frutos da *Corema album* (Adaptado de Polunin & Smithies, 1981).

*C. album* é um arbusto dióico (Figura I.18), com flores pequenas, com 3 sépalas e 3 pétalas. As flores masculinas com 3 estames totalmente expostos, têm um diâmetro, de antera a antera, que varia entre 2 e 8 mm, embora a corola não ultrapasse 1 mm. As flores femininas, com uma corola reduzida, têm um estilete dividido em 3 estigmas e um diâmetro que varia entre 0,5 e 3 mm (Herrera, 1988). A libertação do pólen é massiva e pode atingir um metro de altura, formando nuvens em torno das plantas o que juntamente com a ausência de estruturas atractivas caracteriza a espécie como tendo polinização anemófila.

As folhas, numerosas e pequenas, são lineares, oblongas e duras, com os bordos revirados, sendo convexas superiormente e côncavas inferiormente.

### 2.3.1.3.2 Compostos bioactivos

É uma área pouco explorada, no que concerne a compostos bioactivos na *Corema album*, tendo sido descrito apenas a sua abundância de polifenóis, principalmente nas folhas (Macedo, 2010). A actividade biológica dos ácidos fenólicos inclui inibição da proliferação das células tumorais e actividade anti-inflamatória. Assim, ao nível dos organismos, estes vão inibir a oxidação do plasma e lipoproteínas.

Com excepção de *Arbutus unedo*, e para as restantes espécies endémicas descritas no presente trabalho, não está descrito na literatura científica a existência de lectinas, pelo que esta lacuna inspirou o tema do estudo apresentado.

### 3. Objectivos do trabalho de dissertação

Todos os processos celulares envolvem proteínas e por isso, a identificação das proteínas e a caracterização da sua actividade funcional tornam-se cada vez mais importantes para perceber os processos biológicos dos seres vivos.

Este trabalho de investigação tem o objectivo de identificar novas lectinas, estabelecer a caracterização polipeptídica, a partir de extractos totais obtidos das folhas de espécies da flora endémica Portuguesa, nomeadamente *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* e *Corema album*, com a finalidade de serem utilizadas como ferramenta na detecção e ligação a epitopos glicosilados de membranas das células tumorais do cancro do cólon, da linhagem HT29, preparadas no laboratório.

Assim sendo, a presente dissertação apresenta dois objectivos principais. O primeiro consiste na identificação e caracterização de novas lectinas em extractos de folhas de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* e *Corema album*. O segundo objectivo consiste na detecção e ligação a epitopos glicosilados e avaliação da capacidade antitumoral das proteínas desses extractos.

Para concretizar os objectivos propõe-se optimização do protocolo de extracção das proteínas totais das folhas das diferentes espécies em estudo, que possam vir, potencialmente, a ser identificadas como lectinas.

Para o efeito, ir-se-á estudar e a caracterizar actividade hemaglutinante dos extractos obtidos, em grupos sanguíneos humanos e de coelho, além da especificidade de ligação aos hidratos de carbono. O estudo das proteínas glicosiladas constituintes dos extractos serão igualmente realizados.

A caracterização do perfil polipeptídico será igualmente realizada mediante géis SDS-PAGE, em condições não redutoras e redutoras (para detectar a presença de pontes dissulfureto).

Na detecção e ligação a epitopos glicosilados, ir-se-á fazer a ligação dos respectivos extractos às membranas das células HT29 (carcinoma do cólon), de modo a que, mediante um estudo proteómico com análise bidimensional (2D IEF/SDS-PAGE), se possa evidenciar os polipeptídeos dos diferentes extractos vegetais que se ligam aos receptores glicosilados da membrana das células HT29.

Para avaliar a actividade anti-tumoral das amostras em investigação realizar-se-ão ensaios de estudo de invasão celular e ensaios zimográficos para avaliação da actividade antitumoral de metaloproteinasas MMP9 e MMP2.



## Capítulo II – Caracterização do Perfil Polipeptídico de Quatro Espécies da Flora Endémica de Portugal, *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* e *Corema album*

### 1. MATERIAL e MÉTODOS

#### 1.1 Material Biológico

##### 1.1.1. Material biológico vegetal

O material biológico vegetal utilizado nos ensaios, subordinou-se às folhas de quatro espécies endémicas, designadamente, *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* e *Corema album*. As amostras, até a data dos ensaios, foram previamente congeladas em N<sub>2</sub> líquido e posteriormente armazenadas a -70 °C no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica e Engenharia Biológica do Instituto Superior de Agronomia de Lisboa.

As folhas de *Corema album*, foram colhidas na zona da Comporta, no mês de Outubro de 2010, e após acondicionamento, armazenadas a -70 °C. As amostras de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* e subsp. *badia*, provenientes da estufa do ITQB (Oeiras), foram gentilmente cedidas pelo Prof. Ricardo Boavida Ferreira. As amostras de *Arbutus unedo*, foram colhidas em época apropriada, sempre do mesmo local!

Quando ensaiadas, as folhas foram removidas manualmente dos caules da planta, excepto no caso de *Arbutus unedo*, em que as folhas foram removidas dos caules no momento da colheita.

##### 1.1.2. Material biológico humano

Para determinação da actividade hemaglutinante, os ensaios realizaram-se com amostras de sangue humano do grupo ARH+, ARH-, BRH- e ORH-, cedidas por voluntários de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 20 e 50 anos, sem patologias diagnosticadas no último ano civil, sendo colhidas em condições de segurança para o dador e efectuadas por profissionais de saúde habilitados para o efeito e em local apropriado.

## 1.2. Métodos

Os métodos utilizados foram criteriosamente seleccionados e ajustados ao objectivo pretendido. Antes do início dos ensaios foi verificado, para todos os materiais e equipamentos necessários à técnica adoptada, a conformidade com os requisitos de funcionamento (validação, verificação e ajustamento).

As soluções tampão foram preparadas em água bidestilada obtida por um sistema Milli-Q A10 da Millipore (Billerica, MA, USA). Os valores de pH das soluções foram ajustado recorrendo-se a soluções de ácido ou base de concentração variada, usando-se um medidor de pH da marca Crison micropH 2001 (Barcelona, Espanha).

### 1.2.1 Análise do perfil polipeptídico

#### 1.2.1.1. Obtenção dos extractos de proteínas totais de folhas

Em estudos de proteómica, uma preparação eficaz da amostra, ou seja, uma elevada rentabilidade na extracção de proteínas proveniente de uma célula, tecido, órgão ou organismo, é um passo de imensurável importância para o sucesso da subsequente separação, purificação e identificação das proteínas (Park, 2004). Logo, a optimização do processo de extracção proteica para o órgão estudado, revela ser a etapa principal para obtenção de um bom rendimento, em termos quantitativos, além de uma maior variabilidade de bandas de polipeptídeos, de forma, a maximizar o número de proteínas presentes na amostra (Silva & Souza, 2009), tornando-a representativa daquele extracto.

O material biológico vegetal em estudo foi inicialmente pesado, em balança electrónica (Mettler Toledo, PB1502), seguindo-se a sua pulverização em almofariz de porcelana com utilização de N<sub>2</sub> líquido, de modo a facilitar a fragmentação dos tecidos.

A extracção de proteína total das folhas das espécies *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Corema album* executou-se segundo o método descrito por Jacobs (1999), e para a espécie *Arbutus unedo*, segundo o método descrita por Santos & Sousa (2009), após sua optimização.

##### 1.2.1.1.1. Método de extracção com tampão de Jacobs

A extracção total de proteínas de folha do *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e da *Corema album*, foram realizados segundo o método descrito em Jacobs *et al.*, 1999.

### **Procedimento**

Após a obtenção das amostras pulverizadas com N<sub>2</sub> líquido, estas foram homogeneizadas com PVPP, Polivinilpolipirrolidona (Sigma-Aldrich), numa proporção de 500 mg para 1 g de material vegetal, tendo sido adicionado um comprimido de cocktail de inibidores de proteases, sem EDTA (Roche), por cada 10 ml de tampão de extracção Tris-HCl 350 mM, pH 8,0, contendo 11mM dietilcarbarmato de sódio e 15 mM cisteína.

Adicionou-se faseadamente, ao pó homogeneizado, 1 ml de tampão de extracção, até perfazer o volume total, na relação de 10 ml por 1 g de material vegetal, procedendo à maceração do pó entre cada aplicação. Quando necessário, adicionou-se mais tampão de extracção, até se atingir um homogenato de consistência desejada.

O homogenato obtido foi filtrado em tela Miracloth (Calbiochem) e posteriormente, foi sujeito a uma centrifugação a 18.000 x g, durante 15 minutos, a +4 °C (centrífuga Beckman J2 – 21M/E, rotor JA 20.000), tendo-se rejeitado o sedimento no final.

Posteriormente, procedeu-se à dessalinização do sobrenadante em colunas PD10 (GE Healthcare), com matrix Sephadex G-25 Medium, previamente equilibradas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Os eluídos obtidos no mesmo tampão foram reunidos, homogeneizados, aliquotados e armazenados a – 80°C, de forma a serem utilizados nos ensaios subsequentes.

No final de cada ensaio fez-se a regeneração da coluna com lavagens intercaladas, por cinco vezes cada, de duas soluções: 1ª solução contendo 1% (v/v) Triton X-100; 2ª solução contendo 2 M NaCl. Entre cada lavagem diferenciada, fez-se lavagem com água destilada, ficando, por último a coluna equilibrada em água.

#### **1.2.1.1.2. Método de extracção com tampão contendo glicerol a 5% e triton a 1%**

A extracção de proteína total de folha do *Arbutus unedo*, foi realizado segundo um método de extracção com tampão contendo glicerol a 5% (v/v), segundo a metodologia descrita em Silva e Sousa, 2009. Este método tem um poder de extracção maior que o método de Jacobs, por conter na sua solução um detergente, o Triton X-100, que dissolve as membranas das células e solubiliza as proteínas, mantendo a sua conformação nativa. A concentração de triton original de 4% (m/v) foi modificada para 1% (m/v) de modo a evitar lise celular em determinados ensaios (ver: determinação de actividade hemaglutinante e inibição de actividade hemaglutinante).

### **Procedimento**

Após a obtenção de um pó por meio da pulverização com N<sub>2</sub> líquido, homogeneizou-se com PVPP, Polivinilpolipirrolidona (Sigma-Aldrich), numa proporção de 500 mg para 1 g de material vegetal, sendo adicionado um comprimido de cocktail de inibidores de proteases sem EDTA (Roche), por cada 10 ml de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 5% glicerol (v/v), 100 mM KCl e 1% Triton X-100 (m/v). O EDTA é uma substância quelante de cátions bivalentes, como Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, inibindo a acção de metaloproteases (Sambrook et al., 1989), de qualquer modo e uma vez que estes cátions bivalentes são necessários à actividade das lectinas, decidimos eliminar o EDTA.

Às amostras adicionou-se faseadamente 1 ml de tampão de extracção, até perfazer o volume total, na relação de 10 ml por 1 g de material vegetal, procedendo à maceração homogénea do pó entre cada aplicação.

O homogenato obtido foi filtrado em tela Miracloth (Calbiochem), posteriormente, o filtrado foi sujeito a uma centrifugação a 14.000 x g, durante 30 minutos, a +4 °C (centrífuga Beckman J2 – 21M/E, rotor JA 20.000). Após centrifugação rejeitou-se o sedimento.

Posteriormente, procedeu-se à dessalinização do sobrenadante em colunas PD-10 (GE Healthcare), com matrix Sephadex G-25 Medium, para tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, segundo procedimento descrito anteriormente (ver ponto 1.2.1.1.1. do Capítulo II). Os eluidos obtidos foram reunidos, homogeneizados, aliquoteados e armazenados a -80 °C, de forma a poder ser utilizados nos ensaios subsequentes.

No final de cada ensaio fez-se a regeneração das colunas com PD10.

#### **1.2.1.2. Determinação do teor proteico total pelo Método de Bradford**

Para a quantificação do teor proteico utilizou-se o Método de Bradford (Bradford, 1976).

O Método de Bradford é um ensaio colorimétrico que envolve a interacção do corante Azul Brilhante de Comassie G250, dissolvido em ácido fosfórico e metanol (Reagente de Bradford), e a cadeia lateral básica ou aromática dos aminoácidos, promovendo uma coloração azul pela estabilização da forma aniónica do corante, sendo mais intensa quanto maior for a quantidade de proteína presente na amostra. Esta mudança de coloração pode ser quantificada pela medição da absorvência a um comprimento de onda de 595 nm, permitindo desta forma determinar a concentração proteica. Este ensaio é altamente reprodutível e rápido (Bradford, 1976).

### **Procedimento**

Determinou-se o teor proteico, mediante a realização de uma curva de calibração, usando microplacas (da Greiner), de 96 poços, com fundo em U.

Para a quantificação da concentração proteica, é necessário construir uma curva de calibração relacionando a quantidade de Albumina de Soro Bovino (BSA), proteína padrão, com as respectivas absorvências lidas num espectrofotómetro (Software KinetiCalc – KC 4), a 595 nm.

i. Determinação da Curva de Calibração: Concomitante à análise do teor proteico das amostras elaborou-se uma curva de calibração com solução crescente de BSA, de concentração compreendida entre 0 e 25 µg, em triplicado, sendo adicionado a cada poço água bidestilada (Milli-Q Plus), de modo a perfazer um volume total de 20 µl.

ii. Determinação do Teor Proteico das amostras: As amostras foram testadas de igual forma, em triplicado, ensaiando 10 e 20 µl de todos os extractos totais de folha de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Corema album* e *Arbutus unedo*, adicionando-se água destilada, quando necessário, de modo a perfazer um volume total de 20 µl.

Após decorridas as fases i e ii, foi adicionado 200 µl do reagente de Bradford (BioRad) em cada poço, seguindo-se a incubação da placa durante 15 minutos, na ausência de luz, para posterior leitura em espectrofotómetro a 595 nm. A determinação da concentração proteica fez por interpolação com a curva de calibração.

#### **1.2.1.3. Separação de proteína por electroforese**

As moléculas biológicas, nomeadamente proteínas e ácidos nucleicos, devido às características individuais dos seus monómeros, são providas de carga eléctrica. Esta carga é condicionada pelo meio em que as moléculas se encontram, fisiológico ou não, nomeadamente pela concentração de iões H<sup>+</sup> (Plummer, 1987). A electroforese utiliza esta propriedade para promover a separação das moléculas ao longo de um meio sólido, fazendo uso do princípio que uma partícula carregada electricamente, sob o efeito de uma diferença de potencial, se move no sentido do pólo de carga contrária à sua. Esta é uma técnica de grande importância para a separação de moléculas biológicas uma vez que, para além de ser extremamente sensível a pequenas diferenças na carga da molécula, normalmente não afecta a estrutura nativa da mesma (Robyt *et al.*, 1990).

De forma a separar as proteínas do extracto total das espécies em estudo, para posterior caracterização, realizaram-se separações electroforéticas em géis de

poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Esta técnica baseia-se nas propriedades anfotéricas das proteínas e numa separação proteica por massa molecular.

As proteínas são sujeitas a um campo eléctrico, a sua mobilidade, do cátodo para o ânodo, vai depender em primeira instância da sua carga e do seu tamanho, pelo que, uma migração de acordo com a sua massa molecular, implica que todas as proteínas tenham uma razão densidade de carga/massa semelhante. Isto é conseguido pela adição de agente desnaturantes à amostra como SDS (detergente aniónico), o qual vai conferir uma carga global negativa às proteínas.

O SDS tem a capacidade de formar um forte complexo SDS/proteína devido às suas características apolares, ligando-se de forma micelar às regiões apolares da proteína, e ficando a sua zona iónica exposta ao solvente (Robyt *et al.*, 1990). A ligação do SDS à proteína promove dois efeitos distintos, a dissociação dos oligómeros proteicos e a disrupção da estrutura secundária da proteína. Além disso, a saturação da proteína com SDS leva à camuflagem da carga proteica, passando a migração no gel a ser totalmente dependente da sua massa molecular (Plummer, 1987). O uso do  $\beta$ -mercaptoetanol promove a redução de possíveis ligações persulfureto (Robyt *et al.*, 1990).

Realizaram-se dois tipos de electroforeses, nomeadamente PAGE desnaturante e não redutor (SDS-PAGE NR) e PAGE desnaturante e redutor (SDS-PAGE R), segundo a metodologia descrita em Santos *et al.*, 1997.

#### **1.2.1.3.1. SDS-PAGE NR e SDS-PAGE R**

A electroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) foi desenvolvida segundo o método de Laemmli, 1970. O sistema praticado foi linear, o gel de separação foi constituído por uma matriz de acrilamida de 17,5% (m/v), bisacrilamida 0,1% (m/v), tampão Tris-HCl 375 mM pH 8,8, persulfato de amónio (PSA) 0,03% (m/v), Tetrametiletilenediamina (TEMED) 0,03% (v/v). Para o gel de concentração, constituído por uma matriz de acrilamida de 5% (m/v), bisacrilamida 0,13% (m/v), tampão Tris-HCl 125 mM pH 6,8, persulfato de amónio (PSA) 0,1% (m/v), Tetrametiletilenediamina (TEMED) 0,05% (v/v), sendo utilizados normalmente géis de 16 cm x 18 cm x 0,75 mm.

O gel de concentração posiciona-se sobre o gel de separação e serve para homogeneizar a frente electroforética, ou seja, de forma que as proteínas com maior massa molecular e também as de menor massa molecular migrem ao mesmo tempo para o gel de separação. O gel de separação tem uma concentração maior em acrilamida, para que a separação das proteínas se torne mais efectiva (Bienvenut, 2005).

## Procedimento

Após a montagem do sistema vertical e verificado a sua selagem, adicionaram-se as soluções constituintes dos géis, com auxílio de uma micropipeta. Aplicou-se inicialmente o gel de separação até 2 cm do topo do vidro, o qual foi coberto com uma fina camada de butanol, evitando-se a formação de bolhas de ar indesejáveis à superfície de modo a favorecer polimerização uniforme. Após polimerização retirou-se todo o butanol do sistema vertical, adicionando, em seguida, o gel de concentração, após se ter inserido o pente no molde, para formar os poços de enchimento. Os géis, após polimerização, foram colocados na tina de electroforese (HOEFER SE 600 Ruby da Amersham Biosciences), adicionando-se a solução tampão de electroforese (200 mM Glicina, 25 mM Tris-Base, 0,02% (m/v) SDS), de modo a cobrir os electrodos.

Aos extractos de proteína totais para SDS-PAGE não redutor (NR), foi adicionado tampão de amostra, constituído por Tris-HCl 80 mM, pH 6,8, 2% (m/v) SDS, 15% (m/v) glicerol e 0,01% (v/v) m-cresol púrpura. Em condições redutoras, SDS-PAGE redutor (R), o tampão de amostras continha 100 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol. De acordo com o teor proteico da amostra, estas aplicaram-se directamente ou nas amostras de baixo teor proteico foi necessário realizar-se uma precipitação da proteína pela acetona (1  $\mu$ l de extracto : 4  $\mu$ l de acetona), durante 30 minutos, a -20 °C, seguido de centrifugação (Microcentrifuga VWR CT 15RE), a 21.500 x g durante 10 minutos, a +4 °C, o pellet contendo o teor proteico desejado, foi solubilizado no tampão de amostra pretendido, com auxílio do vórtex, até ficar completamente dissolvido. A mistura colocada em microtubo, foi introduzida em banho-Maria fervente (100 °C), durante 4 min, para desnaturação, seguindo-se a sua aplicação directamente no gel SDS-PAGE ou conservou-se a -80 °C.

Antes de iniciar a corrida electroforética, paralelamente às amostras, depositaram-se 3  $\mu$ l de marcador de peso molecular (BioRad), compreendido entre 10 a 259 kDa. O gel foi sujeito durante a corrida a uma corrente eléctrica de 70 miliamperes (mA) e uma diferença de potencial de 220 V (Pharmacia Gene Power Supply EPS 600), por unidade de gel. Finalizou-se a corrida quando o azul de bromofenol (marcador da linha da frente), atingiu o final do gel. Todo o equipamento utilizado para a realização da electroforese, como tinas, fonte de alimentação, suporte para géis, foi adquirido à Pharmacia.

### 1.2.1.4. Detecção de polipéptidos em gel de poliacrilamida

As técnicas de detecção de proteínas aplicadas nos géis de electroforese devem possuir alguns requisitos básicos, tais como, alta sensibilidade e boa reprodutibilidade.

De acordo com o objectivo, as necessidades e a quantidade proteica disponível, assim se elegeu o método qualitativo e quantitativo de detecção proteica, não desprezando os requisitos que devem ser preenchidos na quantificação das proteínas num gel, tais como: as bandas/spots proteicas deverão estar satisfatoriamente resolvidas; o corante dever-se-á ligar às proteínas de interesse; quando da comparação da amostra com outras, a ligação do corante deverá ser constantemente proporcional à quantidade proteica dentro dum mesmo intervalo.

Após a separação electroforética das proteínas nas suas subunidades, por SDS-PAGE, os géis foram sujeitos à técnica de coloração por nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), de modo, a se evidenciarem as bandas/spots correspondentes às cadeias polipeptídicas. Na generalidade, as técnicas existentes de coloração pelo  $\text{AgNO}_3$  são cerca de 100 vezes mais sensíveis que as técnicas de coloração pelo Coomassie Brilliant Bleu R 250.

#### **1.2.1.4.1. Coloração pelo Nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ )**

O método da coloração por nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) baseia-se na capacidade que as proteínas possuem para se ligarem aos iões de prata ( $\text{Ag}^+$ ). Supõe-se que a complexação dos iões  $\text{Ag}^+$  com os grupos amina, ocorre num ambiente alcalino e na presença de enxofre dos resíduos de cisteína e metionina (Patel *et al.*, 1988).

O princípio da coloração com prata, é semelhante à obtenção de uma fotografia. A matriz do gel com as proteínas separadas é saturada com os iões  $\text{Ag}^+$ . Estes iões vinculam-se preferencialmente a aminoácidos com características básicas de proteínas na superfície da matriz do gel e os iões que não se ligam a nenhum aminoácido, têm de ser removidos. As proteínas ficam visíveis, quando os iões  $\text{Ag}^+$  são reduzidos ao seu estado elementar Ag e as proteínas coradas desenvolvem a típica cor acastanhada (Wait *et al.*, 2000).

#### **Procedimento**

Para a coloração do gel de poliacrilamida por  $\text{AgNO}_3$ , aplicou-se o método de Blum *et al.*, 1987.

O processo de coloração iniciou-se por imersão do gel numa solução de fixação (50% (m/v) metanol, 12% (m/v) ácido acético e 0,02% (v/v) de formaldeído) e colocou-se sobre um agitador orbital com baixa agitação, durante 20 min, não havendo inconveniente de se desenvolver “*overnight*”.

Descartou-se a solução de fixação e lavou-se o gel três vezes, durante 10 minutos cada, com solução de lavagem em 50% (v/v) de etanol.

Retirada a solução de lavagem, realizou-se um pré-tratamento, durante 1 min, por imersão do gel numa solução de hipossulfito de sódio 0,02% (m/v), após o qual se lavou o gel com água destilada, 3 vezes, durante 20 segundos cada.

Adicionou-se a solução corante (11 mM AgNO<sub>3</sub>, 0,03% (v/v) formaldeído), permitindo o contacto com o gel durante 10 minutos, lavando-se em seguida duas vezes com água destilada, durante 20 segundos cada, após as quais se procedeu à adição da solução de revelação (566 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,02% (v/v) formaldeído, 16 µM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> . 5 H<sub>2</sub>O) durante o período de tempo necessário para o aparecimento das bandas/spots, o que poderá demorar até 10 min.

No final da reacção de coloração, procedeu-se a nova lavagem com água destilada, duas vezes de 2 minutos cada, e imergiu-se o gel em solução de paragem (50% (v/v) metanol, 12% (v/v) ácido acético) durante 5 min, tempo mínimo para parar a reacção.

Por fim, o gel é lavado em metanol a 50% (v/v), num tempo não inferior a 20 min, podendo permanecer nesta solução algum tempo, até ser conservado.

Exceptuando nas lavagens com água destilada, as restantes fases decorreram em agitador orbital com baixa agitação, à temperatura ambiente.

### **1.2.2. Determinação do carácter glicosídico dos extractos de proteína totais**

O ensaio é utilizado como valioso recurso na caracterização dos extractos de proteínas totais na identificação de proteínas glicosiladas. Para que a detecção seja bem sucedida é necessário, em primeiro lugar, a obtenção de um perfil proteico onde as proteínas são separadas com elevada resolução, de acordo com o seu tamanho, através de SDS-PAGE R. Depois de separadas são transferidas para uma matriz de transferência, como suporte para a detecção das proteínas imobilizadas.

#### **1.2.2.1. Imobilização de Proteínas para glicodetecção em membrana de nitrocelulose**

A matriz de transferência utilizada foi uma membrana de nitrocelulose (Protran BA83) com poros de 0,2 µm. Esta membrana possui grupos nitro ligados à celulose produzindo desta forma um suporte com alta afinidade para proteínas, fazendo com que estas permaneçam ligadas à sua superfície. Para transferir a proteína do gel para a membrana, após eletroforese, utiliza-se um campo elétrico (mesmo princípio da eletroforese), que varia de acordo com a espessura e malha do gel.

### **Procedimento**

Após finalizada a corrida electroforetica, o gel SDS-PAGE R de 0,75 mm de espessura foi colocado a equilibrar, durante 15 min, em tampão de transferência (Tris base 48 mM, pH 8,3, 39 mM Glicina, 20% (v/v) Metanol, 0,04% (m/v) SDS). Paralelamente, incubou-se no mesmo tampão durante 10 min., a membrana de nitrocelulose e oito folhas de papel 3MM, recortadas previamente com as medidas idênticas ao gel.

Decorrida a incubação, colocaram-se 4 folhas de papel 3MM no eléctrodo positivo do aparelho de transferência (Trans-Blot, Semi-Dry transfer Cell – BioRad), retiraram-se as bolhas de ar existentes com ajuda de um tubo de vidro. Colocou-se de seguida a membrana e sobrepôs-se o gel, cada camada foi cuidadosamente pressionada de modo a retirar as bolhas de ar que eventualmente pudessem diminuir o contacto entre o gel e a membrana. Por último, colocou-se mais 4 folhas de papel 3MM, de modo a formar uma “sanduíche”.

Colocou-se o eléctrodo superior no aparelho e fechou-se o equipamento. Efectuou-se a transferência com uma diferença de potencial de 15 V, sem limite de amperagem, durante 1 hora e 15 min.

Terminado a electrotransferência imergiu-se a membrana de nitrocelulose numa solução de fixação (10% (v/v) ácido acético, 25% (v/v) isopropanol) e colocou-se no agitador orbital com baixa agitação, durante 5 min. Descartou-se a solução de fixação e lavou-se com água destilada durante 1 min. Os polipéptidos fixados à membrana foram corados em solução Ponceau S (0,1% (m/v) Ponceau S, 2,5% (v/v) ácido acético) (Schleicher & Schuell), durante 5 min. Após lavagem, em H<sub>2</sub>O bidestilada, do excesso de corante, pode avaliar-se a eficiência da transferência e, dar continuidade ao protocolo de glicodeteccção.

#### **1.2.2.2. Detecção de glicoproteínas imobilizadas na membrana de nitrocelulose**

A diferenciação das proteínas glicosiladas imobilizadas em membrana de nitrocelulose, fez-se segundo a metodologia proposta por Faye & Chrispeels, 1985.

Diferentes amostras foram ensaiadas para detecção de polipeptídeos glicosilados.

### **Procedimento**

Após conclusão da electrotransferência realizou-se a fixação prévia das proteínas à membrana, de acordo com o ponto 1.2.2.1, prosseguindo o ensaio com a lavagem da membrana, durante 1 min, em TBS (Tris 20 mM, pH 7,4, 0,5 M NaCl). Retirada a solução de lavagem, bloqueou-se a membrana em TTBS (TBS, 0,1% (m/v) Tween-20), durante 1 hora.

Concluído a etapa de bloqueio, iniciou-se a incubação da membrana com concanavalina A (Con A), 25 µg / mL, em TTBS e SAIS (TTBS, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>), durante 1 hora, após o qual se lavou a membrana 4 vezes, com tampão TTBS e SAIS, durante 10 min cada, após as quais se procedeu à incubação com peroxidase, 50 µg/mL, em TTBS e SAIS, durante 1 hora.

Antes da fase de coloração, realizou-se ainda uma serie de 4 lavagens da membrana, durante 10 min cada, com tampão TTBS e SAIS, finalizando, antes da coloração, com uma nova lavagem, durante 5 min, com TBSS (5 mL TBS, 5 µL CaCl<sub>2</sub> 1 M e 5 µL MgCl<sub>2</sub> 1 M). Por fim, foi adicionado a solução de corante composta por 0,05% (m/v) de cloronaftol, dissolvido em 16,6% (v/v) de metanol, 83,3% (v/v) de TBSS e 0,1% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%.

Esperaram-se, alguns minutos, para a revelação dos resultados.

### **1.2.3. Pesquisa de proteínas com actividade hemaglutinante**

#### **1.2.3.1. Determinação da actividade hemaglutinante**

Os grupos sanguíneos são definidos por antigénios (glicoproteínas e glicolípidos) presentes na membrana celular dos eritrócitos. Estes marcadores genéticos são específicos da espécie e variam na imunogenicidade. Um conjunto de dois a vários alelos num locus, constitui o sistema sanguíneo (Giger *et al.*, 2005).

O termo geral utilizado para descrever a aglomeração visível de eritrócitos é hemaglutinação. As lectinas possuem a destreza de induzir o fenómeno de aglutinação celular e a presença desta família é detectada através de ensaios de hemaglutinação (Kennedy *et al.*, 1995).

Muitas lectinas reconhecem diferenças entre antígenos de grupos sanguíneos. No grupo sanguíneo AB0, lectinas isoladas de *Dolichos biflorus*, *Vicia villosa*, *Helix pomatis* potencialmente reconhecem o grupo A, outras como a de *Griffonia simplicifolia* I aglutinam grupo B e *Ulex europaeus* I reconhece os grupos B e 0 (Matsui *et al.*, 2001).

As amostras de extractos de Proteínas totais das quatro espécies em estudo, foram sujeitas a ensaios de aglutinação com grupos sanguíneos humanos do tipo AB0, realizados em solução de eritrócitos humanos a 4% (v/v).

##### **1.2.3.1.1. Sistema AB0 Humano**

O sistema AB0 baseia-se na ocorrência de anticorpos naturais (isoaglutininas) contra os antigénios A e B dos grupos sanguíneos expressos em eritrócitos. Os anticorpos só se desenvolvem contra antigénios não expressos por eritrócitos do hospedeiro: o grupo A tem a

presença exclusiva de antigénios A e anticorpos Anti-B; trata-se do grupo B, quando apenas existe antigénios B e anticorpos Anti-A; os indivíduos de tipo AB, apresentam antigénios A e B e não apresentam qualquer anticorpo e, nos indivíduos do grupo 0, não apresentam antigénios nos eritrócitos, e têm ambos os anticorpos Anti-A e Anti-B presentes no soro (Caquet, 2004).

#### **1.2.3.1.1.1. Preparação da suspensão de eritrócitos humanos**

As amostras de sangue humano do grupo ARH+, ARH-, BRH- e 0RH+, cedidas por voluntários de ambos os sexos com idades compreendidas entre os 20 e 50 anos, foram colhidas em condições de segurança para o dador e executadas por profissionais de saúde habilitados. Foi garantido a preservação e a qualidade da amostra, pelo facto do ensaio ter sido iniciado, imediatamente a seguir à colheita de sangue.

##### **Procedimento**

Colheu-se, para um tubo de hemogramas com anticoagulante (citrato de sódio), 5 mL de sangue. Fez-se uma prévia centrifugação 1.100 x g, durante 6 min, a +13 °C, com o objectivo de separar os elementos figurados (sedimento) do respectivo plasma (sobrenadante). Seguiu-se uma sequência de três lavagens do sedimento, com soro fisiológico (0,9% (m/v) de NaCl), numa relação de 40 mL de soro fisiológico para 5 mL de sangue, por centrifugação a 1.100 x g, durante 6 min, a +13 °C, rejeitando-se entre cada lavagem o sobrenadante, de modo a separar os eritrócitos (sedimento).

O sedimento (eritrócitos) resultante das lavagens, que ocupa um volume de aproximadamente de 4 mL, foi ressuspenso em 96 mL de soro fisiológico, resultando numa solução eritrocitária a 4% (v/v). Em todas as etapas de lavagem, houve um cuidado extremo na rejeição do sobrenadante, de modo, a preservar o sedimento intacto no fundo dos tubos de centrifuga.

A solução eritrocitária obtida foi dividida em volumes menores e conservados a +4 °C para posterior utilização nos ensaios de hemaglutinação. A solução eritrocitária considerou-se dentro da validade, enquanto não apresentou hemólise eritrocitária.

#### **1.2.3.1.1.2. Preparação da suspensão de eritrócitos de coelho**

Ensaíram-se os extractos proteicos das quatro espécies em estudo frente a uma solução de eritrócitos de coelho a 4% (v/v).

### **Procedimento**

Colheu-se, por ponção cardíaca e para um tubo de hemagrama com anticoagulante (citrato de sódio), 5 mL de sangue de coelhos.

Fez-se uma prévia centrifugação, seguida de três lavagens como descrito no procedimento do ponto 1.2.3.1.1, do Capítulo II.

O sedimento (eritrócitos) resultante das lavagens, que ocupa um volume de aproximadamente de 4 mL, foi ressuspenso em 96 mL de soro fisiológico ao qual se adicionou tripsina (Sigma) na concentração final de 0,1% (m/v). Incubou-se 1 h, a 37 °C, com agitação.

Fez-se nova centrifugação, 1.100 x g, durante 6 minutos, para remoção do sobrenadante, e procedeu-se, como descrito no ponto 1.2.3.1.1, do Capítulo II, a três novas lavagens. Por fim, os eritrócitos sedimentados, foram resuspenso em 96 mL de soro fisiológico, ficando-se com uma solução eritrócitos a 4% (v/v).

A solução eritrocitária obtida foi dividida em volumes menores e conservados a +4 °C para posterior utilização nos ensaios de hemaglutinação. A solução eritrocitária considerou-se dentro da validade, enquanto não apresentou hemólise eritrocitária.

#### **1.2.3.1.3. Ensaio de hemaglutinação**

A actividade hemaglutinante foi determinada pelo método de diluição seriada em microplacas (microdiluição). Neste ensaio é feita uma diluição seriada dos extractos de proteínas totais, provenientes das amostras em estudo, numa progressão geométrica de razão 3, seguindo-se a incubação com eritrócitos humanos.

A actividade hemaglutinante foi expressa em Unidade Hemaglutinante (U.H.), considerando-se como a mínima concentração de proteína que ainda manifesta actividade hemaglutinante sobre o eritrócito. Determina-se pela razão entre a concentração da proteína total ensaiada e  $3^n$ , sendo n, igual à última diluição efectuada onde ainda exhibe actividade hemaglutinante.

### **Procedimento**

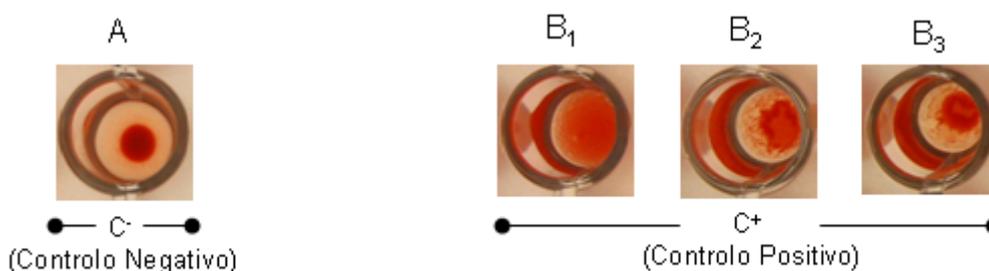
O ensaio foi realizado em microplaca (Greiner), de 96 poços, com o perfil do fundo em U. Em cada poço da placa depositou-se, em número igual as diluições que se pretende fazer, um volume de 50 - 70 µL de soro fisiológico. Seguiu-se a deposição de 50 - 70 µL de amostra, contendo 50 - 100 µg de proteína, no primeiro poço e iniciou-se a diluição seriada na razão de 1 para 2 (1:2) em soro fisiológico, a partir do segundo poço. Por último,

depositaram-se 50 - 70  $\mu$ L da solução eritrocitária a 4 % (v/v), em todos os poços, ficando a proteína diluída na razão de 1 para 3 (1:3).

Para validar os resultados obtidos foi efectuado um controlo negativo (C<sup>-</sup>), com soro fisiológico, e um controlo positivo (C<sup>+</sup>), com Con A, na concentração de 500  $\mu$ g / mL.

Concluídas as diluições das amostras e aplicação das soluções do ensaio, incubou-se a microplaca, sem agitação, a 37 °C, durante 30 min. A leitura dos resultados, por comparação com o controlo positivo e negativo, realizou-se decorrido 30 min.

Um resultado negativo (C<sup>-</sup>), revela-se pela formação de um núcleo de precipitação de eritrócitos, rodeado de um sobrenadante, transparente e incolor. Um resultado positivo (C<sup>+</sup>), manifesta-se pela aderência dos eritrócitos ao fundo da placa, formando um revestimento e não se revelando, por vezes, sobrenadante, mas podendo ainda apresentar uma certa retracção do revestimento eritrocitário, como ilustra a figura II.1.



**Figura II.1** - Padrões de aglutinação eritrocitária. **(A)** Na ausência de hemaglutinação ocorre sedimentação eritrocitária (Controlo Negativo), **(B)** Há aderência dos eritrócitos ao fundo do poço da placa, ocorrendo hemaglutinação. B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> ilustram diferentes manifestações de hemaglutinação (Controlo Positivo).

### 1.2.3.2. Determinação da inibição da actividade hemaglutinante pelos hidratos de carbono

A definição da especificidade glicosídica da lectina pode ser feita por ensaios da inibição da actividade hemaglutinante com diferentes monossacáridos e polissacáridos (Sharon & Lis, 1990).

Os testes de especificidade aos hidratos de carbono, realizaram-se conforme descrito por Ribeiro *et al.*, 2012. Incubaram-se 4 unidades hemaglutinantes (U.H.) da proteína testada, com uma bateria de 12 hidratos de carbono, cada um deles diluído na razão de 1 para 3 (1:3). Os hidratos de carbono utilizados no ensaio (fornecidos pela Sigma com excepção dos indicados), numa concentração de 0,1 M, foram os seguintes: glucose; *N*-

acetil-D-glucosamina; galactose; galactosamina; manose; rafinose; fucose (0,3 M); melezitose; metil- $\alpha$ -glucopiranosido; metil- $\alpha$ -manosido; sacarose; ácido *N*-acetilneuramínico.

### **Procedimento**

O ensaio foi realizado em microplaca (Greiner), de 96 poços, com o perfil do fundo em U, onde se começou por depositar em cada poço da microplaca e em número igual às diluições que se pretendeu realizar, um volume de 70  $\mu$ L de soro fisiológico. Seguiu-se a diluição seriada do açúcar, na proporção de 1:2, num volume de 70  $\mu$ L, tantas vezes, quantas as diluições que se pretenderam testar. Concluída a diluição, efectuou-se a deposição de 70  $\mu$ L de amostra em teste, contendo 4 x U.H. de proteína e incubou-se durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Concluída a primeira incubação, seguiu-se a deposição de 70  $\mu$ L da solução de eritrócitos a 4 % (v/v) em todos os poços, ficando o hidrato de carbono diluído de 1:3. Deixou-se a incubar, novamente, durante 1 hora a temperatura ambiente. Em paralelo realizou-se um C<sup>+</sup>, com Con A (500  $\mu$ g / mL), e um C<sup>-</sup>, com soro fisiológico.

Um resultado positivo, idêntico ao C<sup>-</sup>, revela-se pela formação de um núcleo de precipitação de eritrócitos, rodeado de um sobrenadante, transparente e incolor. Houve inibição da hemaglutinação, significando para determinado açúcar, que este, se ligou à proteína, revelando especificidade, ficando esta incapaz de se ligar aos receptores glicosilados dos eritrócitos. Para os açúcares que provocaram inibição de hemaglutinação, determinou-se a concentração mínima de hidratos de carbono que ainda provoca 100% de inibição da aglutinação, concentração mínima de inibição (c.m.i.).

Um resultado negativo, idêntico ao C<sup>+</sup>, manifesta-se pela aderência dos eritrócitos ao fundo da placa, formando um revestimento, indicando que a proteína não se ligou ao açúcar, não revelando especificidade, ficando disponível para aglutinar eritrócitos.

## **2. RESULTADOS e DISCUSSÃO**

### **2.1. Análise do perfil polipeptídico do *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* e *Corema album***

#### **2.1.1. Extração de proteínas totais de folhas**

Alguns procedimentos são essenciais na optimização das condições de extracção de proteína e devem ser observadas independente do método utilizado: i) As paredes celulares devem ser fragmentadas com o objectivo de libertar os constituintes celulares. Essa etapa é

realizada geralmente pelo congelamento do tecido vegetal em azoto líquido e posterior impacto mecânico, com o auxílio de um pilão e de um almofariz. ii) As membranas devem ser destruídas para libertação de proteínas. iii) Deve-se evitar a acção de proteases vegetais, que podem degradar as proteínas. Com essa finalidade, os tampões de extracção possuem pH de 8,0, para salvaguardar das proteases ácidas, sendo contudo importante, adicionar inibidores de proteases de espectro alargado.

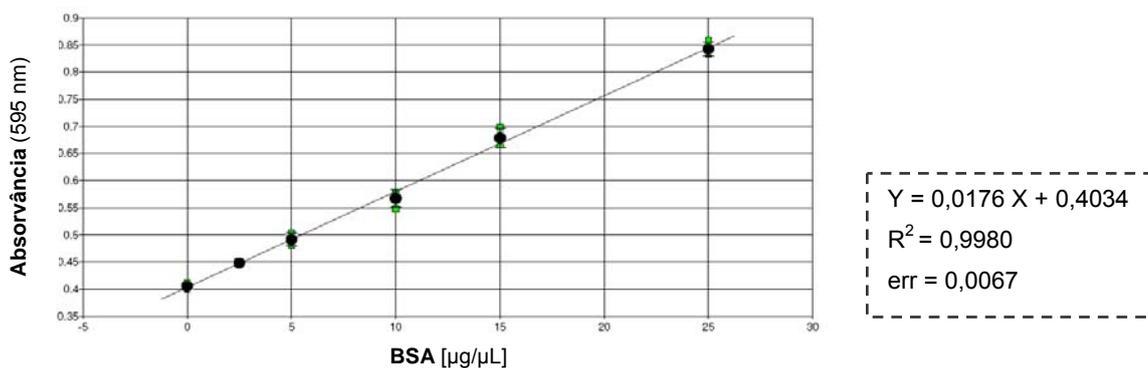
A extracção de proteínas totais de folhas *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Corema album*, realizou-se em conformidade com o descrito no ponto 1.2.1.1.1, do Capítulo II, de acordo com o método de Jacobs (Jacobs *et al.*, 1999). Após análise proteica dos extractos, verificou-se a obtenção de um bom rendimento na extracção proteica, determinado pelo método de Bradford (Tabela II.1), e uma boa resolução do perfil polipeptídico, de acordo com os resultados obtidos nos ensaios por SDS-PAGE, indiciando que o método descrito na literatura era efectivo na extracção de proteínas dos tecidos de folhas das espécies em estudo.

Relativamente há extracção de proteínas de folha *Arbutus unedo* optou-se pelo método de extracção com tampão Tris-HCl, contendo glicerol a 5% (v/v), descrito no ponto 1.2.1.1.2, do Capítulo II, de acordo com Silva & Sousa, 2009. Após optimização, mediante redução da concentração de triton X-100, de 4% para 1%, de modo a facilitar a eliminação do triton, sem comprometer o rendimento da extracção, evitando em ensaios com células eritrocitárias, a sua lise. Após análise proteica dos extractos, verificou-se a obtenção de um bom rendimento na extracção proteica, determinado pelo método de Bradford (tabela II.1), e uma boa resolução do perfil polipeptídico, de acordo com os resultados obtidos nos ensaios por SDS-PAGE, indiciando que o método descrito na literatura era efectivo na extracção de proteínas dos tecidos de folhas da *Arbutus unedo*.

As extracções proteicas das espécies em estudo, iniciaram-se com a pesagem das folhas, após separação, com os resultados obtidos de acordo com a tabela II.1.

### **2.1.2. Determinação do teor proteico dos extractos**

Após a realização das extracções proteicas do material vegetal em estudo, determinou-se a concentração total de proteínas segundo o método de Bradford (1976). Realizou-se uma curva de calibração, estabelecendo uma relação entre as diferentes concentrações da proteína padrão, solução mãe BSA (Sigma) na concentração de 0,5 µg/µL, e os respectivos valores de absorvência a 595 nm, conforme descrito no ponto 1.2.1.2, do Capítulo II, representada pela equação  $Y = 0,0176 X + 0,4034$ , ilustrada na Figura II.2.



**Figura II.2** - Padrão utilizado no método de Bradford. Curva de calibração de BSA com absorvância a 595 nm (y), em função da concentração de BSA (µg/µL) (x).

Relativamente às amostras, analisaram-se triplicados de extracto total de proteína do *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Corema album* e de *Arbutus unedo*, fazendo-se diluições dos extractos quando necessário. A leitura da absorvância no espectrofotómetro, determinado por software KC4, permitiu obter a concentração proteica das amostras em estudo a partir da determinação da média dos triplicados de cada amostra, de acordo com os resultados apresentados na tabela II.1.

**Tabela II.1** – Teor proteico dos extractos em estudo

Espécies	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i>	<i>Arbutus unedo</i>	<i>Corema album</i>
<b>Folhas</b> Peso fresco (g)	6,2	5,8	9,8	6,6
<b>Teor Proteico</b> (µg / µL)	0,116	0,322	3,691	0,231

Comparando os resultados obtidos para o mesmo órgão da planta das quatro espécies em estudo, o *Arbutus unedo* exhibe o maior valor de teor proteico, de 3,691 µg/µL, contrariamente à concentração de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, com o menor valor de teor proteico, de 0,116 µg/µL. Corrobora-se assim, a excelente extração feita pelo método otimizado de Jacobs, relativamente aos restantes extractos que exibem teores proteicos da mesma ordem de grandeza.

### 2.1.3. Estudo do perfil polipeptídico

Os extractos foram analisados electroforéticamente em PAGE desnaturante e não redutor (SDS-PAGE NR), e PAGE desnaturante e redutor (SDS-PAGE R), segundo a metodologia descrita em Santos *et al.*, 1997.

### 2.1.3.1. Avaliação do registo polipeptídico do extracto mediante SDS-PAGE

Avaliou-se o perfil polipeptídico dos extractos proteicos em estudo após aplicação de 30-50 µg de proteína. Após a separação electroforética (17,5% em acrilamida), realizada em presença de um detergente aniónico e na ausência de um agente redutor (SDS-PAGE NR) ou na presença de um agente redutor, o β-mercaptoetanol (SDS-PAGE R), permitindo a separação dos polipéptidos de acordo com a sua massa molecular, conforme procedimento descrito no ponto 1.2.1.3, do capítulo II. A detecção das bandas polipeptídicas no gel, fez-se pela técnica de coloração com AgNO<sub>3</sub>, de acordo com o descrito no ponto 1.2.1.4.1, do Capítulo II.

Pela observação da figura II.3, pode-se extrapolar que o perfil polipeptídico da folha de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* e *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, revelou uma relativa abrangência, com distribuição de bandas polipeptídicas desde os 10 kDa até, aproximadamente, aos 50 kDa, quer na ausência ou presença de β-mercaptoetanol. Apesar da distribuição das massas moleculares (10 < PM < 50 kDa) não ser muito alargada, o perfil polipeptídico mostra-se algo complexo pelo elevado número de polipeptídicos representados.

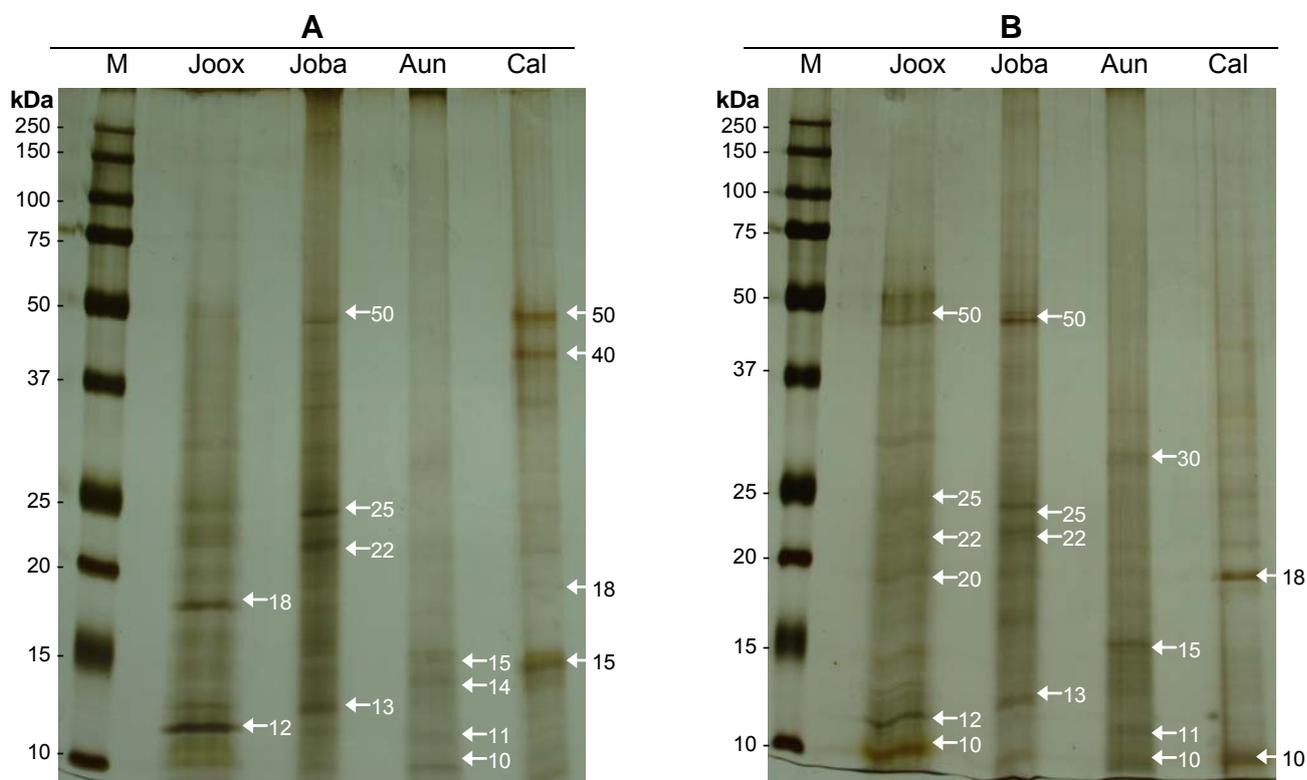
A folha da *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* evidencia, em condições não redutoras (Fig. II.3 (A)), duas bandas de maior representatividade, de aproximadamente 12 kDa e 18 kDa, sendo que, em condições redutoras as bandas revelam fraccionamento pela existência de ligações persulfureto, tornando-se um perfil mais prolongado.

A folha da *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* não evidencia, após a redução, alteração do perfil das bandas mais representativas de 13, 22, 25 e 50 kDa. Em condições redutoras, estas bandas não revelam existência de ligações persulfureto.

Na análise das *lanes* de ambos os painéis (A não redutor e B redutor), representativas da folha da *Arbutus unedo* na figura II.3, pode-se aferir a presença de um perfil polipeptídico pouco abrangente e simplificado, com um número diminuto de bandas polipeptídicas na sua constituição, quase todas situadas ao nível de baixos pesos moleculares (10 - 15 kDa). Na presença de β-mercaptoetanol as proteínas presentes na folha revelaram poucas ligações persulfureto, pelo facto, que em condições redutoras o perfil polipeptídico se torna um pouco mais complexo, aumentando o número de bandas peptídicas de baixa massa molecular, tendo em consideração o método de coloração realizado.

Os extractos totais de folha de *Corema album* (fig. II.3. A e B), apresentam um perfil polipeptídico simplificado, com bandas de peso molecular predominantemente abaixo dos 50 kDa. Três bandas são representativas, de aproximadamente 50, 40 e 15 kDa (assinaladas com as setas). As bandas de 50 e 40 kDa quando tratadas com β-mercaptoetanol (SDS-PAGE R), parecem ser reduzidas a duas bandas de massa molecular

aproximada a 20 e 10 kDa, manifestando desta forma, presença de ligações persulfureto. Também a banda de 15 kDa sofre redução.



**Figura II.3** - Perfil polipeptídico dos extractos proteicos de folhas das espécies *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Joox), *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* (Joba), *Arbutus unedo* (Aun) e *Corema album* (Cal), após coloração pelo AgNO<sub>3</sub>. **(A)** SDS-PAGE NR a 17,5% (m/v) de acrilamida. Aplicaram-se 45 µg de extracto proteico da folha Joox, 45 µg de extracto proteico da folha Joba, 38 µg de extracto proteico da folha Aun e 45 µg de extracto proteico da folha Cal. **(B)** SDS-PAGE R a 17,5% (m/v) de acrilamida. Aplicaram-se 50 µg de extracto proteico da folha Joox, 45 µg de extracto proteico da folha Joba, 40 µg de extracto proteico da folha Aun e 45 µg de extracto proteico da folha Cal. Aplicaram-se 3 µL de marcador de massa molecular (M).

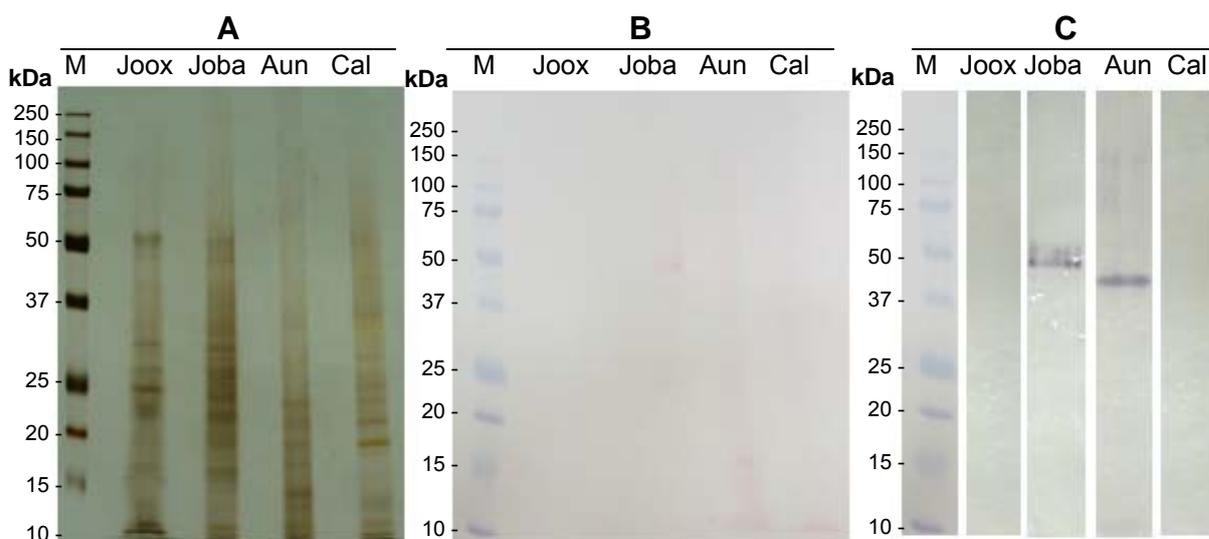
### 1.2.2. Determinação do carácter glicosídico dos extractos totais de proteínas

A detecção do carácter glicosídico dos polipeptídeos constituintes dos quatro extractos em estudo, efectuou-se após corrida electroforetica (SDS-PAGE R), seguido da sua transferência e imobilização em membrana de nitrocelulose, tal como descrito no ponto 1.2.2, do Capítulo II.

O método da concanavalina A-Peroxidase, proposto por Faye & Chrispeels, em 1985, reconhece unicamente glicoproteínas do tipo manose e glucose, uma vez que a Concanavalina A (Con A) se liga especificamente a resíduos do tipo  $\alpha$ -D-manopiranosilo e  $\alpha$ -D-glucopiranosido, assim como, resíduos espacialmente relacionados, pelo que existem

glicoproteínas não detectáveis por este método. Porém, a Con A tem uma larga aplicação na detecção da maioria das glicoproteínas (Ribeiro *et al.*, 2012).

Os extractos proteicos totais de folha das quatro espécies em estudo, imobilizados em membrana de nitrocelulose, após separação electroforética, foram ensaiados para detecção de glicoproteínas imobilizadas na membrana de nitrocelulose, segundo a metodologia descrita no ponto 1.2.2.2, do Capítulo II, foram evidenciadas bandas proteicas glicosiladas, havendo especificidade para glucose/manose (Fig. II.4.C).



**Figura II.4** - Transferência polipeptídica dos extractos proteicos de folhas das espécies *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Joox), *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* (Joba), *Arbutus unedo* (Aun) e *Corema álbum* (Cal). **(A)** SDS-PAGE R a 17,5% (m/v) de acrilamida, com coloração pelo AgNO<sub>3</sub>. Aplicaram-se 540 µg de extracto proteico da folha Joox, 700 µg de extracto proteico da folha Joba, 350 µg de extracto proteico da folha Aun e 400 µg de extracto proteico da folha Cal. Aplicou-se 3 µL de marcador de massa molecular (M). **(B)** Transferência para membrana de nitrocelulose, corada com Ponceau, do perfil electroforético realizado em A. **(C)** Detecção de bandas glicosiladas ao nível dos extractos proteicos das espécies em estudo.

Através da análise da Figura II.4.C pode-se depreender que os extractos proteicos totais de *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Arbutus unedo* apresentam bandas glicosiladas, o primeiro de aproximadamente 50-55 kDa e o segundo de aproximadamente 45 kDa. A banda glicosilada detectada no extracto de *Arbutus unedo* não apareceu no Ponceau, nem no gel de SDS-PAGE R, o que manifesta que a mesma não é representativa, mas, no entanto exhibe uma forte componente de glicosilação fazendo com seja possível detectá-la no ensaio. Os extractos de folha de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* e *Corema album* apresentam umas bandas muito ténues, não permitindo tirar conclusões da sua representatividade.

## **2.2. Pesquisa de proteína com actividade hemaglutinante e avaliação da inibição de actividade hemaglutinante pelos hidratos de carbono**

### **2.2.1. Estudo das propriedades hemaglutinantes do extracto de proteína total das espécies em estudo em grupos sanguíneos humanos**

A membrana eritrocitária é o modelo primário para estudos sobre a membrana plasmática celular animal, pelo facto, de ser desprovida de núcleo e organelos. As membranas plasmáticas de um modo geral apresentam-se como barreiras selectivas que asseguram a composição interna constante das células, através do controle da transferência activa e passiva de inúmeras moléculas. Entre os diferentes constituintes da membrana apresentam-se receptores glicosilados, envolvidos em funções complexas que permitem a comunicação entre as células, reconhecimento imunológico e fenómenos de adesão celular (Salmon *et al.*, 1984).

Realizou-se uma avaliação das proteínas das espécies em estudo, ao nível da folha, com o objectivo de determinar a acção aglutinadora destes extractos sobre os eritrócitos humanos, vulgarmente denominado de actividade hemaglutinante, de modo a averiguar o carácter de lectina, de alguns polipeptídeos constituintes dos extractos.

Detectou-se actividade hemaglutinante e determinou-se a unidade hemaglutinante (U.H.), correspondente à concentração mínima de proteína que ainda provoca hemaglutinação. Para a revelação desta actividade, a estequiometria é um factor importante, pelo motivo, de existir uma relação ideal entre os receptores da membrana eritrocitária e a concentração da proteína, do tipo lectina, existente nas amostras, para a exibição de actividade hemaglutinante.

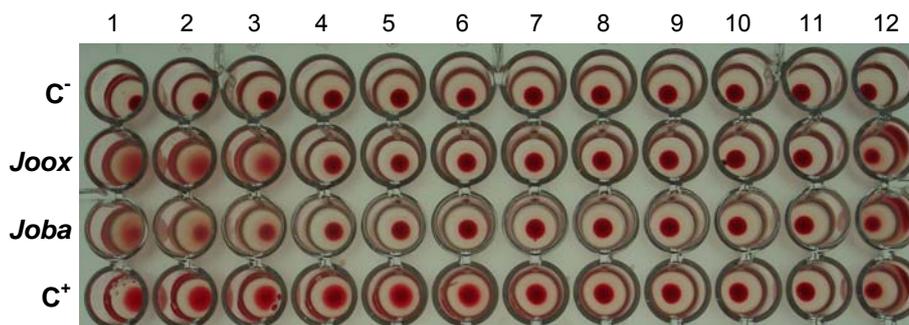
#### **2.2.1.1. Determinação da actividade hemaglutinante frente a grupos sanguíneos humanos**

Realizou-se o ensaio, conforme procedimento descrito no ponto 1.2.3.1.1.1, do Capítulo II, tendo como termo comparativo um controlo positivo (C<sup>+</sup>), de Con A e um controlo negativo (C<sup>-</sup>), com soro fisiológico (NaCl 0,9% (m/v)).

Testou-se a presença de actividade hemaglutinante em extractos proteicos totais, preparados a partir de folhas das espécies em estudo, em amostras de sangue humano do grupo ARH<sup>+</sup>, ARH<sup>-</sup>, BRH<sup>-</sup> e ORH<sup>+</sup>.

#### 2.2.1.1.1. Grupo sanguíneo ARH+

Determinou-se a actividade hemaglutinante nas espécies *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* e *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, para 150 µg de proteína e *Arbutus unedo* e *Corema album*, para 250 µg de proteína, frente a uma solução eritrocitária 4% (v/v) do grupo sanguíneo ARH+, ilustrado na figura II.5. Em relação às espécies *Arbutus unedo* e *Corema album*, não foi detectado qualquer actividade hemaglutinante para a mesma concentração proteica.



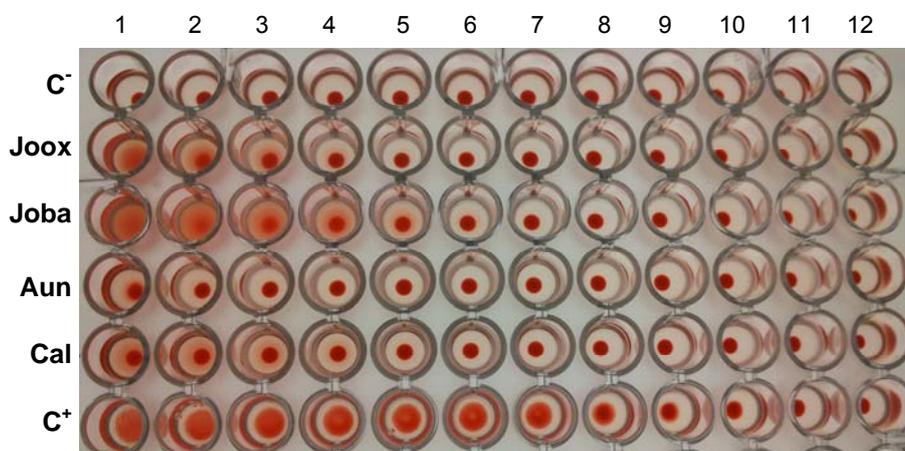
**Figura II.5** - Avaliação da actividade hemaglutinante dos extractos proteicos totais de folha de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Joox) e *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* (Joba) frente a uma solução eritrocitária a 4% (v/v) do grupo sanguíneo ARH+. O ensaio realizou-se em microplaca, tendo-se aplicado 150 µg de proteína, por cada extracto, diluída seriadamente 1:3. A linha correspondente a C<sup>-</sup>, representa o controlo negativo (soro fisiológico) e a linha C<sup>+</sup>, representa o controlo positivo (Con A). Os resultados revelaram-se após incubação da placa a 37 °C, durante 30 minutos.

Da observação da Figura II.5, representativa de um teste de hemaglutinação em microplaca, verifica-se que os extractos proteicos totais de folha de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* e *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* exibem uma apreciável actividade hemaglutinante, tendo-se obtido como unidade hemaglutinante (U.H.), o valor de 16,6 µg e 50 µg, respectivamente (ver Tabela II.2 e Tabela II.3).

#### 2.2.1.1.2. Grupo sanguíneo ARH-

Na sequência da análise do ensaio com uma solução eritrocitária 4% (v/v) do grupo sanguíneo ARH-, ilustrado na figura II.6, detectou-se actividade hemaglutinante na espécie *Juniperus oxycedrus badia*, para uma quantidade de 250 µg de proteína, revelou-se hemaglutinação eritrocitária até ao poço 2 (diluição 1:3), se bem que na diluição 1:9, ainda se detecta alguma alteração da aglutinação eritrocitária. No mesmo ensaio, foi detectado actividade hemaglutinante, só no primeiro poço, em relação à espécie *Juniperus oxycedrus*

*oxycedrus*. As espécies *Arbutus unedo* e *Corema album*, para a mesma quantidade de proteína, não revelaram actividade hemaglutinante.

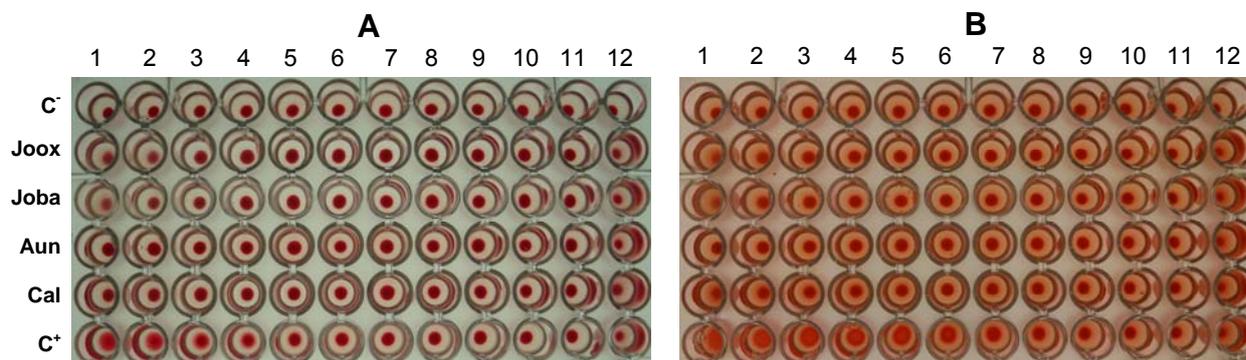


**Figura II.6** - Avaliação da actividade hemaglutinante dos extractos proteicos totais de folha de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Joox), *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* (Joba), *Arbutus unedo* (Aun) e *Corema album* (Cal) em solução eritrocitária a 4% (v/v) do grupo sanguíneo ARH-. O ensaio realizou-se em microplaca, tendo-se aplicado 250 µg de proteína de cada extracto, diluída seriadamente 1:3. A linha correspondentes a C<sup>-</sup>, representa o controlo negativo (soro fisiológico) e a linha C<sup>+</sup>, representa o controlo positivo (Con A). Os resultados revelaram-se após incubação da placa a 37 °C, durante 30 minutos.

Da observação da Figura II.6, representativa de um teste de hemaglutinação em microplaca, verifica-se que os extractos proteicos totais de folha de *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* exibem uma apreciável actividade hemaglutinante, tendo obtido como unidade hemaglutinante (U.H.), o valor de 27,7 µg (Tabela II.2 e Tabela II.3). Para o *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* a actividade hemaglutinante é fraca, sendo a U.H. de 250 µg.

### 2.2.1.1.3. Grupos sanguíneos 0RH+ e BRH-

Da análise dos ensaios com solução eritrocitária 4% (v/v) dos grupos sanguíneos 0RH- e BRH-, ilustrado na figura II.7 (A e B), não foi detectada qualquer actividade hemaglutinante em relação às quatro espécies em estudo, para a quantidade de 150 µg de proteína.



**Figura II.7** - Avaliação da actividade hemaglutinante dos extractos proteicos totais de folha de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Joox), *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* (Joba), *Arbutus unedo* (Aun) e *Corema album* (Cal) em soluções eritrocitárias a 4 % (v/v) do grupo sanguíneo 0RH+ (A) e BRH- (B). O ensaio realizou-se em microplaca, tendo-se aplicado 150 µg de proteína para cada extracto e foi diluída seriadamente 1:3. A linha correspondentes a C<sup>-</sup>, representa o controlo negativo (soro fisiológico) e a linha C<sup>+</sup>, representa o controlo positivo (Con A). Os resultados revelaram-se após incubação da placa a 37 °C, durante 30 minutos.

Os resultados dos testes de hemaglutinação, resumidos na Tabela II.2, levam a concluir que, para os diferentes grupos sanguíneos testados, o extracto proteico do *Juniperus oxycedrus* subsp *badia*, para a quantidade de proteína testada, foi o que revelou actividade hemaglutinante, mas unicamente para o grupo sanguíneo do tipo A, quer para o factor RH+, como RH-, não tendo revelado especificidade glicosídica para os restantes grupos testados, isto é, BRH- e 0RH+. O *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* revelou igual especificidade para o mesmo grupo sanguíneo, mas com maior actividade hemaglutinante para o grupo ARH+ e menor actividade para o grupo ARH-. As propriedades hemaglutinantes podem ser um bom prognóstico para a presença de proteínas com actividade de lectina, específicas para os grupos sanguíneos em estudo. As espécies *Arbutus unedo* e *Corema album* não revelaram actividade hemaglutinante para qualquer dos grupos sanguíneos em estudo, não existindo especificidade para os receptores glicosilados dos eritrócitos em estudo.

**Tabela II.2** - Detecção da actividade de hemaglutinação em grupos sanguíneos humanos.

Amostra		Actividade Hemaglutinante					
Espécie	Proteína µg	Grupo Sanguíneo					
		A		B		O	
		RH+	RH-	RH+	RH-	RH+	RH-
<i>Juniperus oxycedrus oxycedrus</i>	150	(+) 1:9	NR	NR	(-)	(-)	NR
	250	NR	(+)	NR	NR	NR	NR
<i>Juniperus oxycedrus badia</i>	150	(+) 1:3	NR	NR	(-)	(-)	NR
	250	NR	(+) 1:9	NR	NR	NR	NR
<i>Arbutus unedo</i>	150	(-)	NR	NR	(-)	(-)	NR
	250	NR	(-)	NR	NR	NR	NR
<i>Corema album</i>	150	(-)	NR	NR	(-)	(-)	NR
	250	NR	(-)	NR	NR	NR	NR

(+) Exibiu actividade hemaglutinante, referência da última diluição efectuada que ainda exhibe actividade; (-) não exibiu actividade hemaglutinante; NR ensaio não realizado. Nota: O grupo sanguíneo AB não foi ensaiado.

### 2.2.1.2 Determinação da unidade hemaglutinante (U.H.)

Para as espécies em estudo que revelaram actividade hemaglutinante foi determinado a unidade hemaglutinante (U.H.), que por definição, corresponde à concentração mínima de proteína que ainda provoca hemaglutinação numa solução de eritrócitos a 4 % (v/v). Os valores da U.H. estão contemplados na tabela II.3 e determinados pela seguinte equação:

Proteína Total Ensaída <hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> $3^{n-1}$
---

n = última diluição seriada de 1:3 que ainda exhibe actividade hemaglutinante

Cada amostra foi diluída seriadamente (1:3), 12 vezes, de acordo com o número de poços utilizados em cada microplaca (Greiner). Nos ensaios realizados com o grupo sanguíneo ARH+, ilustrados na figura II.5, a espécie *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, exibiu actividade de hemaglutinação até ao poço número 3, correspondendo a uma diluição 1:9, relativamente à espécie *Juniperus oxycedrus badia*, exibiu actividade hemaglutinante até ao poço 2, equivalente a uma diluição 1:3. Nos ensaios com o grupo sanguíneo ARH-, a única espécie que exibiu actividade hemaglutinante foi a *Juniperus oxycedrus badia*, com uma diluição de 1:9, correspondendo ao terceiro poço, de acordo com a figura II.6.

**Tabela II.3** - Avaliação da actividade de hemaglutinação em grupos sanguíneos humanos pela determinação da unidade hemaglutinante.

Espécies	Proteína (µg)	Unidade Hemaglutinante (U.H.) (µg)			
		ARH+	ARH-	BRH-	ORH+
<i>Juniperus oxycedrus oxycedrus</i>	150	<b>16,6</b>	NR	(-)	(-)
	250	NR	<b>250</b>	NR	NR
<i>Juniperus oxycedrus badia</i>	150	<b>50</b>	NR	(-)	(-)
	250	NR	<b>27,7</b>	NR	NR

(-) não exibiu actividade hemaglutinante; NR ensaio não realizado.

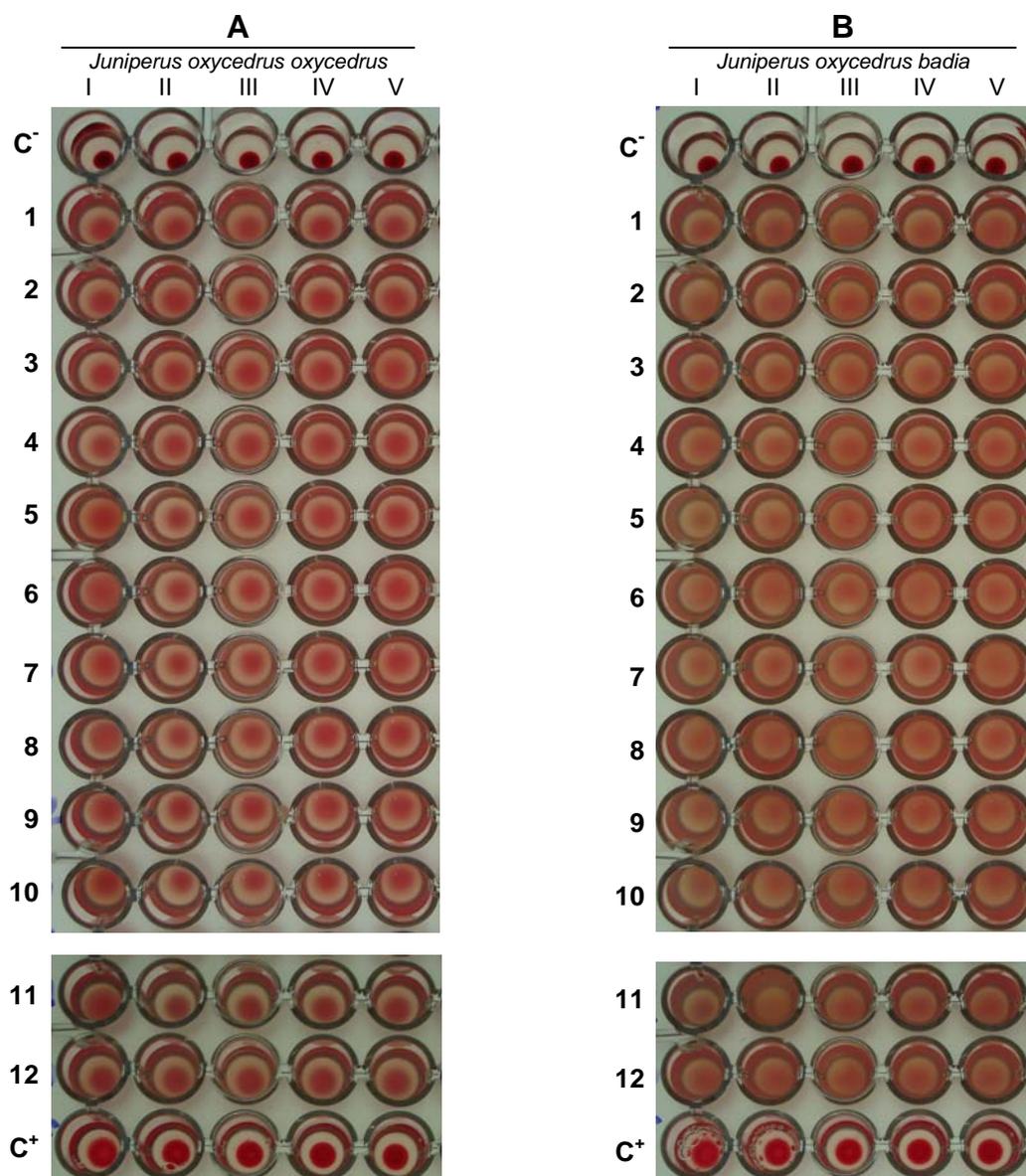
Da análise da tabela II.2, conclui-se que das quatro espécies ensaiadas, *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* e *Corema album*, somente as duas primeiras espécies revelam ter especificidade para alguns grupos sanguíneos humanos, respectivamente ARH+ para *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* e ARH+ e ARH- para *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*. Os eritrócitos do grupo zero (ORH+) e do grupo B (BRH-) contém receptores glicosilados para os quais as lectinas existentes nos respectivos não manifestaram especificidade. O passo seguinte será interpretar qual o tipo de receptor glicosilado eritrocitário a que se ligam as lectinas presentes nos diferentes extractos, através de ensaios de inibição da hemaglutinação.

### 2.2.1.3. Identificação dos hidratos de carbono inibidores da actividade hemaglutinante para os grupos ARH+ e ARH-

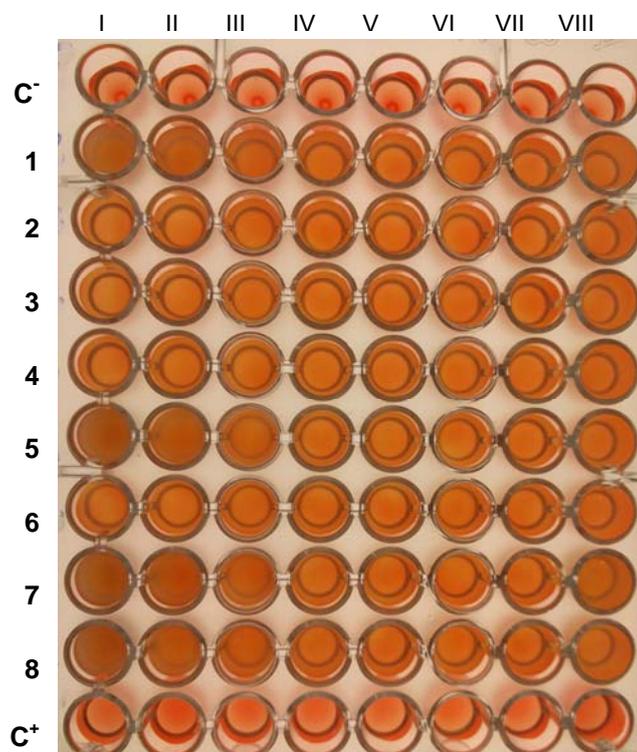
No seguimento dos ensaios preconizados para avaliação de actividade hemaglutinante, foi-se avaliar quais os açúcares que especificamente inibem a actividade hemaglutinante, das lectinas existentes nos extractos *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* e *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, para os grupos sanguíneos ARH+ e ARH-. O procedimento encontra-se descrito no ponto 1.2.3.2, do capítulo II.

Os testes de especificidade aos Hidratos de carbono foram realizados por incubação de um teor proteico, correspondente a 4 U.H. das respectivas espécies com actividade hemaglutinante (quantidade total de proteína utilizada no ensaio, para cada extracto, está referida na tabela II.4), com uma bateria de 12 hidratos de carbono, de concentração 0,1 M, cada um diluído seriadamente 1:3, a partir do primeiro poço, para os ensaios com o grupo sanguíneo ARH+, Ilustrado na figura II.8. Para o ensaio com o grupo sanguíneo ARH-, a inibição pelos hidratos de carbono no extracto de proteína total da espécie *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, foi testado com uma bateria de 8 hidratos de carbono, ilustrado na

figura II.9. Usou-se como controlo de inibição de hemaglutinação (C<sup>-</sup>), soro fisiológico (0,9% (m/v) NaCl) e como controlo da hemaglutinação (C<sup>+</sup>), Con A (0,5 µg/µL (m/v)).



**Figura II.8** - Ensaio de inibição da actividade hemaglutinante dos extractos de proteína total de *Juniperus oxycedrus* Subsp. *oxycedrus* (A) e *Juniperus oxycedrus* Subsp. *badia* (B), pelos hidratos de carbono, frente a solução eritrocitária, a 4%, do grupo sanguíneo ARH<sup>+</sup>. Ensaio realizado com incubação de 4 U.H. de cada extracto, para uma amostragem de 12 hidratos de carbono, de concentração 0,1 M, diluídos seriadamente: (1) glucose, (2) N-acetil-D-glucosamina; (3) galactose; (4) galactosamina; (5) manose; (6) rafinose; (7) D-fucose (0,3 M); (8) melezitose; (9) metil- $\alpha$ -glucopiranosido; (10) metil- $\alpha$ -manosido; (11) sacarose; (12) ácido N-acetilneuramínico, A linha correspondentes a C<sup>-</sup>, representa o controlo negativo (soro fisiológico) e a linha C<sup>+</sup>, representa o controlo positivo (Con A).



**Figura II.9** - Ensaio de inibição da actividade hemaglutinante dos extractos de proteína total de *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, pelos hidratos de carbono, em solução eritrocitária, a 4%, do grupo sanguíneo ARH-. Ensaio realizado com incubação de 4 U.H. de cada extracto, para uma amostragem de 8 hidratos de carbono, de concentração 0,1 M, diluídos seriadamente: (1) Glucosamina; (2) N-acetil-*D*-glucosamina; (3) galactose; (4) N-acetil-*D*-galactosamina; (5) manose; (6) *D*-fucose (0,3 M); (7) metil- $\alpha$ -manosido; (8) sacarose. A linha correspondentes a C<sup>-</sup>, representa o controlo negativo (soro fisiológico) e a linha C<sup>+</sup>, representa o controlo positivo (Con A).

Este estudo é extremamente importante porque, por si só, a actividade hemaglutinante poderá não ser prova da existência de lectinas, outros constituintes, como, taninos alguns lipidos ou catiões bivalentes, em elevadas concentrações, também poderão provocar hemaglutinação (Rüdiger, 1998). Com base na especificidade para diferentes açúcares, as lectinas poderão ter atributos distintos e, desempenhar papéis fisiológicos discrepantes, como a função fungicida (Sitohy *et al.*, 2007) e insecticida (Roy *et al.*, 2002), como exemplo.

Após a realização dos ensaios de inibição pelos hidratos de carbono seleccionados, em microplaca, tornou-se evidente, por comparação com os respectivos controlos, que a actividade hemaglutinante dos extractos de proteína total não foi inibida na concentração ensaiada. Assim, nenhum dos hidratos de carbono testados, revelou ser especifico das

lectinas existentes nos extractos ensaiados, isto é, exibiram preferência de ligação para os receptores dos grupos sanguíneos. A tabela II.4 resume os resultados registados nos ensaios de inibição da actividade hemaglutinante pelos hidratos de carbono.

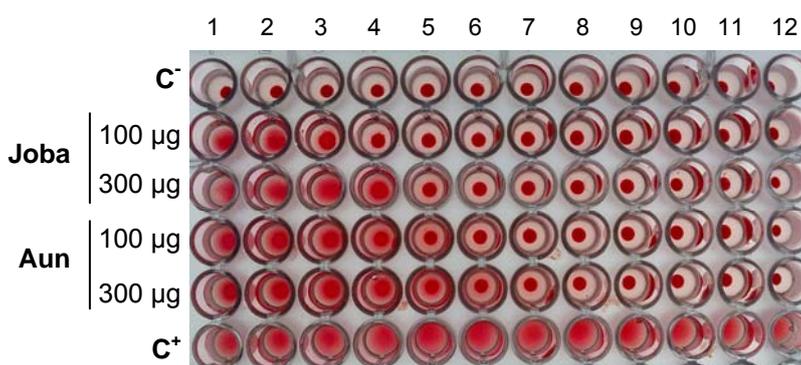
**Tabela II.4** - Resultados dos ensaios de inibição da actividade hemaglutinante pelos hidratos de carbono

Ensaio de inibição da actividade hemaglutinantes pelos hidratos de carbono														
Espécies	4 U.H.* (µg)	Grupo Sanguíneo	Hidratos de Carbono <sup>(1)</sup>											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Juniperus oxycedrus oxycedrus</i>	200	ARH+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Juniperus oxycedrus badia</i>	200	ARH+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	111	ARH-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)				

(-) não exibiu inibição de actividade hemaglutinante; \* Quantidade de proteína aplicada nos ensaios, correspondente a 4 vezes a unidade hemaglutinante. <sup>(1)</sup> A designação dos hidratos de carbono aplicados nos respectivos ensaios, estão referenciadas nas figuras II.8 e II.9.

### 2.3.1. Determinação da actividade hemaglutinante frente a eritrócitos de coelho

Numa fase, já final, deste trabalho e, após selecção das espécies *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Arbutus unedo*, por apresentarem uma actividade biológica, promissora, determinou-se a respectiva actividade hemaglutinante frente a solução a 4%, de eritrócitos de coelho. Ensaio anteriormente realizados (não descrito), já tinham revelado actividade hemaglutinante para todos os extractos.



**Figura II.10** - Avaliação da actividade hemaglutinante dos extractos proteicos totais de folha de *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* (Joba) e *Arbutus unedo* (Aun) em solução eritrocitária de coelho a 4% (v/v). O ensaio realizou-se em microplaca, tendo-se aplicado 100 µg e 300 µg de proteína de cada extracto, diluída seriadamente 1:3. A linha correspondentes a C<sup>-</sup>, representa o controlo negativo (soro fisiológico) e a linha C<sup>+</sup>, representa o controlo positivo (Con A). Os resultados revelaram-se após incubação da placa a 37 °C, durante 30 minutos.

Realizou-se o ensaio, conforme procedimento descrito no ponto 1.2.3.1.2, do Capítulo II, tendo como termo comparativo um controlo positivo (C<sup>+</sup>), de Con A e um controlo negativo (C<sup>-</sup>), com soro fisiológico (NaCl 0,9% (m/v)).

Testou-se a presença de actividade hemaglutinante em extractos proteicos totais de *Juniperus oxycedrus* subsp *badia* e *Arbutus unedo*, perante uma solução de eritrócitos de coelho a 4% (v/v), ilustrado na figura II.10.

Na sequência da análise do ensaio com uma solução eritrocitária de coelho 4% (v/v), ilustrado na figura II.10, detectou-se actividade hemaglutinante nas duas espécies ensaiadas. O extracto de proteína total de *Juniperus oxycedrus badia*, para uma quantidade de 300 µg de proteína, revelou-se hemaglutinação eritrocitária até ao quarto poço (diluição 1:27), com uma Unidade de Hemaglutinação (U.H.) de 11,1 µg. No mesmo ensaio, foi detectado uma apreciável actividade hemaglutinante em relação ao extracto de proteína total de *Arbutus unedo*, para uma quantidade de 300 µg de proteína que revelou hemaglutinação até ao quinto poço (diluição 1:81), com uma Unidade de Hemaglutinação (U.H.) de 3,7 µg.

## Capítulo III – Selecção dos Polipéptidos/Lectinas Envolvidos no Reconhecimento dos Epitopos Glicosilados em Células Tumorais HT29

A especificidade de lectinas para certos hidratos de carbono tem permitido o seu uso na investigação, de forma a reconhecer células de diferentes etiologias (eritrócitos, imunoglobulinas e células tumorais) (Singh *et al.*, 1999) através de receptores glicosilados (glicolípidos, glicoproteínas e proteoglicanos). Um número crescente de trabalhos tem demonstrado que os hidratos de carbono da superfície celular são modificados durante as transformações malignas, originando células diferenciadas que podem favorecer a adesão celular e a invasão, favorecendo o processo metastático (Xu *et al.*, 2000).

Estudos com algumas lectinas, demonstraram uma maior aglutinação sobre células cancerígenas, em comparação com células saudáveis do mesmo tipo. Presumivelmente, deve-se à sua capacidade de reconhecer as variações glicómicas sofridas pela membrana celular, o que converte as lectinas em descodificadores de glicocódigos, com um futuro muito promissor, tanto no diagnóstico, como na terapêutica de cancro. O efeito antitumoral das lectinas em linhas celulares HT29, têm sido demonstrados por vários mecanismos de acção, designadamente, citotoxicidade (*Amaranthus caudatus*) e inibição tumoral (*Artocarpus integrifolia*), bem como, inibição de proliferação (*Sauromatum venosum*) (Castillo-Villanueva & Abdullaev, 2005).

### 1. MATERIAL e MÉTODOS

#### 1.1 Material Biológico

##### 1.1.1. Material biológico vegetal

Utilizaram-se extractos proteicos de folhas de quatro espécies em estudo, designadamente, *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Joox), *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* (Joba), *Arbutus unedo* (Aun) e *Corema album* (Cal), obtidos de acordo com o descrito no ponto 1.2.1, do Capítulo II.

A procedência do material vegetal é idêntica à descrita no ponto 1.1.1 do Capítulo II.

### 1.1.2. Material biológico humano

Na realização deste trabalho experimental utilizou-se uma linha celular HT29, de carcinoma do cólon, da espécie *Homo sapiens sapiens*, obtida no banco celular ECACC, nº 91072201.

Para informação mais detalhada sobre a caracterização e origem da linha celular HT29, consultar o ponto 2.2.1.1. do Capítulo I.

## 1.2. Métodos

Os métodos utilizados foram seleccionados e ajustados ao objectivo pretendido. Antes do início dos ensaios foi verificado, em todos os materiais e equipamentos necessários à técnica adoptada, a conformidade com os requisitos de funcionamento (validação, verificação e ajustamento).

### 1.2.1. Linha celular HT29 de carcinoma do cólon humana

A linha celular HT29, foi cultivada de modo a garantir a sua proliferação *in vitro*, de acordo com as suas necessidades nutricionais e características de crescimento. A manipulação da linha celular HT29, nomeadamente, a inoculação, suplementação e tripsinização, foram realizadas em condições de esterilidade, numa câmara de fluxo laminar (SCANLAF Mars Safety Class 2). As condições de crescimento e manutenção da cultura foram realizadas em estufa (Estufa Shel Lab CO<sub>2</sub> Series, Shledon Mfg, Incorporated) à temperatura de 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> e humidade da estufa compreendida entre 70 a 80 %.

#### 1.2.1.1. Cultura de Células

O meio de cultura é um componente importante para o crescimento das linhas e culturas celulares, que fornece aminoácidos, vitaminas, minerais e glucidos, permitindo às células a produção de novas proteínas essenciais para o seu crescimento, assim como fornecer a energia necessária para o seu metabolismo.

A linha celular tumoral humana HT29 foi cultivada em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI), suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma), 2 mM Glutamina, 0,5% (v/v) de Solução de penicilina a 2x10<sup>4</sup> UI/mL e 34 mM estreptomicina (Pen-Strep), denominado de meio de cultura completo. A cultura fez-se em frascos T-Flask de 75 cm<sup>2</sup>. O meio de cultura completo é previamente filtrado em microfiltros estéreis (GVS Polyethersulfone Membrane 0,22 µm).

### **Procedimento**

A cultura da linha celular HT29 ( $2 \times 10^6$  células/mL), conservadas a  $-80$  °C, em meio de criocongelação (5% (v/v) DMSO, 95% (v/v) SFB), iniciou-se com a descongelação rápida, a  $37$  °C. Seguiu-se a transferência da suspensão de células para um tubo estéril, 10 mL de meio de cultura completo, colocado previamente a  $37$  °C. Após uma suave homogeneização, foi necessário remover o agente criopreservante, dimetil sulfoxido (DMSO), para melhorar a viabilidade celular, por centrifugação a  $200 \times g$ , durante 10 min. O sedimento foi ressuspenso em 10 mL de meio de cultura completo e transferido para um T-Flask de  $25 \text{ cm}^2$  de área de cultura. O frasco de cultura de células foi colocado em estufa de incubação a  $37$  °C, com 5% de  $\text{CO}_2$ , durante 48 horas, para promover a adesão celular à matriz. Com a finalidade de propagar a cultura celular, quando as células revelaram confluência superior a 80%, transferiu-se a suspensão para um T-Flask de  $75 \text{ cm}^2$  de área de cultura ( $T 75 \text{ cm}^2$ ).

#### **1.2.1.2. Manutenção da viabilidade da cultura celular**

Foi efectuado uma monitorização regular do crescimento e adesão celular, bem como, da presença de infecções bacterianas ou fúngicas, por observação do tapete celular ao microscópio óptico (Leyca). A linha celular HT29 foi tripsinizada quando atingiram a confluência igual ou superior a 80%, ou seja, quando a população de células aderentes ocupou praticamente toda a superfície do suporte de cultura. Caso não se verificasse uma confluência superior a 80%, o meio de cultura completo e trocado em cada 2 dias de crescimento.

### **Procedimento**

A manutenção da linha celular HT29 foi feita passado 48 horas, começando por se efectuar a tripsinização das células.

Procedeu-se à eliminação do meio de cultura contido no  $T 75 \text{ cm}^2$ . Lavou-se o tapete celular com 3 mL de tampão PBS (0,8% (m/v) NaCl, 0,02% (m/v) KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,2). Eliminou-se a solução de lavagem e adicionou-se 4 mL de ATV (0,8% (m/v) NaCl; 0,1% (m/v) KCl; 1,1 g/L glucose hidratada; 6 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,2 g/L EDTA hidratado, 2 g/L tripsina), previamente filtrado, com filtro  $0,22 \mu\text{m}$ , seguindo-se uma incubação em estufa em atmosfera de 5% (v/v) de  $\text{CO}_2$ , durante aproximadamente 15 min. ou, até o tapete celular se desprender por completo. Seguiu-se a transferência do aglomerado de células para um tubo cónico estéril (Falcon) de 50 mL (Orange Scientific)

contendo 4 mL de SFB. Sucedeu-se a lavagem do T 75 cm<sup>2</sup>, com 8 mL de SFB, a qual se reuniu no mesmo Falcon, perfazendo um volume de 16 mL.

As células contidas no Falcon foram concentradas por centrifugação a 200 x g, durante 10 min., à temperatura ambiente (centrifuga ScanSpeed 1236, LaboGene). O sobrenadante foi descartado por inversão e o sedimento obtido, aproximadamente 0,3 mL, foi homogeneizado no vortex, segundo dois critérios: para propagação ou contagem das células para posterior congelação.

Para propagação das células HT29, após homogeneização do sedimento, adicionou-se 2,7 mL de meio de cultura completo, tendo transferido 1 mL da suspensão para um novo T 75 cm<sup>2</sup>, ao qual se adicionou 24 mL de meio de cultura completo. A cultura celular foi colocada a incubar nas condições anteriormente descritas.

Para contagem celular e congelação, segue-se o protocolo.

#### 1.2.1.3. Contagem celular

Com a finalidade de conservar as células a -80 °C, para posterior utilização, fez-se a contagem celular em câmara de Neubauer, com um factor de conversão (em células por mL) igual a 10<sup>4</sup> (de acordo com a câmara de contagem).

##### Procedimento

Após o procedimento de tripsinização, no qual o sedimento resultante é ressuspendido em 2,7 mL de meio de cultura completo, fez-se uma diluição da suspensão celular em azul de tripano 0,1 % (v/v) (1:5), num tubo *ependorf*. O Azul de Tripano é um corante que apenas penetra nas células com a membrana plasmática danificada, permitindo distinguir as células viáveis, que não o incorporam, das células não viáveis que se encontram coradas de azul. A mistura foi homogeneizada e aplicada no hemacitómetro/Câmara de Neubauer (Hirschmann, Eberstadt, Alemanha) e contabilizado o número de células viáveis, não coradas, existentes por cada quadrante, com auxílio de um microscópio óptico (Leyca), com ampliação 40x.

A concentração inicial de células foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ Total de Células}}{\text{N}^\circ \text{ Total de Quadrados}} \times \text{diluição (5)} \times 10^4 \text{ (Factor de correcção para converter células por mL)}$$

Calculado o número de células, ressuspendeu-se por cada mL de solução de criocongelação (95 % de SBF, 5 % de DMSO), 2 x 10<sup>6</sup> células.

### 1.2.2. Isolamento da membrana das Células HT29

As membranas plasmáticas das células dos mamíferos são, em larga escala, extensivamente glicosiladas, promovendo potenciais alvos de ligação de lectinas. Com o objectivo de avaliar a ligação de proteínas do tipo lectina à membrana da linha celular HT29, isolaram-se as membranas em conformidade com o protocolo descrito por Edourt *et al.* (2008).

#### Procedimento

Os criotubos com células HT29, conservadas a -80 °C, foram descongelados rapidamente, a 37 °C, e a suspensão das células foi reunida num tubo cónico, ao qual adicionou-se tampão HES (20 mM Hepes, pH 7,4, 250 mM Sucarose), 10 volumes, para lavagem e eliminação do meio de criocongelamento, por centrifugação a 750 x g, durante 10 min, a 21 °C (Beckman J2 -21M/E, Rotor JA 20.000). Descartou-se o sobrenadante e repetiu-se a operação de lavagem por mais uma vez, tendo, o sedimento obtido sido ressuspenso em tampão HES, adicionado cocktail de inibidor de proteases (sem EDTA, Roche). Procedeu-se à lise celular, realizada por criólise, em que as células foram sujeitas a uma sequência de congelamento e descongelamento (4x), durante 30 min, a -20 °C, associada à sonicação em ultrassom, durante 20 min. Sucedeu-se uma centrifugação a 960 x g, durante 10 min, a 4 °C, desprezando-se no final, o sedimento.

Por fim, o sobrenadante foi ultracentrifugado a 10.000 x g, durante 45 min, a 4 °C (Beckman J2 -21M/E, Rotor JA 20.000). O sedimento, contendo as membranas celulares, foi ressuspenso em 2 mL de soro fisiológico (0,9% de NaCl), contendo 2 mM CaCl<sub>2</sub> e 2 mM MgCl<sub>2</sub>. Posteriormente dividiu-se o sedimento em aliquotas contendo 1 mg de proteína, após determinação do teor proteico pelo método de Bradford, conforme procedimento descrito no ponto 1.2.1.2. do Capítulo II. Conservou-se a -80 °C.

### 1.2.3. Ligação de proteínas do tipo lectina à membrana das células HT29

Após isolamento das membranas das células HT29, os extractos de proteína total em estudo foram incubados individualmente com as membranas isoladas de células HT29, para avaliar o potencial de ligação de proteínas, do tipo lectina, aos receptores glicosilados das membranas. De acordo com os objectivos pretendidos realizaram-se dois tipos de protocolo de ligação às membranas: (i) incubação dos extractos proteicos com as membranas das células HT29; (ii) incubação do extracto proteico com as membranas das células HT29, seguido de eluição sequencial pelos açúcares específicos da(s) lectina(s) do extracto de *Corema album*.

### **1.2.3.1. Ligação de Proteínas do Tipo Lectina, às membranas das Células HT29**

As membranas são componentes essenciais de todas as células e os seus componentes principais, as proteínas e lipídios polares, constituem quase toda a massa das membranas biológicas. Os hidratos de carbono encontram-se presentes na superfície celular, geralmente na forma de glicoproteínas ou glicolipídios. As proporções relativas destes glicoconjugados são distintas em diferentes membranas reflectindo a diversidade dos seus papéis biológicos (Nelson & Cox, 2000).

#### **Procedimento**

Iniciou-se o ensaio com a utilização de 2,1 mg de membranas, obtidas pelo processo descrito no ponto 1.2.2. do Capítulo III, solubilizados num volume total de 3,5 mL de soro fisiológico, contendo sais (2 mM  $\text{CaCl}_2$  e 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ). Retirou-se da suspensão uma aliquota de 300  $\mu\text{L}$ , para determinação do teor proteico e ensaios electroforéticos. O volume remanescente, 3,2 mL, foi incubado, durante 35 min. a 25 °C, com agitação suave, com 3,5 mg de proteínas totais da amostra, concentrada a 4 mL, num sistema de ultrafiltração em centricons (Microsep Advanced Centrifugal Devices, PALL) de *cut-off* 10 kDa, em soro fisiológico, contendo 2 mM  $\text{CaCl}_2$  e 2 mM  $\text{MgCl}_2$ . Com o objectivo de remover as proteínas não ligadas, fez-se uma prévia centrifugação a 12.096 x *g*, durante 10 min., seguindo-se um ciclo de três lavagens consecutivas do sedimento, com 10 volumes de soro fisiológico, contendo sais, por centrifugação a 12.096 x *g*, durante 10 min., refrigerada a 4 °C (Beckman J2 -21M/E, Rotor JA 20.000). No final, descartou-se o sobrenadante, o sedimento obtido, constituídos pelas lectinas associadas às membranas, foi posteriormente solubilizado em soro fisiológico (contendo sais) e utilizado para dois fins distintos: averiguação da ligação das lectinas às membranas para o ensaio bidimensional (IEF/SDS-PAGE) ou para eluição das lectinas ligadas por incubação com hidratos de carbono, com especificidade previamente determinada.

Em paralelo, decorreu um ensaio em branco, substituindo-se a incubação do extracto de proteínas total com as membranas, por soro fisiológico.

#### **1.2.3.1.1. Eluição sequencial das lectinas ligadas às membranas por diferentes hidratos de carbono**

Com o intuito de eluir as lectinas ligadas às membranas e, com base na especificidade a hidrato de carbono exibida pelas lectinas constituintes do respectivo extracto de *Corema album*, previamente determinado no laboratório, foi-se eluir diferenciadamente a(s) diferente(s) lectina(s).

Aos sedimentos resultantes da incubação do extracto de *Corema album* com as membranas, obtidos no ponto 1.2.3, do Capítulo III, que continha lectinas associadas às membranas, adicionou-se sequencialmente três soluções de hidratos de carbono, nomeadamente melezitose, manosido e glucosido a 0,4 M, preparadas em soro fisiológico, contendo 2 mM CaCl<sub>2</sub> e 2 mM MgCl<sub>2</sub>.

### **Procedimento**

Após a obtenção do sedimento constituído pelas lectinas ligadas às membranas prosseguiu-se o ensaio com a solubilização do sedimento, obtido no ponto 1.2.3.1, do Capítulo III, em 3 ml de soro fisiológico, contendo sais (2 mM CaCl<sub>2</sub> e 2 mM MgCl<sub>2</sub>), tendo-se retirado uma aliquota de 400 µL, para determinação do teor proteico e realização de ensaios electroforéticos (controlo da incubação). Posteriormente adicionou-se 2,5 mL de uma solução de melezitose 0,4 M e incubou-se durante 35 min, a 25 °C, com agitação rápida, seguido de uma centrifugação (Beckman J2-21M/E, Rotor JA 20.000) a 27.216 x g, durante 15 min, a +4 °C. O sobrenadante contendo as lectinas com especificidade para a melezitose, foi conservado a -80 °C, em tubos falcon de 15 mL, até serem utilizados para determinação do teor proteico e ensaios electroforéticos.

O sedimento resultante, constituído na sua maioria por membranas, poderá, ainda conter outras lectinas com afinidade para outros hidratos de carbono permanecendo por isso, ainda aderentes às membranas. Assim, foram eluidas sequencial os restantes hidratos de carbono, para os quais já tinha sido detectado especificidade para o extracto em estudo, pela seguinte ordem, manosido seguido do glucosido. Entre cada eluição, as membranas foram exaustivamente lavadas com soro fisiológico, contendo 2 mM CaCl<sub>2</sub> e MgCl<sub>2</sub>, de modo a eliminar o hidrato de carbono anteriormente testado.

Paralelamente, realizou-se um ensaio em branco, em que as membranas previamente incubadas com soro fisiológico, foram igualmente incubadas com os hidratos de carbono para as respectivas eluições sequenciais, sendo o ensaio executado de modo idêntico ao da amostra.

#### **1.2.3.2. Avaliação do potencial da ligação de proteínas do tipo lectina à membrana das células HT29**

A avaliação da ligação de proteínas do tipo lectina à membrana das células HT29, foi sustentada a partir da realização das técnicas electroforéticas, nomeadamente, SDS-PAGE e eletroforese bidimensional (IEF/SDS-PAGE).

#### 1.2.3.2.1 SDS-PAGE

Com o objectivo de associar ao perfil polipeptídico da incubação, o perfil polipeptídico das lectinas eluidas, foram aplicadas as amostras: extracto de proteínas totais de *Corema album*; membrana das células HT29; membrana incubada com o extracto e os eluídos de hidratos de carbono, designadamente, melezitose, manosido e glucosido.

##### **Procedimento**

O procedimento foi efectuado de acordo com o descrito no ponto 1.2.1.3.1, do Capítulo II.

#### 1.2.3.2.2. Separação Bidimensional

A electroforese bidimensional (2D) foi inicialmente desenvolvida por O'Farrel e Klose em 1975, mas foi na última década que ocorreram os grandes avanços nos métodos que possibilitaram identificar proteínas separadas através de 2D de forma sensível, rápida e conclusiva.

O recurso à técnica de electroforese bidimensional, neste trabalho, teve o intuito de aumentar a resolução na separação das proteínas, de forma, a permitir a identificação das suas diferentes isoformas (Low *et al.*, 2002).

Esta técnica é uma junção de duas técnicas de separação proteica, a focagem isoeléctrica (*isoelectric focusing* - IEF) e a electroforese unidimensional (SDS-PAGE R). A primeira dimensão é a de IEF que se baseia nas propriedades anfotéricas e no ponto isoeléctrico (pI) das proteínas. As proteínas são colocadas num gel de poliácridamida com um gradiente de pH (*strip* ou tira) e sujeitas a um campo eléctrico, onde migram até atingirem o pH correspondente ao seu pI. A segunda dimensão é um SDS-PAGE R, mas difere da técnica descrita no ponto 2.3.1., no facto de não existir um gel de concentração anterior ao de separação, pois as proteínas já se encontram concentradas na tira de IEF.

As amostras, após a incubação com membranas HT29, foram sujeitas à análise por electroforese bidimensional de modo a se evidenciar as ligações das lectinas, constituintes dos diferentes extractos, aos receptores glicosilados das membranas HT29.

##### 1.2.3.2.2.1. Focagem Isoelectrica (1D - IEF)

O ponto isoeléctrico (pI) de uma proteína corresponde ao valor de pH no qual o somatório de todas as suas cargas parciais é igual a zero. O ponto isoeléctrico é atingido por uma técnica conhecida como focagem isoeléctrica. Esta técnica consiste numa separação eletroforética, segundo a qual as proteínas são ordenadas de acordo com as diferenças dos

seus pontos isoeléctricos (1ª dimensão). Uma vez submetidas a um campo eléctrico, as proteínas migram até encontrar a faixa de pH referente ao seu pI de modo a que fiquem com uma carga total neutra. Atingindo esse ponto, a migração é imediatamente interrompida no gel.

É primordial a preparação da amostra para isentá-la de sais, detergentes, compostos fenólicos, ácidos nucleicos e polissacáridos, compostos que interferem com a migração dos polipéptidos no gel.

Trataram-se previamente os extractos de proteína total, das quatro espécies em estudo, trocando tampão de extracção para água MilliQ, recorrendo a colunas PD-10 (GE-Healthcare), e lavagem dos extractos (3 a 4 vezes), por ultrafiltração em centricons (Microsep Advanced Centrifugal Devices, PALL) de *cut-off* 10 kDa, usando água bidestilada MilliQ. Após as lavagens necessárias as amostras foram precipitadas com acetona e o pellet ressuspenso no volume necessário de tampão solubilização (7 M ureia, 2 M tioureia, 2% (v/v) NP-40, 1% DTT), adicionado de IPG buffer (4 µL de IPG adicionados a 200 µL de tampão de solubilização, para tiras de IEF, de 11 cm). Depois de solubilizadas, as amostras foram sujeitas a uma centrifugação, a 21.500 x g, durante 10 min (VWR CT15RE).

### **Procedimento**

O teor proteico da amostra, a colocar na tira de focagem, deverá estar de acordo com a dimensão da tira utilizada, com o tipo de amostra e com o método de coloração compatível com a análise bidimensional e com o objectivo de análise. Para tiras de focagem de 11 cm de comprimento, com gradiente de pH de 3-10, o mínimo de proteína deverá ser de 100 µg, em um volume de 200 µL.

Utilizaram-se tiras de focagem impregnadas de imobilinas, tiras IPG (do inglês *immobilized pH gel*), de 11 cm, com formação de um gradiente de pH de 3 a 10, obtidas comercialmente à BioRad.

As membranas HT29 controlo e as membranas HT29 incubadas com os extractos em estudo, com uma concentração proteica de aproximadamente 1 mg, foram concentradas a 200 µL e depositadas nos corredores do suporte *IPGphor* (sarcófago), para focagem. As tiras de IEF foram descongeladas e após remoção da película protectora, foram colocadas sobre as amostras. O lado do gel ficou sempre em contacto com as amostras e as tiras foram colocadas de acordo com os respectivos pólos do suporte do aparelho de focagem (*IPGphor*). Em seguida, colocou-se o suporte (sarcófago) no aparelho de focagem e programou-se a rehidratação *overnight* durante 12 horas, 30V.h. Terminada a rehidratação, a corrida foi realizada em seis etapas programadas do seguinte modo: etapa 1 – 250 V.h,

1h; etapa 2 – 500 V.h., 2h; etapa 3 – 1.000 V.h, 2 h; etapa 4 – 2.500 V.h, 3,5h; etapa 5 - 8.000 V.h, 1h; etapa 6 – 8.000 V.h, 25 minutos. Finalizado a focagem isoelectrica, retirou-se a tira e acondicionou-se esta em tubo de vidro, sendo conservada a -80 °C, até ser ensaiada para análise bidimensional – 2D.

#### **1.2.3.2.2. Separação bidimensional (2D - IEF / SDS-PAGE R)**

Na separação bidimensional (2D), os polipéptidos focados (IEF), são separados de acordo com o seu peso molecular num gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE R). A completa desnaturação e redução dos polipéptidos tratadas com DTT (agente redutor), resultam na disrupção da estrutura terciária pela redução das ligações persulfureto, no desdobramento e conseqüente complexação com o SDS. O SDS é um detergente aniónico que confere carga negativa às proteínas, permitindo a sua separação consoante o seu peso molecular através do eléctrodo positivo (ânodo) do gel de poliacrilamida. Cada *spot* visível no gel corresponde a um péptido e permite inferir informações como o seu ponto isoelectrico e o seu peso molecular, conferindo à electroforose 2D uma importância única, como ferramenta, na resolução de misturas proteicas complexas.

#### **Procedimento**

Após a focagem isoelectrica (1D-IEF), a tira foi incubada em tampão de estabilização (Tris-HCl, 50 mM, pH 8,8, 6 M ureia, 2 % (m/v) SDS, 30 % (v/v) glicerol, 1 % (m/v) ditiotreitól (DTT)), durante 15 minutos à temperatura ambiente, com agitação suave. Finalizada a primeira incubação, a tira foi sujeita a nova incubação para remoção do DTT, durante 15 minutos, sob agitação suave, com uma solução semelhante à anterior contendo 2,5 % (m/v) de iodoacetamida (em substituição do ditiotreitól). Após a ultima incubação a tira foi colocada no topo de um gel SDS-PAGE 17,5 % (m/v) de acrilamida, com 1 mm de espessura, selada com uma solução de agarose de baixa electroendosmose (EEO), a 0,5 % (m/v), feita em tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 8,8, contendo azul bromofenol a 0,002 % (m/v), para visualização da linha da frente durante a separação electroforética. Estabeleceram-se as condições electroforéticas, inicialmente de 15 mA e 220 V, durante 15 min, para entrada da amostra no gel, seguido de uma corrente eléctrica de 30 mA e uma diferença de potencial de 220 V, até ao final da corrida.

Após finalização da corrida, realizou-se o tratamento e a coloração do gel com nitrato de prata, em conformidade com o procedimento descrito no ponto 1.2.1.4.1, do capítulo II.

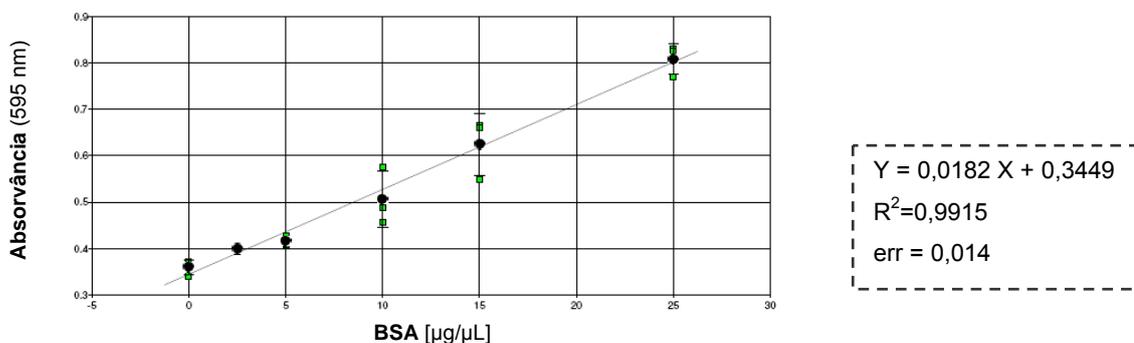
## 2. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Mudanças qualitativas e quantitativas nos componentes glicoprotéicos das membranas celulares são altamente significantes no desenvolvimento e progressão de muitos processos neoplásicos (Yu *et al.*, 2001). As lectinas, em particular, são ferramentas sensíveis, estáveis e de fácil utilização para distinguir células normais das cancerígenas (Litynska *et al.*, 2001).

No presente estudo foi escolhida a linhagem celular de carcinoma do cólon humano HT29 para avaliar o efeito de proteínas do tipo lectina das espécies em estudo, na sua ligação às membranas por afinidade aos receptores glicosilados. A origem da linha celular HT29 e a escassez de trabalhos relacionando-as com lectinas foram fundamentos determinantes na escolha desta linhagem. As células HT29 são células epiteliais do intestino humano, com característica aderente e tumorigénico.

### 2.1. Avaliação da ligação por afinidade de proteínas do tipo lectina aos receptores glicosilados das membranas de células HT29

Após cultura, propagação e reunião do volume necessário de células HT29 para obtenção das respectivas membranas, fez-se a quantificação da concentração proteica pelo método de Bradford, obtendo-se uma curva de calibração, ilustrada na figura III.1.



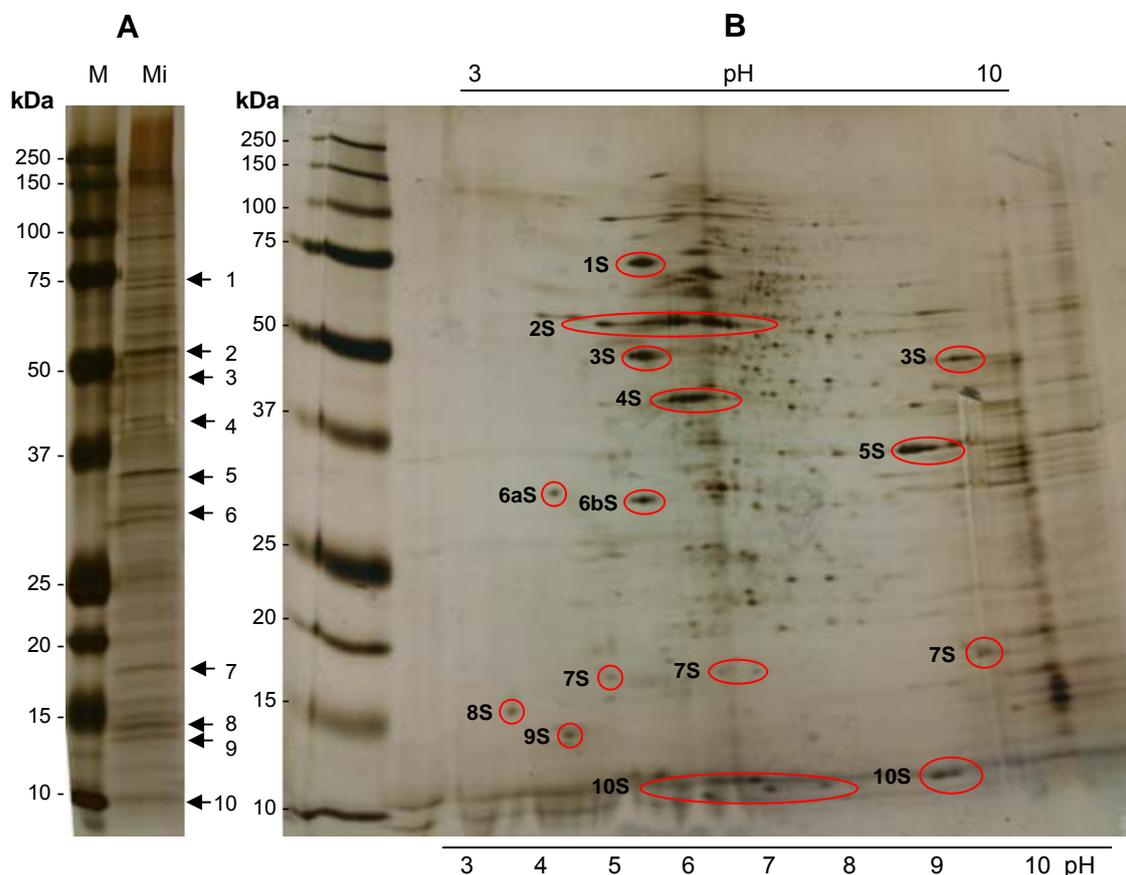
**Figura III.1** - Curva de calibração de BSA, com absorvência a 595 nm (y), em função da concentração de BSA ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (x).

Por interpolação da leitura da absorvência da amostra no espectrofotómetro (software KC4), obteve-se a concentração de proteínas de membrana das células HT29 de 14,87  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

A análise proteómica das lectinas envolvidas, na ligação aos receptores glicosilados, das membranas das células HT29, fez-se por comparação entre a membrana original HT29 (Membrana inicial - Mi) (Figura III.2), para a qual se aplicaram 1 mg de proteína e, as

membranas sujeitas à incubação com os extractos de *Juniperus oxycedrus oxycedrus* (Joox), *Juniperus oxycedrus badia* (Joba), *Arbutus unedo* (Aun) (Figura III.4) e *Corema album* (Cal) (Figura III.3).

A análise polipeptídica da membrana HT29 (Membrana inicial) (figura III.2 – Painel A) revela um perfil polipeptídico abrangente e bastante complexo, apresentando muitas bandas polipeptídicas. No perfil electroforético, realizado em SDS PAGE NR, estão referenciadas algumas das bandas mais representativas, correspondendo a uma zona mais complexa com bandas de elevado peso molecular, com valores compreendidos entre ao 100 e 30 kDa, correspondendo as setas de 1 a 6 e uma zona menos abrangente posicionada na região inferior do gel, equivalente a baixos pesos moleculares, com valores abrangidos de 20 a 10 kDa, correspondendo às setas de 7 a 10.



**Figura III.2** - Perfil proteómico de membrana das células HT29 (Mi). **(A)** Perfil electroforético em gel SDS-PAGE NR, 17,5% (m/v) de acrilamida e coloração pelo  $\text{AgNO}_3$ . **(B)** Electroforese bidimensional (IEF/SDS-PAGE), em gel 17,5% (m/v) de acrilamida e coloração pelo  $\text{AgNO}_3$ . Aplicaram-se 3  $\mu\text{L}$  de marcador de massa molecular (M).

Verifica-se no painel B, da figura III.2, um perfil complexo, com uma elevado número de spots, apresentando uma elevada abrangência de pI. Pode-se observar que os péptidos se distribuem maioritariamente na zona perto da neutralidade, encontra-se mais denso na

zona entre pH 5 a 8, existindo alguns spots representativos na zona fortemente básica e ácida, visto que os spots se desenvolvem numa zona de aproximadamente, pH 3 a 10.

No estudo comparativo entre o painel A e B da Figura III.2, é possível criar a correspondência entre as bandas mais representativas e as respectivas isoformas, assinaladas na Figura III.2, no painel B, de acordo com a tabela III.1.

**Tabela III.1** - Valores representativos dos pesos moleculares e dos respectivos pontos isoeléctricos das membranas das células HT29, de acordo com a análise da figura III.2.

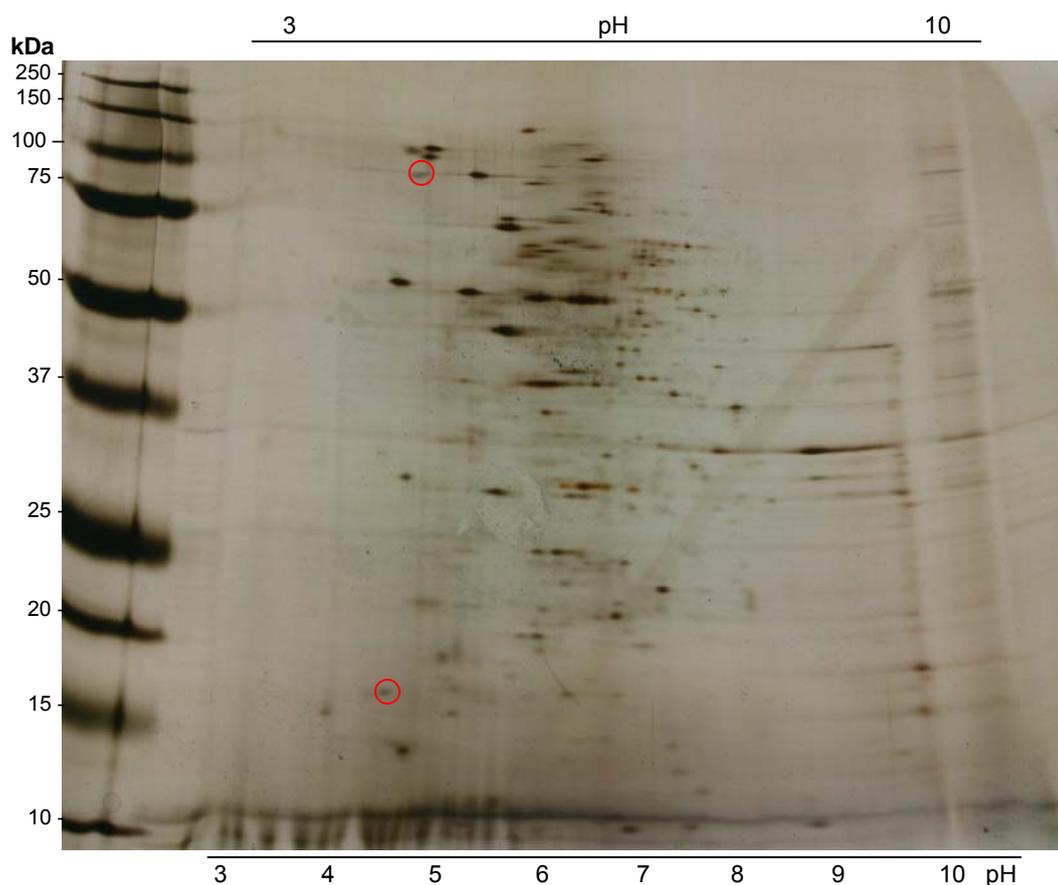
SDS-PAGE NR		IEF / SDS-PAGE R (2D)	
Bandas		Pontos Isoelectricos (Spots)	
Código	kDa	Código	pH
1	75	1S	5
2	55	2S	4; 5 a 7 (*)
3	48	3S	5 (*); 9
4	40	4S	6 (*)
5	35	5S	9 (*)
6 (a / b)	30 / 31	6aS / 6bS	4 / 5
7	17	7S	5; 6; 7; 10
8	14	8S	4
9	13	9S	5
10	10	10S	6; 7; 9 (*)

(\*) Apresenta um ponteadado alargado.

O extracto de proteína total de *Corema album* foi incubado com as membranas isoladas de células HT29 de acordo com o procedimento descrito no ponto 1.2.3 e seguintes, do Capítulo III (Figura III.3). Tendo por base resultados referenciados em trabalhos anteriores da inibição da actividade hemaglutinante, seleccionou-se um painel de hidratos de carbono que exibiram forte inibição da actividade hemaglutinante da proteína ensaiada. Este painel, foi constituído por ordem decrescente de inibição da actividade hemaglutinante. Após incubação das membranas de células HT29 com proteína total do extracto, efectuaram-se três eluições sequenciais das proteínas ligadas: melezitose, metil- $\alpha$ -manosido e metil- $\alpha$ -glucopiranosido, na concentração de 0,4 M. A figura III.4 revela o perfil polipeptídico da eluição sequencial em que, após a primeira eluição com o primeiro hidrato de carbono (Melezitose - E<sub>1</sub>), se seguiram as restantes pela ordem descrita acima, sempre

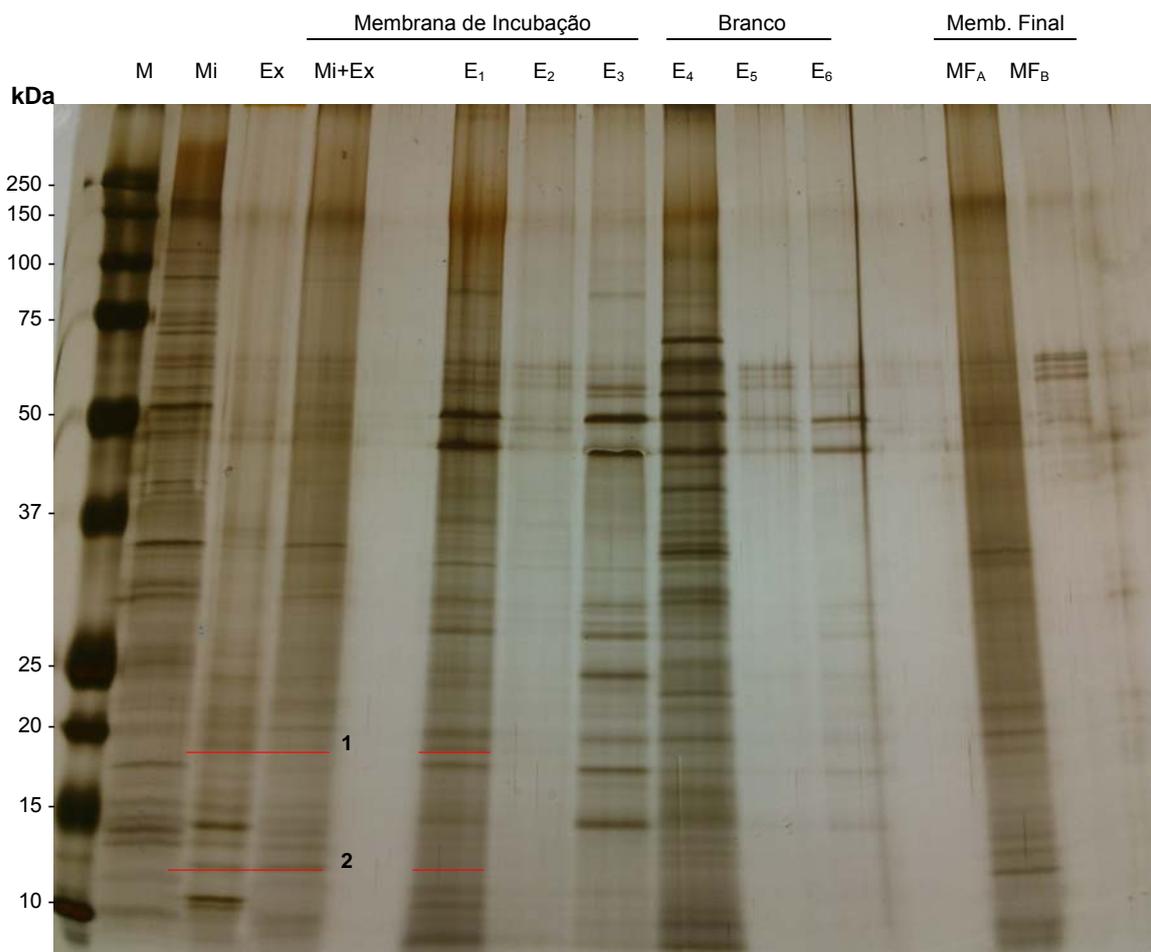
precedidos de lavagens com soro fisiológico, contendo 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  e 2 mM de  $\text{Mg}^{2+}$ , de modo a garantir e efectiva remoção do hidrato de carbono anterior.

A avaliação da ligação por afinidade de proteínas do tipo lectina aos receptores glicosilados das membranas de células HT29, foi estudado a partir da realização de técnicas electroforéticas.



**Figura III.3** - Análise bidimensional da membrana após incubação. Electroforese bidimensional (IEF/SDS-PAGE R) da incubação da membrana das células HT29 com extracto de proteína total da folha da *Corema album*, em gel 17,5% (m/v) de acrilamida e coloração pelo  $\text{AgNO}_3$ . Aplicaram-se 1 mg de proteína de membrana incubada com 1.6 mg do extracto de *Corema album*.

Fez-se a análise comparativa entre a electroforese 2D da incubação da membrana das células HT29 com extracto de *Corema album* (figura III.3) e a electroforese 2D das membranas das células HT29 (figura III.2) e evidenciou a existência de pelo menos dois spots peptídicos do extracto *Corema album* ligados às membranas das células HT29. Os peptídicos ligantes assinalados da figura III.3, revelam pI nitidamente ácido, entre pH 4 e 5, e de massa molecular aproximadamente de 18 kDa e 90 kDa, respectivamente.



**Figura III.4** - Análise da ligação de proteína do tipo lectina de *Corema album* às membranas das células HT29 após Incubação e eluição pelos hidratos de carbono por SDS-PAGE R. Perfil electroforético em gel SDS-PAGE R, 17,5 % (m/v) de acrilamida e coloração pelo  $\text{AgNO}_3$ , representativo da eluição sequencial de proteína(s) do tipo lectinas de *Corema album* pelos hidratos de carbono, após a sua ligação à membrana da célula HT-29. Aplicaram-se 3  $\mu\text{L}$  de marcador de massa molecular (M), 10  $\mu\text{g}$  de membrana inicial de célula HT-29 (Mi), incubadas com soro fisiológico, 34  $\mu\text{g}$  de extracto de proteína total de folha de *Corema album* (Ex), 30  $\mu\text{g}$  de membrana de incubação (Mi+Ex), 17  $\mu\text{g}$  de membrana final da amostra ( $\text{MF}_A$ ), 10  $\mu\text{g}$  de membrana final do branco ( $\text{MF}_B$ ) e 25  $\mu\text{g}$  de cada eluido resultante da amostra ( $\text{E}_1$ ,  $\text{E}_2$  e  $\text{E}_3$ ) e do respectivo branco ( $\text{E}_4$ ,  $\text{E}_5$  e  $\text{E}_6$ ). Ensaiou-se uma bateria de três hidratos de carbono constituído por melezitose (Mel), metil- $\alpha$ -manosido (Man) e metil- $\alpha$ -glucopiranosido (Glu), todos com uma concentração de 0,4 M. O primeiro glícido a ser testado na eluição das lectinas ligadas à membrana foi a Mel ( $\text{E}_1$ ), seguido da Man ( $\text{E}_2$ ) e por último Glu ( $\text{E}_3$ ), seguiu-se a mesma sequência para o Branco ( $\text{E}_4$ ,  $\text{E}_5$  e  $\text{E}_6$ ).

O ensaio da ligação de proteína do tipo lectina de *Corema album* às membranas das células HT29 após incubação por SDS-PAGE R, mostrou que existem pelo menos duas bandas que se ligaram às membranas das células HT29, com massa molecular de 13 kDa e

18 kDa. O estudo comparativo entre os resultados da 2D (figura III.3) e o SDS-PAGE R (figura III.4 – Mi+Ex) da membrana de incubação revela a banda de massa molecular 18 kDa com pI de aproximadamente pH 4,5.

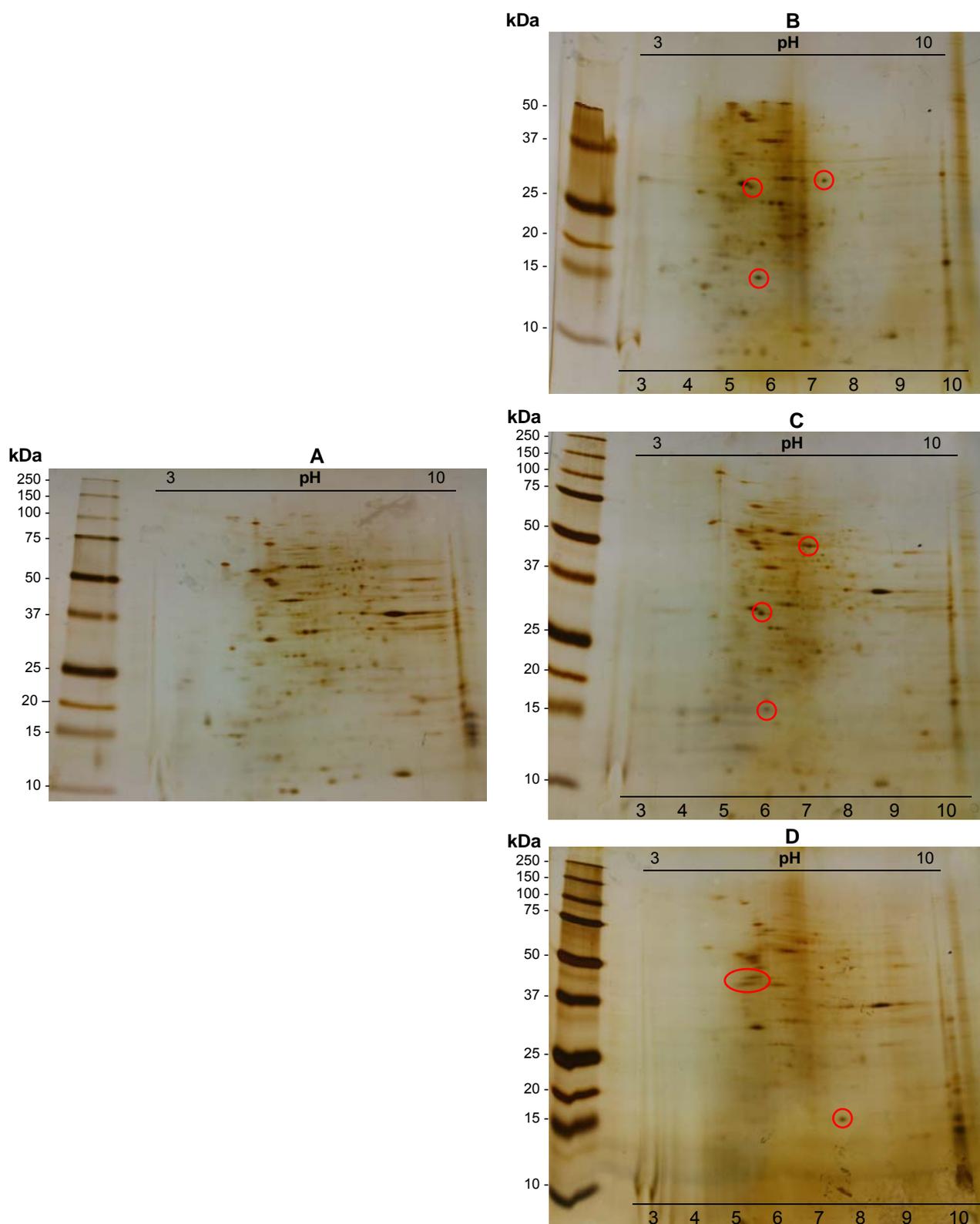
Após incubação do extracto de proteína total de *Corema album* com as membranas das células HT29, fez-se a eluição das proteínas ligadas com Melezitose 0,4 M, o hidrato de carbono que provocou maior inibição sobre a actividade hemaglutinante, revelando desadsorção das bandas de massa molecular de 13 kDa e 18 kDa a partir da incubação da membrana com o extracto, não demonstrando o mesmo comportamento relativamente aos restantes açúcares ensaiados.

A incubação dos restantes extractos em estudo com as membranas das células HT29, por análise bidimensional (2D), está representada na Figura III.5.

Fez-se a análise comparativa entre a electroforese 2D do controlo das membranas das células HT29 e a electroforese 2D da incubação da membrana com os extractos de folha de *Juniperus oxycedrus oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus badia* e *Arbutus unedo*, de forma, a validar a existência de ligações das proteínas do tipo lectinas dos extractos em estudo às membranas das células HT29. As diferenças marcantes entre os *spots* peptídicos, registados na figura III.5, estão registadas no mapeamento de cada painel B, C e D, revelando a ligação de proteína do tipo lectina aos receptores glicosilados das membranas de células HT29.

Os 3 *spots* peptídicos, separados bidimensionalmente, assinalados na figura III.5.B, representam as ligações de proteína do tipo lectina do *Juniperus oxycedrus oxycedrus* aos receptores glicosilados da membrana das células HT29. Dois dos *spots* com pI de aproximadamente 6,0 e com massas moleculares por volta de 30 kDa e 15 kDa, o *spot* restante compreende um pI próximo do 7,0, e com massa molecular de aproximadamente 32 kDa.

No mesmo tipo de ensaio 2D, mas com extracto de *Juniperus oxycedrus badia*, foram identificados 3 *spots* peptídicos, assinalados na figura III.5.C, que se ligaram aos receptores glicosilados das membranas das células HT29. Os *spots* com pI próximo de 6,0, revelam a mesma massa molecular dos *spots* identificados na figura III.5.B, podendo manifestar uma característica do perfil proteómica da espécie *Juniperus oxycedrus*. O terceiro *spot* assinalado compreende uma massa molecular de aproximadamente 50 kDa, com um pI próximo dos 7,0.



**Figura III.5** - Análise bidimensional de proteínas do tipo lectinas ligadas a membrana de células HT-29. **(A)** Electroforese bidimensional da membrana de célula HT-29, aplicou-se 1 mg de proteína membranas. Electroforese bidimensional do extracto proteico total de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* **(B)**, *Juniperus oxycedrus* Subsp. *badia* **(C)** e *Arbutus unedo* **(D)**, obtido após incubação com membrana de células HT-29, aplicou-se 1.6 mg de proteína de amostra e 1 mg de proteína membranas, em gel 17,5% (m/v) de acrilamida e coloração pelo  $\text{AgNO}_3$ .

Concluíram-se os ensaios 2D com o extracto de *Arbutus unedo*, identificando 3 spots peptídicos, na figura III.5.C, com ligação aos receptores glicosilados das membranas das células HT29. Dois dos spots com pI e massa moleculares muito semelhantes, nomeadamente 5 (pH) e entre 44 a 46 kDa. Apresentando o terceiro spot identificado como ligante um pI de 8,0 e uma massa molecular de aproximadamente 15 kDa.

## Capítulo IV – Avaliação da Actividade Antitumoral em Extractos Proteicos de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* e *Corema album*.

### 1. MATERIAL e MÉTODOS

#### 1.1 Material Biológico

##### 1.1.1. Material biológico vegetal

Utilizaram-se extractos de folhas das quatro espécies em estudo, designadamente, *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* e *Corema album*, obtidos de acordo com o descrito no ponto 1.2.1, do Capítulo II.

A procedência do material vegetal é idêntica à descrita no ponto 1.1.1 do Capítulo II.

##### 1.1.2. Material biológico animal

Utilizaram-se células HT29, obtidas de acordo com o descrito no ponto 1.2.1, do Capítulo III. A procedência da linha celular HT29 encontra-se igualmente descrita no ponto 1.1.2, do Capítulo III.

#### 1.2. Métodos

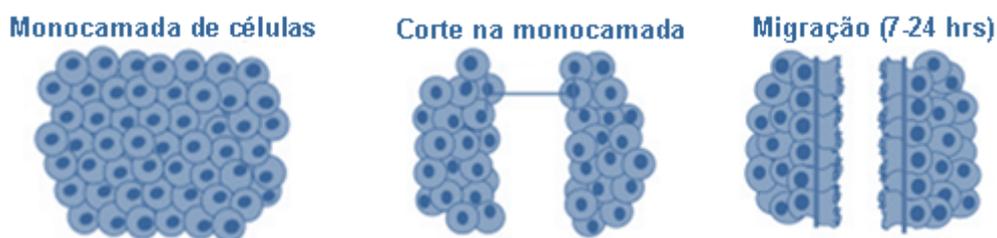
No estudo da actividade anti-tumoral de compostos bioactivos, é necessária a avaliação *in vitro* do potencial citotóxico em culturas de células tumorais (O'Toole *et al.*, 2003).

Com o intuito de avaliar o potencial citotóxico das espécies em estudo na linha celular HT29, foram efectuados ensaios de citotoxicidade nos extractos de proteína total das espécies *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* e *Corema album*, através do ensaio de inibição da invasão celular, em placas de 24 poços ( $2 \times 10^5$  células/mL por poço).

##### 1.2.1. Ensaio de inibição da invasão celular em linha celular HT29

Com o objectivo de avaliar o efeito inibidor na invasão das células HT29, realizou-se o “wound assay”, ilustrado na figura IV.1. Este ensaio *in vitro*, permite avaliar a migração

celular entre as duas margens de um riscado, produzido na monocamada do tapete celular. A migração é monitorizada com recolha de fotografias, em intervalos de tempo predefinidos, e quantificada a taxa de migração a partir da comparação das imagens capturadas em diferentes períodos de tempo, frente a um controlo feito na ausência das espécies para as quais se está a testar o efeito inibitório.



**Figura IV.1** - Esquema representativo do “wound assay”.

### **Procedimento**

Na fase de propagação da linha celular, descritas no ponto 1.2.1.1. e 1.2.1.2., do Capítulo III, transferiu-se 1 mL da suspensão celular, contendo uma concentração de  $2 \times 10^5$  de células HT29 em meio de cultura completo, para cada poço da placa. A placa de 24 poços foi colocada numa estufa de incubação a 37 °C, com 5 % de CO<sub>2</sub> (Estufa Shel Lab CO<sub>2</sub> Series, Shledon Mfg, Incorporated). Decorridas 24 horas ou até se atingir uma confluência superior a 90 %, fez-se um sulco linear, na monocamada do tapete celular, com auxílio da ponta de uma micropipeta (P200). Após ligeira agitação manual, descartou-se o meio de cultura e lavou-se com PBS, de modo a remover as células soltas, finalizando com adição de 1 mL de novo meio de cultura RPMI e 100 µL de amostra (100 µg de extracto total proteico). Foram utilizados dois controlos no ensaio de invasão celular, um constituído apenas por meio RPMI e o segundo, igualmente constituído por meio RPMI, ao qual foi adicionado 100 µL de soro fisiológico (Solução em que se encontravam os extractos proteicos). As amostras e controlos foram ensaiados em quadruplicado. A placa foi incubada em estufa de incubação a 37 °C, com 5 % de CO<sub>2</sub> (Estufa Shel Lab CO<sub>2</sub> Series, Shledon Mfg, Incorporated), durante 48 horas. Procedeu-se à avaliação microscópica (Leica) e registo fotográfico, entre cada período de 24 horas, de modo a avaliar a percentagem de inibição da invasão celular provocada pelos extractos ensaiados, frente aos dois controlos. O aumento das células em suspensão que poderá também ocorrer, foi igualmente analisado.

## 1.2.2. Análise da actividade proteolítica

A actividade proteolítica dos meios resultantes do “wound assay”, após 48 horas de incubação e, que revelaram inibição de migração celular, ao nível do riscado, *Juniperus oxycedrus badia* e *Arbutus unedo*, foram testados, frente aos dois controlos usados anteriormente, para avaliar a actividade proteolítica, por ensaio Zimográfico. Esta técnica permite avaliar a existência de inibição da actividade gelatinolítica.

### 1.2.2.1. Actividade gelatinolítica por zimografia

Mediante uma técnica electroforética fez-se a avaliação da actividade de proteases, neste caso das gelatinases MMP-2 e MMP-9, através da degradação do substrato destas enzimas, no próprio gel de acrilamida, após a sua separação por SDS-PAGE.

O substrato das proteases, a gelatina, é adicionado ao gel de separação ficando retido na malha de acrilamida após a sua polimerização. Após a separação electroforética das proteases, o gel é lavado com uma solução de 2,5% (v/v) Triton X-100, para retirar o SDS e renaturar as proteases das amostras aplicadas. Após incubação, o gel é corado em Coomassie brilliant blue G250, ficando completamente azul, com excepção das bandas representativas das proteases activas que se revelam transparentes, pelo facto de que, nesta zona do gel, a proteína (gelatina) ter sido digerida.

#### 1.2.2.1.1. Separação Electroforética

Em qualquer ensaio, o tratamento da amostra revela-se de uma enorme importância, para tornar o resultado final preciso e exacto. Antes de iniciar o ensaio prepararam-se amostras das folhas do *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Arbutus unedo*, substituindo o tampão de extracção por soro fisiológico, contendo 2 mM CaCl<sub>2</sub> e 2 mM MgCl<sub>2</sub>, recorrendo a colunas PD-10 (GE-Healthcare), e lavagem dos extractos por ultrafiltração em centricons (Microsep Advanced Centrifugal Devices, PALL) de *cut-off* 10 kDa.

#### Procedimento

Os zimogramas foram preparados usando 1% de gelatina co-polimerizada em géis de 12,5% (m/v) poli-acrilamida. As amostras foram aplicadas nos géis sem sofrerem desnaturação por aquecimento ou redução, sendo apenas incubadas com tampão não redutor (Tris-HCl 63 mM pH 6,8; 10% (v/v) Glicerol, 2% (v/v) SDS; 0,01% (m/v) Azul de Bromofenol), durante 10 minutos, à temperatura ambiente, antes da aplicação nos géis.

O sistema praticado foi descontínuo, composto pelo gel de separação, constituído por uma matriz de acrilamida de 12,5% (m/v), 0,1% (m/v) bisacrilamida, tampão Tris-HCl 370

mM pH 8,8, 1 % (m/v) gelatina, 0,03 % (m/v) persulfato de amónio (PSA), 0,03% (v/v) tetrametiletilenediamina (TEMED). O gel de concentração foi constituído por uma matriz de 5% (m/v) de acrilamida, 0,16 % (m/v) bisacrilamida, tampão Tris-HCl 700 mM pH 6,8, persulfato de 0,1% (m/v) amónio (PSA), 0,5% (v/v) tetrametiletilenediamina (TEMED).

A electroforese foi realizada num sistema vertical Mini Protean (BioRad), com tampão de electroforese (Tris-Base 25 mM, 200 mM Glicínia, 0,02% (m/v) SDS), sendo sujeita a uma corrente eléctrica de 20 mA, e uma diferença de potencial de 200 V, por gel, utilizando-se uma fonte de alimentação da marca Pharmacia/LKB e modelo EPS 500/400.

Para comparar os resultados produzidos no ensaio zimográfico, preparou-se igualmente um gel controlo, substituindo-se o substrato de gelatina por H<sub>2</sub>O bidestilada, realizando-se após a corrida electroforética a fixação e a coloração do gel por Coomassie brilliant bleu G250 (CBB G250), cuja constituição da solução está descrita no procedimento do ponto 1.2.2.1.2, do Capítulo IV. Assim, fez-se durante 10 min. a fixação do gel com solução de Ácido tricloroacético (TCA) a 10% (m/v). Seguiu-se a coloração com CBB G250 durante a noite, precedida de lavagem com água bidestilada. Após coloração, descorou-se com água, procedendo-se a várias lavagens, até revelação conveniente dos péptidos.

#### **1.2.2.1.2. Detecção da actividade de gelatinase**

Após a separação das bandas proteicas por corrida electroforética, retirou-se o SDS, para permitir uma melhor activação dos enzimas e permitir um melhor desempenho da incubação na digestão das bandas. A visualização das bandas com actividade proteolítica foi possível através de ensaios de coloração com CBB G250.

#### **Procedimento**

Concluída a electroforese, o gel foi passado por água destilada e sujeito a 3 lavagens, com uma solução de 2,5% de Triton X-100, com agitação moderada, durante 1 hora (por cada lavagem), para remover o SDS. De seguida, os géis foram incubados com tampão de zimografia (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 µM ZnCl<sub>2</sub> e 0,01 % (m/v) Azida de Sódio), durante a noite, à temperatura de 37 °C, podendo prolongar-se a incubação até 48 horas, de modo a potenciar a actividade proteolítica. Finalmente, a actividade proteolítica foi detectada por coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,5% (m/v) coomassie G250, 30% (v/v) etanol e 10% (v/v) ácido acético), em agitação moderada, durante 24 horas ou até ficar azul escuro, prosseguindo-se com a descoloração em 30% etanol e 10% ácido acético, com agitação moderada, até se visualizarem bandas transparentes, de forma a validar a actividade de gelatinase.

## 2. RESULTADOS e DISCUSSÃO

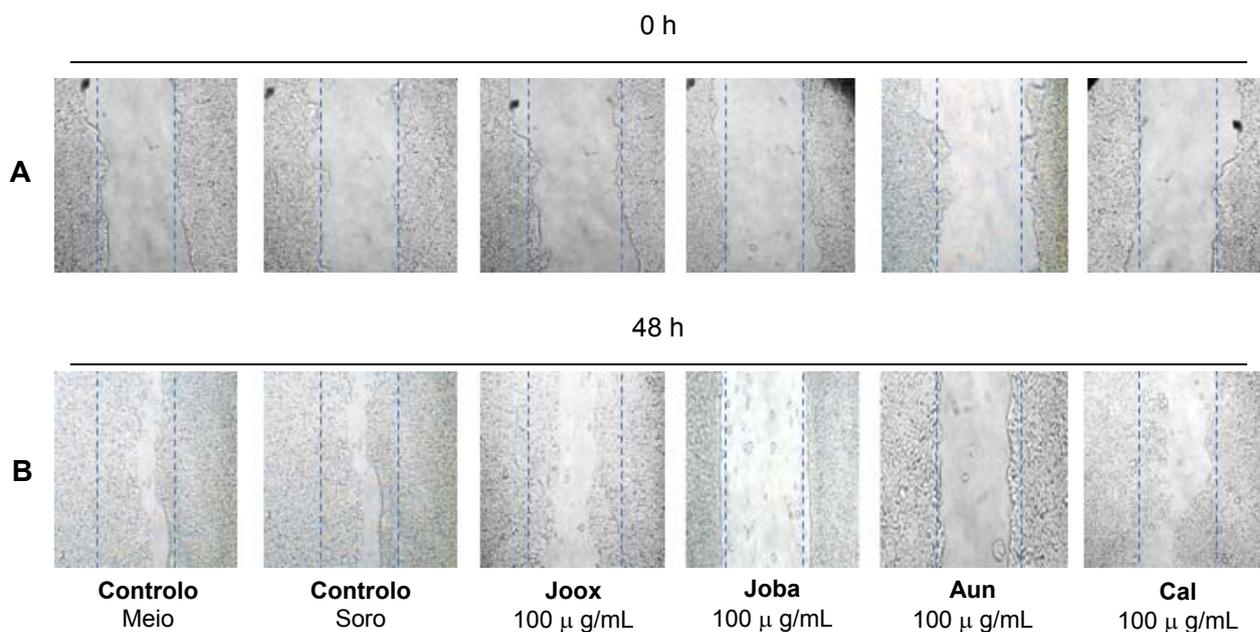
O prognóstico de doentes com o carcinoma do cólon está relacionado com o grau de invasão das células através da parede do intestino e a presença ou ausência de metástases. Estas são algumas das características deste tumor em que se basearam os testes desenvolvidos, de modo a avaliar a capacidade de invasão deste carcinoma (Patwardhan *et al.*, 2006).

### 2.1. Análise da inibição da invasão celular em células HT29

Com o objectivo de avaliar a inibição, provocada pelos extractos proteicos de folhas de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* e *Corema album*, na invasão tumoral em linhas celulares do carcinoma do cólon (HT29), utilizou-se o método “wound assay”, conforme procedimento descrito em IV.1.2.1.

A capacidade de invasão celular *in vitro*, após efectuar-se uma ferida na monocamada de células HT29, estabelece um prognóstico da capacidade de formação de metástases num organismo vivo (Yang *et al.*, 2014). Nas margens da ferida, produzida artificialmente, as células têm tendência natural a fechar, até o novo contacto célula-célula voltar a estabilizar o crescimento.

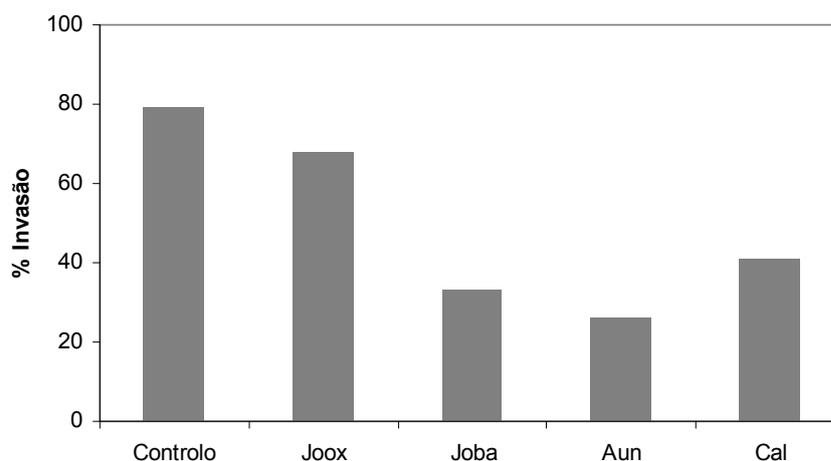
A figura IV.2 regista o fecho da ferida após 48 horas de incubação com os extractos proteicos. Por comparação com o respectivo tempo zero dos referidos extractos proteicos, adicionados em cada poço e, comparação com os respectivos controlo do meio e do soro fisiológico, no tempo zero, objectivou-se a capacidade inibitória destas extractos. Assim, verificou-se que no controlo, após 48 horas de incubação, obteve-se uma média de 80% de invasão do corte, em comparação com uma menor percentagem de invasão celular quando exposta aos extractos. Com uma maior percentagem de invasão celular para o ensaio com extracto proteico de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, com 68% de invasão do corte, em oposição à menor percentagem de invasão celular registada pelo *Arbutus unedo*, com 26%. Para o *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Corema album*, corresponde uma percentagem de invasão de 32,9% e 40,7%, respectivamente. Infere-se assim, que há uma inibição do fecho da ferida, quando é adicionado ao meio de cultura, extractos proteicos das espécies em estudo.



**Figura IV.2** – Registo fotográfico da migração das células após 48 horas. **(A)** Registo fotográfico do tempo zero da ferida da cultura de células HT29 com meio completo (Controlo Meio), adicionando 100 µL de soro (Controlo Soro) e 100 µg/mL de extracto total de folha de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Joox), de *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* (Joba), de *Arbutus unedo* (Aun) e de *Corema album* (Cal). **(B)** Registo fotográfico para as mesmas amostras, após 48 horas de incubação da cultura de células HT29.

Os valores calculados e apresentados na figura IV.3 são médias da percentagem, após 48 horas de exposição aos diferentes extractos, em relação ao primeiro dia de exposição e são demonstrativos de uma inibição da invasão tumoral, ostentando uma percentagem de invasão do corte de aproximadamente 30% para as espécies *Juniperus oxycedrus badia* e *Arbutus unedo*, em relação aos 80% de invasão do corte nos controlos.

Mediu-se, por cada amostra ensaiada, a dimensão do corte e calculou-se a média das quatro réplicas ensaiadas. Os ensaios revelam que o extracto proteico de *Arbutus unedo* foi o que mais inibiu a invasão celular, com 26% de invasão do corte, o que manifesta uma inibição de invasão superior a 50%, em relação ao controlo. O extracto proteico de *Juniperus oxycedrus badia* invadiu o corte cerca de 33%, promovendo uma inibição da invasão do corte de aproximadamente 50%, em comparação com o controlo. As espécies *Juniperus oxycedrus oxycedrus* e *Corema album*, com uma percentagem de invasão do corte de 68% e 40,7%, respectivamente, evidenciaram uma menor percentagem de inibição da invasão celular em comparação com o controlo.



**Figura IV.3** - Percentagem de invasão celular do corte após 48 horas de incubação. Os resultados são médias das percentagens de invasão em relação ao primeiro dia de incubação celular (tempo zero) com os potenciais inibidores, na concentração de 100 µg/mL meio, correspondente ao extracto total de folha de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Joox) *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* (Joba), *Arbutus unedo* (Aun) e *Corema album* (Cal). O controlo é composto por meio de cultura RPMI.

Da análise dos resultados, poder-se-á justificar a inibição da invasão celular por várias vias: inibição da produção ou inactivação das metaloproteinases MMP9/MMP2, provocadas pelos extractos proteicos em estudo; inibição de factores de crescimento e, presença de outros compostos biactivos, tipo lectinas, que provocam a libertação de mediadores que visam impedir a adesão e invasão celular.

Na tentativa de explicar a inibição da invasão celular, decidiu-se averiguar o papel das gelatinases por terem uma função fulcral no crescimento celular. Deu-se assim, continuidade ao trabalho com a realização de ensaios que permite-se avaliar a inibição da actividade proteolítica, com os extractos que revelaram maior inibição da invasão celular, ***Juniperus oxycedrus badia* e *Arbutus unedo***.

## **2.2. Análise por zimografia da actividade de proteolítica/gelatinolítica dos extractos de proteína total de *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Arbutus unedo***

As MMPs possuem um papel principal na remodelação do tecido conjuntivo que ocorre em muitos processos fisiológicos normais, como o crescimento e o desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas e crescimento ósseo (Sternlicht & Werb, 2001; Brummer *et al.*, 2002). Além dos processos normais fisiológicos, a expressão anormal destas proteinases pode contribuir com uma variedade de processos patológicos caracterizados pela degradação da matriz extracelular, incluindo a invasão e metastização em tumores (Wu *et al.*, 2002).

A degradação da matriz extracelular por MMPs afecta o comportamento da célula tumoral e conduz à progressão do tumor (Itoh & Nagase, 2002). Por estarem envolvidos no processo de invasão tumoral, os inibidores de MMPs são considerados um importante foco de pesquisa.

A expressão de MMPs, pode ser analisada através de técnica denominada zimografia, que identifica a actividade proteolítica das MMPs, através da degradação do substrato preferencial. A gelatina pode ser utilizada para detectar a actividade proteolítica das MMPs e determinar se estas enzimas encontram sob a forma activa ou inactiva (Snoek-Van Beurden & Von Den Hoff, 2005).

A actividade proteolítica dos extractos de folhas de *Juniperus oxycedrus badia* e *Arbutus unedo* foi avaliada pela técnica de zimografia, a qual se alicerça num gel de poliacrilamida com SDS, estando co-polimerizado num substrato de gelatina, que tem maior afinidade para as metaloproteinasas (Snoek-van Beurden & Von den Hoff, 2005), sendo degradado, durante o tempo de incubação, pelas enzimas presentes na amostra aplicada. Após a remoção do SDS, as proteases deixam de estar inactivadas no gel, pelo que conseguem exercer actividade proteolítica no substrato co-polimerizado. A coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue G-250 revela os locais de proteólise como bandas transparentes sobre um fundo azul-escuro. Esta técnica indica-nos a presença de proteases numa amostra com actividade de gelatinase. A técnica realizou-se segundo o procedimento descrito no ponto 1.2.2.1, do Capítulo IV.

### **2.2.1. Inibição da actividade gelatinolítica pelo extracto de proteína total de *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Arbutus unedo***

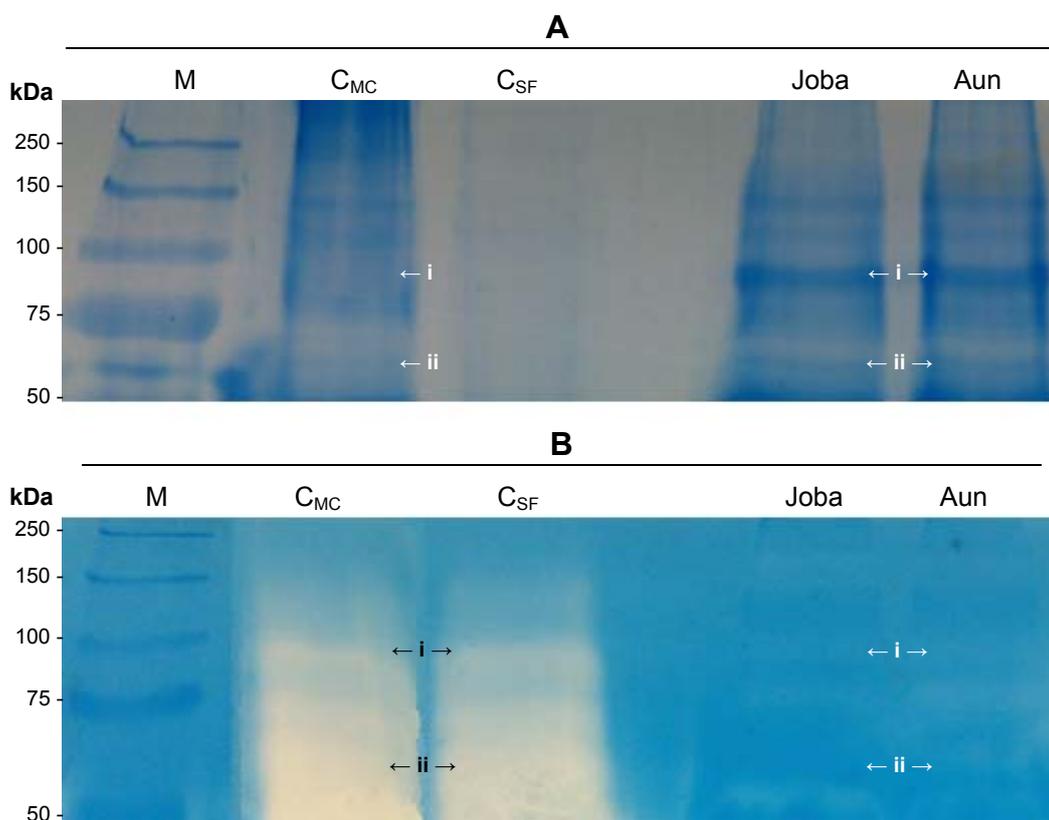
As MMP2 e MMP9 são codificadas por genes localizados no cromossoma humano 16 e são chamadas gelatinases, uma vez que digerem colagénio desnaturado (Murphy & Crabe, 1995). A massa molecular das gelatinases está inscrita na tabela IV.1.

Tabela IV.1 – Algumas características moleculares das MMP2 e MMP9

MMP	Grupo	Massa Molecular Act / Pro (kDa)	Substrato (MEC)
2	Gelatinase	66 / 72	Gelatina, Elastina, Colagénio I/IV/V/VII/X/XI
9	Gelatinase	86 / 92	Gelatina, Elastina, Colagénio I/IV/V/VII/X/XI

Act – Activa; Pro – Inactiva (adaptado de McCawley & Matrisian, 2001)

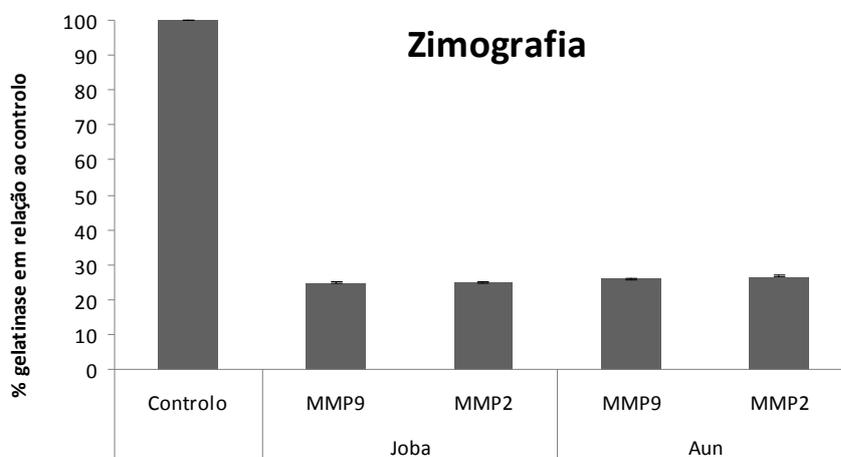
Por observação do gel SDS-PAGE NR (figura IV.4.A), do gel controlo, verifica-se a existência de uma banda de peso molecular entre os 86 e 92 kDa, correspondente ao intervalo da massa molecular que pode ser atribuído às isoformas MMP9, nomeadamente, 86 kDa (MMP9) e 92 kDa (Pro-MMP9) (i), em todas as amostras, quer controlo, quer extracto. Existe igualmente, uma banda menos representativa entre os 60 e 70 kDa, situada no intervalo de referência do peso molecular das isoformas MMP2 (ii), correspondente a 66 kDa (MMP2) e 72 kDa (Pro-MMP2).



**Figura IV.4** - Actividade gelatinolítica dos extractos totais de folhas de *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Arbutus unedo* realizados em gel SDS-PAGE NR. **(A)** Gel de controlo realizado em gel de poliacrilamida de 12,5% (m/v) e coloração pelo CBB G250, representativo das amostras do meio extracelular. Aplicaram-se 5  $\mu$ L de marcador de massa molecular (M) e 20  $\mu$ L de meio extracelular para cada uma das amostras: controlo com meio completo (C<sub>MC</sub>); controlo com soro fisiológico (C<sub>SF</sub>); após incubação com extracto de *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* (Joba) e após incubação com extracto de *Arbutus unedo* (Aun). **(B)** Ensaio zimográfico realizado em gel de poliacrilamida de 12,5% (m/v), contendo 1% (m/v) gelatina e coloração pelo CBB G250, representativo das amostras do meio extracelular, colhidas no final do ensaio de inibição da invasão celular. Aplicaram-se igualmente 5  $\mu$ L de marcador de massa molecular (M) e 20  $\mu$ L de todas as amostras, pela ordem descritas em (A).

Os resultados obtidos, ilustrados na figura IV.4, revelam que, por comparação com o gel de controlo (A), a actividade gelatinolítica está muito aumentada nos controlos de meio completo ( $C_{MC}$ ) e soro fisiológico ( $C_{SF}$ ) do gel (B), justificando a produção livre das gelatinases MMP9 e MMP2 pelas células HT29, degradando a gelatina com grande evidência. Já a análise do meio secretado após incubação com os extractos em estudo, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Arbutus unedo*, sobre a gelatina, revela uma inibição muito acentuada, conseguindo-se distinguir com dificuldade as bandas das proteases MMP9 e MMP2 (assinaladas no gel), devido a uma fraca digestão na zona do gel, correspondentes aos seus pesos moleculares.

Por observação do gel SDS-PAGE NR da figura IV.4.B, enquadrado no ensaio zimográfico, verifica-se uma forte inibição da actividade gelatinolítica das MMPs quando aplicado os extractos proteicos de folhas *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Arbutus unedo*. Na ausência dos extractos, quer em Meio Completo ou em Soro Fisiológico, a actividade manifesta-se elevada, pelo facto de haver uma degradação efectiva de gelatina, correspondente à zona transparente. As gelatinases (MMP9 e 2) aparecem como regiões não coradas de gelatina (Inomata *et al.*, 2003).



**Figura IV.5** – Actividade gelatinolítica da MMP2 e MMP9, após incubação com os extractos proteicos das espécies *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Arbutus unedo*. O controlo é composto por meio de cultura RPMI. O ensaio zimográfico realizou-se com a aplicação de 20  $\mu$ L de secretado (correspondente a 2  $\mu$ g de extracto proteico) da incubação com *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* (Joba) e *Arbutus unedo* (Aun).

A figura IV.5 ilustra a actividade gelatinolítica, representada pelas Metaloproteinasas MMP-2 e MMP-9, no meio extracelular. Em condições normais, as células excretam tanto MMP-2 como MMP-9 para o meio extracelular, na sua forma activa, de modo a prosseguirem com a invasão celular (Herszényi *et al*, 2012; Yang *et al.*, 2014). A sua inibição é frequentemente coincidente com uma redução da capacidade de invasão.

Os resultados demonstram que os extractos proteicos das duas espécies, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Arbutus unedo*, induziram uma forte inibição da actividade de gelatinase, em comparação com o controlo, verificando-se redução de, aproximadamente, 25% de actividade das MMP2 e MMP9.

Os extractos em estudo revelam assim uma promissora inibição da produção de metaloproteinasas MMP9 e MMP2, sendo um excelente prognóstico para a sua aplicação na inibição da actividade tumoral, devido aos polipeptídeos constituintes destes extractos.



## Capítulo V – Conclusões Finais

A relevância deste estudo baseia-se na identificação de proteínas do tipo lectina que se liguem a epitopos glicosilados de membranas de células cancerígenas, podendo ser usadas como sondas ou mediadores, no tratamento de patologias neoplásicas malignas. O cancro é uma das principais causas de morte no mundo, tendo enormes consequências negativas para a sociedade.

Como foi descrito, o presente trabalho de dissertação, teve como finalidade esclarecer a existência de lectinas em extractos de folhas de quatro espécies da flora endémica portuguesa e, estabelecer uma relação entre estas e a presença de actividade biológica detectada, permitindo tirar algumas conclusões promissoras e possibilidade de estudos futuros.

Esta tese dividiu-se em três etapas distintas. Na primeira etapa do trabalho realizou-se a optimização das condições experimentais para análise do perfil polipeptídico e pesquisa de proteínas/lectinas com actividade hemaglutinante nas espécies *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Arbutus unedo* e *Corema album*. A segunda fase do trabalho teve como objectivo, analisar a especificidade de proteínas do tipo lectina das espécies em estudo, no reconhecimento de epitopos celulares glicosilados, em membranas das células HT29. Por último, a terceira etapa, alicerçou-se no objectivo de avaliar a inibição, provocada pelos extractos proteicos das espécies em estudo, na invasão tumoral em células HT29, finalizando com a realização de ensaios que permitiram avaliar a inibição da actividade proteolítica, após selecção dos extractos que revelaram maior inibição da invasão celular, *Juniperus oxycedrus badia* e *Arbutus unedo*, via inibição das metaloproteinases MMP2 e MMP9.

De forma a concretizar os objectivos delineados para este trabalho, extraiu-se a proteína total constituinte da folha das quatro espécies em estudo, para determinar as bandas polipeptídicas mais representativas em SDS-PAGE, e conseqüentemente procedeu-se à sua caracterização. A proteína total constituiu valores inferiores a 5% do peso fresco das folhas das espécies *Juniperus oxycedrus* e *Corema album*, e aproximadamente 37% do peso fresco das folhas de *Arbutus unedo*.

Na caracterização do perfil polipeptídico, a folha da espécie *Juniperus oxycedrus*, revelou uma relativa abrangência, com distribuição de bandas polipeptídicas desde os 10 kDa até, aproximadamente, aos 50 kDa, manifestando a subsp *oxycedrus*, em condições redutoras, a existência de ligações persulfureto. O perfil electroforético da folha de *Arbutus unedo* afigura-se pouco abrangente e simplificado, com um número diminuto de bandas

polipeptídicas na sua constituição, quase todas situadas ao nível de baixos pesos moleculares (10 - 15 kDa). Os extractos totais de folha de *Corema album*, apresentam um perfil polipeptídico simplificado, com bandas de peso molecular predominantemente abaixo dos 50 kDa. As bandas de 50 e 40 kDa, parecem ser reduzidas, manifestando desta forma, presença de ligações persulfureto. Estes extractos revelam assim perfis polipeptídicos diferentes.

A avaliação da presença de proteínas glicosiladas, para as respectivas espécies, mostrou a presença de uma banda glicosilada para o *Juniperus oxycedrus badia* (50 kDa), enquanto o *Arbutus unedo* revela igualmente uma banda glicosilada, não representativa (45 kDa), mas com uma forte componente de glicosilação. As fracções *Juniperus oxycedrus oxycedrus* e *Corema album*, não exibiram bandas glicosiladas.

A determinação da actividade hemaglutinante para os diferentes extractos proteicos totais das espécies em estudo, permitiu observar que a espécie *Juniperus oxycedrus*, subsp *oxycedrus* e subsp *badia*, revelaram, frente a soluções eritrocitárias humanas, um apreciável poder hemaglutinante para o grupo sanguíneo A, não exibindo o mesmo carácter para os grupos B e O. As espécies *Arbutus unedo* e *Corema album* não revelaram qualquer poder hemaglutinante para os grupos AB0 ensaiados. A determinação dos açúcares inibidores da actividade hemaglutinante, para as espécies *Juniperus oxycedrus*, subsp *oxycedrus* e subsp *badia* e, para os grupos ARH+ e ARH-, não revelaram especificidade, das lectinas existentes nos referidos extractos, para qualquer dos açúcares ensaiados. Futuramente dever-se-á alargar o painel de açúcares testados, uma vez que os açúcares mais vulgarmente utilizados e reconhecidos pelas lectinas, não se revelaram específicos para estas lectinas. .

Numa fase final do presente trabalho e, após selecção das espécies *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Arbutus unedo*, por apresentarem uma actividade biológica, promissora, determinou-se a respectiva actividade hemaglutinante frente a solução a 4%, de eritrócitos de coelho, manifestando actividade hemaglutinante de 11,1 µg e 3,7 µg Unidades de Hemaglutinação, respectivamente..

O Cancro colo-rectal é, segundo a Organização Mundial de Saúde, o tumor maligno mais frequente na União Europeia. Dados do Instituto Nacional de Estatística, referem que o cancro colo-rectal representa 14,6% do total de mortalidade oncológica em Portugal. Perante os dados estatísticos, não restam dúvidas que o cancro do cólon constitui um grave e actual problema de saúde. Nesse sentido, justificou-se que no presente trabalho, a análise sobre a actividade antitumoral das espécies em estudo, fosse centrada na linha celular HT29.

Após isolamento das membranas das células HT29, os extractos de proteína total em estudo, foram incubados individualmente com as membranas isoladas de células HT29, para avaliar o potencial de ligação de péptidos, do tipo lectina, aos receptores glicosilados por análise bidimensional (2D).

Pela observação do registo 2D das membranas das células HT29, incubadas com os extractos de proteína total das espécies em estudo e, por comparação com a 2D da membrana HT29 controlo, verificou-se a existência de *spots* peptídicos na espécie ***Juniperus oxycedrus oxycedrus***, representando as ligações de proteína do tipo lectina do extracto aos receptores glicosilados da membrana das células HT29. Os *spots* são caracterizados por baixos pesos moleculares e pI localizado na região neutra ou ligeiramente ácida. Observaram-se dois *spots* peptídicos, de pI≈6,0, com massa molecular de aproximadamente 15 kDa e 30 kDa e, um *spot* com pI≈7,0, de massa molecular de 32kDa, revelando que três péptidos com actividade de lectina exibiram especificidade para os receptores glicosilados das membranas HT29, para a referida espécie. No extracto de ***Juniperus oxycedrus badia***, três péptidos exibiram ligação às membranas. Estes 3 *spots* são caracterizados por pI próximo da região neutra e revelam massas moleculares, entre os 15 e os 50 kDa. Este péptido de 50 kDa, tinha sido anteriormente revelado como sendo uma glicoproteína.

O facto de, para ambas as espécies existirem péptidos ligados às membranas, com igual caracterização, i.e. igual pI e massa molecular, pI 6,0 e massa molecular 15 e 30 kDa, poderá indicar que estas lectinas possam ser características da espécie *Juniperus oxycedrus*

O ***Arbutus unedo***, configura 3 *spots* peptídicos. Dois dos *spots* exibem pI e massa moleculares muito semelhantes, nomeadamente 5 (pH) e entre 44 a 46 kDa, o terceiro *spot* peptídico é caracterizado por ter um pI de alcalino, pI ≈8,0 e uma massa molecular próxima de 15 kDa.

Os dois *spots* peptídicos do extracto ***Corema album*** revelam pI nitidamente ácido, entre pH 4 e 5, e de massa molecular, aproximadamente, de 18 kDa e 90 kDa, respectivamente. Este extracto é o que revela maior diferença na caracterização dos péptidos/lectinas que se ligam à membrana.

Após a incubação das membranas das células HT29 com o extracto proteico total da folha de *Corema album*, fez-se a eluição sequencial com os três hidratos de carbono com maior poder inibitório da actividade hemaglutinante; melezitose, seguido do manosido e, por último do glucopiranosido, todos com uma concentração de 0,4 M. O eluido da melezitose revelou desadsorção das bandas de massa molecular de 13 kDa e 18 kDa a partir da

incubação da membrana com o extracto, não demonstrando o mesmo comportamento relativamente com os restantes açúcares ensaiados. Assim o péptido de 18 kDa, além de revelar especificidade de ligação à membrana, revela ainda especificidade para a melezitose.

O mecanismo de ligação das lectinas, aos receptores glicosilados das membranas de células cancerígenas, confere-lhes a capacidade de actuarem no sentido de contrariarem o processo tumoral, promovendo a inibição do crescimento tumoral, entre outras actividades antitumorais. Com o objectivo de avaliar a actividade inibitória sobre a progressão tumoral da linha celular HT29, provocada pelos extractos proteicos em estudo, o método “wound assay”, permitiu apurar uma inibição de aproximadamente 50%, em relação ao controlo, para as espécies *Arbutus unedo* e *Juniperus oxycedrus badia*, correspondendo a uma invasão de corte de 26% e 33%, respectivamente, o que se traduziu em uma excelente actividade inibitória. As espécies *Juniperus oxycedrus oxycedrus* e *Corema album*, com uma percentagem de invasão do corte de 68% e 40,7%, respectivamente, evidenciaram uma menor percentagem de inibição da invasão celular em comparação com o controlo.

Com o intuito de explicar a inibição da invasão celular, averiguou-se o papel das gelatinases por terem uma função fulcral no crescimento celular. Realizaram-se ensaios que permitiram avaliar a inibição da actividade proteolítica, com os extractos que revelaram maior inibição da invasão celular, *Juniperus oxycedrus badia* e *Arbutus unedo*, revelando uma promissora inibição da produção de metaloproteinasas MMP9 e MMP2, verificando-se uma redução de, aproximadamente, 25% de actividade, sendo um excelente prognóstico para a sua aplicação na inibição da actividade tumoral, devido aos polipeptídeos constituintes destes extractos.

Os resultados preliminares obtidos, para as diferentes amostras em estudo, especialmente para *Juniperus oxycedrus badia* e *Arbutus unedo*, revelam um bom prognóstico destas espécies, relativamente a uma actividade antitumoral. O reconhecimento exibido pelas lectinas, constituintes destes extractos, relativamente ao reconhecimento de epítomos glicosilados ao nível das membranas das células tumorais HT29, do cancro do cólon, revelam que poderão, após reconhecimento da sua especificidade glicana, ter um possível aproveitamento como sonda, quer no reconhecimento da célula tumoral, quer na terapêutica *in situ*. Associado a este reconhecimento, que evidencia a capacidade das lectinas como descodificadoras de glicocódigos e, por isso de receptores glicosilados tumorais, também a actividade antitumoral evidenciada para os extractos de *Juniperus oxycedrus badia* e *Arbutus unedo*, actuando por um mecanismo antitumoral, na progressão *v.s.* invasão *v.s.* metastização, das células tumorais HT29, por um mecanismo

possivelmente inibitória via lectina, indicam que estes extractos terão um potencial antitumoral promissor,

Os conhecimentos adquiridos com o presente trabalho de dissertação poderão ser futuramente aprofundados, sendo imprescindível conhecer os efeitos destes compostos a nível celular, dando maior robustez aos resultados adquiridos. A identificação das fracções inibitórias com actividade de gelatinase, para posterior sequenciação, serão de interesse prioritário.

Neste sentido, este trabalho abre uma série de perspectivas que incluem a pesquisa, através de novos ensaios *in vitro* e, *in vivo*, da influência das lectinas em outros mecanismos celulares para prevenção do cancro de cólon.



## Referências Bibliográficas

- Abdullaev, F. I., DeMejia, E. G. (1997). Antitumor activity of natural substances: lectins and saffron. *Arch. Latino. Nutr.* 47(3): 195-202.
- Adams, J. M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Development*, V.17, N.20, 2481-2495.
- Adams, R. P. (2004). *Junipers of the World: The genus Juniperus*. Vancouver: Trafford Publ.
- Agapov, I. I., Tonevitsky, A. G., Maluchenko, N. V., Moisenovich, M. M., Bulah, Y. S., Mikhail, P., Kirpichnikov, M. P. (1999). Mistletoe lectin A-chain unfolds during the intracellular transport. *FEBS Letters*. V.464, 63-66.
- Ala-aho, R., Kähäri, V. M. (2005). Collagenases in Cancer. *Biochimie* 87: 273-86.
- Alarcão-e-Silva, M., Leitão, A. E., Azinheira, H. G. e Leitão, M. C. (2001). The arbutus berry: studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *J. Food Compôs. Anal.* 14: 27-35.
- Alencar, N. M., Teixeira, E. H., Assreuy, M. A., Cavada, B. S., Flores, C. A., Ribeiro, R. A. (1999). Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leucocyte recruitment. *Mediators Inflamm.*, V. 8, 107-113.
- Alves, A. M., Pereira, J. S., Correia, A. V. (2012). *Silvicultura – A Gestão dos Ecossistemas Florestais*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai O. S., Sung, B. e Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research* 25 (9): 2097-2116.
- Andrade, J. L., Arruda, S., Barbosa, T., Paim, L., Ramos, M. V., Cavada, B.S., Barral-Netto, N.I. (1999). Lectin-induced NO production. *Cellular Immunology*. V. 194, 98-112.
- Andreeff, M., Goodrich, D. W., Pardee, A. (2000). Cell proliferation, differentiation and apoptosis. *Holland-Frei Cancer Medicine* 5th edition. B.C. Decker Publisher, Atlanta, Geórgia.
- Antunes, R. V., Coelho, L. B. (1993). Identification of lectin activity in the hemolymph of *Castnia licus drury*, a sugar-cane giant borer (Lepidoptera-Castniidae). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, V. 47, 33-37.
- Aub, J. C., Tieslau, C., Lankester, A. (1963) Reactions of normal and tumor cell to enzymes. I. Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides. *PNAS*. V.50, 613-619.
- Azevedo, C. (1999). *Biologia Celular e Molecular*. 3.<sup>a</sup> Edição, Lidel, Edições técnicas, Lisboa.
- Bah, C., Fang, E., Ng, T. (2013). Medical applications of plant lectin. In; Fang, E.F., Ng, T.B. editors. *Antitumor potencial and other emerging medicinal properties of natural compounds*: Springer Netherlands. 55-74.

## Referências Bibliográficas

- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., Ferreira, I. R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruit: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food chemistry*. 120: 247-254.
- Barillé, S., Akhoundi, C., Collette, M., Mellerin, M. P., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Bataille, R., Amiot, M. (1997). Metalloproteinases in Multiple Myeloma: Production of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), Activation of proMMP-2, and Induction of MMP-1 by Myeloma Cells. *Blood* 90(4): 1649-1655.
- Bergers, G., Coussens, L. (2000). Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases. *Cur Opin Genet Dev* 10: 120-27.
- Beuth, J., Ko, H. L., Pulverer, G., Uhlenbruck, G. (1995). Importance of lectins for the prevention of bacterial infection and cancer metastases. *Glycoconjugate J.*, V.12, 1-6.
- Bird, G. W. G., Roy, T. C. F. (1980). Human antibodies to melibiose and other carbohydrates. *Vox Sanguinis*, V.38, 169-171.
- Birkedal-Hansen, H. (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Cur Opin Cell Biol* 7: 728-35.
- Björklund, M., Koivunen, E. (2005). Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1775, 37-69.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Boatright, K.M., Salvesen, G.S. (2003). Mechanisms of caspases activation. *Curr Opin Cell Biol*, V.15, 725-731.
- Boettner, D. R., Huston, C., Petri, W. A. (2002). Galactose/N-acetylgalactosamine lectin: the coordinator of host cell killing. *Journal of Biosciences*, 27(6): 553-557.
- Böhm, I., Schild, H. (2003). Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Molecular Imaging & Biology*, V.5, N.1, 2-14.
- Boya, P., González-Polo, R. A., Casares, N., Perfettini, J. L., Dessen, P., *et al.* (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*, 25(3): 1025-1040.
- Boyd, W. C., Reguero, R. M. (1949). *J. Immunol.* 62: 333-339.
- Bouckaert, J., Hamelryck, T., Wyns, L., Loris, R. (1999). Novel structures of plant lectins and their complexes with carbohydrates. *Carbohydrate and Glycoconjugates*. V.9, N.5, 572-577.
- Bourne, Y., Rougé, P., Cambillau, C. (1992). X-ray structure of a biantennary octasaccharide-lectin complex at 2.3 angstroms resolution. *J. Biol. Chem.*, V.267, 197-203.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.*, 72: 248-254.
- Brockhausen, I. (1999). Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1473: 67-95.

## Referências Bibliográficas

Brockhausen I. (2006). The Role of Galactosyltransferase in Cell Surface Functions and in the Immune System, *Drug News and Perspective*, 19(7): 401-409.

Brummer, O., Bohmer, G., Hollwitz, B., Flemming, P., Petry, K.U., Kuhnle, H. (2002). MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation-an immunohistochemical study. *Gynecol. Oncol.*, V.84, N.2, 222-227.

Caixinhas, L. (1987). *Lexicoteca. Moderna Enciclopédia Universal. Círculo de Leitores*, 12: 22.

Caquet, R. (2004). *Análises Clínicas de A a Z-Guia Prático Climepsi de Análises Clínicas; Climepsi editores.*

Carvalho, A. V., Ribeiro, M., Gonçalves, P., Cruz, P., Cruz, H. (2005). Composições farmacêuticas contendo extractos de *Thymus mastichina* e sua utilização em terapias anticancerígenas. Patente Nacional N.º 103334.

Carvalho e Vasconcelos, J. (1977). *Focus. Enciclopédia Internacional. Livraria Sá da Costa Eds., Lisboa.*

Castroviejo, S., López González, G., Montserrat, P., Muñoz Garmendia, F., Paiva, J., Villar, L. (1986). *Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares., Vol. I. Lycopodiaceae-Papaveraceae. Real Jardín Botánico, C.S.I.C., Madrid. 184.*

Castroviejo, S., Aedo, C., Campo, C.G., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Garmendia, F.M., Feliner, G.N., Rico, E., Talavera S., Villar, L. (1993). *Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. IV, Cruciferae-Monotropaceae. Real Jardín Botánico, C.S.I.C., Madrid. 515.*

Cavada, B. S., Santos, C. F., Granjeiro, T. B., Nunes, E. P., Sales, P. V. P., Ramos, R. L., De Souza, F. A. M., Crisostomo, C. V., Calvete, J. J. (1998). Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. *Phytochemistry*. V.49, 675-680.

Cavada, B.S., Barbosa, T., Arruda, S., Granjeiro, T. B., Barral-Netto, M. (2001). Revisiting Proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and biotechnological uses of the *Diocleinae* subtribe. *Current Protein and Peptide Science*. V.2, 126-135.

Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Krzewinski-Rechi, M. A., Harduin-Lepers, A., Groux-Degroote, S., Delanoy, P. (2010). Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydrate Research*, 345: 1377-1383.

Chan, K. S., Sano, S., Kiguchi, K., Anders, J., Komazawa, N., Takeda J., DiGiovanni, J. (2004). Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 114(5): 720-728.

Chang, C. P., Lei, H. Y. (2008). Autophagy induction in T cell-independent acute hepatitis induced by concanavalin A in SCID/NOD mice. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 21: 817-826.

Chen, J., Liu, B., Ji, N., Zhou, J., Bian H. J., Li, C. Y., Chen, F., Bao, J. K. (2009). A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. *Phytomedicine* 16, 352-360.

## Referências Bibliográficas

- Chen, T. R., Drabkowski, D., Hay, R. J., Macy, M., Peterson W. Jr. (1987). WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. *Cancer Genet. Cytogenet.*, V. 27, 125-134.
- Cheng, Y., Qiu, F., Huang, J., Tashiro, S., Onodera, S., Ikejima, T. (2008). Apoptosis-suppressing and autophagy-promoting effects of calpain on oridonin-induced A375 cell death, *Arch. Biochem. Biophys.* 475: 148-155.
- Cheng, Y., Qiu, F., Ye, Y. C., Guo, Z. M., Tashiro, S. I., Onodera, S., Takashi, I. (2009). Autophagy inhibits reactive oxygen species-mediated apoptosis via activating p38-nuclear factor-kappaB survival pathways in oridonin-treated murine fibrosarcoma L929 cells. *FEBS J.* 276: 1291–1306.
- Chiara, D. P., Omar, P., Maria, T. S., Carlo, T., Chiara, Z., Gianni, Z., Marina, F., Angelo, P., Corrado, R., Roberto, C. (2009). Effects of wheat germ agglutinin on human gastrointestinal epithelium: insights from an experimental model of immune/epithelial cells interaction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 237: 146-53.
- Chiarugi, V., Magnelli, L., Sbarba, P., Ruggiero, M. (2000). Tumor angiogenesis: thrombin and metalloproteinases in focus. *Experimental and Molecular Pathology* 69: 63-66.
- Chiarugi, V., Ruggiero, M., Magnelli, L. (2002). Angiogenesis and the unique nature of tumor matrix. *Molecular Biotechnology* 21: 85-90.
- Cho, N., Shim, H., Rha, S., Kang, S., Hong, S., Choi, Y., Hong, S., Cho, S. (2003). Increased Expression of Matrix metalloproteinase 9 Correlates with Poor Prognostic Variables in Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 44: 560-66.
- Chou, F. C., Shieh, S. J., Sytwu, H. K. (2009). Attenuation of Th1 response through galectin-9 and T-cell Ig mucin 3 interaction inhibits autoimmune diabetes in NOD mice. *Eur J Immunol* 39: 2403-2411.
- Clavijo, A., Díaz Barradas, M.C., Lhout, F., Zunzunegui, M., Correia, O., Garcia-Novo, F. (2007). Spatial segregation and sexual dimorphism in the dioecious species *Corema album* all over its biogeographical area. Proceedings of the MEDECOS XI 2007 Conference, 2-5 September, Perth, Australia. Kings Park and Botanic Garden, Perth, Australia.
- Coelho, L. C. B. B., Silva, M. B. R. (2000). Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*, V. 11, 295-300.
- Cory, G. (2011). Cell Migration, *Methods in Molecular Biology, Scratch-Wound Assay* V.769, 25-30.
- Correia, A., Oliveira, Â. (1999). Principais Espécies Florestais com Interesse para Portugal – Zonas de Influência Mediterrânica. *Direção Geral das Florestas*. Lisboa. 67-69.
- Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., Paiva, P. M. G. (2008). Lectins, Carbohydrate recognition molecules: are they toxic? In: Sissique, Y. H. *Recent Trends in toxicology*. V.37, 47-59.
- Costa-Barbosa, T. (1997). Ativação linfocitária e apoptose em linfonodos de camundongos BALB/c tratados com lectinas. *Universidade Federal da Bahia*. Salvador.

## Referências Bibliográficas

- Crawford, H., Matrisian, L. (1995). Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis* 14: 234-45.
- Croce, C. (2008). Oncogenes and Cancer. *The new england journal of medicine*. 358-502.
- Crocker, P. R. (2005). Siglecs in innate immunity. *Curr Opin Pharmacol*. 5(4): 431-437.
- Cummings, R. D. (1997). Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization. In: *Glyco-sciences, status and perspectives*. Capítulo 10, Edited by Gabius HJ. Weinheim, Germany, 191-199.
- Cunha, A. P., Teixeira, F., Silva, A. P., Roque, O. R. (2010). Plantas na terapêutica. *Farmacologia e Ensaios Clínicos*. Fundação Calouste Gulbenkian, 2.<sup>a</sup> Edição. 15-41.
- Curran, S., Murray, G. (2000). Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36: 1621-1630.
- Dall'Olio, F. (1996). Protein glycosylation in cancer biology: an overview. *J. Clin. Pathol: Mol Pathol*. 49: 126-135.
- Dalziel, M., McFarlane, I., Axford, J. S. (1999). Lectin analysis of human immunoglobulin G N-glycan sialylation. *Glycoconj. J.* 16(12): 801-807.
- De Hoff, P., Brill, L., Hirsch, A. (2009). Plant Lectins: The ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Molecular Genetics and Genomics*. 282: 1-15.
- De Robertis E. D. P., De Robertis E. M. F. (1993). *Bases da Biologia Celular e Molecular*. 2<sup>a</sup> edição, Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 270.
- DeClerck, Y. (2000). Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J Cancer* 36: 1258-1268.
- Diaz, A., Leon, K. (2011). Therapeutic Approaches to Target Cancer Stem Cells. *Cancers*. 3: 3331-3352.
- Dini, L. I., Koff, W. J. (2006). Perfil do câncer de próstata no hospital de clínicas de Porto Alegre. *Rev Assoc Med Bras*. V.52, N.1, 28-31.
- Down, R. E., Gatehouse, A. M. R., Hamilton, W. D. O., Gatehouse, J. A., (1996). Snowdrop lectin inhibits development and decreases fecundity of the glasshouse potato aphid (*Aulacorthum solani*) when add ministered *in vitro* and via transgenic plants both in laboratory and glasshouse trials. *Insect physiol*. 42: 1035-1045.
- Edinger, A. L., Thompson, C. B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology*, V.16, 663-669.
- Egeblad, M., Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*, V.2, 161-174.
- Eichinger, D. (2001) A role for a galactose lectin and ligands during encystment of *Entamoeba*. *Histol. Histopathol.*, 14(1): 217-226.
- Elgavish, S., Shaanan, B. (1997). Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends in Biochemical Sciences*, V.22, 462-467.

## Referências Bibliográficas

- Elmastas, M., Gulcin, I., Beydemir, S., Kufrevioglu, O., Aboul-Enein, H. (2006). A study on the *in vitro* antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) fruit extracts. *Analytical Letters*, 39: 47-65.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35(4): 495-516.
- Esteller, M., Sanchez-Cespedes, D., Sidransky, S. B., Herman, J. G. (1999). Detection of Aberrant Promoter Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Serum DNA from Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancer Research*. 59: 67-70.
- Etzler, M. E. (1986). Distribution and function of plant lectins. In Liener, I. E., Sharon, N., Goldstein, I. J. (Eds), *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine*. Academic Press, Orlando, FL, 371-435.
- Evan, G., Vousdent, K. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411: 342-348.
- Faye, L., Chrispeels, M. J. (1985). Characterization of N-linked oligosaccharides by affino blotting with concanavalin A-peroxidase and treatment of the blots with glycosidases. *Anal. Biochem.* 145: 218-224.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Ilio, D., Laurenzi V. (2012). Role of Apoptosis in disease. *Aging* 4(5): 330-349.
- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals Oncology* 18(3): 581-592.
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited, *Nature Reviews. Cancer*, 3: 1-6.
- Fogh, J., Trempe, G. (1975). New Human Tumor Cell Lines. In: J. Fogh (ed.), *Human Tumor Cells In Vitro*, New York: Plenum Press, 115-160.
- Fogh, J., Fogh, J. M., Orfeo, T.. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, V.59, 221-226.
- Folkman, J., (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and Metastasis, *Seminars in Oncology*, 29: 15-8.
- Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpão, R., Tyagi, M., Pontes, V., Alves P.M., *et al.*, (2010). Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit. *Nutrients*. 2: 214-229.
- Freire, M. G., *et al.* (2003). Inflammatory reponses induced in mice by lectin from *Talisia esculanta* seeds. *Toxicon*, V.42, 275-280.
- Fu, L. L., Zhou, C. C., Yao, S., Yu, J. Y., *et al.*, (2011). Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43: 1442-1449.
- Gabor, F., Klausegger, U., Wirth, M. (2001). The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. *International Journal of Pharmaceutics*, V.221, 35-47.

## Referências Bibliográficas

Garrett, M.D. (2001). Cell cycle control and cancer. *Current Science* 81: 515-522.

Gatehouse, A. R., Davidson, G. M., Newell, C. A., Merryweather, A., Hamilton, W. O., Burgess, E. J., Gilbert, R. C. e Gatehouse, J. A., (1997). Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth *Lacanobia oleraceae*: Growth room trials. *Mol Breed.* 3: 49-63.

Gheri, G., Russo, G., Cappugi, P., Sgambati, E., Bryk, S. G. (1999) The oligosaccharidic component of the glycoconjugates in lichen planus, granuloma annulare, seborrheic keratosis and palmoplantar keratoderma: lectin histochemical study. *Histol. Histopathol* 14(3): 697-704.

Gokalsan, Z., Chintala, S., York, J., Boyapati, V., Jasti, S., Sawaya, R., Fuller, G., Wildrick, D., Nicolson, Rao, J. (1998). "Expression and role of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in human spinal column tumors." *Clin. Exp. Metastasis* 16(8): 721-728.

Goldsby, R., Hays, L., Chen, X., Olmsted, E., Slayton, W., Spangrude, G. (2002). High incidence of epithelial cancers in mice deficient for DNA polymerase - proofreading. *Proceedings of National Academy of Sciences*, V.99, 15560-15565.

Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa T., Sharon, N. (1980). What should be called a lectin?. *Nature* 285: 66.

Gomes, J. C., Ferreira, R. R., Cavada, B. S., Moreira, R. A. (1994). Histamine release induced by glucose (mannose) – specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. *Agents Actions*. V.41, 132-135.

Gorelik, E., Galili, U., Raz, A. (2001). On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 20: 245–77.

Gratani, L., Ghia, E. (2002) Adaptive strategy at the leaf level of *Arbutus unedo* L. to cope with Mediterranean climate. *Flora* 197: 275–284

Greenwood, J .S., Chrispeels, M. J. (1985). Correct targeting of the bean storage protein phaseolin in the seeds of transformed tobacco. *Plant Physiol.* 79: 65-71.

Guzmán-Partida, A. M., Robles-Burgueño M. R., Ortega-Nieblas M., Vázquez-Moreno I. (2004). Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. *Biochimie*, 86 (4-5): 335-342.

Hakomori, S. (1985). *Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives*. *Cancer Res.* 45(6): 2405-2414.

Hakomori, S. (1996). *Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism*. *Cancer Res.* 56(23): 5309-5318.

Hakomori, S. I. (2002). Glycosylation defining câncer malignancy: New wine in an old bottle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 10231-10233.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57-70.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-674.

## Referências Bibliográficas

- Häuselmann, I., Borsig, L. (2014). Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis, *Front Oncol.* 4: 28.
- Heimburg-Molinaro, J., Lum, M., Vijay, G., Jain, M., Almogren, A., Rittenhouse-Olson, K. (2011). Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. *Vaccine*, 29: 8802-8826.
- Herrera, C. M. (1988). Plant size, spacing patterns and host-plant selection in *Osyris quadripartita*, a hemiparasitic dioecious schrub. *Journal of Ecology* 76: 995-1006.
- Herszényi, L., Hritz, I., Lakatos, G., Varga, M. Z., & Tulassay, Z. (2012). The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*, 13(10): 13240-13263.
- Hong, M., Cassely, A., Mechref, Y., Novotny, M. V. (2001). Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, V.752, 207-216.
- Horvitz, H. R. (2003). Worms, Life, and Death. *Biosciences Reports*, V. 23, N. 5: 239-303.
- Huyen, J. V., Bayry, J., Delignat, S., Gaston, A. T., Michel, O., Bruneval, P., Kazatchkine, M. D., Nicoletti, A., Kaveri, S. V. (2002). Induction of apoptosis of endothelial cells by *Viscum album*: a role for anti-tumoral properties of mistletoe lectins. *Molecular Medicine*, V.8, N.10, 600-606.
- Igney, F. H., Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Câncer*, 2: 277-288.
- Ikehara, Y., Kojima, N., Kurosawa, N., Kudo, T., Kono, M., Nishihara, S., Issiki, S., *et al.* (1999). Cloning and expression of a humam gene encoding an N-acetilgalactosamine- $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I): a candidate for systhesis of cancer-associated sialyl-Tn antigens. *Glycobiology*, 9: 1213-1224.
- Itzkowitz, S. H., Bloom, E. J., Kokal, W. A., Modin, G., Hakomori, S. I., Kim, T. S. (1990). A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal câncer patients. *Cancer*, 66: 1960-1966.
- Inomata, S., Matsunaga, Y., Amano, S., Takada, K., Kobayashi, K., Tsunenaga, M., Nishiyama, T., Kohno, Y., Fukuda, M. (2003). Possible involment of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet-exposed hairless mouse. *J. Invest. Dermatol.*, V.120, 1-7.
- Itoh, Y., Nagase, H. (2002). Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem.*, V.38, 21-36.
- Jacobs, A. K., Dry, I. B., Robinson, S. P. (1999). Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology*, 48: 325-336.
- Jacobson, R. L., Doyle, R. J. (1996). Lectin-parasite interactions. *Parasitology today*, 12 (2): 55-60.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians* 61(2): 69-90.

## Referências Bibliográficas

Jones, S., Thornton, J. M. (1996). Review Principles of protein-protein interactions, 93: 13-20.

Ju, T., Lanneau, G. S., Gautam, T., Wang, Y., Xia, B., Stowell, S. R., Willard, M. T., Wang, W., Xia, J. Y., Zuna, R. E., Laszik, Z., Benbrook, D. M., Hanigan, M. H., Cummings, R. D. (2008). Human Tumor Antigens Tn and Sialyl Tn Arise from Mutations in Cosmc. *Câncer Research*, 68: 1636-1646.

Kabir, S. (1998). Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. *J. Immunol. Meth.* 212: 193-211.

Takeji, Y., Tsujitani, S., Mori, M., Maehara, Y., Sugimachi, K. (1991). Helix-pomatia agglutinin binding-activity is a predictor of survival-time for patients with gastric carcinoma. *Cancer*. 68(11): 2438-2442.

Karlsson, K. (1998). Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. *Molecular Microbiology*, 29 (1): 1-11.

Katink-Prastowska, I. (1999). Haptoglobin glycoforms in a case of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Glycoconj. J.* 10(10): 573-577.

Kaur, A., Singh, J., Kamboj, S. S., Sexama, A. K., Pandita, R. M., Shamnugavel, M. (2005). Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific from the rhizomes of *Arundo donax* with antitumor activity. *Phytochemistry*, V.66, 1933-1940.

Kawagishi, H., Takagi, J., Taira, T., Murata, T., Usui, T. (2001). Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycophotodermoides aitchisonii*. *Phytochemistry*, V.56, 53-58.

Kennedy, J. F., Paiva, P. M. G., Correia, M. T. S., Cavalcanti, M. S. M. e Coelho, L. C. B. B., (1995). Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydr. Polym.* V.26, 219-230.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Câncer*, 26: 239-257.

KerKela, E., Saarialho-Kere, U. (2003). Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer." *Exp Dermatol* 12: 109-125.

Kerrigan A. M., Brown G. D. (2009). C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiol* 214: 562-575.

Kim, B. S., Oh, K. T., Cho, D. Y., Kim, Y. J., Koo, W. M., Kong, K. H., Kim, H. (2004). A sialic acid-binding lectin from the legume *Maackia fauriei*: comparison with lectins from *M. amurensis*. *Plant Sci.* 167: 1315-1321.

Kim, W. H., Park, W. B, Gao, B., Jung, M. H. (2004). Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* 66: 1383-1396.

Klein, P. J., Vierbuchen, M., Wurz, H., Schulz, K. D., Newman, R. A. (1981). Secretion-associated lectin-binding sites as a parameter of hormone dependence in mammary carcinoma. *Brit. J. Cancer.* 44: 476-478.

## Referências Bibliográficas

- Konozy, E. H. E., Bernardes, E. S., Rosa, C., Faca, V., Greene, L. J., Ward, R. J. (2003). Isolation, purification and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. V.410, 222-229.
- Kudo, T., Ikehara, Y., Togayachi, A., Morozumi, K., Watanabe, M., Nakamura, M., Nishihara, S., Narimatsu, H. (1998). Up-regulation of a set of glycosyltransferase genes in human colorectal cancer. *Lab Investig.* 78: 797-811.
- Kufe, D. W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., BastR, C., Gansler, T. S., Holland, J. F., Frei, E. (2003). Section 3, Cancer etiology, Papillomaviruses and Cervical neoplasia. In: *Câncer Medicine*.
- Kundu, J. K., Surh, Y. J. (2004). Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF-kappaB and AP-1 as potential targets. *Mutation Research*, 555: 65-80.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Landsteiner, K., Raubitschek, L. (1908). Observations about hemolysis and hemagglutination. *Central Journal of Bacteriology and Parasite Cleanse*. 45: 660-667.
- Le, Q.T., Katunuma, N. (2004). Detection of protease inhibitors by a reverse zymography method, performed in a tris(hydroxymethyl)aminomethane-Tricine buffer system, *Analytical Biochemistry* 324: 237-240.
- Lee, K. (2000). Research and future trends in the pharmaceutical development of medicinal herbs from Chinese Medicine. *Public Health Nutrition*, 3: 515-522.
- Lei, H. Y., Chang, C. P. (2007). Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumour therapy, *Autophagy* 3: 402-404.
- Lei, H. Y., Chang, C. P. (2009). Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. *J. Biomed. Sci.* 16: 10.
- Letizia, P., Massimo, B., Valentina, F., Maria, G. B., Luigi, B., Andrea, B. (2009). Saporin induces multiple death pathways in lymphoma cells with different intensity and timing as compared to ricin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41: 1055-1061.
- León-González, A. J., Mateos, R., Ramos, S., Martín, M., *et al.*, (2012). Chemo-protective activity and characterization of phenolics extracts from *Corema album*. *Food Research International*. 49(2): 728-738.
- Levine, B., Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death; an innocent convict? *J Clin Invest*, 115 (10): 2679-2688.
- Liener, I. E., Shaton, N., Goldstein, I. J. (1986). *The Lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine*. Orlando: Academic Press, 371-435.
- Liotta, L., Rao, C., Barsky, S. (1983). Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 49: 636-649.
- Lis, H., Sharon, N. (1998). Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, 98: 637-674.

## Referências Bibliográficas

- Liu, B., Xu, X. C., Cheng, Y., Huang, J., Liu, Y. H., Liu, Z., Min, M. W., Bian, H. J., Chen, J., Bao, J. K. (2008). Apoptosis inducing effect and structural basis of *Polygonatum cyrtonema* lectin and chemical modification properties on its mannose-binding sites. *BMB Rep.* 41: 369–375.
- Liu, B., Cheng, Y., Zhang, B., Bian, H.J., (2009). *Polygonatum cyrtonema* lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 Pathway. *Cancer Letters*, V.275, 54-60.
- Liu, F., Bevins, C. L. (2010). A sweet target for innate immunity. *Nature Medicine*, 16: 263-264.
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., Wyns, L. (1998) Legume lectin structure. *Biochem. Biophys. Acta.* 1383: 9-36.
- Loris, R. (2002). Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochem Biophys. Acta.* 1572: 198-208.
- Lowe, S. W., Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 21: 485-495.
- Luo, H., Daddysman, M. K., Rankin, G. O., Jiang, B. H., Chen, Y.C. (2010). Kaempferol enhances cisplatin's effect on ovarian cancer cells through promoting apoptosis caused by down regulation of cMyc. *Cancer Cell International*, 10: 1-9.
- Macedo, D. (2010). Polyphenols as antioxidants in Parkinson's disease: protein aggregates in cellular models. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina. Universidade de Lisboa.
- Macedo, M. L., Freire, M., Silva, M. B., Coelho, L. C. (2007). Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comp Biochem Physiology, Part A.* 146(4): 486-498.
- Males, Z., Plazibat, M., Vundac, V. B., Zuntar, I. (2006). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree. *Acta Pharm.* 56(2): 245-250.
- Martinez-Cruz, M., Zenteno, E., Córdoba, F. (2001). Purification and characterization of a galactose specific lectin from corn (*Zea mays*) coleoptyle. *Biochem Biophys. Acta.* 1568: 37-44.
- Matsui, T., Hamako, J., Ozeki, Y., Titani, K. (2001). Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. *Biochem Biophys. Acta.* 1525: 50-57.
- Matsumoto, H., Shimazu, H., Muramatsu, T. (1992). Carbohydrate profiles shown by a lectin and monoclonal antibody correlates with metastatic potential and prognosis of human lung carcinoma. *Cancer.* 69(8): 2084-2090.
- McGowan, S. E., Snyder, J. M. (2004). Development of alveoli. In: The lung development, aging and the environment, Cap. 4: 55-73, Eds. Harding, R., Pinkerton, K. E., Plopper C. G., Elsevier Academic Press.
- Mejía, E. G., Prisecaru, V. I. (2005). Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, V.45, N.6, 425-445.

## Referências Bibliográficas

Minko, T. (2004). Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 491-509.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 451(7182): 1069-1075.

Mody, R., Joshi, S., Chaney, W. (1995). Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmacol Toxicol Methods* 33: 1-10.

Morelli, C., Campioni, K., Parolin, C., Tognon, M. (2004). Activity of the Matrix Metalloproteinase-9 Promoter in Human Normal and Tumor Cells." *J Cellular Physiology* 199: 126-133.

Mota, M. H. (2001). Lectinas da sub-tribo *Diocleinae* como ferramentas histoquímicas. Avaliação em tecidos normais e transformados do sistema nervoso central, colo uterino e mama. CCB-UFCE. 108.

Moujir, L., Seca, A. M., Barreto M. C., (2008). Cytotoxic activity of diterpenes and extracts of *Juniperus brevifolia*. *Planta Med.* 74 (7): 751-763.

Narita, T. (1989). Cellular glycoproteins correlatin with pulmonary-colonizing potential in B16 melanoma. *Inv. Metast.* 9: 1-3.

Nelson, D. L., Cox, M. M. (2000). *Lehninger. Principles of the Biochemistry*. Worth publishers. 3a Edição, New York, 1145.

Nicholson, D. W., Thornberry, N. A. (1997). Caspases: Killer proteases. *Trends Biochem Sci*, V.22, 299-306.

Nilsson, C. L. (2007). Lectins: Analytical Tools from Nature *In "Lectins: Analytical Technologies"*. 1-15. Nilsson, C. L (eds.). Elsevier, Amesterdao.

Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res.* 59: 365-378.

Numahata, K., Satoh, M., Handa, k., Salto, S., Ohyama, C., Ito,A., Takahashi, T., Hoshi, S., Orikasa, S., Hokomori, S. I. (2002). Sialosyl-Lex Expression Defines Invasive and Metastatic Properties of Bladder Carcinoma. *American Câncer Society*, 94: 673-685.

Oliveira, I., Baptista, P., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A., Pereira, J. A. (2011). Influence of strawberry tree fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Research International*. 44 (5):1401-1407.

Olsnes, S., Kozlov. J. V. (2001). *Ricin. Toxicon.* V.39, 1713-1728.

Pacheco-Yépez, J., Shibayama, M., Campos-Rodríguez, R., Petri, W. A., Tsutsumi, V. (2000). *Archives of Medical Research*, 31: 231-233.

Pallauf, K., Riva-Gonzalo, J. C., Castillo, M. D., Cano, M. P., Pascual-Teresa, S. (2008). Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *J. Food Compôs. Anal* 21: 273-281.

Palozza, P. *et al.* (2009). Effect of beta-carotene-rich tomato lycopene beta-cyclase (tlcy-b) on cell growth inhibition in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *Br. J. Nutr.* V.102, N.2, 207-214.

## Referências Bibliográficas

- Pardal, R., Clarke, M. F., Morrison, S.J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Reviews Cancer* 3: 895-902.
- Parijs, J. V., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J., Peumans, W. J. (1991). Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta* 183: 258-264.
- Patwardhan, M. B. *et al.* (2006). Cancer Care Quality Measures: Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancer. Evidence Report/Technology Assessment n. 138. AHRQ Publication n. 06-E002. Rockville, MD. Agency for Healthcare Research and Quality.
- Park, J., Lee, M. (2013). Increasing the  $\alpha$  2,6 Sialylation of Glycoproteins May Contribute to Metastatic Spread and Therapeutic Resistance in Colorectal Cancer. *Gut Liver*. 7(6): 629-641.
- Peng, H., LV, H., Wang, Y., Liu, Y. H., Li, C. Y., Meng, L., Chen, F., Bao, J. K. (2009). *Clematis montana* lectin, a novel mannose-binding lectin from traditional Chinese medicine with antiviral and apoptosis-inducing activities. *Peptides*, V.30, N.10, 1805-1815.
- Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109: 347-352.
- Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M. (1998). Plant lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, V.15, 199-228.
- Pfeifer, K. (2000). Cirurgia. In S. Otto. *Enfermagem em Oncologia*. Lusociência. 529-556.
- Pinho, M. S. L. (2008). Biologia Molecular de Câncer Colorretal: uma revolução silenciosa em andamento. *Rev. Bras. Coloproct.*, 28 (3): 353-368.
- Plattner, V. E., Wagner, M., Ratzinger, G., Gabor, F., Wirth, M. (2008). Targeted drug delivery: binding and uptake of plant lectins using human 5637 bladder cancer cells. *Eur J Pharm Biopharm*, 70: 572-576.
- Plummer, D. T. (1987). *An Introduction to Practical Biochemistry*. 3rd Ed.. McGraw-Hill International Limited. U.K.
- Prada, M., Arizpe, D. (2008). Guia de Propagação de Árvores e Arbustos Ribeirinhos – Um Contributo para o Restauro de Rios na Região Mediterrânica. ISA Press: 27-29.
- Pusztai, A., Bardocz, S., Ewen, S. W. (2008). Uses of plant lectins in bioscience and biomedicine. *Front. Biosci.* 1: 1130-1140.
- Rabinovich, G. A., Toscano, M. A., Jackson, S. S., Vasta, G. R. (2007). Functions of cell surface galectin– glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol* 17: 513 –520.
- Ratanapo, S., Ngamjunyaporn, W., Chulavatnatol, M. (2001). Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae*. *Plant Science*, V.160, 739-744.
- Rego, E. J. L., Carvalho, D. D., Marangoni, S., Oliveira, B., Novello, J. C. (2002). Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (Smooth rattlebox). *Phytochemistry*. V.60, 441-446.
- Reis, C. A., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C., David, L. (2010). *Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection*. *J Clin Pathol*. 63(4): 322-329.

## Referências Bibliográficas

- Reiter, L. S., Kruithof, E. K., Cajot, J. F., Sordat, B. (1993). The role of the urokinase receptor in extracellular matrix degradation by HT29 human colon carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 53(3): 444-450.
- Ribeiro, A., Catarino, S., Ferreira, R. B. (2012). Multiple lectin detection by cell membrane affinity binding. *Carbohydrate Research*. 352: 206-210.
- Robyt, J. F., White, B. J. (1990). *Biochemical Techniques – Theory and Practice*. 2nd Ed. Waveland Press Inc. U.S.A.
- Rolim, H. M. L., Rodrigues, O. G., Nascimento, S. C., Figuerêdo-Silva, J., Coelho, L. C. B. B., Correia, M. T. S. (2001). Effect of glucose/mannose lectins in larynx epidermoide carcinoma cells (HEp-2). VI Phamatech - III annual Meeting of the SBTF. DD-117.
- Roy, A., Banerjee, S., Majumder, P., Das, S. (2002). Efficiency of manose-binding plant lectins in controlling a homopterano insect, the red cotton bug. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 6775-6779.
- Rudiger, H. (1998). Plant lectins-more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anatomica (Basel)*, V.161, 130-152.
- Rüdiger, H., Gabius, H. (2001). Review. Plant Lectins: Occurrence, biochemistry, function and applications. *Glycoconjugate Journal*, 18: 589-613
- Ruseva, M., Kolev, M., Dagnaes-Hansen, F., Hansen, S. B., Takahashi, K., Ezekowitz, A., Thiel, S., Jensenius, J. C., Gadjeva, M. (2009). Mannan-binding lectin deficiency modulates the humoral immune response dependent on the genetic environment. *Immunology* 127: 279–288.
- Salmon, C., Cartron J. P., Rouger, P. (1984). *The human blood groups part1*. New York: Masson Publishing USA; Cap.4, 44-53.
- Sames, K., Schumacher, U., Halata, Z., Van Damme, E. J., Moll, I. (2001). Lectin and proteoglycan Histochemistry of feline pacinian corpuscles. *J. Histochem. Cytochem.* 49(1): 19-28.
- Santos, C. N., Ferreira, R. B., Teixeira, A. R. (1997). Seed proteins of *Lupinus mutabilis*. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 3821-3825.
- Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J., Grangeiro, T. B., Calvete, J. J. (1997). The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *FEBS Letters*. V.405, 114-118.
- Saravanan, C., Cao, Z., Head, S., Panjwani, N. (2009). Detection of differentially expressed wound healingrelated glycogens in galectin-3-deficient mice. *Invest Ophthal- mol Vis Sci* 50: 5690-5696.
- Schneider, F., Kemmer, W., Haensch, W., Franke, G., Gretschel, S., Karsten, U., Schlag, P. M. (2001). Overexpression of sialyltransferase CMP-sialic acid: Gal $\beta$ 1,3GalNAc-R  $\alpha$ 6-sialyltransferase is related to poor patient survival in human colorectal carcinomas. *Cancer Res*. 61: 4605-4611.
- Schwarz, R. E., Wojciechowicz, D. C., Picon, A. I., Schwarz, M. A., Paty, P. B. (1999). Wheat germ agglutininmediated toxicity in pancreatic cancer cells. *Br. J. Cancer* 80: 1754-1762.

## Referências Bibliográficas

- Sharma, V., Surolia, A. (1997). Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. *J. Mol. Biol.*, 267: 433-445.
- Sharon, N., Lis, H. (1972). Lectins: cell-agglutinating and sugar specific proteins. *Science*, V.177, 949-959.
- Sharon, N. (1983). Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Adv. Immunol.* 34: 213-298.
- Sharon, N., Lis, H. (1989). Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246, 227-234.
- Sharon, N., Lis, H. (1990). Legume lectins – a large family of homologous proteins. *FASEB Journal*, V.4, 3198-3208.
- Sharon, N., Lis, H. (1993). Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American*, Jan., 74-80.
- Sharon, N., Lis, H. (2003). *Lectins*. 2.<sup>a</sup> Edition. Springer Ed. 118-122.
- Sharon, N., Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14: 53-62.
- Shibao, K., Izumi, H., Nakayama, Y., Ohta, R., Nagata, N., Nomoto, M., Matsuo, K., Yamada, Y., Kitazato, K., Itoh, H., Kohno, K. (2002). Expression of UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D galactosaminepolypeptide GalNAc N-acetylgalactosaminyl transferase-3 in relation to differentiation and prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. V.94, 7: 1939-1946.
- Shinagawa, K., Andreson, G. P. (2000). Rapid isolation of homogeneous murine bronchoalveolar lavage fluid eosinophils by differential lectin affinity interaction and negative selection. *J. Immunol. Meth.* 237: 65-72.
- Silva, M. R., da Silva, M. A. A. P. (2000). Factores Antinutricionais: Inibidores de Proteases e lectinas. *Ver. Nutr.* 13: 3-9.
- Silva, R. S., Souza, R. B. (2009). Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*. *Act. Amaz.* 39(2): 255-260.
- Singh, R. S., Tiuvary, A. K., Kennedy, J. F. (1999). Lectins: sources, activities and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. V.19, N.2, 145-178.
- Sitohy, M., Dohein, M., Badr, H. (2007). Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from *Egyptian Pisum sativum* seeds. *Food Chem.*, 104: 971-979.
- Snoek-Van Beurden, P. A., Von Den Hoff, J. W. (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*. V.38, 73-83.
- Spicer, S. S., Schulte, B. A. (1992). Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: A perspective. *J. Histochem. Cytochem.* 40(1): 1-38.
- Sternlicht, M. D., Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* V.17, 463-516.

## Referências Bibliográficas

Stillmark, H. (1888). Uber Ricin, ein giftiges ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Phd Thesis, Dorpat University, Estónia.

Strathmann, M., Wingender, J., Flemming, H. C. (2002). Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods*, V.50, 237-248.

Sulusoglu, M., Cavusoglu, A., Erkal, S. (2011). *Arbutus unedo* L. (Strawberry tree) selection in Turkey Samanlı mountain locations. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 3545-3551.

Summer, J. B., Howell, S. F. (1936). The identification of the haemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *Journal of Bacteriology* 32: 227-237.

Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer* 3(10): 768-780.

Szabo, K., Ablin, R., Singh, G. (2004). Matrix metalloproteinases and the immune response. *Clin. Applied Immunol Rev* 4: 295-319.

Tapum, J. A. M. (1980). Breves notas sobre a cultura do medronheiro na serra algarvia – passado, presente e futuro. Instituto Geográfico e Cadastral. Direcção dos Serviços de Cadastro, Divisão dos Serviços de Avaliação e Conservação Cadastral.

Tavares, L., McDougall, G. J., Fortalezas, S., Stewart, D., Ferreira, R. B., Santos, C. N., (2012). The neuroprotective potential of phenolic-enriched fraction from four *Juniperus* species found in Portugal. *Food Chemistry*. 135(2): 562-570.

Taviano, M. F., Marino, A., Trovato, A., Bellinghieri, V., Melchini, A., *et al.*, (2013). *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *Oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *Macrocarpa* ball. Berries from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food and Chemical Toxicology*. 58: 22-29.

Thies, A., Nugel, D., Pfuller, U., Moll, I., Schumacher, U. (2005). Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells in vitro, *Toxicology* 207: 105-116.

Thrush, G., Lark, L. R., Clinchy, B.C., Vitetta, E.S. (1996). Immunotoxins: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 49-71.

Tinjuangiun, P., Loe, N. T., Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, A., Christou, P., (2000). Enhanced insect resistance in Thai rice varieties generated by particle bombardment. *Mol. Breeding*, 6: 391-399.

Toone, E. J., (1994). Structure and energetics of protein-carbohydrate complexes. *Current Opinion Structure Biology*, 4: 719-728.

Turpeenniemi-Hujanen, T. (2005). Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* 87: 287-297.

Ueno, T., Ohtawa, K., Sakurai Y., Kodera, Y., Hiroto M., Matsushima, A., Nishimura, H., Inada, Y. (2000). Polyethylene glycol-modified Concanavalin A as an effective agent to stimulate anti-tumour cytotoxicity, *Cancer Detect. Prev.* 24: 100–106.

## Referências Bibliográficas

- Upadhyaya, K. R., Radha, K. S., Madhyastha, H. K. (2007). Cell cycle regulation and induction of apoptosis by beta-carotene in U937 and HL-60 leukemia cells. *J Biochem Mol Biol.*, V.40, N.6, 1009-1015.
- Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Barre, A., Rougé, P. (1998). Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Plant Sciences.* V.17, N.6, 575-692.
- Van Damme, E. J. M., Barre, A., Rouge, P., Peumans, W. J. (2004). Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. *Trends in Plant Science*, V.9, 484-489.
- Van Damme, E. J., Lannoo, N., Peumans, W. J., (2008). Plant lectins. *Adv Bot Res* 48:107-209.
- Vavasseur, F., Yang, J. M., Dole, K., Paulsen, H., Brockhausen, I. (1995). Synthesis of O-glycan core 3: Characterization of UDPGlcNAc: GalNAc-R  $\beta$ 3-N-cetylglucosaminyltransferase activity from colonic mucosal tissues and lack of the activity in human cancer cell lines. *Glycobiology.* 5: 351-357.
- Vega, N., Perez, G. (2006). Isolation and characterization of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. *Phytochemistry*, V.67, 347-355.
- Visse, R., Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ. Res.*, 827-839.
- Wang, Q., Yu, L. G., Campbell, B. J., Milton, J. D., Rhodes, J. M. (1998). Identification of intact peanut lectin in peripheral venous blood. *Lancet* 352: 1831-1832.
- Wang, H., Gao, J., *et al.* (2000). A new lectin with high potent anti-hepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 275(3): 810-816.
- Watkins, W. M., Morgan, W. T. (1952). Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum simple sugar. *Nature.* 169 (4307): 825-831.
- Watson, A. J. (2006). An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol. Review.* 57(2): 107-121.
- Weber, K., Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244: 4406-4412.
- Weis, W. I., Drickamer, K. (1996). Structural basis of lectin carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem.* 65: 441-473.
- WHO 2012. [http://www.who.int/gho/ncd/mortality\\_morbidity/en/](http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/en/) (acedido em Outubro de 2014).
- Wong, J. H., NG, T. B. (2006). Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, V.38, 234-243.
- Wong, J. H., Wong, C. C. T., NG, T. B. (2006). Purification and characterization of a galactose-specific lectin with mitogenic activity from pinto beans. *Biochimica et Biophysica Acta*, V.1760, 808-813.

## Referências Bibliográficas

- Wormald, M. R., Sharon, N. (2004). Carbohydrates and glycoconjugates: progress in non-mammalian glycosylation, glycosyltransferases, invertebrate lectins and carbohydrate-carbohydrate interactions. *Curr Opin Struct Biol* 14: 591–592.
- Wu, A. M., Wu, J. H., Liu, J. H., Singh, T. (2004). Recognition profile of *Bauhinia purpurea agglutinin* (BPA). *Life Sci*, 74(14): 1763-1779.
- Wu, A. M., Lisowska, E., Duk, M., Yang, Z. (2008). Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconjugate Journal*.
- Wu, N., Opalenik, S., Liu, J., Jansen, E. D., Giro, M. G., Davidson, J. M. (2002). Real-time visualization of MMP-13 promoter activity in transgenic mice. *Matrix Biol.*, V.21, N.2, 149-161.
- Xu, X. C., Brinck, U., Schauer, A., Gabius, H. J. (2000). Differential binding activities of lectins and neoglycoproteins in human testicular tumors. *Urol. Res.* 28(1): 62-68.
- Xu, Y., Sette, A., Sidney, J., Gendler, A. J., Franco, A. (2005). Tumor-associated carbohydrate antigens: A possible avenue for câncer prevention. *Immunology and Cell Biology*, 83: 440-448.
- Yamanaka, M., Kato, Y., Angata, T., Narimatsu, H. (2009). Deletion polymorphism in SIGLEC 14 and its functional implications. *Glycobiology* 19: 841-846.
- Yan, Q., Jiang, Z., Yang, S., Deng, W., Han, L. A (2005). Novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, V. 442: 72-81.
- Yang, B., Tang, F., Zhang, B., Zhao, Y., Feng, J., & Rao, Z. (2014). Matrix metalloproteinase-9 overexpression is closely related to poor prognosis in patients with colon cancer. *World journal of surgical oncology*, 12(1): 24.
- Zalatnai, A., Lapis, K., Szende, B., Raso, E., Telekes, A., Resetar, A., Hidvegi, M. (2001). Wheat germ extract inhibits experimental colon carcinogenesis in F-344 rats. *Carcinogenesis* 22: 1649-1652.
- Zatta, P. F., Cummings, R. (1992). Lectins and their uses as biotechnological tools. *Biochemical Education*. V.20, N.1, 2-9.
- Zhu, J., Wan, Q., Danishefsky, S. J. (2009). Synthesis of biotinylated tumor-associated carbohydrate antigens for immunological studies. *Tetrahedron Letters*. 50: 712-714.

