

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISILOGIA



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA LECTINA
RECOMBINANTE DE *Cratylia mollis* (rCRAMOLL) LIVRE E
ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS FURTIVOS**

CÁSSIA REGINA ALBUQUERQUE DA CUNHA

Orientadora: PROF^a. DR^a. MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA

Coorientadora: PROF^a. DR^a. NEREIDE STELA SANTOS MAGALHÃES

RECIFE
2014

CÁSSIA REGINA ALBUQUERQUE DA CUNHA



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA LECTINA
RECOMBINANTE DE *Cratylia mollis* (rCRAMOLL) LIVRE E
ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS FURTIVOS**

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

**RECIFE
2014**

Cunha, Cássia Regina Albuquerque da

Avaliação da atividade antitumoral da lectina recombinante de *Cratylia mollis* (rCramoll) livre e encapsulada em lipossomas furtivos/Cássia Regina Albuquerque da Cunha. – Recife: O Autor, 2014.

123folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Nereide Stela Santos Magalhães

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2014.**

Inclui bibliografiae anexos

1. Lectinas2. Câncer I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora)
II. Magalhães, Nereide Stela Santos (coorientadora) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-114

CÁSSIA REGINA ALBUQUERQUE DA CUNHA



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA LECTINA
RECOMBINANTE DE *Cratylia mollis* (rCRAMOLL) LIVRE E
ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS FURTIVOS**

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovado por:

Orientador

Titular Interno 1

Titular Interno 2

Titular Externo 1

Data:27/12/2013

**RECIFE
2014**

Ao meu Deus e minha mãe,

AGRADECIMENTOS

“Não tenho palavras para agradecer Tua bondade, dia após dia me cercas com fidelidade, nunca me deixes esquecer que tudo que tenho, tudo o que sou, o que vier a ser, vem de Ti Senhor” Aquele que fez tudo isso ser possível, meu DEUS.

À minha mãe, detentora de um coração inigualável. Por todo o esforço que você fez para que tudo isso fosse possível. Você é a grande culpada pelo meu sucesso, serei imensamente grata à senhora.

À minha família pelo orgulho que vocês sentem de mim.

A Marcos, por me estimular, incentivar e apoiar e a sua família por todo o incentivo e apoio.

A doutora Nathália Varejão, pela colaboração e pela síntese heteróloga dessa super lectina.

A minha querida doutoranda Raiana Apolinário, pelas conversas, almoços e conselhos essenciais para o meu crescimento como pesquisadora e principalmente por me mostrar a elegância da humildade.

As minhas orientadoras, professora Doutora Maria Tereza dos Santos Correia pela confiança, paciência e orientação desde a graduação, e a professora Doutora Nereide Stela Santos Magalhães por seu conhecido zelo pela excelência.

A todos do LIKA, professores, funcionários e alunos, em especial prof^o Dr^o José Luiz, Rafael Padilha, Otaviano, Maria Helena, Felipe, Carmelita Cavalcanti, Marina Cartaxo por todo o apoio.

Ao laboratório de Bioquímica, em especial ao grupo de Sistema de Liberação Controlada-SLC. Obrigada por cada mão estendida para me ajudar e pela confiança depositada. Vocês são realmente um grupo de pesquisa. Meus sinceros agradecimentos a Rafaela Ferraz, por todas as broncas, elogios e auxílios nesses dois anos, a Talita Calaça por sua disposição para me ajudar e pelo privilégio de sua amizade, a Fábio Fidelis pela paciência para me ensinar os experimentos in vivo, a Milena Ferraz por todas as orientações, a Laís Santos pela disposição para me auxiliar, a Círia por todos os momentos de risos, a Marcela por sempre estar disponível para me ajudar, a Sarah, Catarine, Lina, Rebeca, Thiers, Camila e Tiago Arpos. A minha querida aluna colaboradora Juliana Kishishita e todos os ICs em especial, Thamires, Jéssica, Andresa, Marília, Luana e Vítor. Obrigada a todos do SLC que direta ou indiretamente me auxiliaram nesse projeto, sou imensamente grata a vocês.

Aos professores Noemia e Francisco pela colaboração essencial. As professoras Mariana, Isabela Macário, Camila e Juliana Rebouças pelas propostas para o desenvolvimento do trabalho.

Aos queridos doutores, mestres, técnicos e ICs que fazem ou fizeram parte do departamento de Bioquímica-UFPE, Luana Coelho, Fernando Vaz, Thiago Napoleão, Luís Cláudio, Michele Melo, Renata, Priscilla Sales, José Roberto Ferreira, Maria, João, Albérico, Carlos e Fernanda Pacífico.

Aos tecnólogos e pesquisadores do Instituto de Pesquisa Ageu Magalhães, Marlos, Cássia e o ilustríssimo Roberto Wercause (exemplo de pesquisador).

Aos meus antigos e mais novos amigos que entenderam alguns momentos de ausência e apreensão. Amanda Barlavento, Andréia Vanessa, Andrezza, Antônio Braz, Anallu Santos, Elaine Muniz, Thiago Muniz, Amanda Jéssica, Fabiana Gomes, Antônio Sérgio, Bruno Trajano, Arquimedes Moraes, Marta Lúcia, Escol Gonçalves, e Lúcia Aguiar.

Aos funcionários, Mirom (caronas e risadas essenciais), Djalma e Adenilda.

A Marta Chagas, Etiane, Luiza, Lêda, Bernadete, pessoas essenciais para os melhores anos de minha vida, CEFET-PE inesquecível. E também desta mesma instituição de ensino o incrível Válder Júnior, suas orientações foram essenciais para minha formação como professora.

Ao meu querido professor da 5ª série Weidman, você me fez amar a ciência e o ensino da biologia.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não
consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos”
(Marcel Proust)*

RESUMO

Apesar do avanço no tratamento e métodos de prevenção, algumas doenças ainda continuam a ser um desafio para a ciência, como o câncer. Algumas moléculas de origem natural, têm sido estudadas como candidatas a fármacos anticancerígenos, como as lectinas de plantas a exemplo Cramoll 1,4. Uma nova lectina recombinante (rCramoll) foi sintetizada pela técnica de expressão heteróloga que visa evitar as interferências sazonais nos produtos purificados bem como acentuar seu grau de pureza. Contudo, a utilização de proteínas para terapia do câncer esbarra em algumas dificuldades como a possível degradação pelos fluidos biológicos, rápida eliminação da corrente sanguínea, distribuição em tecidos ou órgãos não desejados e necessidade de doses frequentes para se manter o nível terapêutico. Com o propósito de superar essas dificuldades, sistemas de liberação controlada de fármacos, tais como lipossomas, têm sido desenvolvidos como veículos para o carreamento de proteínas. Sendo assim, rCramoll foi avaliada quanto ao seu potencial antitumoral livre e encapsulada em lipossomas furtivos. Testes para avaliar a estabilidade desta lectina frente a condições de estresses, tais como agitação mecânica e sonicação revelaram que, assim como a proteína nativa da planta (Cramoll 1,4), rCramoll não diminuiu a sua capacidade de hemaglutinação até 250s de sonicação e 24 horas de agitação mecânica. Quando submetida a ciclos de congelamento em nitrogênio líquido (-196 °C) e descongelamento em banho-maria (35 °C) ela também não alterou a sua atividade hemaglutinante até 2 ciclos. Formulações lipossomais pelo método de congelamento e descongelamento foram elaboradas e mostraram um tamanho de partícula de $190,0 \pm 0,5$ nm, que estavam dentro da faixa adequada para o estudo *in vivo* e índice de polidispersão de $0,266 \pm 0,002$, sugerindo que as amostras eram monodispersas. Por esta técnica foi possível encapsular cerca de 60% da proteína. A atividade antitumoral *in vivo* revelou que rCramoll livre inibiu o crescimento do tumor em 68% e quando encapsulada em lipossomas furtivos essa inibição aumentou para 80%. Análises bioquímicas e histopatológicas revelaram que a lectina livre ou encapsulada não foi nefrotóxica. A avaliação do nível da enzima glutathione peroxidase não mostrou alteração após o tratamento com a lectina livre ou encapsulada. Sendo assim, esse estudo revelou que a expressão heteróloga proporcionou uma lectina mais pura sem interferências sazonais com potencial antitumoral que pode ser intensificado ao ser encapsulada em lipossomas furtivos para futuras aplicações na terapia do câncer.

Palavras-Chave: Lectinas, expressão heteróloga, lipossomas furtivos, antitumoral, câncer.

ABSTRACT

Despite the advancement in the treatment and prevention methods, some diseases still remain a challenge to science, such as cancer. Some molecules of natural origin have been studied as candidates for anticancer drugs, including the plant lectins, such Cramoll 1,4. A new recombinant lectin (rCramoll) was synthesized by heterologous expression technique that aims at avoiding interference in the seasonal purified products and enhance its purity. However, the use of proteins for cancer therapy faces some difficulties as possible degradation by biological fluids, rapid clearance from the bloodstream distribution in tissues or organs unwanted and need frequent dosing to maintain therapeutic levels. With the goal of overcoming these difficulties, drug delivery systems such as liposome, have been developed as vehicles for carrying of proteins. So rCramoll was evaluated for its potential antitumor free and encapsulated in stealth liposomes. Tests for stability of this lectin against stressful conditions, such as mechanical stirring and sonication revealed that, as the plant native protein (Cramoll 1,4), rCramoll not diminished their hemagglutinating capacity up to 250s of sonication and 24 hours of mechanical agitation. When subjected to cycles of freezing in liquid nitrogen (-196°C) and thawing in water bath (35°C) it also has not changed its hemagglutinating activity up to 2 cycles. Liposomal formulations by the method of freezing and thawing were prepared and showed a particle size of $190,0 \pm 0,5$ nm, which was within the range suitable for the *in vivo* study and polydispersity index of $0,266 \pm 0,002$, suggesting that sample were monodisperse. By this technique it was possible to encapsulate about 60% of the protein. The antitumor activity *in vivo* revealed that free rCramoll inhibited tumor growth by 68% and when encapsulated into stealth liposomes that inhibition increased to 80%. Biochemical and histopathological analyzes revealed that the free or encapsulated lectin was not nephrotoxic. The assessment of the level of glutathione peroxidase showed no change after treatment with free or encapsulated lectin. Thus, this study showed that heterologous expression yielded a more pure lectin without seasonal intereferências with antitumor potential that can be enhanced to be encapsulated into stealth liposomes for future applications in cancer therapy.

Keywords: Lectins, heterologous expression, stealth liposomes, antitumoral activity, cancer.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- FIGURA 1** - Número total de novos casos de câncer (exceto pele não melanoma) por regiões do Brasil, 2012/2013. 24
- FIGURA 2** - Tipos de crescimento celular. 24
- FIGURA 3** - Diferença entre a neoplasia benigna (tumor benigno) e neoplasia maligna (tumor maligno). 25
- FIGURA 4** - Ativação e Inativação normal de Ras. 27
- FIGURA 5** – O câncer e suas principais marcas. 30
- FIGURA 6** - Células do microambiente tumoral. 35
- FIGURA 7** - Diversos tipos de lectinas de superfície celular e suas interações. Lectinas podem participar do processo de reconhecimento de vírus a várias células via carboidratos presentes na superfície celular. As lectinas podem ligar-se a domínios de carboidratos de glicoproteínas (ex:asialoglycoproteins), glicoproteínas ou glicolipídios. 40
- FIGURA 8** - Taxonomia de *Cratylia mollis*. 41
- FIGURA 9** - Etapas principais para extração e purificação das isoformas de lectinas de *Cratylia mollis*. 42
- FIGURA 10** - Estrutura Terciária de Cramoll mostrando o sítio de ligação a monossacarídeo e aos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} . 43
- FIGURA 11** - Lectina de *Cratylia mollis* (CRAMOLL 1): oligomerização dependente de pH. (a) Monômero, (b) Dímero, (c) Tetrâmero. (D) Eletroforese mostrando o monômero intacto-I e monômeros fragmentados-F. 47
- FIGURA 12** - Diferenças no perfil de dissociação e desnaturação de p e rCramoll. Em condições não desnaturantes rCramoll só apresenta tetrâmeros intactos diferente
-

de pCramoll que possui tetrâmeros formados tanto por monômeros intactos como fragmentados. Os tetrâmeros (pCramoll) ao serem submetidos a 4molar de ureia apresenta apenas monômeros parcialmente desenovelados, enquanto que rCramoll apresenta tanto monômeros como tetrâmeros parcialmente desenovelados. 48

FIGURA 13 - Quatro principais tipos de fosfolipídios, PC (fosfatidilcolina) possui grupo polar neutro; PE (fosfatidiletanolamina) possui grupo polar neutro; PS (fosfatidilserina) possui grupo polar carregado negativamente; PI (fosfatidilinositol) possui grupo polar carregado negativamente em pH 7. Organização das moléculas de fosfolipídios. (a), (b) e (c). 52

FIGURA 14 - Classificação dos lipossomas de acordo com o tamanho e número de camadas. 53

FIGURA 15 - Fosfolipídios tradicionais com fármacos solúveis em água (a) encapsulado no interior aquoso, e fármaco insolúvel na bicamada (b). B. Lipossomas com moléculas sítio-específicas como anticorpos (c) reagindo com fosfolipídios na membrana ou ancorados em outra estrutura(d). C. Lipossomas de longa circulação revestido com polímero como o polietilenoglicol (PEG) (e). D. Imunolipossomas de longa circulação. 54

FIGURA 16 - Estrutura do DSPE-mPEG₂₀₀₀. 55

FIGURA 17 - Diagrama esquemático dos regimes de configurações do PEG revestindo a bicamada lipídica. 56

FIGURA 18 - Resumo esquemático dos métodos que podem ser usados para a preparação de lipossomas contendo enzimas: (a) métodos que basicamente começam do filme lipídico seco; (b) métodos que usam emulsões (microemulsões) contendo água e solvente imiscível no sistema inicial; (c) métodos que envolvem o uso de detergente na formação de micelas; (d) métodos que são baseados na mistura de uma solução lipídica não aquosa com solução aquosa. 58

FIGURA 19 - Diferenças entre o tecido normal(A) e tumoral(B) e a acumulação passiva dos nanocarreadores pelo aumento da permeabilidade e efeito de retenção 62

ARTIGO

-
- FIGURA 1** - Diminuição do tamanho do tumor após o experimento. Resultados expressos como Média± DP. *(p<0,05). **100**
- FIGURA 2** - Porcentagem de inibição do crescimento tumoral dos grupos tratados com a proteína livre (rC Livre) e proteína encapsulada (LIPO_rC). *(p<0,05). **102**
- FIGURA 3** - Tecido tumoral do grupo controle. As setas indicam a presença de mitoses nesse tecido. **102**
- FIGURA 4** - Hepatócitos do grupo tratado com a lectina encapsulada. Presença de vacualizações indicando começo de esteatose. **103**
- FIGURA 5** - Níveis de expressão sanguíneo de glutathiona peroxidase nos grupos experimentais. **103**
-

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

TABELA 1 - Protocolo experimental e grupos de animais tratados no ensaio da atividade antitumoral em camundongos com Sarcoma 180.	95
TABELA 2 - Ação da sonicação e agitação mecânica na AH de rCramoll.	97
TABELA 3 - Estabilidade da proteína frente a diferentes ciclos de congelamento de descongelamento.	97
TABELA 4 - Variação do tamanho dos lipossomas submetidos a diferentes tempos de sonicação.	98
TABELA 5 - Tamanho e índice de polidispersão no decorrer das fases da técnica de congelamento e descongelamento.	99
TABELA 6 - Avaliação da taxa de encapsulação por dois métodos: diálise e ultracentrifugação.	99
TABELA 7 - Parâmetros hematológicos.	101
TABELA 8 - Parâmetros bioquímicos.	101

LISTA DE ABREVIATURAS

ARF – gene supressor de tumor ARF.

ATM – do inglês, ataxia telangiectasia mutated.

ATR – do inglês, ataxia telangiectasia and Rad3 related.

Bcl2 - do inglês, B-cell lymphoma 2.

bHLHzip - Basic/helix-loop-helix/leucina zipper.

BRCA1 - do inglês, breast cancer (gene associado ao câncer de mama 1).

BRCA2 - do inglês, breast cancer 2 (gene associado ao câncer de mama 2).

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

CDI - Carcinoma Ductal Invasivo.

CDIS - Carcinoma Ductal *in situ*.

CMC - Concentração Micelar Crítica.

c-myc - gene de mielocitomatose celular.

CON A - Concanavalina A.

CpG - Citosina fosfato Guanina.

CTD - Domínio Carboxila-terminal.

DDV - do inglês, Detergent Dialysis Vesicles (vesículas por diálise por detergente).

DMs - Cromossomos (corpúsculos) duplo-minúsculos.

DNA - do inglês Desoxiribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico).

DNMT - do inglês DNA Methyltransferases (DNA Metiltransferases).

DOX – doxorubicina.

DRV - do inglês, Dehydration and Rehydration Vesicles (vesículas por Desidratação e hidratação).

DSPE-PEG - PEG – distearoilfosfatidiletanolamina.

EDTA - do inglês, Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilendiaminotetracético).

EPR – do inglês, Enhanced permeability and retention effect_ (efeito de aumento de permeabilidade e retenção).

ERBB2/HER2/ c erbB2 - Fator de Crescimento Epidermal Humano 2.

FAT – do inglês , Freeze and Thaw (Congelamento e descongelamento).

FDA - do inglês, Food and Drug Administration.

GAPs - proteínas que ativam GTPase.

GEF's - fatores de troca do nucleotídeo guanidina.

GDP - guanosina difosfato.

GM1 - glicolípido monossialogangliosídeo.

GTP - guanosina trifosfato.

Hep-2 - linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano

IARC – Agência Internacional de Pesquisa para o Câncer .

IFN- γ – Interferon γ .

IL-4 - Interleucina 4.

IL-8 - Interleucina 8.

INCA - Instituto Nacional do Câncer.

Kb – Kilobases.

kDa - KiloDantons.

(kGy) – Kilogray

L-myc - gene de mielocitomatose de pulmão.

L929 - (linhagem de fibroblastos de camundongos).

LPSF/AC04 (5Z) – 5-acridin-9-ylmethylene-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione.

LUV's - do inglês, large unilamellar vesicles (vesículas grandes unilamelares).

MB I - Boxe myc I.

MB II - Boxe myc II.

MB III - Boxe myc III.

MB IV - Boxe myc IV.

MCP-1- proteína quimiotática de monócitos-1.

MDR - proteína associada à multi resistência a fármacos.

MIF - Fator Inibitório da Migração de Macrófago.

ML - Lectina de *Mistletoe*.

MLV - do inglês, multilamellar large vesicles (vesículas grandes multilamelares).

MPS - sistema mononuclear fagocítico.

mRNA - do inglês, messenger ribonucleic acid (RNA mensageiro).

MSP - do inglês, methylation specific PCR.

MYC - gene de mielocitomatose celular.

MYCL1 – do inglês, v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog.

MYCN - gene de mielocitomatose em neuroblastoma.

NBR2 - do inglês Neighborhood gene 2.

NHEJ - do inglês, non-homologous end joining.

N-myc - gene de mielocitomatose em neuroblastoma.

pb - pares de bases.

PCL - lectina de *Polygonatum cyrtonema*.

PCR - do inglês Polymerase Chain Reaction.

pCramoll - Lectina de *Cratylia mollis*, Cramoll 1.

PEG – polietilenoglicol.

pET – vetor para expressão heteróloga pET.

pH - Potencial hidrogeniônico.

PLD- Doxil® - doxorubicina encapsulada em lipossomas peguilados.

pRb - proteína do retinoblastoma.

Ras – do inglês, rat sarcoma vírus, proto-oncogene e proteína rãs

REV - do inglês, Reverse phase Evaporation Vesicles (vesículas por evaporação em fase reversa)

RFLP - do ingles, Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA - ácido ribonucléico

RPM - rotações por minuto

S-180 - Sarcoma 180

SNP - do inglês, Single Nucleotide Polymorphism

SOD –enzima superóxido dismutase

SUV's - do inglês, small unilamellar vesicle (vesículas pequenas unilamelares)

TAD - domínio de transativação

t-DCTN - trans-desidrocrotonina

Th2 – do ingles, T helper 2 (resposta imune Th2)

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α

TP53 - do inglês Tumor Protein 53, proteína P53

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

UH - Unidade Hemaglutinante

UICC - Union Internationale Contre le Cancer

VEGF-A - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEI – vesículas formadas por uma mistura de uma fase não aquosa com lipídios e solução aquosa

WGA - Lectina do germe de trigo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1	O CÂNCER	23
2.1.1	Surgimento das neoplasias	24
2.1.2	Genes alterados na patologia do câncer: proto-oncogenes	25
2.1.3	Genes alterados na patologia do câncer: supressores de tumor	28
2.1.4.	O Câncer e suas principais marcas	29
2.1.4.1	Instabilidade genômica	30
2.1.4.2	Sustentação dos sinais de proliferação e insensibilidade aos sinais de morte	31
2.1.4.3	Angiogênese sustentada	32
2.1.4.4	Evasão do sistema imune	32
2.1.4.5	Inflamação promovendo o tumor	33
2.1.4.6	Alteração no metabolismo energético	33
2.1.5	Microambiente tumoral	34
2.1.6	Sarcoma 180	35
2.1.7	Terapia do câncer	36
2.2	LECTINAS E SUA IMPORTÂNCIA HISTÓRICA	37
2.2.1	Família Fabaceae	40
2.2.2	<i>Cratylia mollis</i> e suas lectinas	41
2.2.3	Expressão heteróloga de lectinas, o caso de rCramoll	45
2.2.4	Lectinas e ação antitumoral	49

2.3	NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA	50
2.3.1	Lipossomas	51
2.3.2	Métodos de preparação de lipossomas	57
2.3.3	Lipossomas na terapia do câncer	61
2.3.4	Proteínas Encapsuladas em Lipossomas	63
3	OBJETIVOS	65
3.1	Geral	65
3.2	Específicos	65
4	REFERÊNCIAS	66
5	ARTIGO	87
6	CONCLUSÕES	120
7	ANEXOS	121

1 INTRODUÇÃO

O câncer tem sido caracterizado como uma doença crônica (HANAHAN e WEINBERG, 2011) que exibe uma gama de mudanças em múltiplos genes (CAO et al., 2011), sendo considerada a segunda causa de morte da população brasileira precedida apenas pelas doenças cardiovasculares (INCA, 2012). A Organização Mundial da Saúde estima que 84 milhões de pessoas morrerão de câncer entre 2005 a 2015 (DANHIER et al., 2010). Alguns estudos sugerem que o aumento da expectativa de vida e fatores ambientais substancialmente influenciam a incidência de cânceres em humanos, e isto pode estar relacionado também a prevalência de agentes cancerígenos nas sociedades modernas (DAVID e ZIMMERMAN, 2010). Tratar uma doença dessa magnitude compreende: encontrar o alvo adequado no tumor, (ii) encontrar fármacos que tratem eficazmente esta doença, e (iii) determinar a forma de transportar a fármaco (DANHIER et al., 2010).

Uma das fontes de tratamento do câncer consiste na utilização de produtos de fontes vegetais, que já era utilizada, segundo relatos históricos, pelos gregos como uma das alternativas terapêuticas para esta doença (DAVID e ZIMMERMAN, 2010). Um destes produtos de fontes vegetais são as lectinas, proteínas de origem não imune que se ligam especificamente e reversivelmente a resíduos de carboidratos (VAN DAMME et al., 1998; FU et al., 2011). Nas duas últimas décadas, as lectinas de plantas têm sido usadas como ferramentas para diferenciar tumores malignos de benignos e também para avaliar o grau de glicosilação associado com metástase (GORELIK et al., 2001). Além do potencial diagnóstico elas também possuem um potencial para a terapia antitumoral em uma variedade de células malignas (CHOI et al., 2004; ANDRADE et al., 2004; DE MEJÍA e PRISECARU, 2005; LIU et al., 2010).

Embora métodos de entrega de proteínas tenham sido desenvolvidos, existem muitos obstáculos remanescentes (CLELAND e DAUGHERT, 2001), como a exposição dessas macromoléculas a possível degradação pelos fluidos biológicos, rápida eliminação e distribuição em tecidos ou órgãos não desejados o que resulta na necessidade de doses frequentes. Uma alternativa viável para transpor estes problemas tem sido o uso de nanossistemas, em especial os lipossomas (TORCHILIN, 2011).

Os lipossomas tem mostrado grande potencial para o carreamento de moléculas antitumorais e seu estudo para este fim vem vertiginosamente crescendo após a aprovação dos

primeiros liposomas furtivos voltados para o tratamento do câncer, DOXIL[®] (ZHANG Y, 2008). Em 2004, ANDRADE e colaboradores mostraram a capacidade de inibição do crescimento tumoral da lectina purificada das sementes de *Cratylia mollis* encapsulada em lipossomas carregados positivamente.

Em 2010, pela técnica de expressão heteróloga, uma nova lectina recombinante (rCramoll) foi sintetizada e purificada, esta metodologia visa evitar as interferências sazonais e proporcionar uma lectina com acentuado grau de pureza. rCramoll quando comparada a lectina da planta Cramoll 1 (pCramoll) apresenta diversas propriedades físico-químicas iguais como massa molecular, densidade de carga e estruturas terciárias e secundárias, além disso, elas também apresentam similaridades quanto a afinidades por resíduos de carboidratos aglutinando eritrócitos de coelho e células epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Entretanto, rCramoll apresentou-se mais estável que pCramoll quando submetidas à algumas situações desnaturantes (VAREJÃO et al., 2010). Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antitumoral da nova lectina recombinante rCramoll livre e encapsulada em lipossomas furtivos frente ao sarcoma 180 visando verificar se esta lectina também apresenta potencial antitumoral e se este poderia ser intensificado com o encapsulamento da lectina em lipossomas furtivos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O CÂNCER

A humanidade tem vivenciado diferentes fases da evolução no conhecimento das doenças que é essencial para o aumento da qualidade e expectativa de vida. Algumas doenças, anteriormente fadadas à morte hoje são facilmente tratadas por meio de vacinas e métodos de prevenção. Entretanto, algumas delas como o câncer, ainda mantêm-se um desafio para a ciência.

O câncer ou neoplasia maligna é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). As causas do câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando inter-relacionadas. As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2013).

A agência internacional de pesquisa para o câncer (IARC) mostra que existe cerca de 10 milhões de novos casos de câncer por ano e cerca de 6 milhões de mortes anuais pela doença. A estimativa para essa doença é que em 2030, ela irá aumentar para 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de novas mortes globais (ALLEN e CULLIS, 2004; IYER et al., 2013).

No Brasil, a mortalidade por neoplasias vem crescendo consideravelmente ao longo das últimas décadas. Em 2008, as neoplasias foram consideradas a segunda maior causa de morte na população brasileira, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares, o que representa mais de 14,6% das causas de morte ocorrida no país (INCA, 2012). Como pode ser visto na figura 1, a estimativa de novos casos no Brasil de 2012/2013 era de cerca de 384.340 pessoas (INCA, 2011).

Figura 1- Estimativa do número total de novos casos de câncer (exceto pele não melanoma) por regiões do Brasil, 2012/2013.

Região	Estimativas de casos novos
Sudeste	204.890
Sul	70.030
Nordeste	66.310
Centro-Oeste	27.820
Norte	15.290
BRASIL	384.340

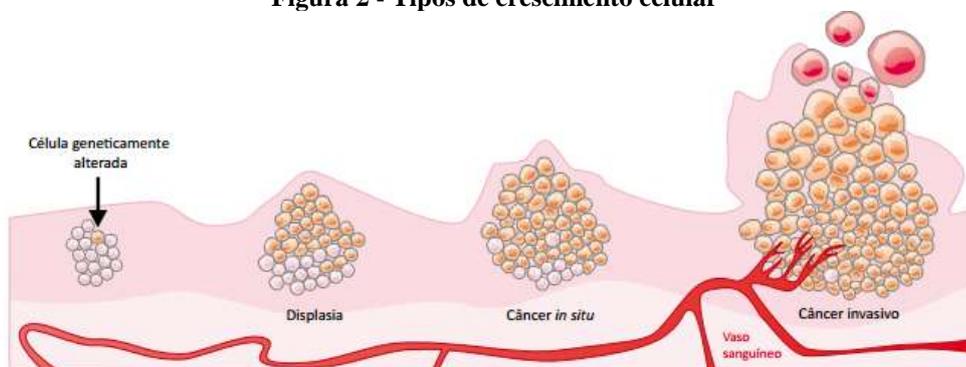
Fonte: INCA, 2011.

2.1.1 Surgimento das neoplasias

O processo de divisão celular é um mecanismo essencial para homeostase do organismo e é por meio dela que tecidos são formados e regenerados. Entretanto, esse é um processo altamente localizado, autolimitado e controlado por estímulos fisiológicos ou patológicos. Dependendo da necessidade do tecido, essas células podem se autoreplicar em uma taxa alta (hiperplasia), entretanto, altamente responsiva a necessidade do tecido e reversível após o término dos estímulos que a provocaram (INCA, 2012).

O tecido displásico, figura 2, é aquele que cresce de forma anormal podendo perder as características iniciais do tecido, esse estado precede o estado neoplásico, onde as células crescem de forma anormal perdendo as características iniciais do tecido de origem e não respondem parcialmente ou totalmente aos controles da homeostase tecidual, essa neoplasia pode ser localizada (benigna) ou possuir a característica invasiva (maligna), figura 3 (INCA, 2012).

Figura 2 - Tipos de crescimento celular



Fonte: INCA, 2011.

Figura 3 - Diferença entre a neoplasia benigna (tumor benigno) e neoplasia maligna (tumor maligno)

Fonte: INCA, 2012.

2.1.2 Genes alterados na patologia do câncer: Proto-oncogenes

O material genético humano e sua complexidade tem sido alvo constante de pesquisadores para saciar suas necessidades de respostas sobre como o câncer se desenvolve. Teorias iniciais apontavam o câncer como sendo uma doença infecciosa, devido a descoberta em 1910 por Peyton Rous de que vírus poderiam induzir tumores em galinhas, entretanto, essa ideia foi posteriormente questionada a partir da descoberta de que outros agentes também poderiam induzir a formação do câncer (WEINBERG, 2008).

O câncer é caracterizado pelo o acúmulo de alterações em múltiplos genes (CAO et al., 2011). Alguns desses genes são potenciais para induzir transformação celular pois exercem papéis importantes na proliferação, diferenciação e controle do ciclo celular. Entre os genes comumente alterados nessa patologia estão os proto-oncogenes, que a princípio, são inativos em células normais. Quando ativados, os proto-oncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (cancerização) das células normais (INCA, 2012).

As alterações genéticas que costumam ativar esses oncogenes são: amplificação gênica (como pela ação de um vírus), mutações de ponto (substituição de uma base nitrogenada em outra, gera a modificação de um aminoácido por outro) e a translocação cromossômica (alterações que fusionam uma região do cromossomo com outra região de outro cromossomo não relacionado). Além disso, alterações estruturais nas proteínas receptoras de fatores de crescimento podem deixá-las ativadas independente do sinal extracelular ordenando a ativação dos oncogenes para a proliferação celular (WEINBERG, 2008).

Os retrovírus podem induzir a transformação desses genes por meio da inserção do DNA viral em regiões próximas a esses proto-oncogenes e dessa forma impedir que esses proto-oncogenes sejam normalmente regulados pelo seu promotor sendo muitas vezes superexpressos por conta do DNA (ácido desoxirribonucléico) viral. Esses vírus também

podem ativar esses genes por outro mecanismo, onde o DNA viral ao se inserir próximo a um proto-oncogene transcreve além do RNA (ácido ribonucleico) viral o RNA do proto-oncogene, dessa forma, o vírus carrega também as informações do hospedeiro para outras células. O *MYC* (MYeloCytomatosis) foi o primeiro oncogene celular que foi mostrado estar ativo através da inserção do promotor retroviral (PAYNE et al., 1982; MEYER e PENN, 2008).

As mutações somáticas que transformam proto-oncogenes em oncogenes podem resultar na superexpressão ou em proteínas mal-formadas ou truncadas que podem ativar uma cascata de sinalização independente do estímulo dos ligantes. Alguns genes que produzem fatores de crescimento também são potenciais oncogenes. O aumento da síntese dessas biomoléculas secretadas pode ser capaz de estimular a própria célula (sinalização autócrina) aumentando a ordem para proliferação celular (WEINBERG, 2008).

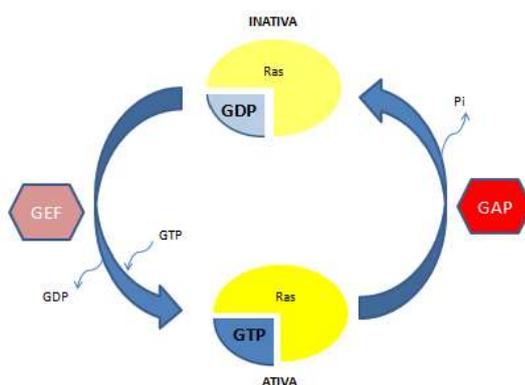
O produto do gene *MYC* é uma proteína nuclear que liga as duas fitas do DNA (DONNER et al., 1982) agindo como um fator de transcrição promotor do crescimento. Como este fator de transcrição está associado a porções do gene reguladores de metabolismo e crescimento celular, mutações podem alterar funções importantes desencadeando a transformação celular. Esse proto-oncogene pode ser transformado em sua forma variante por meio de mecanismos como translocação, amplificação e inserção mutagênica (MEYER e PENN, 2008). A ativação desse gene em humanos como resultado da translocação é comum em tumores hematopoiéticos (BOXER e DANG, 2001). Outra alteração pode ser decorrente da amplificação gênica, como no gene *MYCL1* que é expresso normalmente apenas durante o desenvolvimento, ele encontra-se amplificado em diversos tipos de câncer, incluindo carcinomas de ovário, esse é um dos genes da família de *MYC* (*MYC*, *MYCN* e *MYCL1*) (NAU et al., 1985; ZIMMERMAN e ALT, 1990; ZAJAC-KAYE, 2001) que também encontra-se amplificado em câncer de pulmão (WU et al., 2003). As translocações cromossômicas de *MYC* estão associadas a câncer hematopoiético enquanto que a amplificação é comumente detectada em tumores sólidos (MEYER e PENN, 2008).

Alguns proto-oncogenes expressam proteínas receptoras de fator de crescimento que são importantes no desenvolvimento da proliferação celular e rotas de sobrevivência, como o fator de crescimento epidermal humano 2 (ERBB2, HER2 ou c erbB2) (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano) que é um receptor encontrado em baixas expressões nas células normais, entretanto, é visto super expresso em 20% do câncer de mama e alguns de

ovário e gástrico que confere um pior comportamento biológico dessas células. Alguns fármacos têm sido produzidos tendo como alvo esse receptor, além de também ser utilizado como um fator prognóstico (SLAMON et al., 1987, SLAMON et al., 1989; GUTIERREZ e SCHIFF, 2011). A terapia hormonal visando como alvo o receptor de estrógeno e o uso de trastuzumab como alvo os receptores HER 2 tem providenciado vários benefícios (PICCART-GEBHART et al., 2005; ROMOND et al., 2005; JOENSUU et al., 2009).

Outro importante proto-oncogene é o da família Ras (gene de sarcoma de rato), lipoproteínas ancoradas a membrana celular interna com função transdutora de sinais que vem de receptores membranares. Mutações em um resíduo de aminoácido gera a perda da função GTPase levando a um estado sempre ativado. A transição entre as fases ativada e desativada é regulada por trocas de nucleotídeos de Ras, dessa forma, fatores GEFs (fatores de troca do nucleotídeo guanidina) trocam o nucleotídeo GDP(guanosina difosfato) por GTP (guanosina trifosfato) que ativa Ras. GAPs (proteínas que ativam GTPase) aceleram a hidrólise de GTP mediada por Ras, inativando-a, figura 4. Esta inativação da atividade de Ras por GAPs (proteínas que ativam GTPase) é o alvo predominante em muitas mutações somáticas que são encontradas nas variantes oncogênicas dos alelos de Ras (PYLAYEVA-GUPTA et al, 2011). Sabe-se que uma mutação pontual é capaz de transformar um proto-oncogene em oncogene. Essa mutação provoca a troca de glicina por uma valina na proteína modificada (WEINBERG, 2008).

Figura 4 - Ativação e inativação normal de Ras



Fonte: Próprio autor.

Ras dirige a proliferação celular pela alteração dos sinais de crescimento e inibição de sinais anti-crescimento. Essa proliferação exacerbada pode induzir estresse e possíveis danos no DNA. A supressão da morte celular pelo RAS é uma consequência da perturbação da

balança homeostática entre sinais anti e pro-apoptóticos. Para favorecer o crescimento há uma reprogramação metabólica para glicólise. Ocorre também a promoção de mecanismos pro-angiogênicos e alteração da resposta imune do hospedeiro. Além de indução de mudanças na mobilidade e adesão celular, levando a aquisição de propriedades invasivas e metastáticas das células do câncer (PYLAYEVA-GUPTA et al., 2011).

2.1.3 Genes alterados na patologia do câncer: Supressores de tumor

Os Genes Supressores de Tumor são os controladores do crescimento operando de modo à restringí-lo ou suprimir a proliferação celular, estes podem ser desativados ou perdidos e dessa forma estarem diretamente relacionados ao tumor. Os produtos de expressão desses genes mesmo agindo em diferentes sítios intracelulares tem em comum o fato de estarem associados a uma diminuição do risco do câncer (WEINBERG, 2008).

Moléculas de DNA podem ser alteradas covalentemente por grupos metila em bases citosina em regiões chamadas de sequências CpGs (Citosina fosfato Guanina), essa ação quando acontece em regiões próximas a um promotor gênico pode causar repressão da transcrição. Esse é um mecanismo normal que pode regular a expressão do material genético, que por não alterar a sequência de nucleotídeo e ser reversível é dito um mecanismo epigenético. Entretanto, em tumores pode ser visto um grau anormal no perfil de metilações, sendo assim, em algumas regiões promotoras de importantes genes supressores do tumor podem estar metiladas avisando ou sinalizando que aquele gene não deve ser transcrito. Os dois genes supressores de tumor mais importantes no surgimento da patologia é o Tp53 (gene da proteína de tumor 53), e o pRb (gene da proteína do retinoblastoma). O produto do gene pRb, a proteína Rb, governa o progresso de uma variedade de células por meio de seus ciclos de crescimento e divisão (WEINBERG, 2008).

O gene Tp53 é extensivamente estudado por sua importância como gene regulador do ciclo celular, é também nomeado como o “guardião do genoma” (LANE,1992). Ele tem por função sinalizar a parada do ciclo celular em situações de dano do material genético ou em níveis abaixo de nucleotídeos, fatores de crescimento, glicose ou oxigenação, importantes constituintes para manutenção do ciclo celular, induzindo a correção ou então direcionando a célula para a apoptose (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A proteína p53 é um fator de transcrição que está diretamente relacionada à capacidade da célula em mediar a supressão tumoral (VOGELSTEIN et al., 2000; LOWE et al., 2004; VOUSDEN et al., 2007). Ela está envolvida em muitas vias de ação para manutenção do controle do ciclo celular, em especial essa proteína pode ativar, caso o reparo do DNA não seja possível, a rota de apoptose, que envolve uma destruição organizada e rápida da célula (SCHMITT et al., 2002; TAYLOR et al., 2008). Nos estudos de modelos animais a perda ou mutação do gene e conseqüentemente seu produto, predispõe a uma faixa de tumores espontâneos ou induzidos (LAVIGUEUR et al., 1989; DONEHOWER et al., 1992; HARVEY et al., 1995; IWAKUMA e LOZANO, 2007; MEEK, 2009).

O gene Tp53 é acoplado a chaves, proteínas que regulam negativamente seu desacoplamento e conseqüentemente sua ação. Entretanto, pequenas moléculas interferem na interação entre o gene e suas chaves e acabam por induzi-lo na ausência de estímulos estressores (ISSAEVA et al., 2004; VASSILEV et al., 2004; YANG et al., 2005). A indução desse gene em resposta ao dano de DNA é coordenada por proteínas kinases ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) e ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related) que coordenam uma complexa rede de sinalização em resposta a esses danos (SHILOH, 2003).

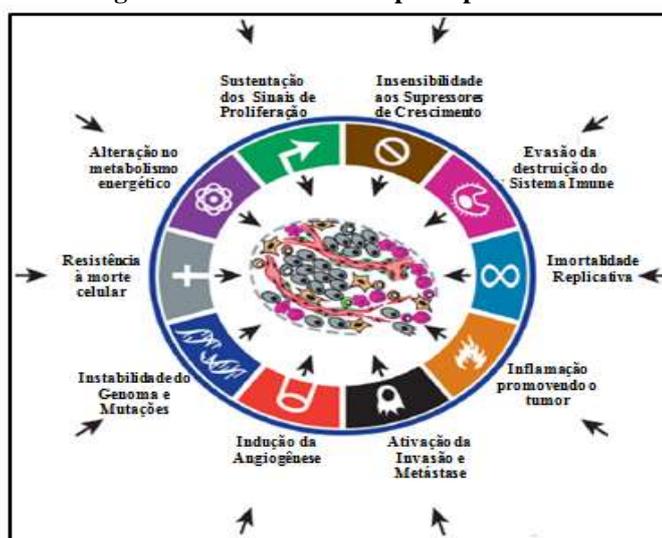
O Tp53 também é induzido através da rota do supressor de tumor ARF (SHERR, 2001; LOWE e SHERR, 2003) que funciona independente da via de dano do DNA. O ARF está normalmente presente em pequenas quantidades (QUELLE et al., 1995; DE STANCHINA et al., 1998; HONDA e YASUDA, 1999; TAO e LEVINE, 1999; WEBER et al., 1999; ZHANG e XIONG, 1999). A indução de ARF por oncogenes ativados tem classicamente sido considerada o mecanismo pelo qual o Tp53 responde a proliferação sustentada anormal (KAMIJO et al., 1997). Dessa forma, alguma mutação nessa via está associada, pelo menos em camundongos, a um fator de progressão tumoral (EISCHEN et al., 1999; SCHMITT et al., 1999; SERRANO, 2000; MEEK, 2009).

2.1.4 O Câncer e suas principais marcas

O câncer surge a partir de células normais que sofreram inúmeras mutações devido à instabilidade genômica dessas células que as capacitam a desenvolver características peculiares, conhecidas como hallmarks (marcas do câncer). As principais marcas, figura 5, extensivamente estudadas consistem na proliferação contínua, falha nos genes supressores de tumor, escape da ação repressora do sistema imunológico, reprogramação do metabolismo

energético, reprodução indefinida que não responde aos sinais de morte celular programada, imortalidade do processo replicativo, indução da angiogênese, crescimento influenciado pelo processo inflamatório e poder de invadir e metastasear (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Sendo assim, o câncer é uma função tanto da construção de um nicho bem sucedido, interação de células malignas e não malignas do microambiente tumoral, como da seleção natural de mutações específicas que habilitam essas células cancerígenas a sobrevivência e proliferação (BARCELLOS-HOFF et al, 2013).

Figura 5 - O câncer e suas principais marcas.



Fonte: Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011.

2.1.4.1 Instabilidade genômica

A maquinaria celular finamente controla o ciclo celular, checando possíveis erros e ajustando para continuar o processo ou excluí-lo caso necessário, garantindo dessa forma a homeostase celular e tecidual. Entretanto, o acúmulo de mutações em pontos de importante controle dessa normalidade transforma a célula normal em outra que não responde mais de maneira adequada aos sinais celulares.

No tecido normal as células sofrem o rígido controle das necessidades teciduais de crescimento garantindo o número, arquitetura e funções normais. As células do câncer não respondem a esses sinais de controle, elas podem produzir e serem estimuladas por fatores de crescimento por meio da sinalização autócrina ou ainda enviar sinais que estimulam células vizinhas a produzirem esses fatores (BHOWMICK et al., 2004; CHENG et al., 2008). A

proliferação também pode ser gerada de mutações que elevem o número de receptores na membrana aos fatores de crescimento, modificações na estrutura desses receptores ou alterações dos mediadores da cascata intracelular deixando-os sempre ativos independente do receptor (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Outras mutações podem ocorrer desativando importantes genes que suprimem o tumor como o Rb e o TP53.

2.1.4.2 Sustentação dos sinais de proliferação e insensibilidade aos sinais de morte

O tecido para manter-se de forma harmoniosa necessita de regras e limites não respeitados pelas células transformadas do câncer, a exemplo estão os impostos pela própria vizinhança, processo conhecido como inibição por contato, que costuma ser regulado por moléculas de adesão como as E-caderinas (OKADA et al., 2005; CURTO et al., 2007). Em algumas neoplasias é observada a inativação mutacional de E-caderina ou baixa expressão o que demonstra sua importante relação com supressão desse processo tumoral (CAVALLARO e CHRISTOFORI, 2004; BERX e VAN ROY, 2009). Além disso, outros importantes genes responsáveis diretamente pela função de anexação podem estar alterados nesses tipos de neoplasias. Assim como moléculas que promovem a migração celular podem estar super expressas (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

É importante para célula cancerígena não apenas manter níveis adequados de sinais proliferativos como também não responder aos comandos celulares de morte programada, conhecidos como apoptose. Esse mecanismo é regulado por duas vias principais, uma recebendo e processando os sinais extracelulares indutores de morte (receptores Fas) e outra sensibilizando e integrando uma variedade de sinais que liberam fatores apoptóticos como citocromo C, que ativa uma cascata de proteases (caspases) (WILLIS e ADAMS, 2005; ADAMS e CORY, 2007) que desorganizam a célula sendo finalmente consumida tanto pela vizinhança como por células fagocíticas. A apoptose é direcionada por sinais reguladores e efetores contrabalanceados por membros pro e antiapoptóticos da família Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) de proteínas regulatórias (ADAMS e CORY, 2007) sendo assim, mutações nesses genes podem desregular e inativar esse importante mecanismo.

Além de proliferarem continuamente e não terem processos de morte programada adequadamente ativos, as células do câncer apresentam a característica de imortalidade replicativa onde a célula não é direcionada para o processo de envelhecimento (senescência) ou apoptose. Sabe-se que os telômeros são importantes estruturas dos cromossomos

diretamente envolvidos na proteção do DNA ao longo dos diversos ciclos celulares (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Entretanto, com o encurtamento do telômero no decorrer da vida da célula esta é dirigida à senescência e posteriormente à apoptose. Diferente das células normais as do câncer apresentam uma quantidade diferenciada de telomerase, enzima que adiciona sequências repetidas no DNA telomérico protegendo a célula do envelhecimento e posterior apoptose por esta via (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

2.1.4.3 Angiogênese sustentada

O tecido tumoral em crescimento constante precisa para suprir suas necessidades de vias que as abasteçam com moléculas essenciais para seu desenvolvimento. Dessa forma, essas células lançam mão de substâncias, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A), que é diretamente expresso em situações de hipoxia ou por sinalização de oncogenes (FERRARA, 2009; MAC GABHANN e POPEL, 2008; CARMELIET, 2005). Essas substâncias sinalizam o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, processo conhecido como angiogênese (HANAHAN e FOLKMAN, 1996).

2.1.4.4 Evasão do sistema imune

O entendimento do potencial protetor do sistema imune e que este poderia ser uma das principais barreiras para a progressão do tumor foi modificada à medida que alguns estudos foram sendo realizados e novas técnicas que provassem a real função deste sistema no tumor fossem desenvolvidas. Desta forma, o sistema imune não atua apenas eliminando as células tumorais, mas também pode agir selecionando ou “editando” as células do tumor (ONUCHIC e CHAMMAS, 2010).

Esta edição é composta por três fases: eliminação, equilíbrio e escape. Na fase de eliminação o sistema imunológico reconhece essas células transformadas e as elimina, a segunda fase é caracterizada pelo equilíbrio dinâmico, onde sistema imune exerce uma pressão seletiva de onde prevalecerão aquelas que apresentam características adaptativas como resistência a atuação imune e baixa imunogenicidade. Dessa forma, o sistema imune seleciona uma nova população que agora proliferará e escapará do controle imunológico (DUN e SCHREIBER, 2004).

Interessantemente, as células tumorais que escapam desse controle imunológico podem recrutar e influenciar células imunes para este local para agirem de forma a promover o desenvolvimento do tumor (ONUCHIC e CHAMMAS, 2010). Macrófagos na periferia do tumor podem auxiliar essa proliferação por meio da secreção de enzimas que degradam a matriz extracelular (MOHAMED e SLOANE, 2006; PALERMO e JOYCE, 2008; JOYCE e POLLARD, 2009; KESSENBROCK et al., 2010), esses macrófagos podem ser ativados por interleucina 4 (IL-4) produzida pela própria célula cancerígena (GOICHEVA et al., 2010). Está íntima relação entre macrófagos e células tumorais podem facilitar a intravasão no sistema circulatório e disseminação metastática das células do câncer (WYCKOFF et al., 2007; QIAN e POLLARD, 2010; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

2.1.4.5 Inflamação promovendo o tumor

Há uma íntima relação do processo inflamatório com o desenvolvimento tumoral, pesquisas revelam que a inflamação crônica é um dos fatores epigenéticos que mais contribuem no surgimento e na progressão do tumor (VIRCHOW e REIZBARKEIT, 1858; ONUCHIC e CHAMMAS, 2010).

Mesmo sabendo do papel da inflamação nessa patologia, apenas na última década pode ser entendido como células inflamatórias, e outros componentes do estroma tumoral, alimentam a progressão do tumor por meio da criação de um microambiente que é enriquecido pelas mesmas citocinas, que são os protagonistas da inflamação crônica associada a cânceres de fígado, estômago e cólon (CAO et al., 2011).

O surgimento de células tumorais nos ambientes de inflamação crônica pode ser devido à regeneração tecidual contínua encontrada nesses locais, o que pode acarretar em maiores chances de mutações, também em parte por ser uma região com uma considerável produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio além de uma área de produção de novos vasos (CONDEELIS e POLLARD, 2006; MUMM e OFT, 2008; ONUCHIC e CHAMMAS, 2010).

2.1.4.6 Alteração no metabolismo energético

Um traço marcante das células cancerígenas que tem surgido como um dos mais recentes hallmarks descobertos é o metabolismo energético diferenciado nessas células.

Dessa forma, a glicólise é a etapa amplamente escolhida por essas células, mesmo sendo contraditório por seu aspecto de pouco rendimento energético, essa via permite a diversificação de intermediários importantes em vias biossintéticas, incluindo geração de nucleosídeos e aminoácidos importantes para a proliferação celular (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

De forma intrigante, no microambiente tumoral tem sido observado dois grupos celulares que vivem em simbiose, um grupo em situações de relativa hipoxia, que são dependentes de glicose, que ao ser metabolizada é liberado na forma de lactato por ser este um dos produtos da glicólise. O lactato é utilizado pelo outro grupo celular que o aproveita para o ciclo do ácido cítrico prosseguindo a fosforilação oxidativa (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

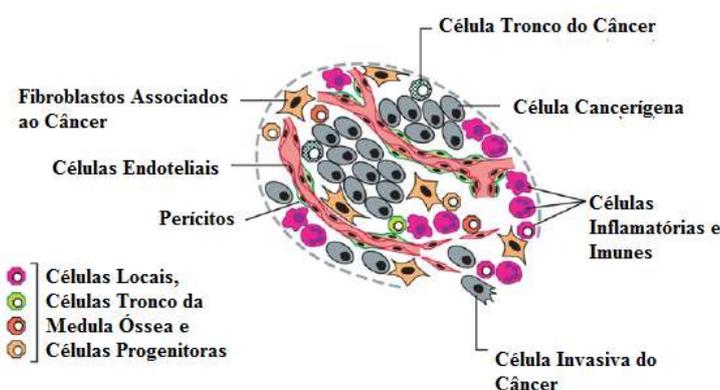
2.1.5 Microambiente Tumoral

Para um melhor entendimento do processo cancerígeno o foco não pode ser apenas direcionado para as células neoplásicas e sim todo o ambiente ao seu redor, o seu microambiente. Este é composto por células que podem ter suas funções coagidas para o crescimento do tumor, figura 6. Dentre essas células não cancerígenas que compreendem esse microambiente estão os subtipos de macrófagos e neutrófilos (DE PALMA et al., 2007; JOHANSSON et al., 2008; MURDOCH et al., 2008; COFFELT et al., 2010; DENARDO et al., 2010; EGEBLAD et al., 2010), que são relacionadas aos processos inflamatórios. Alguns autores sugeriram que o câncer poderia ser entendido como uma ferida que nunca sara (DVORAK, 1986; SCHAFER e WERNER, 2008). Estas células podem produzir fatores de crescimento de tumor e de vasos sanguíneos e outras substâncias que podem aumentar o estado inflamatório além de enzimas que degradam a matriz extracelular (MURDOCH et al., 2008; QIAN e POLLARD, 2010; HANAHAN e WEINBERG, 2011). Todas essas substâncias acabam por auxiliar a proliferação das células neoplásicas.

O recrutamento e o direcionamento de funções das células imunes para auxílio das células do câncer compreendem três estágios: 1) Recrutamento via produção de citocinas (proteína quimiotática de monócitos-1 [MCP-1] e interleucina-8 [IL-8]; 2) Educação/Cooptação via secreção de citocinas que regulam a diferenciação de células imunes no sentido de promover o tumor, interleucina 6 [IL-6], fator de necrose tumoral- α [TNF- α] e fator inibitório da migração de macrófago [MIF]; 3) Resposta imune, em que células imunes

diferenciadas geram citocinas, hormônios e fatores de crescimento, que são agentes promotores de proliferação e tolerância imune ao tumor (COUSSENS, 2002; CHEN et al., 2007; WHITESIDE, 2008; ONUCHIC e CHAMMAS, 2010). Além dessas células, também podem ser encontrados os fibroblastos associados ao câncer, células indiferenciadas ou tronco do câncer, células endoteliais e células associadas à parede do vaso sanguíneo (perícitos). Todas essas células principais do microambiente tumoral agem de forma a propiciar o desenvolvimento e/ ou intravasão tumoral (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Figura 6 - Células do microambiente tumoral



Fonte: Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011.

2.1.6 Sarcoma 180

O estudo de neoplasias necessita de modelos experimentais. Para este fim, vários tipos de tumores transplantáveis tem sido utilizados, entre eles está o Sarcoma 180 (PELCZAR et al., 1996; FACCHINI, 2011), que é uma neoplasia maligna do tecido mesenquimal (CONTRAN et al., 2000). O Sarcoma 180 (S-180) ou Tumor de Crocker é um tumor que foi encontrado em ratos albinos machos em 1914. É uma linhagem celular transplantada por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal que cresce rapidamente em 90% a 100% dos animais inoculados (BUCCHI, 2002). Análises cariotípicas revelaram que esse tumor é desenvolvido devido a rearranjos cromossômicos que resultam em aneuploidias, cromossomos em número diferente do cariótipo normal (OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2005).

Por ser de fácil obtenção, vários centros de pesquisa tem utilizado esse modelo tumoral (BUCCHI, 2002), o que permite uma melhor compreensão da biologia tumoral, assim

como o estudo dos efeitos de diversos agentes sobre a patogenia do câncer (PELCZAR et al., 1996; FACCHINI, 2011).

2.1.7 Terapia do Câncer

Mesmo com o avanço dos estudos sobre o câncer que revelam aspectos de prevenção e geram o desenvolvimento da detecção e tratamento, as terapias adequadas ainda parecem encontrar inúmeras limitações como endereçamento específico de fármacos e elaboração de multi-fármacos para células cancerosas resistentes aos tratamentos convencionais (TSURUO et al., 2003; DONNENBERG V.S e DONNENBERG A.D, 2005; IYER et al., 2013).

Um dos principais modos de tratamento do câncer é a quimioterapia, mas a sua eficiência é limitada pela resistência das células aos fármacos. Essa resistência aos quimioterápicos pode ser dividida em duas classes: intrínseca e adquirida. A intrínseca indica que antes do recebimento da quimioterapia existem fatores pré-existentes que medeiam à resistência nas células do tumor e tornam a terapia ineficiente. A resistência adquirida pode ser desenvolvida durante o tratamento, onde o tumor é inicialmente sensível, mas pode se tornar resistente através de mutações surgidas durante o tratamento, e também através da ativação de rotas alternativas de sinalização compensatórias (LONGLEY e JOHNSTON, 2005; HOLOHAN et al., 2013). Assim, a resistência pode surgir através da seleção de uma minoritária subpopulação resistente que estava presente desde o início (SWANTON, 2012; HOLOHAN et al., 2013). Tumores são altamente adaptáveis, pois podem ativar rotas de sinalização de resistência e inativação da cascata de sinalização de morte que pode levar a resistência ao tratamento (DEBATIN e KRAMMER, 2004; LOWE et al., 2004; HOLOHAN et al., 2013).

A quimioterapia convencional utiliza, em geral, moléculas sintéticas e produtos naturais que esbarram, além da resistência, em outras dificuldades como na rápida retirada e curto tempo de meia vida, levando a uma possível diminuição e manutenção da concentração do fármaco no tumor fora da janela terapêutica para longas durações, além disso, podem apresentar pouca seletividade para o local desejado e ações adversas em células normais, causando efeitos colaterais (PAI et al., 2006; AAGAARD e ROSSI, 2007).

Portanto, existe uma necessidade de desenvolvimento de sistemas direcionados que não só protejam os fármacos da degradação pelos fluidos biológicos, mas também transporte-os seletivamente para os sítios de interesse, proteja as células saudáveis da exposição à esses

fármacos citotóxicos (ZHANG L et al., 2008; FAROKHZAD e LANGER, 2009) e mantenha-os dentro da faixa terapêutica sem a necessidade de doses recorrentes.

Durante os primeiros estágios do desenvolvimento do tumor, vasos sanguíneos do tecido normal suprem a necessidade inicial, entretanto, com o crescimento excessivo do tumor esse suprimento é insuficiente, levando as células cancerígenas a induzirem o desenvolvimento dos seus próprios vasos sanguíneos. O crescimento da vasculatura do tumor, entretanto, é caótico. (NARANG e VARIA, 2011). Esses novos vasos que crescem apresentam-se mais desorganizados e vazados, além do sistema linfático apresentar a drenagem comprometida nesses locais. Essa patofisiologia anormal pode levar ao acúmulo passivo de nanossistemas no interstício do tumor (YUAN et al., 1995; MAEDA et al., 2000; MAEDA et al., 2001; GREISH et al., 2003; DREHER et al., 2006; IYER et al., 2006; IYER et al., 2013).

Um dos nanossistemas extensivamente usados são os lipossomas, esses podem passivamente chegar ao local do tumor, ou serem sofisticadamente desenhados com a incorporação de ligantes para direcionamento ativo. Além disso, alguns nanossistemas podem apresentar tanto funções diagnósticas como terapêuticas sendo altamente versáteis e atingindo dois objetivos importantes para o tratamento de tumores resistentes a fármacos (IYER et al., 2013).

2.2 Lectinas e sua importância histórica

A idéia que certos animais e plantas são tóxicos para o homem é amplamente conhecida há anos (SINGH e SARATHI, 2012). A intoxicação devido ao não cozimento ou ao cozimento incorreto de sementes de leguminosas, em alguns casos, leva a sintomas intestinais agudos e pode estar relacionada à presença de proteínas com uma incrível estabilidade térmica, resistentes a enzimas digestivas e ácidos (KUMAR et al., 2012), essas proteínas chamadas de lectinas tem como uma de suas funções conferir ao vegetal mais um mecanismo de defesa contra fitopatógenos (VAN DAMME, 2008; VANDENBORRE et al., 2009B; MICHIELS et al., 2010; VANDENBORRE et al., 2011).

Importantes pesquisas têm mostrado o poder da irradiação gama para diminuir a alergenicidade provocada por lectinas. Vaz em 2011 mostrou que a exposição à radiação ionizante acima de 1kGy (Kilogray) induziu uma significativa perda da atividade

hemaglutinante da lectina da casca de *Sebastiania jacobinensis* o que pode significar uma redução da alergenicidade dessa proteína.

A lectina do germe de trigo WGA, largamente responsável por muitas alergias, foi submetida a uma faixa de dose de radiação ionizante e foi observado mudanças em seu estado conformacional. Essas mudanças conformacionais da lectina resultaram na redução de citocinas típicas das reações alérgicas com diminuição do infiltrado linfocitário no estômago de camundongos, mostrando que essa técnica pode ser efetiva no combate dos efeitos alérgicos e imunológicos dessa proteína (VAZ et al, 2012).

Também foi avaliado impacto da faixa da dose da irradiação gama na estrutura e potencial alergenicidade, mostrando que em baixas doses de irradiação pode levar a um aumento no potencial alergênico, diferente das altas doses de irradiação, onde ocorre fragmentação das estruturas moleculares essencial para eliminar o efeito alérgico (VAZ et al., 2013).

Embora lectinas estejam relacionadas a uma certa toxicidade, seus benefícios são também documentados na literatura como uma ferramenta de interesse terapêutico para diversas pesquisas como terapia do câncer, imunologia, propriedade antibacteriana e outras, que não podem ser negligenciadas (SINGH e SARATHI, 2012).

Stillmark foi o primeiro a experimentalmente provar que a fração protéica do feijão castor (*Ricinus communis*), que ele chamou de “Ricina” era capaz de aglutinar células vermelhas denominando de “Fitohemaglutininas” em 1988. (OLSNES e KOZLOV, 2001). Em 1936, LANDSTEINER, declarou que a atividade hemaglutinante relativa de vários extratos de sementes é muito diferente quando testadas com eritrócitos de diferentes animais. A especificidade para determinados eritrócitos foi melhor investigada por BOYD e SHAPLEIGH (1954) e foram eles quem cunharam o termo “Lectinas”, derivado do latim “legere”, escolher, selecionar.

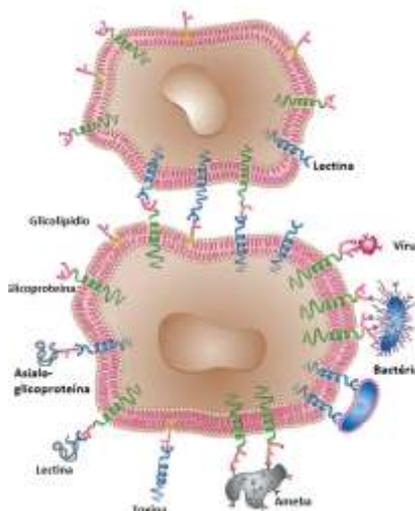
Baseada na arquitetura global das lectinas de plantas, quatro grupos principais podem ser distinguidos: apenas um domínio de ligação a carboidrato (merolectinas), dois ou mais domínios de ligação idênticos (hololectinas), no mínimo dois domínios de ligação a carboidratos diferentes (superlectinas), um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio que exerce atividade biológica independente do domínio de ligação a carboidratos (quimerolectinas). Muitas lectinas isoladas pertencem ao grupo das hololectinas e todos esses grupos possuem a capacidade de aglutinar células exceto as merolectinas por possuírem

apenas um domínio de ligação a carboidrato (VAN DAMME et al., 1998a; VANDENBORRE et al, 2011).

Outra importante classificação considerando a sequência de dados disponíveis nas últimas décadas é feita através de análises de genoma/transcriptoma, onde é possível organizar as lectinas em doze famílias com domínios relacionados estruturalmente e evolucionariamente (VAN DAMME et al., 2008; VANDENBORRE et al, 2011), entre essas está o grupo com domínio lectina de leguminosa que abriga lectinas como Concanavalina A (ConA) e Cramoll.

As lectinas, figura 7, podem ser encontradas em micro-organismos, plantas e animais, podendo estar na membrana ou dentro da célula. Lectinas endógenas medeiam processos biológicos como reconhecimento célula-célula, interações da matrix extracelular, fertilização gamética, desenvolvimento embrionário, crescimento celular, diferenciação celular, sinalização celular, adesão e migração celular, apoptose, imunomodulação e inflamação, interação parasita-hospedeiro, enovelamento e direcionamento de glicoproteína, indução mitogênica e homeostase (MODY et al., 1995; GORELIK et al., 2001; MINKO, 2004; NIMRICHTER et al., 2004; SHARON e LIS, 2004; WORMALD e SHARON, 2004; RABINOVICH et al., 2007; CHOU et al., 2009; KERRIGAN e BROWN, 2009; RUSEVA et al., 2009; SARAVANAN et al., 2009; YAMANAKA et al., 2009; GHAZARIAN et al., 2011). E tem atraído grande interesse devido a sua variedade de atividades biológicas como na aglutinação celular (KHAN et al., 2007), antitumoral (LIU et al. 2009, 2010), imunomodulatória (RUBINSTEIN et al. 2004), antifúngica (HERRE et al.2004) e efeitos antivirais (WONG e NG 2005, ZUO et al., 2012).

Fig 7 - Diversos tipos de lectinas de superfície celular e suas interações. Lectinas podem participar do processo de reconhecimento de vírus a várias células via carboidratos presentes na superfície celular. As lectinas podem ligar-se a domínios de carboidratos de glicoproteínas (ex: asialoglicoproteínas), glicoproteínas ou glicolipídios.



Fonte: Adaptado de SHARON e LIS, 2004.

2.2.1 Família Fabaceae

A família das leguminosas ou Fabaceae é a terceira maior família de angiospermas compreendendo cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies (LEWIS et al., 2005), ficando atrás apenas de Orchidaceae e Asteraceae (DOYLE; LUCKOW, 2003). As leguminosas apresentam uma importância ecológica, econômica e medicinal. Elas constituem a segunda maior família botânica em importância econômica, ficando atrás apenas de Poaceae (WOJCIECHOWSKI et al., 2004).

Phaseoleae é uma tribo da família Fabaceae, que compreende um vasto número de gêneros, sendo economicamente a mais importante das tribos dessa família. Nessa tribo encontra-se a subtribo Diocleinae. Espécies da subtribo Diocleinae são mais encontradas no Novo Mundo, apresentando uma série de características primitivas: frequência de flores largas com proeminentes discos sobre o ovário e hilo geralmente alongado. Treze gêneros de Diocleinae foram reconhecidos, compreendendo entre tantos outros os de *Canavalia* e *Cratylia*. (VARELA et al., 2004).

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram um sofisticado e elaborado sistema de defesa diante do grande número de inimigos potenciais que as cercam, abrangendo fungos, insetos, bactérias, vírus, ácaros, nematoides e mamíferos. Esse mecanismo de defesa é

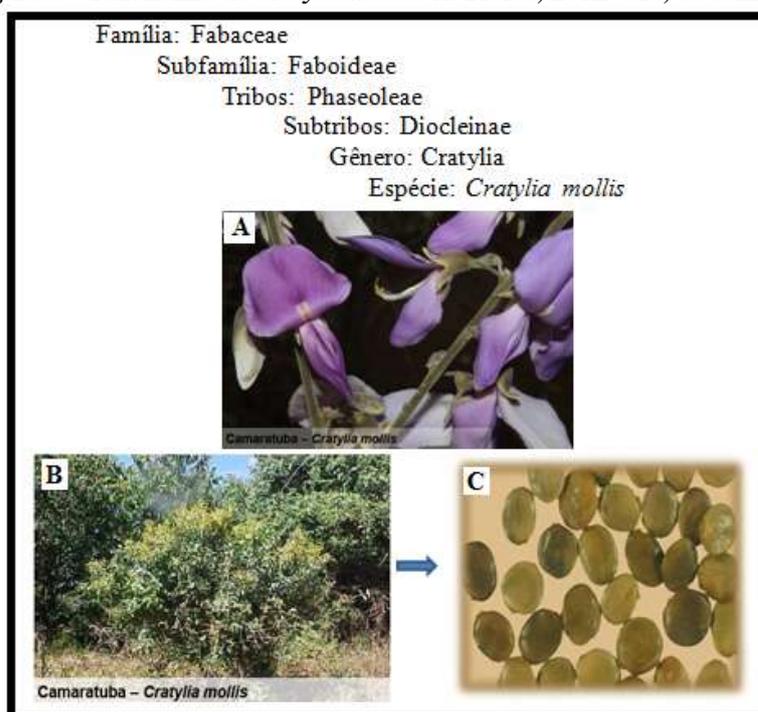
mediado por reações complexas, muitas dessas sendo ativadas em resposta a tais agressores (BRAGA, 2009).

As plantas dispõem de um vasto número de peptídeos e proteínas, dentre outras substâncias, capazes de protegê-las contra o ataque de pragas e patógenos (VAN DEN BERGH et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004; BRAGA, 2009). As lectinas são importantes como proteínas de defesa por sua vasta atuação contra herbívoros e patógenos. Tal proteção ocorre devido à sua capacidade de ligação a glicoconjugados e, conseqüentemente, desestabilização do metabolismo do agressor, exercendo, assim, efeitos deletérios (BANDYOPADHYAY et al., 2001).

2.2.2 *Cratylia mollis* e suas lectinas

Cratylia mollis, popularmente conhecida como feijão Camaratu ou Camaratuba, é uma espécie autóctone do semi-árido do nordeste do Brasil (SOUZA et al., 2003). *Cratylia*, que pertence à família Fabaceae ou leguminosa, figura 8, é uma planta arbustiva, tolerante à seca e a solos ácidos e tem potencial para adubação verde e forrageamento (ARAÚJO et al., 2011).

Figura 8 - Taxonomia de *Cratylia mollis*. A. Flores, B. Árvore, C. Sementes



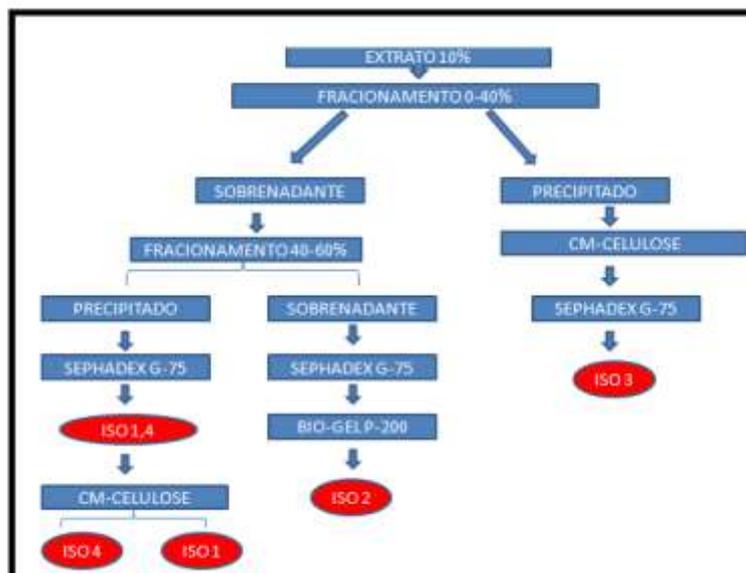
Fonte: Fotos adaptadas de CARDOSO, 2009.

De sua utilização como recurso forrageiro até a purificação das lectinas de suas sementes, *Cratylia mollis* tem atraído ao longo dos anos a atenção de inúmeros pesquisadores que visam descobrir as diversas atividades biológicas de suas lectinas.

Das sementes de *C. mollis* foram purificadas quatro isoformas de lectinas que são separadas pelos diferentes estágios do processo de fracionamento com sulfato de amônio. CORREIA e COELHO (1995) purificaram duas isoformas (1,4) em apenas uma etapa cromatográfica em coluna com sephadex G-75, sendo essas isoformas separadas através de mais uma etapa cromatográfica com CM-celulose gerando um rendimento de 94% para a isoforma 1 (31kDa)(Figura 9).

As evidências indicavam que mais outras isoformas poderiam estar presentes no precipitado da fração 0-40% (3,3%) e no sobrenadante da fração 40-60% (2,6%) (Figura 9). As isoformas 2 e 3 ligam-se a diferentes tipos de carboidratos, a isoforma 2 (60kDa) assim como a isoforma 1 se liga a resíduos de glicose/manose enquanto que a isoforma 3, que é uma glicoproteína (31kDa) se liga a galactose. As isoformas 1, 2, e 3 apresentam diferenças de migração eletroforética, Cramoll 1 (pI 8.5-8.6), Cramoll 2 (pI 4.15-6.7), Cramoll 3 (pI 5.25-5.8) (PAIVA e COELHO, 1992).

Figura 9 - Etapas principais para extração e purificação das isoformas de lectinas de *Cratylia mollis*



Fonte: Próprio autor.

Cramoll consiste de 236 resíduos de aminoácidos, dentro os quais quatro são triptofanos, com 82% de identidade com ConA, apresentando um sítio de ligação idêntico para metil- α -manopiranosídeo Mn^{2+} e Ca^{2+} , figura 10, entretanto, são observadas diferenças de

ligação a oligossacarídeos e glicoproteínas dessas duas lectinas. Os dois sítios de metal são encontrados na proximidade do sítio de ligação a monossacarídeo. O sítio de ligação a metais é indispensável para ligação do carboidrato, os metais interagem com a cadeia polipeptídica tanto diretamente como via coordenação de moléculas de água (SOUZA et al., 2003).

Figura 10 - Estrutura Terciária de Cramoll mostrando o sítio de ligação a monossacarídeo e aos íons Ca^{2+} e Mn^{2+}



Fonte: SOUZA et al., 2003.

Através de análise imunocitoquímica foi possível mostrar que assim como diversas lectinas de legumes, as isolectinas 1 e 3 encontra-se predominantemente na matriz amorfa de corpos protéicos e nas paredes celulares do eixo embrionário, isso mostrou que isolectinas com diferenças em relação a especificidade de carboidratos e glicosilação estão localizadas no mesmo compartimento subcelular sugerindo diferentes funções dentro de uma mesma organela. A presença dessas isolectinas está relacionada a uma possível função de defesa contra predadores e no eixo embrionário elas podem estar associadas a necessidade mitogênica para o processo germinativo ou como um estoque protéico para a dormência da semente. Dessa forma, essas proteínas podem ser metabolicamente ativas para seu uso em momento oportuno (SANTOS et al., 2004).

Como lectina majoritária das sementes de *C. mollis*, Cramoll 1 assim como Cramoll 1,4 têm mostrado seus potenciais diagnósticos nas pesquisas biomédica e médicas do câncer. Beltrão e colaboradores (1998) revelou que Cramoll 1 ao ser utilizada para avaliar o perfil diferencial de marcação de tecidos normais e transformados de mama apresentou uma maior marcação dos tecidos neoplásicos em relação aos sadios do que a lectina comercial Concanavalin A (ConA). Cramoll 1,4 também revelou seu potencial diagnóstico ao marcar de forma diferencial tecidos normal, hiperplásico e de carcinoma de próstata mostrando que o

padrão de coloração foi mais intenso no tecido hiperplásico comparado ao tecido normal para os grupos utilizando essa lectina em comparação com o grupo utilizando ConA. Cramoll 1,4 e ConA também mostraram uma diminuição na intensidade de marcação com o aumento do grau de malignidade. Entretanto, Cramoll 1,4 apresentou um valor diagnóstico maior para doenças na próstata do que a lectina comercial ConA (LIMA et al., 2010).

O potencial terapêutico das lectinas de *C. mollis*, em especial Cramoll 1,4 tem sido amplamente estudado. Essa lectina mostrou sua capacidade de inibição do crescimento do Sarcoma 180 *in vivo* que foi intensificada ao ser encapsulada em lipossomas convencionais (ANDRADE et al., 2004), mostrando que além de suas ações diagnósticas essa lectina também pode ser um potencial para terapia do câncer.

O efeito mitogênico de Cramoll 1,4 e Cramoll 1 em linfócitos foi avaliado mostrando que essas lectinas podem ser usadas como ferramentas para proliferação dos linfócitos e não há diferença significativa na utilização dessas isolectinas, além disso, essa atividade biológica está diretamente relacionada ao sítio de ligação a carboidratos dessas lectinas (MACIEL et al., 2004). Cramoll 1,4 também está associada a um aumento da proliferação de esplenócitos. Tanto Cramoll 1,4 como ConA também induziram altos níveis de IL-2, IL-6, IFN- γ e produção de óxido nítrico. Além disso, Cramoll 1,4 não induziu apoptose e estimulou um número significativo de células na fase S do ciclo celular, mostrando que essa lectina pode ser usada como agente mitogênico nos ensaios de imunoestimulação (MELO et al., 2010a). Cramoll 1,4 também apresenta atividade modulatória nos linfócitos do baço e estimula a resposta imune Th2 (MELO et al., 2010b). Essa lectina também é hábil para induzir a expressão *in vitro* de IL-6, IL-17A, IL-22, e IL-23 melhor que a comercial ConA, além de gerar memória imunológica (OLIVEIRA et al., 2013).

As isolectinas de Cramoll também mostram seu potencial de isolamento de glicoproteínas, com importantes atividades biológicas, quando imobilizadas em matriz de Sepharose (LIMA, 1997; PAIVA, 2003; SILVA, 2011).

Em 2008, OLIVEIRA e colaboradores imobilizaram Cramoll 1,4 em nanopartículas de ouro adsorvidas em eletrodos, mostrando que ela mantém sua atividade biológica e interage com ovalbumina, demonstrando que esse sistema pode ser usado na construção de um biossensor sensível a glicoproteínas em solução. Em 2011 um novo sensor utilizando Cramoll 1,4 foi desenvolvido com alta sensibilidade e seletiva discriminação de lipossacarídeo bacteriano (OLIVEIRA et al., 2011a). Essa lectina também mostrou ser um potencial

biossensor para detectar padrões anormais de glicoproteínas no soro de pacientes com dengue (OLIVEIRA et al., 2011b).

Compostos isolados de diversas plantas da região semi-árida brasileira tem revelado atividade tripanocida contra as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (VIEIRA et al., 2008). Cramoll 1,4 também tem mostrado o mesmo potencial de aglutinação e inibição da proliferação e morte celular por necrose dessas formas de *T. cruzi* (FERNANDES et al., 2010).

O efeito cicatrizante de Cramoll 1,4 foi avaliado no reparo das lesões experimentais de camundongos normais e imunocomprometidos, mostrando seu potencial como futuro composto cicatrizante (MELO et al., 2011). O tratamento regular de queimaduras de segundo grau em camundongos utilizando hidrogel contendo Cramoll 1,4 acelerou a granulação, o processo de reepitelização e retração da ferida, mostrando o potencial de Cramoll que pode ser utilizada com outros bioprodutos para o tratamento desse problema (PEREIRA et al., 2012).

Dessa forma, as lectinas de *Cratylia mollis* tem mostrado diversas atividades biológicas podendo ser utilizada como fonte potencial para diversas aplicações biomédicas e médicas.

2.2.3 Expressão heteróloga de lectinas, o caso de rCramoll

A purificação de lectinas a partir de um material é em geral um processo que consome tempo e em alguns casos demanda uma grande quantidade de material biológico. Não obstante, o rendimento pode ser baixo e as frações purificadas podem estar contaminadas por diversas biomoléculas. Uma alternativa para solucionar alguns desses problemas é a expressão heteróloga que oferece uma produção de maior grau de controle das propriedades finais, mais efetiva e proteínas podem ser preparadas com um maior grau de pureza (GEMEINER et al., 2009).

Para lectinas vegetais a expressão heteróloga oferece vantagens como a não dependência da coleta de sementes, que em muito afeta a homogeneidade das amostras devido à sazonalidade, além de evitar a contaminação como outras proteínas ou metabólitos secundários durante o processo de purificação (VAREJÃO et al., 2010).

Com o progresso da tecnologia de DNA recombinante, numerosos sistemas de expressão têm sido usados para produção heteróloga de lectinas. Expressão em sistema hospedeiro tem clareado a influência das modificações pos-traducionais no enovelamento e direcionamento das propriedades de ligação de carboidratos de proteínas de plantas, variando nas bactérias (*Escherichia coli*), fungos (*Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*), plantas ou células animais. *E. coli* e *P. pastoris* têm sido empregados com sucesso para produção em larga escala de proteínas produzidas heterologicamente, que são usadas na indústria devido ao sua genética bem conhecida, rápida, alta densidade de cultivo e grande número disponível de ferramentas biotecnológicas compatíveis (BRETTHAUER e CASTELLINO, 1999; MENÉNDEZ et al., 2005; GEMEINER et al., 2009).

Lectinas de leguminosas são sintetizadas pelos ribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso e conseqüentemente acumuladas em vacúolos nas células que formam tecidos ou órgãos vegetais. Elas são encontradas em grandes quantidades nos cotilédones das sementes e podem ser usadas como estoque de aminoácidos para o desenvolvimento das sementes ou terem funções de defesa. Muitas dessas proteínas são sintetizadas como precursores inativos sendo ativadas após o transporte para destinos subcelulares pelo processo de clivagem proteolítica (SHELDON et al., 1996; VANDENBORRE et al., 2011).

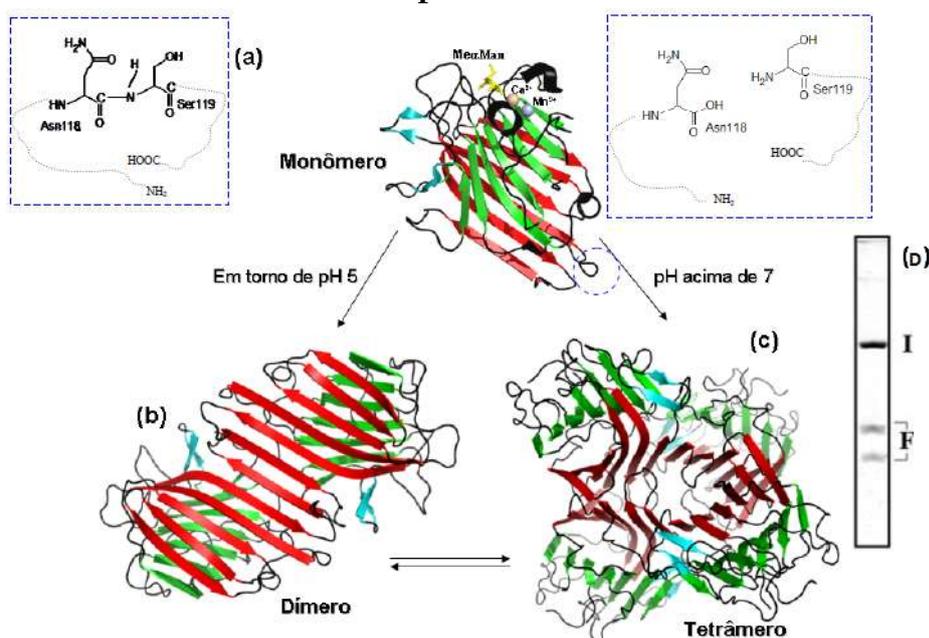
Lectinas da subtribo Diocleinae a qual pertence *C. mollis* apresentam um complexo processo de modificação pós-traducional (MIN e JONES, 1992; BEZERRA et al., 2006; VAREJÃO et al., 2010), que é inexistente na bactéria, o que pode gerar lectinas com a mesma especificidade e atividade que a proteína nativa, mas a estrutura e propriedades de ligação levemente diferentes (STREICHER e SHARON, 2003; GEMEINER et al., 2009). Sendo assim, existia um grande desafio para a síntese de forma heteróloga de rCramoll.

Entretanto, VAREJÃO e colaboradores (2010) visando transpor esse problema, utilizaram um DNA quimicamente sintetizado que codificava a sequência de aminoácidos da lectina madura o que resultou na expressão e purificação de uma lectina recombinante funcional CRAMOLL 1 (rCramoll) em *Escherichia coli*. Para síntese dessa nova lectina recombinante foi utilizado o vetor de expressão bacteriano contendo a sequência de DNA de rCramoll sob o controle do promotor T7 (VAREJÃO et al., 2010). Esse vetor é comumente usado para produção de lectinas heterólogas (pET) sistema de expressão contendo o promotor T7, que é então transferido para o hospedeiro, particularmente em *E. coli* (GEMEINER et al., 2009).

Um segundo obstáculo para produção de rCramoll era o fato de mais de 90% da lectinas previamente expressas em células de *E. coli* formarem corpos de inclusão, resultando em apenas uma pequena parcela de proteínas ativas. Mesmo uma grande quantidade tendo se encontrado em corpos de inclusão (agregados insolúveis) foi possível recuperar uma quantidade razoável de rCramoll solúvel em sua forma ativa. Essa lectina apresenta as mesmas propriedades físico-químicas como massa molecular, densidade de carga, estruturas secundárias e terciárias e a mesma capacidade para aglutinar eritrócitos de coelho e células epimastigotas *Trypanosoma cruzi*. Entretanto, foi possível observar que pCramoll se apresentou mais instável que sua forma recombinante quando submetida a altas temperaturas ou alta pressão hidrostática (VAREJÃO et al., 2010).

pCramoll, figura 11, também mostrou-se mais instável com o aumento da acidez quando comparada a rCramoll. Em pH 7, as duas proteínas existem em sua forma tetramérica, entretanto, com o aumento da acidificação elas comportam-se de formas diferentes, figura 12. Em pH 6,0, 26% de dímeros de pCramoll são formados, enquanto que rCramoll permanece 100% como tetrâmero. Em pH 5,0 onde pCramoll é 100% dimérica, 50% de rCramoll ainda apresenta-se como tetrâmero, apenas em pH 4,2 todos as formas de rCramoll são dímeros (VAREJÃO et al., 2010).

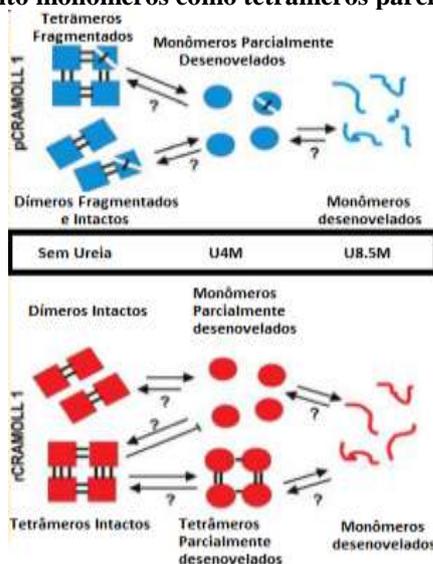
Figura 11 - Lectina de *Cratylia mollis* (CRAMOLL 1): oligomerização dependente de pH. (a) Monômero, (b) Dímero, (c) Tetrâmero. (D) Eletroforese mostrando o monômero intacto-I e monômeros fragmentados-F



Fonte: Adaptado de VAREJÃO et al., 2010.

Na presença de 4 molar(M) de uréia, tetrâmeros de pCramoll são dissociados em monômeros, enquanto que na mesma situação os tetrâmeros de rCramoll são inicialmente desnovelados. Já ao analisar as espécies diméricas, a dissociação a 4M de uréia forma monômeros parcialmente desnovelados para as duas proteínas, figura 12. Essa diferença no perfil de desnovelamento e dissociação é provavelmente devido a ausência de uma ligação peptídica específica em alguns monômeros fragmentados de pCramoll o que pode ocasionar a diminuição da estabilidade dos tetrâmeros (VAREJÃO et al., 2011).

Figura 12 - Diferenças no perfil de dissociação e desnaturação de p e rCramoll. Em condições não desnaturantes rCramoll só apresenta tetrâmeros intactos diferente de pCramoll que possui tetrâmeros formados tanto por monômeros intactos como fragmentados. Os tetrâmeros (pCramoll) ao serem submetidos a 4molar de ureia apresenta apenas monômeros parcialmente desnovelados, enquanto que rCramoll apresenta tanto monômeros como tetrâmeros parcialmente desnovelados



Fonte: Adaptado de VAREJÃO et al., 2011.

A técnica de expressão heteróloga também proporcionou o estudo da influência da modificação pós-traducional na síntese de CRAMOLL e sua possível importância para o vegetal. Essa certa instabilidade da proteína da planta pode ser importante para a disponibilidade dessa proteína como fonte de nutrição para o crescimento do embrião na semente. rCramoll não apresenta monômeros fragmentados vindos do processo de modificação pós-traducional que ocorre nas plantas, dessa forma, isso rende um aumento da estabilidade da proteína recombinante frente em algumas situações desnaturantes (VAREJÃO et al., 2011).

2.2.4 Lectinas e ação antitumoral

O século XX apresentou um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais, especialmente de plantas e microorganismos, no campo da oncologia propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica. A maioria (60%) dos fármacos anticâncer introduzidos na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2007; BUTLER, 2008; HARVEY, 2008).

Algumas lectinas de plantas já foram usadas como ferramentas de reconhecimento tumoral para diferenciar tumores malignos de benignos e o grau de glicosilação associado com metástases (MODY et al., 1995). Elas têm sido desenvolvidas para utilização como microarranjos sofisticados para melhor reconhecimento de tumores malignos no diagnóstico e prognóstico do câncer (GUPTA et al., 2010).

Estas lectinas têm sido bem conhecidas por possuir atividade antitumoral, via morte celular programada, que é um mecanismo celular intrínseco para eliminar células prejudiciais e manter a homeostase, incluindo apoptose e autofagia (LI et al., 2009), existem múltiplas conexões entre apoptose e autofagia que pode selar o destino final da célula do câncer (GIANSANTI et al., 2011). Além disso, as lectinas de plantas são um potencial terapêutico nos ensaios pré-clínicos e clínicos na descoberta de fármacos anticâncer (FU et al., 2011).

Até agora, diversas lectinas de plantas como MLs (lectina de *Mistletoe*) e Ricina tem sido bem estudadas por possuir efeito antiproliferativo e atividade que induz a apoptose nas células cancerígenas (DE MEJÍA e PRISECARU, 2005). As lectinas ConA e PCL (lectina de *Polygonatum cyrtonema*) podem resultar na morte celular por autofagia depois da internalização ou ligação a certos receptores de açúcares na superfície das células do câncer (LEI e CHANG, 2007).

ConA foi a primeira lectina de legume com ampla atenção devido a sua atividade antitumoral. Em 1995, essa lectina foi reportada por induzir apoptose que estava associada com sua propriedade de ligação a carboidrato (KULKARNI e MCCULLOCH, 1995). Estudos recentes tem demonstrado que a iniciação do processo de apoptose pode ser mediada pela mitocôndria (LIU et al., 2009C; LI et al., 2010) devido ao colapso de seu potencial de membrana, liberando o citocromo C e ativando as caspase 9/3 culminando com a apoptose (LIU et al., 2009D, 2010C).

Além disso, outras lectinas de legume são reportadas por possuir significantes atividades anti-proliferativas e indutoras de apoptose para uma variedade de tipos de câncer (FU et al., 2011). Sementes de *Phaseolus coccineus* possuem atividade anti-proliferativa. Esta lectina induz a apoptose dependente de caspase em células L929 (fibroblastos de camundongos) e a atividade anti-neoplásica desta lectina foi abruptamente diminuída quando a especificidade por ácido siálico foi completamente inibida, o que indica que esta especificidade de ligação a açúcar pode estar relacionada a atividade anti-neoplásica. (CHEN et al., 2009). Cramoll 1,4 apresentou cerca de 41% de inibição tumoral em camundongos com sarcoma 180 (ANDRADE et al., 2004).

Lectinas têm sido abrangentemente usadas como candidatas a fármacos antitumorais em cânceres humanos *in vitro*, algumas delas têm sido aplicadas nas terapias pré-clínicas e clínicas na luta contra câncer humano (THIES et al., 2005; GUPTA et al., 2010; FU et al., 2011).

Por conseguinte, as lectinas têm como uma de suas atividades biológicas a ação antitumoral que pode ser desencadeada por três possíveis vias. Algumas lectinas agem inativando ribossomos nas células do câncer, outras através da endocitose e seletivamente se localizam em algumas organelas como mitocôndrias e por fim algumas se ligam a domínios contendo açúcares de alguns receptores dessas células cancerígenas. Sendo todas as três vias direcionadas para a morte celular programada e assim destruição dessas células malignas (FU et al., 2011).

2.3 Nanotecnologia Farmacêutica

A formulação, caracterização e aplicação de dispositivos em escala nanométrica é função da nanotecnologia, amplamente conhecida por ter um grande potencial em trazer benefícios para muitas áreas da pesquisa e aplicações. Em 1974, o cientista Norio Taniguchi da universidade de Tokyo foi o primeiro a utilizar o termo nanotecnologia ao referir-se a habilidade de produzir materiais em nível nanométrico (THASSU et al., 2007; VARSHNEY e SHAILENDER, 2012). Essa tecnologia é um campo inovador e altamente especializado, que tem revolucionado a indústria farmacêutica. A nanotecnologia pode fornecer diagnósticos mais precisos e tratamentos terapêuticos de doenças fundamentadas ao nível molecular (JAIN, 2007).

A nanotecnologia tem sido amplamente estudada como alternativa para o tratamento de muitas doenças a exemplo do câncer, que apresenta inúmeras dificuldades, entre elas a resistência que algumas células tumorais têm ao efeito citotóxico de alguns quimioterápicos. A nanotecnologia providencia uma inovadora e promissora alternativa para pequenas moléculas quimioterápicas convencionais, superando a resistência do tumor a esses medicamentos por meio da encapsulação, anexação ou conjugação dos fármacos ou produtos biológicos terapêuticos (GAO et al., 2012).

Simultaneamente, os nanocarreadores podem promover uma melhora na penetração/permeação das substâncias ativas nas barreiras fisiológicas e proteger os fármacos ou produtos biológicos sensíveis dos fluidos biológicos. Além disso, os nanocarreadores permitem a solubilização de fármacos hidrofóbicos, aumento do tempo de circulação sanguínea do fármaco, entrega a múltiplos alvos terapêuticos e liberação controlada do fármaco (GAO et al., 2012).

Um dos fatores que tem impulsionado, em grande parte, o uso de nanossistemas para o tratamento de câncer resistente a vários fármacos, pode ser atribuído à possibilidade de acoplar moléculas a esses nanossistemas que direcionam especificamente, como anticorpos e peptídeos aos sítios de ação nas células tumorais de interesse (JABR-MILANE et al., 2008; ABEYLATH et al., 2011; JABR-MILANE et al., 2008; IYER et al., 2013). Alguns importantes nanocarreadores para este fim são: nanopartículas, lipossomas, micelas, dendrímeros, quantum dots, nanopartículas magnéticas e polímeros conjugados a fármacos (GAO et al., 2012; DESOIZE e JARDILLIER, 2000).

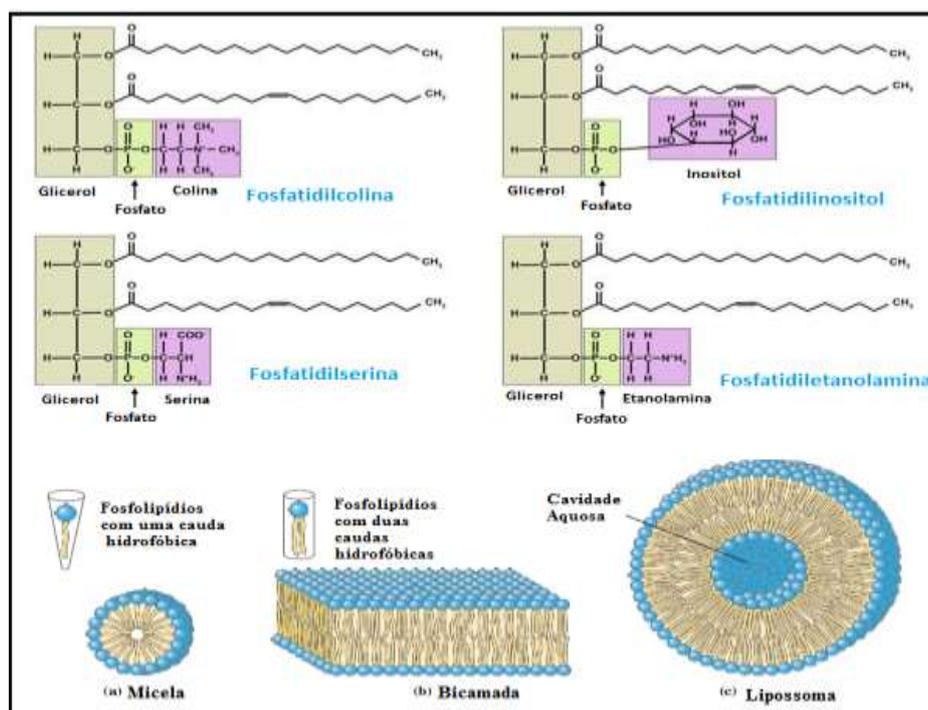
2.3.1 Lipossomas

Moléculas anfifílicas normalmente interagem de modo a diminuir a exposição de seus grupos hidrofóbicos em um ambiente hidrofílico formando monocamadas. Em uma faixa acima de determinada concentração destes compostos, a chamada concentração micelar crítica (CMC), ocorre a formação de agregados termodinamicamente estáveis, estruturas que apresentam diferentes formas de acordo com suas características químicas, figura 13 (NELSON e COX, 2008).

Fosfolipídios são exemplos de moléculas anfifílicas que possuem cadeia hidrocarbonada única ou duas cadeias curtas que são capazes de formar, em meio aquoso,

micelas, evitando dessa forma a exposição de seus grupos apolares em água ou substância polar. Caso os fosfolipídios apresentem duas cadeias hidrocarbonadas longas, espontaneamente formarão agregados em bicamadas, assumindo a forma vesicular quando dispersos em solução aquosa, estas estruturas são nomeadas de lipossomas, estruturas fechadas que envolvem um núcleo aquoso, figura 13 (FERREIRA et al., 2005).

Figura 13 - Quatro principais tipos de fosfolipídios, PC (fosfatidilcolina) possui grupo polar neutro; PE (fosfatidiletanolamina) possui grupo polar neutro; PS (fosfatidilserina) possui grupo polar carregado negativamente; PI (fosfatidilinositol) possui grupo polar carregado negativamente em pH 7. Organização das moléculas de fosfolipídios. (a), (b) e (c).



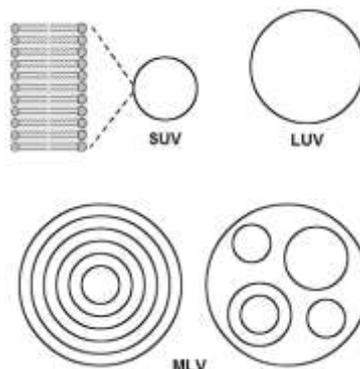
Fonte: Adaptado de: NELSON e COX, 2008; R. VALENZUELA e A. VALENZUELA, 2013.

De acordo com TORCHILIN (2005), os lipossomas são vesículas que consistem de uma ou mais bicamadas de fosfolipídios concêntricas ao redor de um compartimento aquoso, (figura 13), eles podem carrear fármacos, biomoléculas e agentes diagnósticos no núcleo aquoso (moléculas hidrofílicas) ou embebidos em sua membrana (moléculas hidrofóbicas).

Os lipídios utilizados para a preparação dos lipossomas são biodegradáveis e biocompatíveis. Entre os fosfolipídios mais utilizados encontram-se as fosfatidilcolinas devido a sua estabilidade apropriada e sua habilidade para agir contra mudanças de pH ou de concentrações salinas no produto ou ambiente biológico. (BATISTA et al., 2007).

Os lipossomas são classificados quanto ao seu grau de lamelaridade e quanto ao seu tamanho. Vesículas unilamelares quando pequenas são nomeadas de (SUV's) e as grandes de (LUV's), enquanto que aquelas que possuem várias camadas são denominadas de vesículas multilamelares grandes (MLV's) (LOPES et al., 2013).

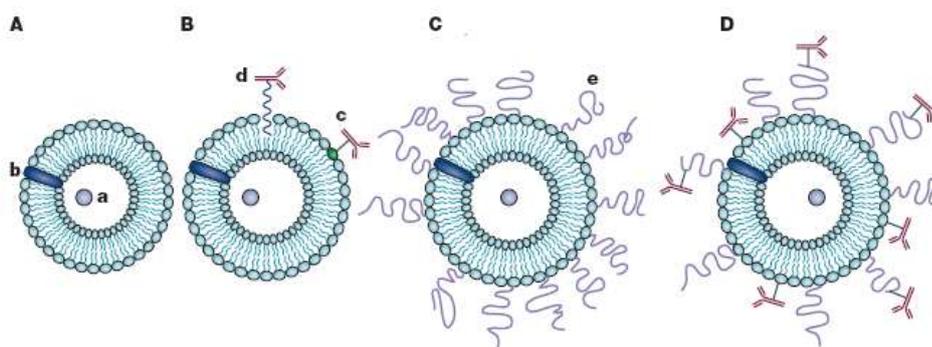
Figura 14 - Classificação dos lipossomas de acordo com o tamanho e número de camadas



Fonte: Adaptado de LOPES et al., 2013.

A primeira linha de lipossomas formulados chamados de convencionais (figura 15), são compostos basicamente de fosfolipídios e colesterol, podendo ter também um lipídeo com carga negativa ou positiva para evitar a agregação das vesículas, aumentando a estabilidade em suspensão (BATISTA et al., 2007). Estas vesículas têm sido exploradas para uma entrega eficiente de fármacos antiparasitas e antimicrobianos e para o tratamento de infecções localizadas no sistema mononuclear fagocítico (MPS) (AGRAWAL e GUPTA 2000; BASU e LALA 2004). Lipossomas catiônicos também são extensivamente usados para encapsular moléculas carregadas negativamente como DNA, RNA e oligonucleotídios (BATISTA et al., 2007). Entretanto, esses lipossomas enfrentam limitações pela sua rápida captura pelo (MPS) depois da administração sistêmica (HUWYLER et al., 2008).

Figura 15 - A. Fosfolipídios tradicionais com fármacos solúveis em água (a) encapsulado no interior aquoso, e fármacos insolúveis na bicamada (b). B. Lipossomas com moléculas sítio-específicas como anticorpos (c) reagindo com fosfolipídios na membrana ou ancorados em outra estrutura(d). C. Lipossomas de longa circulação revestido com polímero como o polietilenoglicol (PEG)(e). D. Imunolipossomas de longa circulação



Fonte: Adaptado de TORCHILIN, 2005.

Outro grupo de lipossomas são os polimórficos, que se tornam reativos devido à mudança na sua estrutura desencadeada por algumas situações específicas (BATISTA et al., 2007). Lipossomas pH-sensíveis são chamados de polimórficos, pois são geralmente estáveis em pH fisiológico, mas podem ser desestabilizados e adquirir propriedades fusogênicas em condições de acidez, como em áreas de infecção, inflamação e tumores (GULINO et al., 1967; LOPES et al., 2013) levando a liberação de seu conteúdo aquoso (SIMÕES et al., 2004; CARVALHO-JÚNIOR et al., 2007). Lipossomas termo-sensíveis também são polimórficos e são constituídos por fosfolípidios cuja temperatura de transição de fase é levemente acima de 37°C, o que favorece a liberação do material encapsulado em regiões com hipertermia como o tumor (BATISTA et al., 2007; LOPES et al., 2013).

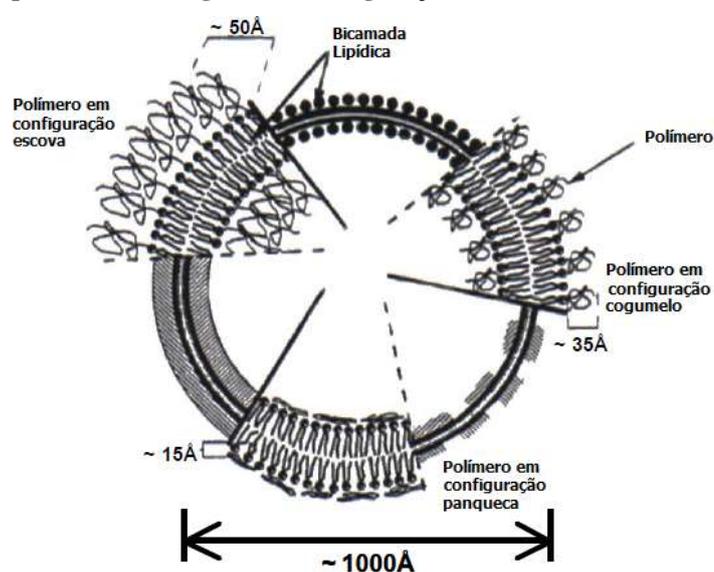
Uma nova linha de lipossomas tem sido elaborada, os lipossomas sítio-específicos, figura 15, que objetiva o acúmulo dos produtos carregados nas células ou tecidos alvos, diminuindo a exposição para tecidos saudáveis agindo de forma seletiva e diminuindo os efeitos colaterais causado pelos fármacos. Esses lipossomas são formados por meio do acoplamento em sua superfície de uma molécula direcionadora para o sítio de ação, que é capaz de reconhecer, ligar e induz a internalização do nanossistema ou do fármaco encapsulado. As moléculas direcionadoras envolvem anticorpos ou fragmentos, fatores de crescimento, carboidratos ou ligantes de receptores e lectinas (LOPES DE MENEZES et al., 1999; SAPRA e ALLEN 2003; MEDINA et al., 2004; MAKHLOF et al., 2011).

As lectinas, por se ligarem especificamente e reversivelmente a resíduos de carboidratos (FU et al., 2011) são potenciais moléculas para o direcionamento de nanossistemas. Em 2006, ROLIM-SANTOS e colaboradores conjugaram a lectina comercial concanavalina A para avaliar seu potencial no direcionamento da doxorubicina (DOX) para as células. Eles mostraram que a encapsulação do DOX nesse nanossistema foi capaz de

distearoilfosfatidiletanolamina) e posteriormente sua inserção na bicamada lipídica (MOGHIMI e SZEBENI, 2003).

A massa molecular do polímero e sua densidade na nanoestrutura determinam o grau de cobertura da superfície e a distância entre os locais de inserção do lipídio peguilado que é representando por diferentes configurações desse polímero na superfície lipossomal, figura 17, proposto por De Gennes (1980) (IMMORDINO et al., 2006).

Figura 17 - Diagrama esquemático dos regimes de configurações do PEG revestindo a bicamada lipídica



Fonte: Adaptado de IMMORDINO et al., 2006.

Várias especulações têm sido feitas a respeito do real mecanismo pelo qual esses nanocarreadores revestidos por esse polímero prolongam seu tempo na circulação. Uma das hipóteses amplamente defendida é que a presença do PEG pode reduzir ou prevenir a adsorção protéica e consequentemente a rápida retirada da corrente sanguínea pelo MPS (sistema mononuclear fagocítico) (NEEDHAM e KIM, 2000). Outros grupos tem sugerido a idéia de “disopsonização”, fenômeno onde o PEG promove ligação com certas proteínas que agem recobrando a vesícula e “mascarando-a” do sistema MPS (VERT e DOMURADO, 2000). Essas proteínas podem modular a taxa de captura do lipossoma e reduzir a quantidade de opsonina ligada, protegendo da fagocitose e aumentando o tempo de permanência na corrente sanguínea (PARK e HUANG, 1993; MOGHIMI e SZEBENI, 2003; NOGUEIRA et al., 2013).

A incorporação do lipídio peguilado na bicamada lipídica confere a estas vesículas algumas características especiais. NOGUEIRA e COLABORADORES (2013) mostraram que o padrão de distribuição de tamanho de lipossomas tem sido influenciado pelo DSPE-mPEG, pois em sua presença, os lipossomas apresentam a tendência de serem menores (NOGUEIRA et al., 2013). A repulsão eletrostática entre lipossomas com DSPE-mPEG pode reduzir a agregação dos lipossomas depois da extrusão, técnica bastante utilizada para diminuir o tamanho das vesículas, resultando em menores faixas de tamanho (BIHARI et al., 2008).

Um dos grandes sucessos do uso de lipossomas peguilados foi o DOXIL[®] contendo doxorubicina aprovada nos Estados Unidos e Europa para o tratamento do sarcoma de Kaposi's (KROWN et al., 2004) e câncer ovariano recorrente (ROSE, 2005), além de continuar a ser testado para outros tipos de câncer (HUSSEIN e ANDERSON, 2004; ROBERT et al., 2004; HAU et al., 2004; IMMORDINO et al., 2006). Desde então, grandes estudos utilizando os nanossistemas revestidos com esse polímero tem sido constantemente realizados.

2.3.2 Métodos de preparação de lipossomas

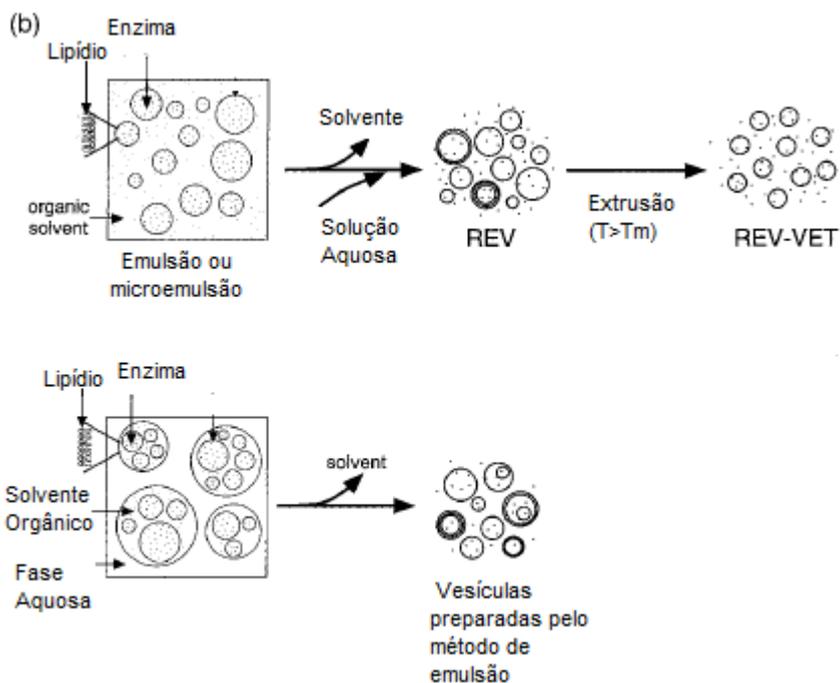
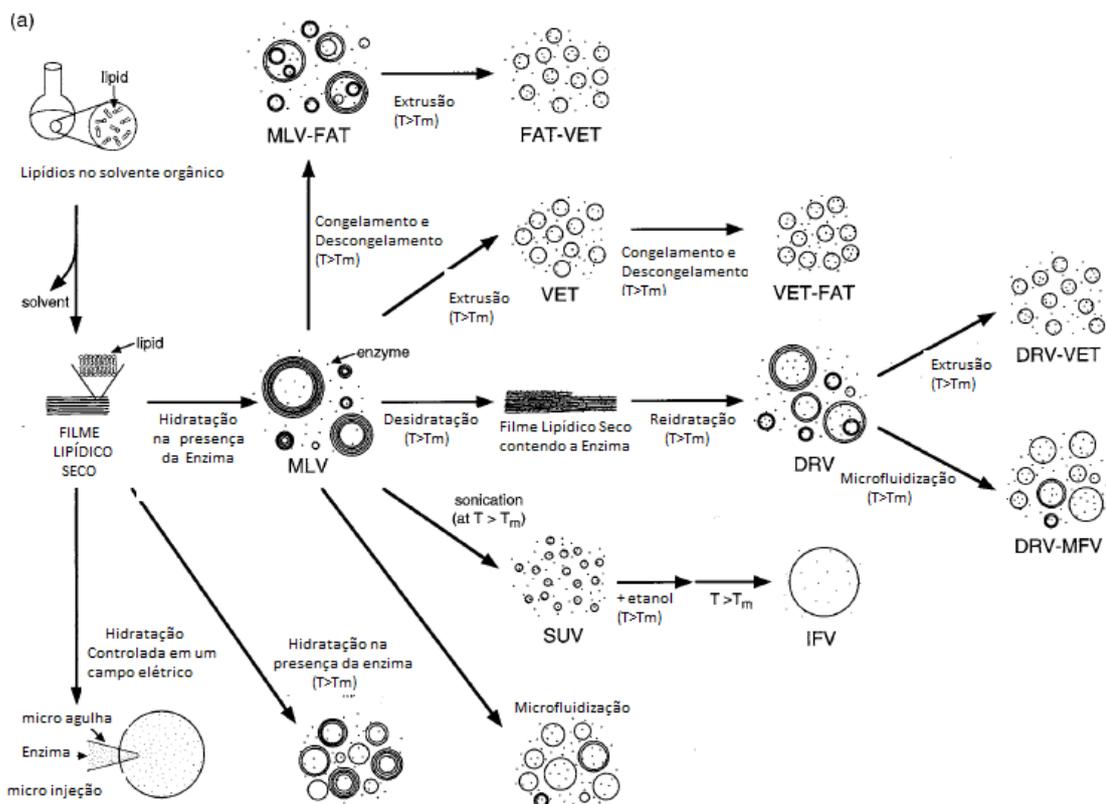
Existem muitos métodos para a formação de lipossomas, alguns desses amplamente usados para a encapsulação de proteínas. A maioria desses métodos consiste na formação do filme lipídico e posterior dispersão deste filme em meio aquoso (MOZAFARI e MORTAZAVI, 2005).

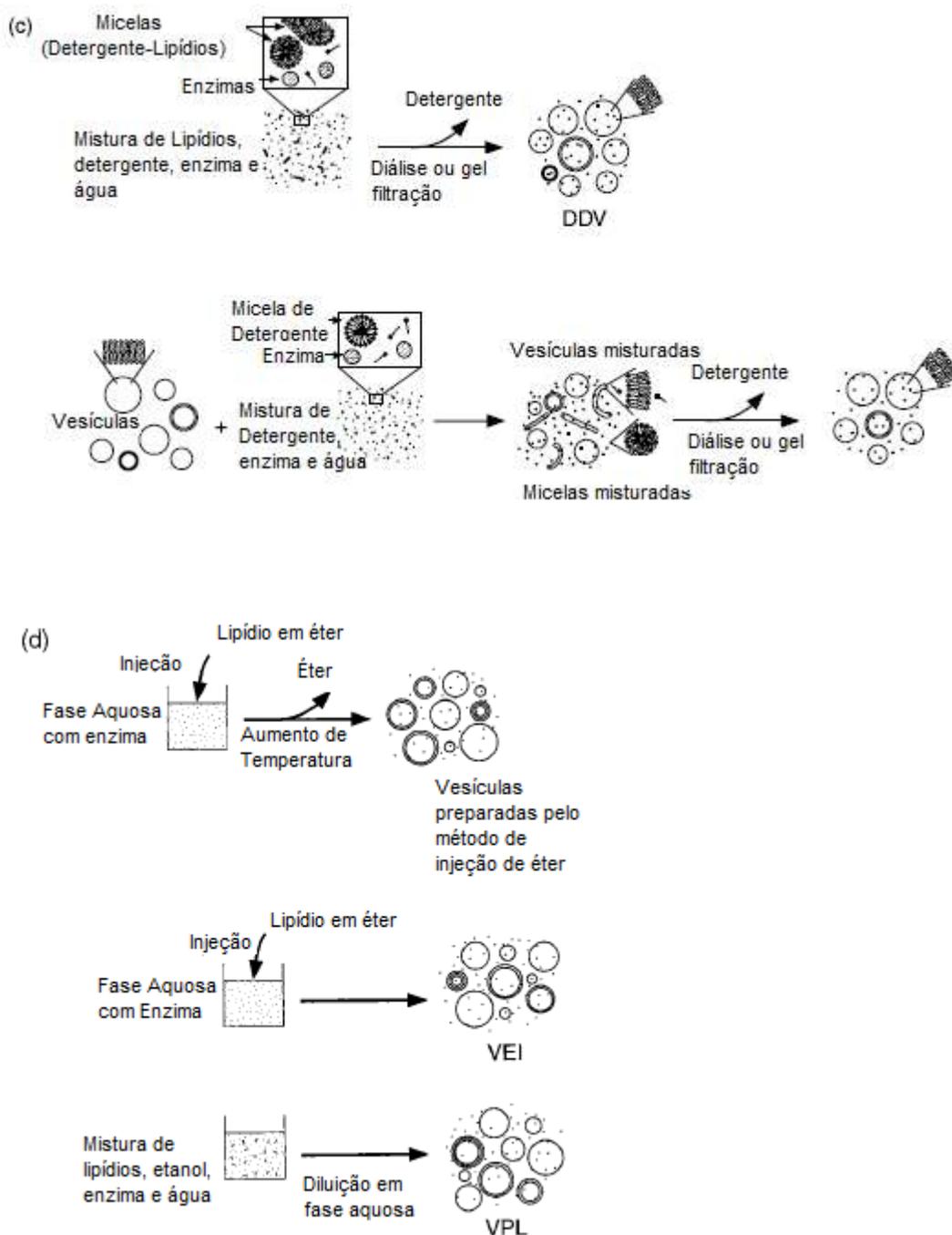
O método de hidratação do filme lipídico gera vesículas multilamelares grandes (MLV) que podem ser submetidas à diversas técnicas para aumentar a taxa de encapsulação e posterior adequação de características como tamanho e índice de polidispersão. Algumas técnicas como o congelamento e descongelamento (FAT) e hidratação e reidratação (DRV) são amplamente escolhidas para encapsular moléculas hidrofílicas. Outras metodologias envolvem o uso de emulsões (microemulsões) como a evaporação em fase reversa (REV) onde um solvente imiscível é colocado em água como sistema inicial. Alguns envolvem o uso de detergentes para formação de micelas como o método de diálise por detergente (DDV). Outros são baseados na mistura de uma fase não aquosa com lipídios e solução aquosa (VEI) (figura 18) (WALDE e ICHIKAWA, 2001).

O método de hidratação e reidratação (DRV) seguido da técnica de extrusão proporciona altas eficiências de encapsulação para moléculas hidrofílicas e evita o uso de solventes orgânicos durante o procedimento de encapsulação. Este método produz vesículas relativamente monodispersas e com um alto grau de unilamellaridade (WALDE e ICHIKAWA, 2001). ZADI e GREGORIADIS (2000) reportaram uma alta eficiência de encapsulação de solutos hidrofílicos em pequenos lipossomas pelo método de hidratação e reidratação.

Outra técnica bastante utilizada para encapsulação de moléculas hidrofílicas, consiste no congelamento e descongelamento da formulação. Nessa metodologia, os MLV's são submetidos a repetidos ciclos rápidos de congelamento, geralmente em nitrogênio líquido (-196°C) e ciclos de descongelamento na temperatura de transição de fase dos lipídios. Esses ciclos refletem na quebra das lamelas devido a formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento (SRIWONGSITANONT e UENO, 2011). Durante o processo de descongelamento, a água proporciona um meio que permite a difusão passiva da molécula hidrofílica devido ao gradiente de concentração através da bicamada (XU et al., 2012). Entretanto, durante os ciclos de congelamento e descongelamento muitas proteínas são desnaturadas (COLLETIER et al., 2002). Desta forma, um estudo prévio avaliando a estabilidade da macromolécula é necessário.

Figura 18 - Resumo esquemático dos métodos que podem ser usados para a preparação de lipossomas contendo enzimas: (a) métodos que basicamente começam do filme lipídico seco; (b) métodos que usam emulsões (microemulsões) contendo água e solvente imiscível no sistema inicial; (c) métodos que envolvem o uso de detergente na formação de micelas; (d) métodos que são baseados na mistura de uma solução lipídica não aquosa com solução aquosa





Fonte: Adaptado de WALDE e ICHIKAWA, 2001.

XU e colaboradores em 2012 conseguiram encapsular cerca de 50% da enzima superóxido dismutase (SOD) em vesículas unilamelares com cerca de 150 nm utilizando apenas dois ciclos de congelamento e descongelamento, mantendo constante a atividade desta enzima. COLLETIER e colaboradores em 2002 também mostraram haver um aumento da eficiência de encapsulação da enzima acetilcolinesterase recombinante em lipossomas de acordo com o aumento do número de ciclos de congelamento e descongelamento. Sendo

assim, a hidratação do filme lipídico seguida de ciclos de congelamento e descongelamento foi a metodologia utilizada para a elaboração dos lipossomas furtivos encapsulando rCramoll.

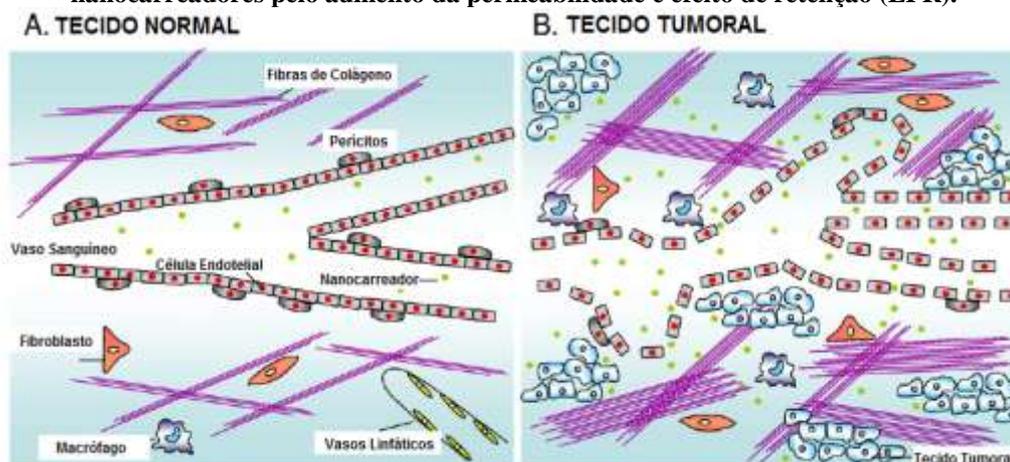
2.3.3 Lipossomas na terapia do câncer

Lipossomas têm sido o candidato de maior sucesso para aplicações como no tratamento de infecções, doenças no pulmão, da pele, elaboração de vacinas, entrega medicinal de genes, e terapia do câncer. Muitos dos sistemas de entrega controlada, aprovados pelo órgão governamental dos Estados Unidos de administração de alimentos e fármacos (FDA) são lipossomas ou baseados em lipídios. Desde o primeiro sistema de entrega de fármacos aprovado pela FDA, anfotericina B lipossomal, em 1990, alguns sistemas de entrega de fármacos estão disponíveis comercialmente para tratar diversas doenças que vão desde a infecção fúngica ao câncer (ALLEN e CULLIS, 2004; ZHANG et al.,2013).

Lipossomas modificados com ligantes na superfície interagem com receptores celulares específicos podendo resultar na internalização do carreador e intracelularmente liberar o fármaco (GABIZON, 2006). Propriedades físico-químicas dos nanossistemas, tamanho, carga e hidrofiliicidade de sua superfície também afetam a entrega da molécula carregada para o tumor (AU et al., 2002; JANG et al., 2003; WANG et al.,2010; LI et al., 2012).

Mesmo sem o direcionamento específico, nanossistemas tem mostrado habilidade para se acumularem passivamente nos sítios com aumento da permeabilidade vascular, quando sua faixa de diâmetro é menor que 200 nm (ALLEN e. CULLIS, 2013). Isso se deve a morfologia diferenciada dos vasos que permeiam o tumor. A angiogênese induzida pelas células tumorais gera vasos com maior permeabilidade, além disso, a drenagem deficiente do sistema linfático nesse local gera um aumento da retenção, fenômeno conhecido como efeito de aumento de permeabilidade e retenção (EPR), figura 19, (TORCHILIN, 2011).

Figura 19 - Diferenças entre o tecido normal (A) e tumoral (B) e a acumulação passiva dos nanocarreadores pelo aumento da permeabilidade e efeito de retenção (EPR).



Fonte: Adaptado de DANHIER et al., 2010.

O efeito EPR, é uma das vias mais utilizadas pelos nanossistemas na terapia do câncer, visto que eles podem entrar e se acumular passivamente (IMMORDINO et al., 2006) no local do tumor devido a esse perfil diferencial de vasos expressos no microambiente tumoral. Uma grande vantagem no encapsulamento de fármacos anticâncer é o fato de que moléculas menores que 4 nm podem atingir o interstício tumoral, mas podem retornar a circulação sanguínea e serem reabsorvidas, enquanto que para nanopartículas esse processo encontra barreiras devido ao grande raio hidrodinâmico o que favorece o acúmulo dessas nanoestruturas no interstício tumoral (BERTRAND et al., 2013).

PARK e colaboradores (2002) mostraram a eficácia substancial no tratamento de câncer de mama e de ovário de lipossomas furtivos contendo doxorubicina assim como na monoterapia e em combinação com outros fármacos quimioterápicos. Um aumento da deposição de doxorubicina encapsulada em lipossomas furtivos (PLD- Doxil®) em células tumorais, promoveu um maior efeito antitumoral de Doxil® quando administrado em doses menores que o fármaco livre (GABIZON et al., 2002).

A encapsulação de prednisolona fosfato em lipossomas furtivos proporcionou uma inibição do crescimento tumoral máximo de 80-90% com apenas uma única dose de 20 mg/kg enquanto que sua forma livre não teve atividade mesmo quando aplicado uma dose de 50mg/kg (SCHIFFELERS et al., 2006).

Em 2013, LAPENDA e colaboradores mostraram que a atividade antitumoral de *trans-desidroacetonina* (t-DCTN) em lipossomas aumentou em duas vezes seu potencial, além disso, a formulação lipossomal reduziu a hepatotoxicidade do fármaco e nenhuma

toxicidade hematológica significativa foi observada nos animais com sarcoma 180. Mostrando que o desenvolvimento de formulações lipossomais contendo esse fármaco é um importante avanço para seu uso na terapia.

Outro importante estudo foi realizado com uma série de novos agentes anticâncer sintetizados com o propósito de serem fármacos mais efetivos e menos tóxicos como os derivados de acridina a exemplo o LPSF/AC04 (5Z)-[5-acridin-9-ylmethylene-3-(4-methylbenzyl)-thiazolidine-2,4-dione], entretanto, eles tem seu uso limitado devido sua baixa solubilidade em soluções aquosas o que motivou sua incorporação em complexos de inclusão em lipossomas. Esse estudo mostrou um significativo aumento da atividade antiproliferativa do fármaco em linhagens celulares graças a sua incorporação em lipossomas (MENDONÇA et al., 2012).

Desde a aprovação dos primeiros lipossomas furtivos voltados para o tratamento do câncer, DOXIL[®] (ZHANG Y, 2008) a nanomedicina tem sido amplamente utilizada para carrear moléculas citotóxicas voltadas para o câncer, e tem por objetivos providenciar o aumento da solubilidade do quimioterápico, controlar a taxa de liberação, reduzir dos efeitos colaterais e diminuir a exposição desses agentes citotóxicos às células sadias (BLANCO et al., 2011; VENDITTO e SZOKA, 2013).

2.3.4 Proteínas encapsuladas em lipossomas

A busca para o tratamento de muitas doenças vive uma nova era, agentes terapêuticos baseados em proteínas e peptídeos têm sido produzidos por processos biotecnológicos e aprovados pelos principais órgãos regulamentadores para uso terapêutico. A eficiência e entrega segura de proteínas terapêuticas é a chave para o sucesso comercial. Embora métodos de entrega de proteínas tenham sido desenvolvidos, existem muitos obstáculos remanescentes (CLELAND e DAUGHERT, 2001), como a rápida eliminação e distribuição do fármaco em tecidos ou órgãos não desejados, o que aumenta a necessidade de doses frequentes. Uma alternativa viável para transpor estes problemas tem sido o uso de lipossomas (TORCHILIN, 2011). Esse nanossistema também tem atraído olhares para entrega de macromoléculas, permitindo biocompatibilidade, diminuição dos efeitos colaterais, e proteção contra os fluídos biológicos que poderiam afetar a estabilidade das proteínas (GUPTA e SHARMA, 2009).

As proteínas são macromoléculas cujo seu peso molecular é geralmente maior que os observados em produtos farmacêuticos (GUPTA e SHARMA, 2009), além disso, proteínas hidrofílicas apresentam uma baixa eficiência de encapsulação, especialmente em vesículas de (50~150 nm) devido, principalmente, ao baixo volume interno do lipossoma, tornando-se um desafio o desenvolvimento desses nanossistemas carreadores de macromoléculas (XU et al., 2012).

Uma etapa crucial para o desenvolvimento dos nanossistemas é a seleção da metodologia para encapsular proteínas hidrofílicas. Há grandes desafios a serem superados, dentre estes, a baixa eficiência de encapsulação e o cuidado com a estabilidade da proteína durante a preparação, especialmente se as condições do processo são agressivas para a proteína ou envolve solventes orgânicos (XU et al., 2012).

Novos métodos para entrega de proteínas e peptídeos em sistemas lipossomais incluem o revestimento dessas nanoestruturas, na superfície, com polímeros hidrofílicos como o PEG, com o objetivo de reduzir a imunogenicidade e aumentar o tempo de circulação das vesículas (GABIZON et al., 1994; FRKANEC et al., 2003; ARULSUDAR et al., 2004; BADIEE et al., 2007; CHANG et al., 2011). A peguilação das nanopartículas tem contribuído significativamente para uma melhora na biodisponibilidade e minimização dos efeitos colaterais (WANG et al., 2012). Por exemplo, a encapsulação da enzima ativadora de plasminogênio tecidual em lipossoma convencional prolongou o tempo de meia vida desta proteína 16 vezes e o lipossoma peguilado 21 vezes quando comparados com a proteína em sua forma livre, evidenciando o efeito do polímero na superfície para longevidade dos lipossomas (KIM et al., 2009).

ANDRADE e colaboradores em 2004, demonstraram que a lectina Cramoll 1,4 apresentou cerca de 43% de inibição do crescimento do sarcoma 180 em camundongos, enquanto sua forma encapsulada em lipossomas carregados positivamente teve 71% de inibição de crescimento do tumor. Isso incentivou o nosso estudo com a nova proteína recombinante (rCramoll), com o objetivo de avaliar se o seu potencial antitumoral seria intensificado quando encapsulada em lipossomas furtivos frente a este mesmo tumor.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* da lectina recombinante (rCramoll) livre e encapsulada em lipossomas furtivos frente a sarcoma 180.

3.2 Específicos

- ✓ Obter a lectina recombinante de *Cratylia mollis* (rCramoll) por meio da expressão heteróloga em *Escherichia coli*;
- ✓ Avaliar a estabilidade de rCramoll após exposição a ultrassom, agitação mecânica e ciclos de congelamento (-196°C) e descongelamento (35°C);
- ✓ Formular lipossomas furtivos pela técnica de congelamento e descongelamento com tamanho, PDI e pH adequados para a atividade antitumoral *in vivo* ;
- ✓ Caracterizar físico-quimicamente as formulações lipossomais contendo rCramoll;
- ✓ Avaliar *in vivo* a atividade antitumoral de rCramoll livre e encapsulada em lipossoma furtivos frente ao sarcoma 180;
- ✓ Analisar histopatologicamente os tumores e órgãos (fígado, baço e rins) dos grupos experimentais;
- ✓ Avaliar parâmetros hematológicos e bioquímicos dos grupos experimentais;
- ✓ Verificar a influência da lectina livre e encapsulada nos níveis da enzima glutationala peroxidase no sangue dos animais tratados.

4 REFERÊNCIAS

AAGAARD, L.; ROSSI, J.J. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 59 75–86, 2007.

ABEYLATH, S.C.; GANTA, S.; IYER, A.K.; AMIJI, M. Combinatorial-designed multifunctional polymeric nanosystems for tumor-targeted therapeutic delivery. **Acc. Chem. Res.** 44, 1009–1017, 2011.

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2007.

AGRAWAL, A.K.; GUPTA, C.M. Tuftsin-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 41:135–46, 2000.

ALLEN, T.M.; CHONN, A. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. **FEBS Letters**. 23(1) 42-46, 1987.

ALLEN, T.M.; CULLIS, P.R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**. 19;303(5665):1818-22. Mar 2004.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 65:36–48, 2013.

ANDRADE, C.A.S.;CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHAES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **Int J Pharma**. 278(2): 435–445, 2004.

ARAÚJO, S.N.; MATRANGOLO, W.J.R.; MIRANDA, G.A.; NETTO, D.A.M.; DA SILVA, I.H.S. Análises das sementes de *Cratylia argentea*: cultura potencial para adubação verde e forragem/ Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo,.18 p. : il. -- (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo**, ISSN 1679-0154; 36), 2011.

ARULSUDAR, N.; SUBRAMANIAN, N.; MISHRA, P.; CHUTTANI, K.; SHARMA, R.K.; MURTHY, R.S.R. Preparation, characterization, and biodistribution study of technetium-99m-labeled leuprolide acetate-loaded liposomes in Ehrlich ascitestumor-bearing mice. **AAPS J. Pharm. Sci.** 6, 45–56, 2004.

AU, J.L.S.; JANG, S.H.; WIENTJES, M.G. Clinical aspects of drug delivery to tumors. **Journal of Controlled Release**. 78:81–95, 2002.

BADIEE, A.; JAAFARI, M.R.; KHAMESIPOUR, A.; *Leishmania major*: Immune response in BALB/c mice immunized with stress-inducible protein 1 encapsulated in liposomes. **Exp Parasitol**. 115:127–34, 2007.

BANDYOPADHYAY, S.; ROY, A.; DAS, S. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopter a pests is correlated to its insecticidal activity. **Plant Science**.v. 161, p. 1025 -1033, 2001.

BARCELLOS-HOFF, M.H.; LYDEN, D.; WANG, T.C. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. **Nat Rev Cancer**. 513:511–18. 2013.

BASU, M.K.; LALA, S. Macrophage specific drug delivery in experimental leishmaniasis. **Current Molecular Medicine**. 4(6): 681-689, 2004.

BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Jornal Brasileiro de Ciências Farmacêuticas**. 43(2) 167-179, 2007.

BELTRÃO, E.I.C.; CORREIA, M.T.S.; FIQUEREDO, J.S.; COELHO, L.C.B.B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.74, p. 125–134, 1998.

BERTRAND, N.; WU, JUN.; XU, X.; KAMALY, N.; FAROKHZAD, O.C. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology, **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2013.

BERX, G.; VAN ROY, F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol**. 1, 003129, 2009.

BEZERRA, W.M.; CARVALHO, C.P.; MOREIRA, R.A.; GRANGEIRO, T.B. Establishment of a heterologous system for the expression of *Canavalia brasiliensis* lectin: a model for the study of protein splicing. **Genet. Mol. Res**. 5, 216–223, 2006.

BHOWMICK, N.A.; NEILSON, E.G.; MOSES, H.L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**. 432, 332–337, 2004.

BIHARI, P.M.; VIPPOLA, S.; SCHULTES, M.; PRAETNER, A.; KHANDOGA, C.; REICHEL, C.; COESTER, T.; TUOMI, M. R.; KROMBACH, F. **Part. Fibre. Toxicol**. 2008.

BLANCO, E.; HSIAO, A.; MANN, A.P.; LANDRY, M.G.; MERIC-BERNSTAM, F.; FERRARI, M. Nanomedicine in cancer therapy: innovative trends and prospects, **Cancer Sci**. 102 1247–1252, 2011.

BOXER, L.M.; DANG, C.V. Translocations involvingvc-myc and c-myc function. **Oncogen**. 20, 5595–5610, 2001.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**. 119, p419, 1954.

BRAGA, A.B. Potenciais fungicida e inseticida de proteínas presentes em sementes de *Dioclea megacarpa* Rolfe. **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará**, 2009.

BRETTAUER, R.K.; CASTELLINO, F.J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. **30**, (193–200), 1999.

BUCCHI, D.F. Efeitos do medicamento homeopático. Método Canova em camundongos normais e portadores do tumor Sarcoma 180. **Dissertação** (mestrado em Biologia Celular) Universidade Federal do Paraná. 132 p. Curitiba, 2002.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Nat Prod Rep**. Jun;25(3):475-516, 2008.

CAO, Y.; DEPINHO, R.A.; ERNST, M.; VOUSDEN, K. Cancer research: past, present and future. **Nat Rev Cancer**. Sep 15;11(10):749-54, 2011.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**. 15;438(7070):932-6, Dec 2005.

CARVALHO-JÚNIOR, A.D.; VIEIRA, F.P.; MELO, V.J.M.; LOPES, M.T.P.; SILVEIRA, J.N.; RAMALDES, G.A.; GARNIER-SUILLEROT, A.; PEREIRA-MAIA E.C.; OLIVEIRA, M.C. Preparation and cytotoxicity of cisplatin loaded liposomes. **Jornal Brasileiro de Pesquisa Médica e Biológica**. 40 (8) 1149-1157, 2007.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nat. Rev. Cancer**. 4, 118–132, 2004.

CHANG, W.K.; TAI, Y.J.; CHIANG, C.H.; HU, C.S.; HONG, P.D.; YEH, M.K. The comparison of protein-entrapped liposomes and lipoparticles: preparation, characterization, and efficacy of cellular uptake. **Int. J. Nanomed**. 6, 2403–2417, 2011.

CHEN, C.J.; KONO, H.; GOLENBOCK, D.; REED, G.; AKIRA, S.; ROCK, K.L. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. **Nat Med**. 13(7):851-6. 2007.

CHEN, J.; LIU, B.; JI, N.; ZHOU, J.; BIAN, H.J.; LI, C.Y. A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. **Phytomedicine**, 16:352–60, 2009.

CHENG, N.; CHYTIL, A.; SHYR, Y.; JOLY, A.; MOSES, H.L. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Mol. Cancer Res**. 6, 1521–1533. 2008.

CHOI, S.H.; LYU, S.Y.; PARK, W.B. Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of Akt, **Arch. Pharm. Res**. 27, 68–76, 2004.

CHOU, F.C.; SHIEH, S.J.; SYTWU, H.K. Attenuation of Th1 response through galectin-9 and T-cell Ig mucin 3 interaction inhibits autoimmune diabetes in NOD mice. **Eur J Immunol**. 39:2403–11, 2009.

CLELAND, J.L.; DAUGHERTY, A.; MRSNY, R. Emerging protein delivery methods **Curr Opin Biotechnol**. Apr;12(2):212-9., 2001.

COFFELT, S.B.; LEWIS, C.E.; NALDINI, L.; BROWN, J.M.; FERRARA, N.; DE PALMA, M. Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors. **Am. J. Pathol.** 176, 1564–1576, 2010.

COLLETIER, J.P.; CHAIZE, B.; MATHIAS, W.; FOURNIER, D. Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. **Journal: BMC Biotechnology.** Vol. 2, 2002.

CONDEELIS, J.; POLLARD, J.W. Macrophages: obligate 6. partners for tumour cell migration, invasion and metastasis. **Cell.**124:263-6, 2006.

CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Purification of glucose / manose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Appl Biochem Biotechnol.** 55:261–73, 1995.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. R. Patologia Estrutural e Funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan.** p. 233-293, 2000.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature.** 420:860-7, 2002.

CURTO, M.; COLE, B.K.; LALLEMAND, D.; LIU, C.H.; MCCLATCHEY, A.I. Contact dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. **J. Cell Biol.** 177, 893–903, 2007.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release.** 148, 135–146, 2010.

DAVID, A.R.; ZIMMERMAN, M.R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? **Nature Reviews-Cancer.** Vol 10, 2010.

DE GENNES, P.G. Conformations of polymers attached to an interface. **Macromolecules.** 13:1069–75, 1980.

DE MEJÍA, E.G.; PRISECARU, V.I. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. **Crit Rev Food Sci Nutr.** 45:425–45, 2005.

DE PALMA, M.; MURDOCH, C.; VENNERI, M.A.; NALDINI, L.; LEWIS, C.E. Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. **Trends Immunol.** 28, 519–524, 2007.

DE STANCHINA, E.; MCCURRACH, M.E.; ZINDY, F.; SHIEH, S.Y.; FERBEYRE, G.; SAMUELSON, A.V.; PRIVES C.; ROUSSEL M.F.; SHERR C.J.; LOWE, S.W. E1A signaling to p53 involves the p19ARF tumor suppressor. **Genes & Dev.** 12:2434–2442, 1998.

DEBATIN, K.M.; KRAMMER, P.H. Death receptors in chemotherapy and cancer. **Oncogene.** 23, 2950–2966, 2004.

DENARDO, D.G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L.M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. **Cancer Metastasis Rev.** 29, 309–316, 2010.

DESOIZE, B.; JARDILLIER, J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** 36 193–207, 2000.

DONEHOWER, L.A.; HARVEY, M.; SLAGLE, B.L.; MCARTHUR, M.J.; MONTGOMERY, C.A.J.; BUTEL, J.S.; BRADLEY, A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature.** 19;356(6366):215-21, 1992.

DONNENBERG, V.S.; DONNENBERG, A.D. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis, **J. Clin. Pharmacol.** 45 872–877, 2005.

DONNER, P.; GREISER-WILKE, I.; MOELLING, K. Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene product of avian myelocytomatosis virus. **Nature.** 296, 262–269, 1982.

DOS SANTOS, N.; ALLEN, C.; DOPPEN, A.M.; ANANTHA, M.; COX, K.; GALLAGHER, R.C.; KARLSSON, G.; EDWARDS, K.; KENNER, G.; SAMUELS L.; WEBB, M.S.; BALLY, M.B. Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: Relating plasma circulation lifetimes to protein binding. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes.** 1768:1367–1377, 2007.

DOYLE, J.J.; LUCKOW, M.S. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology.** 131:900-910, 2003.

DREHER, M.R.; LIU, W.; MICHELICH, C.R.; DEWHIRST, M.W.; YUAN, F.; CHILKOTI, A. Tumorvascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers, *J. Natl. Cancer Inst.* 98 335–344, 2006.

DUNN, G.P.; OLD, L.J.; SCHREIBER, R.D. The three Es of cancer 9. **immunoediting. Annu Rev Immunol.** 22:329-60, 2004.

DVORAK, H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **N Engl J Med.** Dec 25; 315(26):1650-9, 1986.

EGEBLAD, M.; NAKASONE, E.S.; WERB, Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organs. **Dev. Cell.**18, 884–901, 2010.

EISCHEN, C.M.; WEBER, J.D.; ROUSSEL, M.F.; SHERR, C.J.; CLEVELAND, J.L. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. **Genes Dev.** 15;13(20):2658-69, 1999.

FACCHINI, J.M. Atividade Antitumoral de frações polissacarídicas de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 sobre tumor ascítico de Ehrlich e Sarcoma 180. **Dissertação** (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) Universidade da Região de Joinville. 93 p. JOINVILLE, 2011.

FAROKHZAD O.C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS Nano.** 3 16–20, 2009.

FERNANDES, M.P.; INADA, N.M.; CHIARATTI, M.R.; ARAÚJO, F.F.B.; MEIRELLES, F.V.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; ALVES, M.J.M.; GADELHA, F.R.; VERCESI, A.E. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. **J Bioenerg Biomembr.** Feb;42(1):69-78. doi: 10.1007/s10863-010-9268-9. Epub Feb 13, 2010.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor. **Arterioscler. Thromb.Vasc. Biol.** 29, 789–791, 2009.

FERREIRA, H.; LÚCIO, M.; SIQUET, C.; REIS, S. Utilização de Modelos Membranares na Avaliação da Atividade de Fármacos. **Química.** 99, p. 39-50, 2005.

FRKANEC, R.; NOETHIG-LASLO, V.; VRANESIC, B.; MIROSAVLJEVIC, K.; TOMASIC, J. A spinlabelling study of immunomodulating peptidoglycan monomer and adamantyl-tripeptides entrapped into liposomes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1611,187–196, 2003.

FU, L.L.; ZHOU, C.C.; YAO, S.; YU J.Y.; LIU, B.O.; BAO, J. K. Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** 43 1442– 1449, 2011.

GABIZON, A.; CATANE, R.; UZIELY, B.; KAUFMAN. B.; SAFRA. T.; COHEN R.; MARTIN, F.; HUANG, A.; BARENHOLTZ, Y. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. **Cancer Res.** 54:987–992, 1994.

GABIZON, A.; TZEMACH, D.; MAK, L.; BRONSTEIN, M.; HOROWITZ, A.T. Dose dependency of pharmacokinetics and therapeutic efficacy of pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL) in murine models. **J. Drug Target.** 2002.

GABIZON, A.A.; SHMEEDA, H.; ZALIPSKY, S. Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting. **J Liposome Res.** 16(3):175-83, 2006.

GAO, Z.; ZHANG, L.; SUN, Y. Nanotechnology applied to overcome tumor drug resistance. **Journal of Controlled Release.** 162 45–55, 2012.

GEMEINER, P.; MISLOVIČOVÁ, D; TKÁČ, J.J.Š; PÄTOPRSTÝ, V.; HRABÁROVÁ, E.; KOGAN, G.; KOŽÁR, T. LECTINOMICS II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances.** 27 1–15, 2009.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; Oppenheimer, S.B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta histochemica.** 113 236–247, 2011.

GIANSANTI, V.; TORRIGLIA, A.; SCOVASSI, A.I. Conversation between apoptosis and autophagy: “Is it your turn or mine?” **Apoptosis,** 16:321–33, 2011.

GOICHEVA, V.; WANG, H.W.; GADEA, B.B.; SHREE, T.; HUNTER, K.E.; GARFALL, A.L.; ,BERMAN, T.; JOYCE, J.A. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. **Genes Dev.** 24, 241–255, 2010.

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

GREGORIADIS, G. Liposome Technology, **Third Ed. Informa**. New York, 2007.

GREISH, K.; FANG, J.; INUTSUKA, T.; NAGAMITSU, A.; MAEDA, H.; Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumour targeting. **Clin. Pharmacokinetics.** 42 1089–1105, 2003.

GULINO, P.M.; GRANTHAM, F.H.; SMITH, S.H; HAGGERTY, A.C. Modification of the acid-basic status of the internal milieu of tumors. **Journal of the National Cancer Institute.** 34(6) 857-869, 1967.

GUPTA, H.; SHARMA, A. Recent trends in protein and peptide drug delivery systems. **Asian J Pharm** [serial online] [cited 2013 Jul 13]. 3:69-75, 2009.

GUPTA, G.; SUROLIA, A.; SAMPATHKUMAR, S.G. Lectin Microarrays for Glycomic Analysis. **OMICS: A Journal of Integrative Biology.** August, 14(4): 419-436. doi:10.1089/omi.2009.0150, 2010.

GUTIERREZ, C.; SCHIFF, R. HER2 Biology, Detection, and Clinical Implications **Arch Pathol Lab Med**—Vol 135, January 2011.

HANAHAAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell.** Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. 2011.

HANAHAAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell.** 86 353–364, 1996.

HARVEY, M.; VOGEL, H.; MORRIS, D.; BRADLEY, A.; BERNSTEIN, A.; DONEHOWER, L.A. A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. **Nat Genet.** 9(3):305-11, 1995.

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov Today.** 13: 894–901, 2008.

HAU, P.; FABEL, K.; BAUMGART, U.; et al. Pegylated liposomal doxorubicinefficacy in patients with recurrent high-grade glioma. **Cancer.**100:1199–207, 2004.

HERRE, J.; MARSHALL, A.S.; CARON, E.; EDWARDS, A.D.; WILLIAMS, D.L.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ, V.; REIS E SOUSA C.; GORDON, S.; BROWN G.D. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. **Blood.** 104:4038–4045, 2004.

HOLOHAN, C.; VAN SCHAEYBROECK, S.; LONGLEY, D.B.; JOHNSTON, P.G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nat Rev Cancer.** Oct;13(10):714-26. 2013.

HONDA, R.; YASUDA, H. Association of p19 (ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. **EMBO J.** 4;18(1):22-7. 1999.

HUSSEIN, M.A.; ANDERSON, K.C. Role of liposomal anthracyclines in the treatment of multiple myeloma. **Semin Oncol.** 31(Suppl 13):147–60, 2004.

HUWYLER, J.; DREWE, J.; KRÄHENBÜHL, S. Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs. **International Journal of Nanomedicine.** 2008; 3(1) 21–29, 1987.

IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **International Journal of Nanomedicine.** (3) 297–315, 2006.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA), Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Educação ; organização Luiz Claudio Santos Thuler . **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer /** . – 2. ed. rev. e atual.– Rio de Janeiro : Inca.129p, 2013.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA), Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Educação ; organização Luiz Claudio Santos Thuler . **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer /** . – 2. ed. rev. e atual.– Rio de Janeiro : Inca.129p, 2012.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA), Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Educação ; organização Luiz Claudio Santos Thuler . **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer /** . – 2. ed. rev. e atual.– Rio de Janeiro : Inca.129p, 2011.

ISSAEVA, N.; BOZKO, P.; ENGE, M.; PROTOPOPOVA, M.; VERHOEF, L.G.; MASUCCI, M.; PRAMANIK, A.; SELIVANOVA, G. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. **Nat Med.** 2004.

IWAKUMA, T.; LOZANO, G. Crippling p53 activities via knock-in mutations in mouse models. **Oncogene.** 2;26(15):2177-84. 2007.

IYER, A.K.; SINGH, A.; GANTA, S.; AMIJI, M.M. Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance, **Adv. Drug Deliv. Rev.** 2013.

IYER, A.K.; KHALED, G.; FANG, J.; MAEDA, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting, **Drug Discov.** 812–818, 2006.

JABR-MILANE, L.; VAN VLERKEN, L.; DEVALAPALLY, H.; SHENOY, D.; KOMAREDDY, S.; BHAVSAR, M.; AMIJI, M. Multi-functional nanocarriers for targeted delivery of drugs and genes, **J. Control. Release.** 130 121–128, 2008.

JAIN, N.K. Pharmaceutical Nanotechnology. **Pharmaceutical Technology.** 1-17, 2007.

JANG, S.H.; WIENTJES, M.G.; LU, D.; AU, J.L.S. Drug delivery and transport to solid tumors. **Pharmaceutical Research.**20:1337–1350, 2003.

KIM, J.Y.; KIM, J.K.; PARK, J.S.; BYUN, Y.; KIM, C.K. The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator. **Biomaterials**. 30 5751–5756, 2009.

JOHANSSON, M.; DENARDO, D.G.; COUSSENS, L.M. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. **Immunol. Rev.** 222, 145–154. 2008.

JOENSUU, H.; BONO, P.; KATAJA, V.; ALANKO, T.; KOKKO, R.; ASOLA, R.; UTRIAINEN, T.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T.; JYRKKIÖ, S.; MÖYKKYENEN, K.; HELLE, L.; INGALSUO, S.; PAJUNEN, M.; HUUSKO, M.; SALMINEN, T.; AUVINEN, P.; LEINONEN, H.; LEINONEN, M.; ISOLA, J.; KELLOKUMPU-LEHTINEN, P.L. fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide with either docetaxel or vinorelbine, with or without trastuzumab, as adjuvant treatments of breast cancer: final results of the FinHer Trial. **J Clin Oncol**. 27, 5685-9, 2009.

JOYCE, J.A.; POLLARD, J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat. Rev. Cancer**. 9, 239–252, 2009.

KAMIJO, T.; ZINDY, F.; ROUSSEL, M.F.; QUELLE, D.E.; DOWNING, J.R.; ASHMUN. R.A.; GROSVELD, G.; SHERR, C.J. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. **Cell**. 28;91(5):649-59, 1997.

KHAN, F.; AHMAD, A.; KHAN, M. I. Purification and characterization of a lectin from endophytic fungus *Fusarium solani* having complex sugar specificity. **Archives Biochemistry Biophysics**. 457, 243-251, 2007.

KIM, J.Y.; KIM, J.K.; PARK, J.S.; BYUN, Y.; KIM, C.K. The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator. **Biomaterials**. 30, 5751–5756, 2009.

KERRIGAN, A.M.; BROWN, G.D. C-type lectins and phagocytosis. **Immunobiol**. 214:562–75, 2009.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. **Cell**. 141, 52–67, 2010.

KROWN, S.E.; NORTHFELT, D.W.; OSOBA, D.; et al. Use of liposomal anthracyclines in Kaposi’s sarcoma. **Semin Oncol**. 31(Suppl 13):36–52, 2004.

KULKARNI, G.V.; MCCULLOCH, C.A. Concanavalin A induced apoptosis in fibroblasts: the role of cell surface carbohydrates in lectin mediated cytotoxicity. **J Cell Physiol**. 165:119–33, 1995.

KUMAR, K. K.; CHANDRA, K. L. P.; SUMANTHI, J.; REDDY, G. S.; SHEKAR, P.C.; REDDY, B.V.R. Biological role of lectins: A review. **Journal of Orofacial Sciences**. 20 Vol. 4, Issue 1, June, 2012.

LANDSTEINER, K. The Specificity of Serological Reactions. **3rd ed. Springfield**: Charles C Thomas, 1936.

LANE, D.P. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature**. 358, 15–16, 1992.

LAPENDA, T.L.; MORAIS, W.A.; ALMEIDA, F.J.; FERRAZ, M.S.; LIRA, M.C.; SANTOS, N.P.; MACIEL, M.A.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Encapsulation of trans dehydrocrotonin in liposomes: an enhancement of the antitumor activity. **J. Biomed Nanotechnol.** 9(3):499-510, 2013.

LAVIGUEUR, A.; MALTBY, V.; MOCK, D.; ROSSANT, J.; PAWSON, T.; BERNSTEIN, A. High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. **Mol Cell Biol.** 9(9): 3982–3991. 1989.

LEI, H.Y.; CHANG, C.P. Induction of autophagy by Concanavalin A and its application in anti-tumor therapy. **Autophagy.** 3:402–4, 2007.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the world: 1-577. **Royal Botanic Gardens, Kew.** 2005.

LI, C.Y.; MENG, L.; LIU, B.; BAO, J.K. Galanthus nivalis agglutinin (GNA)-related lectins: traditional proteins, burgeoning drugs. **Curr Chem Biol.** 3:324–33, 2009.

LI, C.Y.; XU, H.L.; LIU, B.; BAO, J.K. Concanavalin A, from an old protein to novel candidate anti-neoplastic drug. **Curr Mol Pharmacol.** 3:123–8, 2010.

LI, Y.; WANG, J.; WIENTJES, M.G.; AU, J.L. Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 64 29–39, 2012.

LIMA, V.L.M.; CORREIA, M.T.S.; CECHINEL, Y.M.N.; SAMPAIO, C.A.M.; OWEN, J.S.; COELHO, L.C.B.B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers.** 31, 27-32, 1997.

LIMA, A.L.R.; CAVALCANTI, C.C.B.; SILVA, M.C.C.; PAIVA, P.M.G. ; COELHO, L.C.B.B. ; BELTRÃO, E.I.C. ; CORREIA, M.T.S. Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with *Cratylia mollis* Seed Lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology.** p. 1-7, 2010.

LIU, B.; BIAN, H.J.; BAO, J.K. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Lett.** 287(1):1–12 2010.

LIU, B.; LI, C.Y.; BIAN, H.J.; MIN, M.W.; CHEN, L.F.; BAO, J.K. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Arch Biochem Biophys.** 482:1–6, 2009c.

LIU, B.; ZHANG, B.; MIN, M.W.; BIAN, H.J.; CHEN, L.F.; LIU, Q.; BAO, J.K. Induction of apoptosis by *Polygonatum odoratum* lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells. **Biochim Biophys Acta.** 1790(8):840–844, 2009d.

LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. **J. Pathol.** 205, 275–292, 2005.

LOPES DE MENEZES, D.E.; KIRCHMEIER, M.J.; GAGNE, J.F.; PILARSKI, L.M.; ALLEN, T. M. Cellular trafficking and cytotoxicity of anti-CD19-targeted liposomal doxorubicin in B lymphoma cells. **J Liposome Res.** 9:199–228, 1999.

LOPES, S.C.A.; GIUBERTI, C.S.; ROCHA, T.G.R.; FERREIRA, D. S.; LEITE, E.A.; OLIVEIRA, M.C. Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs, Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches, Prof. Letícia Rangel (Ed.), **ISBN: 978-953-51-1098-9**, InTech, DOI: 10.5772/55290, 2013.

LOWE, S.W.; SHERR, C.J. **Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles.** *Curr Opin Genet Dev.* 13(1):77-83. 2003.

LOWE, S.W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature.** 432, 307–315, 2004.

LUCKOW, L.; MILLER, J.T.; MURPHY, D.J.; LIVSHULTZ, T. A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. In: KLITGAARD, B.B.; BRUNEAU, A. (eds). **Advances in Legume Systematics 10, Higher Level Systematics.** London: Royal Botanic Gardens, Kew. p. 197-220, 2003.

MAC GABHANN, F.; POPEL, A.S. Systems biology of vascular endothelial growth factors. **Microcirculation.** 15, 715–738, 2008.

MACIEL, E.V.M.; ARAÚJO-FILHO, V.S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y.M.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S. Mitogenic activity of Cratylia mollis lectin on human lymphocytes. **Biologicals.** Mar; 32(1):57-60, 2004.

MAEDA, H.; WU, J.; SAWA, T.; MATSUMURA, Y.; HORI, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **J. control release.** Mar 1;65(1-2):271-84, 2000.

MAEDA, H.; SAWA, T.; KONNO, T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS, **J. Control. Release.** 74 47–61, 2001.

MAKHLOF, A.; FUJIMOTO, S.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. In vitro and in vivo evaluation of WGA–carbopol modified liposomes as carriers for oral peptide delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** 77 216–224, 2011.

MARSH, D.; BARTUCCI, R.; SPORTELLI, L. Lipid membranes with grafted polymers: physicochemical aspects. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1615, 33– 59, 2003.

MARUYAMA, K.. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 63 161–169, 2011.

MEDINA, O.P.; ZHU, Y.; KAIREMO, K. Targeted liposomal drug delivery in cancer. **Curr Pharm Des.** 10:2981–9, 2004.

MEEK, D.W. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? **Nature Reviews Cancer**. 9, 714-723, 2009.

MELO, C.M.L.; PORTO, C.S.; MELO-JÚNIOR, M.R.; MENDES, C.M.; CAVALCANTI, C.C.B.; COELHO, L.C.B.B.; PORTO, A.L.F.; LEÃO, A.M.A.C.; CORREIA, M.T.S. Healing activity induced by Cramoll1,4 lectinin healthy and immune compromised mice. **Int. J. Pharm.** 2011.

MELO, C.M.L.; MELO, H.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B B.; DA SILVA, M. B.; PEREIRA, V.R.A. Mitogenic response and cytokine production induced by Cramoll 1,4 lectin in splenocytes of inoculated mice. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 73, p. 112-121, 2010a.

MELO, C.M.L.; CASTRO, M.C.A.B.; OLIVEIRA, A.P.; GOMES, F.O.S.; PEREIRA, V.R.A.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P. M.G. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **PTR. Phytotherapy Research**. v. 24, p. 1631-1636, 2010b.

MENDONÇA, E.A.M.; LIRA, M.C.B.; RABELLO, M.M.; CAVALCANTI, I.M.F.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; CARMO, A.; LIMA, M.; PITTA, M.G.R.; HERNANDES, M.Z.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Enhanced Antiproliferative Activity of the New Anticancer Candidate LPSF/AC04 in Cyclodextrin Inclusion Complexes Encapsulated into Liposomes. **AAPS PharmSciTech**. v. 13, p. 1355-1366, 2012.

MENÉNDEZ, C.; HERNÁNDEZ, L.; PAÍS, J.M.; BANGUELA, A.; RAMÍREZ, R.; TRUJILLO, L.E.; et al. Identification and recombinant expression of a bacterial exolevanase useful for the production of high fructose syrups. **Biotecnologia Aplicada**. 22:68–72, 2005.

MEYER, N.; PENN, L. Z. Reflecting on 25 years with MYC. **Nature Reviews Cancer**. 8, 976-990, 2008.

MICHIELS, K.; VAN DAMME, E.J.M.; SMAGGHE, G. Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins? **Arch Insect Biochem. Physiol**. 73, 193–212, 2010.

MIN, W.; JONES, D.H. Stability and detection of recombinant pre-pro-concanavalin A after cytoplasmic expression in Escherichia coli, **FEBS Lett**. 301, 315–318, 1992

MINKO T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. **Adv Drug Deliv Rev**. 56:491–509, 2004.

MODY, R.; JOSHI, S.H.A.; CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. 33 (1), p1-10, 1995.

MOGHIMI, S. M.; SZEBENI, J.,_Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: Critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties **Prog. Lipid Res**. 463-478, 2003.

MOZAFARI, M.R.; MORTAZAVI, S.M. Nanoliposomes: from Fundamentals to Recent Developments. **Oxford, UK: Trafford Publishing Ltd**, 2005.

MOHAMED, M.M.; SLOANE, B.F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer*. Oct;6(10):764-75, 2006.

MUMM, J.B.; OFT, M. Cytokine-based transformation of 21. immune surveillance into tumor-promoting inflammation. **Oncogene**. 27:5913-9. 2008.

MURDOCH, C.; MUTHANA, M.; COFFELT, S.B.; ANDLEWIS, C.E. Theroleofmyeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nat. Rev. Cancer** 8, 618–631. 2008.

NARANG, A.S.; VARIA, S. Role of tumor vascular architecture in drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**. 2011 Jul 18;63(8):640-58. 2011.04.002. EpubApr 14, 2011.

NAU, M.M.; BROOKS, B.J.; BATTEY, J.; SAUSVILLE, E.; GAZDAR, A.F.; KIRSCH, I.R.; MCBRIDE, O.W.; BERTNESS, V.; HOLLIS, G.F.; MINNA, J.D. L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. **Nature**. 318, 69–73, 1985.

NEEDHAM, D.; KIM, D. H. Colloids Surf. B. **Biointerfaces**. 183-195, 2000.

NELSON, D.L.; COX, M.M. LEHNINGER. Principles of Biochemistry. **5th ed. W. H. Freeman: New York**. 1100p, 2008.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod**. 2007 Mar;70(3):461-77, 2007.

NIMRICHTER, L.; GARGIR, A.; GORTLER, M.; ALTSTOCK, R.T.; SHTEVI, A.; WEISSHAUS, O.; FIRE, E.; DOTAN, N.; SCHNAAR, R.L. . Intact cell adhesion to glycan microarrays. **Glycobiology**.14:197–203, 2004.

NOGUEIRA, E.; LOUREIRO, A.; NOGUEIRA, P.; FREITAS, J.; ALMEIDA, C.R.; HÄRMARK, J.; HEBERT, HANS.; MOREIRA, ALEXANDRA.; CARMO, A.M.; PRETO, A.; GOMES, A. CAVACO-PAULO, A.; Liposome and protein based stealth nanoparticles. **Faraday Discuss**, 2013.

OKADA, T.; LOPEZ-LAGO, M.; GIANCOTTI, F.G. Merlin/NF-2 mediates contact inhibition of growth by suppressing recruitment of Rac to the plasma membrane. **J. Cell Biol**. 171, 361–371, 2005.

OLIVEIRA, J.T.A.; RIOS, F.J. B.; VASCONCELOS, I. M.; FERREIRA, F. V. A.; NOJOSA, G. B. A.; MEDEIROS, D. A. *Cratylia argentea* seed lectin, a possible defensive protein against plantea ting organisms: effects on rat metabolism and gut histology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1737–1747, 2004.

OLIVEIRA, M.D.L.; NOGUEIRA, M.L.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; ANDRADE, C.A.S. Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on *Cratylia mollis* lectin affinity. **Sensors and Actuators**. 155 789–795, 2011b.

OLIVEIRA, M.D.L.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; DINIZ, F.B. Electrochemical evaluation of lectin-sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. **Colloids Surf B Biointerfaces**. Oct 1;66(1):13-9, 2008.

OLIVEIRA, P.S.S.; RÊGO, M.J.B.M.; SILVA, R.R.; CAVALCANTI, M.B.; GALDINO, S.L.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; PITTA, M.G.R. *Cratylia mollis* 1, 4 Lectin: A New Biotechnological Tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 Induction and Generation of Immunological Memory. **Biomed Research International**, 2013.

OLIVEIRA, M.D.L.; ANDRADE, C.A.S.;CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; SINGHC, P. R.; ZENG, X. IMPEDIMETRIC biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal of Colloid and Interface Science** 362, 194–201, 2011a.

OLIVEIRA-JÚNIOR, R.J.; CHESCHINI, J.J.; HUMANES, A.C.; MORELLI, S.; SILVEIRA-LACERDA, E.P. Caracterização citogenética de uma linhagem celular tumoral (Sarcoma 180) de *Mus musculus*. In: 51º Congresso Brasileiro de Genética, São Paulo. **Resumos do 51º Congresso Brasileiro de Genética** São Paulo, p. 1279, 2005.

OLSNES, S.; KOZLOV, J. V. Ricin. **Toxicon**. V. 39, p. 1713-1728, 2001.

ONUCHIC, A.C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev Med (São Paulo)**.-mar.;89(1):21-31. jan 2010.

PAI, S.I.; LIN, Y.Y.; MACAES, B.; MENESHIAN, A.; HUNG, C.F.; WU, T.C. Prospects of RNA interference therapy for cancer. **Gene Ther**. 13 464–477, 2006.

PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Purification and Partial Characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 36:113-8, 1992.

PAIVA, P.M.G.; SOUZA, A.F.; OLIVA, M.L.V.; KENNEDY, J.F.; CAVALCANTI, M.S.M.; COELHO, L.C.B.B, SAMPAIO, C.A. Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. **Bioresource Technology**. 88:75–9, 2003.

PALERMO, C.; JOYCE, J.A. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. **Trends Pharmacol. Sci**. 29, 22–28 2008.

PARK, J.W. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. **Breast Cancer Res**. 4:95–99, 2002.

PARK, Y. S.; HUANG, L. Lipids and Lipid Metabolism, **BBA**. 105-114, 1993.

PAYNE, G. S.; BISHOP, J. M.; VARMUS, H. E. Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. **Nature**. 295, 209–214, 1982.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia: conceitos e aplicações. v. II, 2ª ed. São Paulo: **Makron Books**. 517p., 1996.

PEREIRA, D.S.T.; LIMA-RIBEIRO, M.H.M.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; CAVALCANTI, C.L.B.; PONTES-FILHO, N.T.; COELHO, L.C.B.B.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; CORREIA, M.T.S. Topical Application Effect of the Isolectin Hydrogel (Cramoll 1,4) on Second-Degree Burns: **Experimental Model Journal of Biomedicine and Biotechnology**. Article ID 184538, 11 pages, 2012.

PICCART-GEBHAR, T. M.J.; PROCTER, M.; LEYLAND-JONES, B.; GOLDBIRSCHE, A.; UNTCH, M.; SMITH, I.; GIANNI, L.; BASELGA, J.; BELL, R.; JACKISCH, C.; CAMERON, D.; DOWSETT, M.; BARRIOS, C.H.; STEGER, G.; HUANG, C.S.; ANDERSSON, M.; INBAR, M.; LICHINITSER, M.; LÁNG, I.; NITZ, U.; IWATA, H.; THOMSEN, C.; LOHRISCH, C.; SUTER, T.M.; RÜSCHOFF, J.; SUTO, T.; GREATOREX, V.; WARD, C.; STRAEHLE, C.; MCFADDEN, E.; DOLCI, M.S.; GELBER, R.D. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**. Oct 20;353(16):1659-72, 2005.

PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; ABAR-SAGI, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. **Nature Reviews: Cancer**. VOLUME 11, 761-774 NOVEMBER, 2011.

QIAN, B.Z.; POLLARD, J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**. 141, 39–51, 2010.

QUELLE D.E.; ZINDY, F.; ASHMUN, R.A.; SHERR, C.J. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. **Cell**. 15;83(6):993-1000, 1995.

RABINOVICH, G.A.; TOSCANO, M.A.; JACKSON, S.S.; VASTA, G.R. Functions of cell surface galectin–glycoprotein lattices. **Curr Opin Struct Biol**. 17:513–20, 2007.

ROBERT, N.J.; VOGEL, C.L.; HENDERSON, I.C.; SPARANO, J.A.; MOORE, M.R.; SILVERMAN, P.; OVERMOYER, B.A.; SHAPIRO, C.L.; PARK, J.W.; COLBERN, G.T.; WINER, E.P.; GABIZON, A.A.; The role of the liposomal anthracyclines and other systemic therapies in the management of advanced breast cancer. **Semin Oncol**. 31(SUPPL 13):106–46, 2004.

ROLIM-SANTOS, H. M. L.; QUEIROZ, F. B.; MAIOR, R. M. S.; NASCIMENTO, S.C.; MAGALHAES, N. S. S. Cytotoxicity of doxorubicin-loaded Con A-liposomes. **Drug Development Research**, v. 67, p. 430-437, 2006.

ROMOND, E.H.; PEREZ, E.A.; BRYANT, J.; ET AL. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**. 353(16):1673–1684, 2005.

ROSE, P.G. Pegylated liposomal doxorubicin: optimizing the dosing schedule in ovarian cancer. **Oncologist**.10:205–14, 2005.

RUBINSTEIN, N.; ILARREGUI, J.M.; TOSCANO, M.A.; RABINOVICH, G.A. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. **Tissue Antigens** 64:1–12, 2004.

RUSEVA, M.; KOLEV, M.; DAGNAES-HANSEN, F.; HANSEN, S.B.; TAKAHASHI K.; EZEKOWITZ, A.; THIEL, S.; JENSENIUS, J.C.; GADJEVA, M.; Mannan-binding lectin deficiency modulates the humoral immune response dependent on the genetic environment. **Immunology**. 127:279–88, 2009.

SANTOS, A.C.O.; PEIXOTO, C.A.; COELHO, L.C.B.B. Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds. **Micron**.35(7):613-8, 2004.

SAPRA, P.; ALLEN, T.M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. **Prog Lipid Res**. 42:439–62, 2003.

SARAVANAN, C.; CAO, Z.; HEAD, S.; PANJWANI, N. Detection of differentially expressed wound healing-related glycogens in galectin-3-deficient mice. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 50:5690–6, 2009.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**. 9, 628–638, 2008.

SCHIFFELERS, R.M.; BANCIU, METSELAAR, J.M.; STORM, GERT. Therapeutic Application of Long-Circulating Liposomal Glucocorticoids in Auto-Immune Diseases and Cancer. **Journal of Liposome Research**, 16:185–194, 2006.

SCHMITT, C.A.; FRIDMAN, J.S.; YANG, M.; BARANOV, E.; HOFFMAN, R.M.; LOWE, S.W. Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. **Cancer Cell**. 1(3):289-98, 2002.

SCHMITT, C.A.; MCCURRACH, M.E.; DE STANCHINA, E.; WALLACE-BRODEUR, R.R.; LOWE, S.W. INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. **Genes Dev**. 15;13(20):2670-7, 1999.

SERRANO, M. The INK4a/ARF locus in murine tumorigenesis. **Carcinogenesis**. 21(5):865-9, 2000.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. 14:53R–62R, 2004.

SHELDON, P. S.; KEEN, J. N.; BOWLES, D. J. Post-translational peptide bond formation during concanavalin A processing in vitro. **Biochemical Journal**, v. 320, p.865-870, 1996.

SHERR, C.J. The INK4a/ARF network in tumour suppression. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2(10):731-7, 2001.

SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nature Reviews Cancer**. ;3(3):155-68, 2003.

SILVA, M.C.C.; SANTANA, L.A.; R.A. SILVA-LUCCAC, R.A.; LIMA, A. L.R.; FERREIRA, J.G.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; OLIVA, M.L.V.; ZINGALI, R. B.; CORREIA, M.T.S. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. **Process Biochemistry**. 46, 74–80, 2011.

SIMÕES, S.; MOREIRA, J.N.; FONSECA, C.; DÜZGÜNEŞ, N.; DE LIMA, M.C. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. **Advanced Drug Delivery Reviews**;56(7) 947-965, 2004.

SINGH, H.; SARATHI, S.P. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, Volume 3 , Issue 4, April - 1ISSN 2229-5518, 2012.

SLAMON, D.J.; CLARK, G.M.; WONG, S.G.; LEVIN, W.J.; ULLRICH, A.; MCGUIRE, W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**. 235(4785):177–182, 1987.

SLAMON, D.J.; GODOLPHIN, W.; JONES, L.A.; et al. Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**. 244(4905):707–712, 1989.

SOUZA, G.A.; OLIVEIRA, P.S.L.; TRAPANI, S.; SANTOS, A.C.O.; ROSA, J.C.; LAURE, H.J.; FACA, V.M.; CORREIA, M.T.S.; TAVARES, G.A.; OLIVA, G.; COELHO, L.C.B.B.; GREENE, L.J. "Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin." **Glycobiology**. 13:961-972, 2003.

SRIWONGSITANONT, S.; UENO, M. Effect of Freeze-Thawing Process on the Size and Lamellarity of PEG-Lipid Liposomes. **The Open Colloid Science Journal**. 4, 1-6, 2011.

STREICHER, H.; SHARON N. Recombinant plant lectins and their mutants. **Methods Enzymol**; 363:47–77, 2003.

SWANTON, C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. **Cancer Res**. 72, 4875–4882, 2012.

TAO, W.; LEVINE, A.J. P19 (ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 8;96(12):6937-41, 1999.

TAYLOR, R.C.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 9(3):231-41, 2008.

THASSU, D.; PATHAK Y.; DELEERS, M. Nanoparticulate drug-delivery systems: an overview, in. thassu d., pathak y., deleers M., **Nanoparticulate Drug Delivery Systems, Informa Healthcare**. USA, Inc. 1-31, 2007.

THIES, A.; NUGEL, D.; PFULLER, U.; MOLL, I.; SCHUMACHER, U. Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells in vitro. **Toxicology**. 207:105–16, 2005.

TORCHILIN, V.P. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 63 131–135, 2011.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Rev**. 4, 145–160, 2005.

TSURUO, T.; NAITO, M.; TOMIDA, A.; FUJITA, N.; MASHIMA, T.; SAKAMOTO, H.; HAGA, N., Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal, **Cancer Sci.** 94 15–21, 2003.

ULRICH, A.S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. **Bioscience Reports**;22(2) 129-150, 2002.

VAN DAMME, E.J.M.; LANNON, N.; PEUMANS, W.J. Plant lectins. **Adv. Bot. Res.** 48,107–209, 2008.

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

VAN DEN BERGH, K. P. B.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; COOSEMANS, J.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J. Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). **FEBS Letters.** v. 530, p. 181-185, 2002.

VANDENBORRE, G.; VAN DAMME, E.J.M.; SMAGGHE, G. Natural products: plant lectins as important tools in controlling pest insects. In: Ishaaya, I., Horowitz, A.R. (Eds.), *Biorational Control of Arthropod Pests: Application and Resistance Management*. Springer **Science**. pp. 163–187, 2009.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry.** 72 1538–1550, 2011.

VAREJÃO, N.; ALMEIDA, M.S.; DE CICCIO, N.N.T.; ATELLA, G.C.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; FOGUEL, D. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). **Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics**, v. 1804, p. 1917-1924, 2010.

VAREJÃO, N.; CORREIA, M.T.S.; FOGUEL, D. Characterization of the unfolding process of the tetrameric and dimeric forms of *Cratylia mollis* seed lectin (CRAMOLL 1): effects of natural fragmentation on protein stability. **Biochemistry (Easton)**, v. 50, p. 7330-7340, 2011.

VARELA, E.S.; LIMA, J.P.M.S.; GALDINO, A.S.; PINTO, L.S.; BEZERRA, W.M.; NUNES, E.P.; ALVES, M. A. O.; GRANGEIRO, T. B. Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. **Phytochemistry.** v. 65 (1), p. 59 - 69, 2004.

VARSHNEY, H.M.; SHAILENDER, M. NANOTECHNOLOGY. Current Status in Pharmaceutical Science: A Review. **Int. J. Therap. Appl.** 6: 14–24, 2012.

VASSILEV, L.T.; VU, B.T.; GRAVES, B.; CARVAJAL, D.; PODLASKI, F.; FILIPOVIC, Z.; KONG, N.; KAMMLOTT, U.; LUKACS, C.; KLEIN, C.; FOTOUHI, N.; LIU, E.. A In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. **Science.** Vol. 303 no. 5659 pp. 844-848, 2004.

VAZ, A.F.M.; SOUZA, M.P.; MEDEIROS, P.L.; MELO, A.M.M.A.; SILVA-LUCCA, R. A.; SANTANA, L. A.; OLIVA, M. L.V.; PEREZ, K.; CUCCOVIA, I.; CORREIA, M.T.S. Low-dose gamma irradiation of food protein increases its allergenicity in a chronic oral challenge. **Food and Chemical Toxicology**. v. 51, p. 46-52, 2013.

VAZ, A.F.M.; MARTHYNA, P.S.; ARGÔLO, A.C.C.M.; MELO, A.M.M.A.; OLIVA, M.L. V.; XAVIER, S.H.; COELHO, L.C.B.B; CORREIA, M.T.S. Gamma irradiation as an alternative treatment to abolish allergenicity of lectins in food. **Food Chemistry**. 124 1289–1295, 2011.

VAZ, A.F.M.; SOUZA, M.P.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; MEDEIROS, P. L.; MELO, A.M.M.A.; AGUIAR, J.S.; SILVA, T.G.; SILVA-LUCCA, R.A.; OLIVA, M.L.V.; CORREIA, M.T.S. Molecular fragmentation of wheat-germ agglutinin induced by food irradiation reduces its allergenicity in sensitised mice. **Food Chemistry**. v. 132, p. 1033-1039, 2012.

VENDITTO, V.J.; SZOKA, F.C.J. Cancer nanomedicines: so many papers and so few drugs! **Adv Drug Deliv Rev**. Jan;65(1):80-8, 2013.

VERT, M.; DOMURADO, D. Poly(ethylene glycol): protein-repulsive or albumin-compatible? **J. Biomater. Sci. Polym**. Ed. 1307-1317, 2000.

VIEIRA, N.C.; ESPINDOLA, L.S.; SANTANA, J.M.; VERAS, M.L.; PESSOA, O.D.; PINHEIRO, S.M.; DE ARAUJO, R.M.; LIMA, M.A.; SILVEIRA, E.R. **Bioorg Med Chem**. 16:1676–1682, 2008.

VINCENT, J.; VENDITTO, F.C.; SZOKA, J.R. Cancer nanomedicines: So many papers and so few drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 65 80–88, 2013.

VIRCHOW, R.R.; REIZBARKEIT. *Arch Pathol Anat Klin Med* 14: 1–63, **1858**. July 1858, Volume 14, Issue 1-2, pp 1-63.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature**. 16; 408(6810):307-10, 2000.

VOUSDEN, K.H.; LANE, DP. p53 in health and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 8(4):275-83. 2007.

WALDE, P.; ICHIKAWA, S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. **Biomolecular Engineering**. 18 143–177, 2001.

WANG, J.; LU, Z.; WIENTJES, M.G.; AU, J.L. Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers. **Adv Drug Deliv Rev**. 64(1): 29–39 January, 2012.

WANG, T.; D'SOUZA, G.G.; BEDI, D.; FAGBOHUN, O.A.; POTTURI, L.P.; PAPAHAADJOPOULOS-STERNBERG, B.; PETRENKO, V.A.; TORCHILIN, V.P. Enhanced binding and killing of target tumor cells by drug-loaded liposomes modified with tumor-specific phage fusion coat protein. **Nanomedicine (Lond)**. Jun;5(4):563-74, 2010.

WEBER, J.D.; TAYLOR, L.J.; ROUSSEL, M.F.; SHERR, C.J.; BAR-SAGI, D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. **Nat Cell Biol.** 1(1):20-6, 1999.

WEINBERG, R.A. A biologia do câncer. Porto Alegre: **Artmed**. 844p, 2008.

WEISSIG, V. Liposomes, **Springer**. New York, 2009.

WHITESIDE, T.L. The tumor microenvironment and 32. its role in promoting tumor growth. **Oncogene.** 27(45):5904-12. 2008.

WILLIS, S.N.; ADAMS, J.M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. **Curr. Opin. Cell Biol.** 17, 617–625, 2005.

WOJCIECHOWSKI, M.F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M. J. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. **American J. Botany.** 91: 1846-1862, 2004.

WORMALD, M.R.; SHARON, N. Carbohydrates and glycoconjugates. Progress in non-mammalian glycosylation, glycosyltransferases, invertebrate lectins and carbohydrate-carbohydrate interactions. **Current Opin. Struct. Biol.** 14, 591, 2004.

WONG, J.H.; NG, T.B. Isolation and characterization of a glucose/mannose/ rhamnose-specific lectin from the knife bean *Canavalia gladiata*. **Arch Biochem Biophys.** 439:91–98, 2005.

WYCKOFF, J.B.; WANG, Y.; LIN, E.Y.; LI, J.F.; GOSWAMI, S.; STANLEY, E.R.; SEGALL, J.E.; POLLARD, J.W.; CONDEELIS, J. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. **Cancer Res. Mar.** 15;67 (6):2649-56, 2007.

WU, R.; LIN, L.; BEER, D.G. et al. "Amplification and overexpression of the L-MYC proto-oncogene in ovarian carcinomas". **Am. J. Pathol.** 162 (5): 1603–10. doi:10.1016/S0002-9440(10)64294-0, 2003.

XU, X.; COSTA, A.; BURGESS, D.J. Protein Encapsulation in Unilamellar Liposomes: High Encapsulation Efficiency and A Novel Technique to Assess Lipid-Protein Interaction. **Pharm Res.** 29:1919–1931, 2012.

YANG, Y.; LUDWIG, R.L.; JENSEN, J.P.; PIERRE, S.A.; MEDAGLIA, M.V.; DAVYDOV, I.V.; SAFIRAN, Y.J.; OBEROI, P.; KENTEN, J.H.; PHILLIPS, A.C.; WEISSMAN, A.M.; VOUSDEN, K.H. Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. **Cancer Cell.** 7(6):547-59, 2005.

YAMANAKA, M.; KATO, Y.; ANGATA, T.; NARIMATSU, H. deletion polymorphism in *siglec14* and its functional implications. **Glycobiology.** 19:841–6, 2009.

YUAN, F.; DELLIAN, M.; FUKUMURA, D.; LEUNIG, M.; BERK, D.A.; TORCHILIN, V.P.; JAIN, R.K. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size, **Cancer Res.** 55:3752–3756, 1995.

ZADI, B.; GREGORIADIS, G. A novel method for high-yield entrapment of solutes into small liposomes. **J Liposome Res.** 10:73–80, 2000.

ZAJAC-KAYE, M. Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer. **Lung Cancer.** 34 (Suppl. 2), S43–S46, 2001.

ZHANG, L.; GU, F.X.; CHAN, J.M.; WANG, A.Z.; LANGER, R.S.; FAROKHZAD, O.C. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments, **Clin. Pharmacol. Ther.** 83:761–769, 2008.

ZHANG, Y.; XIONG, Y. Mutations in human arf exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of mdm2 and p53. **Mol Cell.** 3(5):579-91, 1999.

ZHANG, Y. Stealth liposomes: The silent nanobombers. **Preclinical Formulation.** 4:19-24, 2008.

ZHANG, Y.; CHAN, H.F., LEONG, K.W. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 65:104–120, 2013.

ZIMMERMAN, K.; ALT, F.W. Expression and function of myc family genes. **Crit. Rev. Oncog.** 2, 75–95, 1990.

ZUO, Z.; FAN, H.; WANG, X.; ZHOU, W.; LI, L. Purification and characterization of a novel plant lectin from *Pinellia ternata* with antineoplastic activity. **SpringerPlus.** 1:13, 2012.

5 ARTIGO

Atividade antitumoral da lectina recombinante rCramoll livre e encapsulada em lipossomas furtivos

CUNHA, C.R.A

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco

* Autor para correspondência:

Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Universidade Federal de Pernambuco.

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas,

Laboratório de Glicoproteínas,

Avenida Professor Moraes Rego, s/n, B. Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife-Pernambuco, Brasil.

Tel: + 55 81 21268541, 55 81 21268540 (219)

E-mail: mtscorreia@gmail.com

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada o potencial de inibição do crescimento do sarcoma 180 *in vivo* da nova lectina recombinante de *Cratylia mollis* (rCramoll) expressa de forma heteróloga (rCramoll) livre ou encapsulada em lipossomas furtivos que foram formulados pela técnica de hidratação do filme lipídico seguido de ciclos de congelamento e descongelamento. Os lipossomas apresentaram tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH adequados para avaliação da atividade antitumoral *in vivo*. Esta atividade revelou que a lectina livre apresentou um percentual de inibição do crescimento do tumor de 68% enquanto sua forma encapsulada apresentou 80% de inibição. Análises histopatológicas dos grupos experimentais revelaram que a lectina livre ou encapsulada não apresentou alterações nos rins dos animais. Análises hematológicas revelaram que o tratamento com a proteína encapsulada aumentou significativamente a concentração de leucócitos em relação ao grupo não tratado. Os níveis da enzima glutationa peroxidase não foi alterado em nenhum grupo experimental. Esses resultados revelam o potencial antitumoral da nova lectina rCramoll que ao ser expressa de forma heteróloga é um proteína sem interferência sazonal que pode ser utilizada para futuras aplicações na terapia do câncer.

Palavras-chave: Lectinas. Expressão heteróloga. Lipossomas furtivos. Antitumoral. Câncer.

ABSTRACT

This study evaluated the potential to inhibit the growth of sarcoma 180 *in vivo* of new recombinant lectin *Cratylia mollis* (rCramoll) expressed heterologously (rCramoll) , free or encapsulated in stealth liposomes were formulated by the technique of hydration of the lipid film followed by cycles of freezing and thawing. Liposomes encapsulating about 60 % of the protein showed particle size, polydispersity index and pH suitable for the evaluation of antitumor activity *in vivo*. This activity revealed that the free lectin showed a percent inhibition of tumor growth of 68 % while its encapsulated form showed 80 % inhibition. Histopathological analyzes of the experimental groups showed that the free and encapsulated lectin showed no changes in the kidneys of animals. Hematological analyzes revealed that treatment with encapsulated protein significantly increased leukocyte concentration compared with the untreated group. The levels of glutathione peroxidase enzyme was not altered in any experimental group. These results reveal the potential of the new antitumor rCramoll lectin, without seasonal interference, expressed in a heterologous form, could be used for future applications in cancer therapy.

Keywords: Lectins. Heterologous expression. Stealth liposomes. Antitumor activity. Cancer.

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde estima que 84 milhões de pessoas morrerão de câncer entre 2005 a 2015 (DANHIER et al., 2010). Tratar uma doença dessa magnitude compreende: encontrar o alvo adequado para o tumor, (ii) encontrar fármacos que tratem eficazmente esta doença, e (iii) determinar a forma de transportar o fármaco (DANHIER et al., 2010).

Produtos de fontes vegetais podem ser utilizados para terapêutica dessa doença, a exemplo as lectinas, proteínas de origem não imune que se ligam especificamente e reversivelmente a resíduos de carboidratos (DAVID & ZIMMERMAN, 2010; VAN DAMME et al., 1998; FU et al., 2011). Durante anos, esse grupo de proteínas têm sido usado como ferramenta para diferenciar tumores malignos de benignos e também para avaliar o grau de glicosilação associado com metástase (GORELIK et al., 2001). Além do potencial diagnóstico, as lectinas também possuem a capacidade para serem utilizadas a terapia antitumoral em uma variedade de células malignas (DE MEJÍA & PRISECARU, 2005; CHOI et al., 2004; LIU et al., 2010; ANDRADE et al., 2004). Dentre essas lectinas está a extraída das sementes de *Cratylia mollis* (pCramoll) que mostrou um potencial antitumoral *in vivo* frente a sarcoma 180 (ANDRADE et al, 2004). A fim de evitar interferências sazonais e proporcionar proteínas mais puras, uma lectina recombinante (rCramoll) foi expressa de forma heteróloga em *Escherichia coli* (VAREJÃO et al., 2010). Esta nova lectina possui a mesma capacidade de aglutinação de eritrócitos, entretanto, frente a algumas situações desnaturantes ela mostra-se mais estável que a lectina extraída da planta (VAREJÃO et al., 2010, 2011).

As lectinas apresentam um potencial terapêutico na luta contra o câncer, entretanto, existem alguns obstáculos na utilização destas macromoléculas para este fim (CLELAND & DAUGHERT, 2001) como a possível degradação pelos fluidos biológicos, exposição a tecidos e órgãos não desejados e a necessidade de doses frequentes para se manter o nível terapêutico. Com o propósito de superar essas dificuldades, nanossistemas têm sido desenvolvidos para o carreamento de proteínas. Entre os candidatos a esses sistemas de carreamento estão os lipossomas, vesículas constituídas por uma ou mais bicamadas lipídicas, que podem carrear tanto fármacos lipofílicos como hidrofílicos (TORCHILIN, 2011).

Tendo em vista as limitações das lectinas para fins terapêuticos, os lipossomas apresentam aplicabilidades promissoras através da encapsulação dessas proteínas,

especialmente os lipossomas furtivos, que podem proporcionar um maior tempo de circulação desses nanossistemas em relação aos lipossomas convencionais acarretando em um maior direcionamento e acumulação passiva dos nanossistemas furtivos devido ao fenômeno EPR, onde macromoléculas seletivamente atravessam os vasos sanguíneos que permeiam o tumor e se acumulam nestes tecidos, processo esse que não ocorre em tecidos normais (MATSUMURA & MAEDA, 1986; MAEDA, 2001; FANG et al., 2003; SEKI et al., 2009; MAEDA et al., 2006; MAEDA et al., 2009; IYER et al., 2006; FANG et al., 2011). Logo, este artigo tem como objetivo avaliar o potencial antitumoral *in vivo* dessa nova lectina (rCramoll) livre e encapsulada em lipossomas furtivos e verificar se essa diferença de estabilidade apresentada pela lectina recombinante em relação a lectina da planta pode influenciar na atividade biológica.

MATERIAIS E MÉTODOS

A proteína recombinante (rCramoll), obtida por expressão heteróloga em *Escherichia coli*, foi fornecida pela Dra. Nathalia Varejão Nogueira da Paz (UFRJ, Brasil). A fosfatidilcolina de soja (Epikuron[®] 200) e o DSPE-PEG₂₀₀₀ foram adquiridos da Lipoid (Dusseldorf, Alemanha). A trealose e o Kit de dosagem protéica de Peterson-Lowry foram comprados da Sigma-Aldrich (E.U.A). O fosfato monobásico de potássio, o hidróxido de sódio e os solventes foram comprados da Merck (Darmstadt, Germany). Membrana de diálise *cut off* 300 kDa Spectrumlabs (E.U.A).

Obtenção de rCramoll

A proteína recombinante (rCramoll) foi obtida por expressão heteróloga em *Escherichia coli* e purificada por cromatografia de afinidade Sephadex G-75 (VAREJÃO et al., 2010).

Avaliação da atividade hemaglutinante

A avaliação da atividade hemaglutinante (AH) da lectina foi realizada de acordo com Correia & Coelho (1995). Uma alíquota da lectina (50µl) foi submetida a uma diluição seriada em NaCl 0.15M e posteriormente foi adicionada uma suspensão de eritrócitos

glutarizados de coelho (2.5% v/v em NaCl 0.15M, 50µl) o título foi lido após 45min. A AH é definida como o inverso da última diluição que apresentou hemaglutinação.

Avaliação da estabilidade de rCramoll após exposição a ultrassom, agitação mecânica e ciclos de congelamento e descongelamento.

Amostras de rCramoll em solução (150 µg/mL) foram submetidas de modo contínuo à ultrassonicação (Vibra Cell, BRASON, USA, 200W, 40 Hz e 4 °C) e à agitação mecânica utilizando um *shaker* (150 agitações por min a 37 °C por 24 ou 48 h). Para o teste de estabilidade a ciclos de congelamento e descongelamento, 1 mL da proteína em tampão fosfato pH 7,4 (150 µg/mL) foi submetida até 6 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido (-196°C) e descongelamento em banho maria (35°C). Após estes procedimentos, a atividade hemaglutinante (AH) foi avaliada (CORREIA & COELHO, 1995). Todo o estudo foi realizado em triplicata.

Lipossomas formados pelo método de congelamento e descongelamento

Os lipossomas foram formulados pela técnica de congelamento e descongelamento (PICK, 1981) onde os lipídios (Fosfatidilcolina: Colesterol: DSPE-PEG₂₀₀₀) (7,5:2:0,5) 80mM foram dissolvidos em uma solução 3:1 (v/v) clorofórmio/metanol, e em seguida evaporados sob pressão reduzida a 37±1 °C à 80 RPM para formação do filme lipídico. Em seguida, o filme foi hidratado com uma solução de lectina dissolvida em tampão fosfato pH 7,4 e agitado para obtenção de lipossomas multilamelares (MLV's). A formulação foi então submetida a dois ciclos seguidos de congelamento em nitrogênio líquido (-196 °C) e descongelamento em banho-maria (35°C) para formação de MLV's FAT (vesículas multilamelares grandes pela técnica de congelamento e descongelamento/freeze and thaw) e sonicados por 25s (Vibra Cell, BRASON, USA, 200W, 40 Hz e 4 °C) para obtenção de vesículas unilamelares.

Caracterização físico-química das formulações lipossomais

-Otimização do tamanho de partícula e índice de polidispersão através do tempo de sonicação

Diferentes tempos de sonicação foram avaliados para determinar o tamanho adequado das vesículas para atividade antitumoral. Os lipossomas MLV's foram submetidos a diferentes tempos de sonicação (0, 10, 25, 50, 100s), o tamanho e o índice de polidispersão foram avaliados no aparelho Delsa™ Nano S (Beckman Coulter, UK). A carga de superfície (potencial zeta) da formulação utilizada para atividade antitumoral foi determinado por mobilidade eletroforética utilizando um Zetatrac Legacy (Microtrac, EUA). A medição foi feita após a diluição em água deionizada (25°C) da formulação lipossomal. Os resultados (média ± D.P.) foram representantes de três experimentos independentes

-Estabilidade dos lipossomas

Os lipossomas foram submetidos a testes de estabilidade a longo prazo, onde foram avaliados os seguintes parâmetros físico-químicos: tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e pH após a preparação e em intervalos regulares de 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias.

Teor Protéico e Taxa de Encapsulação

Para determinação do teor, uma alíquota da amostra lipossomal (150 µl) foi adicionada a 50 µL de uma solução de clorofórmio: metanol 3:1 (v/v) em um eppendorf, a mistura foi agitada em vórtex e colocada para sonicar por 7 min no banho sonicador. Após isso, uma alíquota de água milli-Q foi adicionada para um volume final de 1mL (ROLIM-SANTOS et al., 2006 modificado). Em seguida, o conteúdo de proteína foi dosado com o Kit de dosagem Peterson-Lowry (SIGMA) e a absorbância lida a 750 nm.

Duas metodologias para separação da lectina não encapsulada foram utilizadas para posterior verificação da taxa de encapsulação. A primeira consistiu na ultracentrifugação, onde 1mL da formulação lipossomal foi submetida a ultracentrifugação a 256.860 g durante 30 min (Beckman Optima LE-80K rotor 70 ti), sendo o sobrenadante retirado e o precipitado ressuspendido. Ao final, a proteína foi quantificada do sobrenadante com o Kit de dosagem Peterson-Lowry (SIGMA) e a absorbância lida a 750 nm.

A segunda metodologia utilizada foi a técnica de diálise utilizando membranas com *cut off* de 300 KDa (Spectra/Por® Float-A-Lyzer® da Spectrum Labs, EUA). A diálise ocorreu por 12 horas com 6 trocas a cada 2 horas. Posteriormente, a proteína encapsulada foi

quantificada após a quebra lipossomal com o Kit de dosagem Peterson-Lowry (SIGMA) e a absorvância lida a 750nm.

Atividade antitumoral de rCramoll livre e encapsulada em lipossomas furtivos

Os ensaios de avaliação da atividade antitumoral *in vivo* de rCramoll livre e encapsulada frente ao Sarcoma 180 foram realizados utilizando camundongos machos, albinos, da linhagem Swiss, com 40 a 60 dias e peso médio de 40 g, provenientes do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami-Lika-UFPE. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado sob temperatura controlada ($\pm 22^{\circ}\text{C}$), com ração e água *ad libitum* em um ciclo de claro:escuro de 12 h:12 h. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (Processo nº23076.023165/2012-13).

Exceto o grupo (A): controle negativo que consistia de animais saudáveis, todos os animais foram inoculados com uma suspensão celular ($5,0 \times 10^6$ células mL^{-1}) do tumor ascítico Sarcoma-180 (com sete dias de implantado), via subcutânea na região subaxilar dos camundongos, O tratamento foi iniciado 24 horas após implantação do tumor, os animais, foram marcados e separados aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais contendo 7 animais cada: grupo (B): controle positivo de animais tratados com soro fisiológico, grupo (C):animais tratados com rCramoll livre, grupo (D): animais tratados com lipossomas contendo rCramoll encapsulada (Tabela 1). O tratamento foi iniciado 24 h após inoculação do tumor, e mantido durante sete dias consecutivos com injeções diárias (via i.p.) de uma solução de rCramoll em tampão fosfato (pH 7,4) ou de rCramoll encapsulada em lipossomas utilizando uma dose terapêutica de 7mg/Kg/ dia durante sete dias. Após o tratamento, os animais foram eutanasiados com uma dose letal de Urethame[®] (Sigma, E.U.A) (1,25 g/kg de peso corpóreo) sendo o sangue coletado do punção cardíaca. Os tumores foram dissecados e pesados. A inibição tumoral foi expressa pela média dos pesos dos tumores dos animais tratados (T) em comparação com o grupo controle (C). A percentagem de inibição do tumor foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: % inibição do tumor = $[(C-T)/C] \times 100$.

Tabela 1 - Protocolo experimental e grupos de animais tratados no ensaio da atividade antitumoral em camundongos frente ao Sarcoma 180.

Grupos experimentais	Tratamento
Grupo A (Controle negativo)	Soro Fisiológico
Grupo B (Controle positivo)	Soro Fisiológico
Grupo C (rCramoll)	rCramoll Livre
Grupo D (Lipo_rCramoll)	rCramoll Encapsulada

Análises histopatológicas

Ao final do tratamento os tumores e órgãos dos animais (fígado, baço e rins) foram armazenados em solução tamponada de formalina a 10% por 24h. Posteriormente, os órgãos foram submetidos a procedimentos histológicos de rotina e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise histopatológica.

-Determinação do índice mitótico (IM)

As lâminas contendo cortes dos tumores devidamente coradas com HE foram fotografadas por câmera digital (Moticam 3.0) acoplada ao microscópio óptico (Nikon-E200), sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se 20 campos por lâmina com aumento final de 400X. As fotomicrografias foram avaliadas através do software ImageJ versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.), onde em cada uma das amostras histológicas foram avaliados o número de mitoses por campo, determinando a partir destes a média do número de mitoses por tumor. Os valores obtidos foram normalizados para o controle considerado como 100%.

Análise hematológica e bioquímica

O sangue coletado dos animais foi devidamente acondicionado em microtubos MiniCollect[®] K3EDTA (Greiner Bio-One, Austria). As amostras de sangue dos camundongos foram submetidas à determinações do hematócrito, número total de hemácias e leucograma (contagem total e diferencial de leucócitos) no hemocitómetro (SYSMEX XT-4000i[™], Sysmex Corporação, Curitiba, Brazil) e análises bioquímicas para determinações dos índices

plasmáticos de glicose, ureia, AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase), no analisador automático (COBAS® 6000, Roche Diagnósticos, Inglaterra).

Avaliação da expressão da enzima glutationa peroxidase nos grupos experimentais

O sangue coletado dos animais foi devidamente acondicionado em microtubos MiniCollect® K3EDTA (Greiner Bio-One, Austria) com anticoagulante EDTA e submetido à avaliação da atividade da enzima glutationa peroxidase utilizando o kit teste Ransel (Randox, Reino Unido).

Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e testes com análise de variância (ANOVA). O teste T-Student foi empregado para comparar as significâncias estatísticas entre os grupos controle e experimentais com $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software PRISMA (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, versão 6.03).

RESULTADOS

Estabilidade de rCramoll frente a ultrassom, agitação mecânica e ciclos de congelamento e descongelamento

Um ensaio preliminar foi realizado para verificar a estabilidade de rCramoll frente a ultrassom e agitação mecânica, na atividade biológica de hemaglutinação de eritrócitos glutarizados de coelho.

As amostras submetidas à sonicação a 100 s e 250 s não mostraram alterações da atividade hemaglutinante 256^{-1} , entretanto, acima de 300 s foram detectadas alterações da atividade hemaglutinante 128^{-1} . Esta capacidade de aglutinar eritrócitos também foi alterada a 48 h de agitação mecânica para 128^{-1} . Este estudo mostrou que rCramoll oferece a mesma estabilidade que pCramoll frente a agitação e ultrassom (Tabela 2).

Tabela 2 - Ação da sonicação e agitação mecânica na Atividade Hemaglutinante de rCramoll.

Tempo de Exposição	Sonicação (Continuous, 200 W power)				Agitação Mecânica (180 strokes/min)		
	0 s	100 s	250 s	300 s	0 h	24 h	48 h
Atividade Hemaglutinante ^a (UH/50µL)	256 ⁻¹	256 ⁻¹	256 ⁻¹	128 ⁻¹	256 ⁻¹	246 ⁻¹	128 ⁻¹

^a O valor expressa o inverso do título da maior diluição na base 2 que ainda produziu aglutinação visível em número de unidades hemaglutinantes (UH) em cada 50µL de amostra utilizada no ensaio com sangue glutarizado de coelho.

A escolha do método de preparação para encapsular proteínas em lipossomas deve visar alta eficiência de encapsulação preservando a atividade biológica da proteína (WALDE & ICHIKAWA, 2001). Sendo assim, a estabilidade da lectina em tampão fosfato pH 7,4 (150 µg/mL), foi avaliada frente a um gradiente de ciclos de congelamento em nitrogênio líquido (-196°C) e descongelamento em banho maria (35°C). Como pode ser visto na tabela 3 até dois ciclos a lectina permanece com a mesma capacidade de aglutinar eritrócitos.

Tabela 3 - Estabilidade da Proteína frente a diferentes ciclos de congelamento e descongelamento

Ciclos de Congelamento e Descongelamento ^a	Atividade Hemaglutinante (UH/50µL) ^b
0	128 ⁻¹
1	128 ⁻¹
2	128 ⁻¹
3	32 ⁻¹
4	32 ⁻¹
5	32 ⁻¹
6	32 ⁻¹

^a Congelamento em nitrogênio líquido(-196°C) e descongelamento a 35°C.

^b O valor expressa o inverso do título da maior diluição na base 2 que ainda produziu aglutinação visível em número de unidades hemaglutinantes (UH) em cada 50µL de amostra utilizada (150µg/mL) no ensaio com sangue glutarizado de coelho.

Preparação e caracterização físico-química das formulações lipossomais

Os lipossomas preparados com 2 ciclos de congelamento e descongelamento foram submetidos a diferentes tempos de sonicação (0-100s) a fim de verificar qual tempo seria ideal para obter lipossomas com tamanhos adequados para encapsulação da proteína e viáveis para a atividade antitumoral (< 200nm) (ALLEN & CULLIS, 2013). O tempo de sonicação é considerado um importante parâmetro para otimização do tamanho dos lipossomas (JAIN et al., 2012).

Como pode ser visto na tabela 4 a melhor formulação foi a submetida a 25 segundos de sonicação, pois obteve tamanho médio das vesículas de $168 \pm 0,7$ nm e PDI $0,265 \pm 0,025$, dessa forma, as formulações apresentaram-se monodispersas. A partir desses dados preliminares estabeleceu-se que os lipossomas deveriam ser submetidos a apenas 25s de sonicação.

Tabela 4 - Variação do tamanho dos lipossomas submetidos a diferentes tempos de sonicação

	Tempo de Sonicação (seg)				
	0	10	25	50	100
Tamanho de Partícula (nm)	443,6 ± 34,7	230,7 ± 3,9	168 ± 0,7	106,1 ± 4,2	88,3 ± 0,4
Índice de Polidispersão	0,463 ± 0,047	0,299 ± 0,019	0,265 ± 0,025	0,226 ± 0,053	0,219 ± 0,016

A tabela 5 apresenta as variações de tamanho e índice de polidispersão nas etapas de preparação dos lipossomas pela técnica de congelamento e descongelamento, freeze and thaw (FAT) (PICK, 1981). Como pode ser visto nesta tabela, a submissão dos lipossomas a apenas dois ciclos de congelamento e descongelamento já foi suficiente para diminuir o tamanho das vesículas multilamelares grande (**Lipo_rCramoll_MLV's FAT**). A etapa seguinte de sonicação dos MLV's proporcionou lipossomas (**rCramoll_SUV's FAT**) com tamanho < 200 nm ideal para terapia antitumoral (ALLEN & CULLIS, 2013).

Tabela 5 - Tamanho e índice de polidispersão no decorrer das fases da técnica de congelamento e descongelamento.

	Tamanho (nm) ± DP	PDI ± DP
Lipo_rCramoll_MLV's	638,6 ± 3,1	0,369 ± 0,009
Lipo_rCramoll_MLV's FAT	593,4 ± 6,3	0,226 ± 0,022
rCramoll_SUV's FAT	168± 0,7	0,265 ±0,025

Os lipossomas apresentaram-se estáveis por 90 dias com tamanho de partícula de 177,8 ±3,9, PDI 0,350±0,053 e pH 7,2. Dessa forma, após a avaliação dos melhores parâmetros para a formulação dos lipossomas visando a terapia antitumoral, estes foram formulados com tamanho de partícula de 168 ± 0,7 nm, PDI 0,265 ± 0,025, potencial zeta(ξ) de -31,9 ± 0,1 e pH 7,3 a união dessas características favorece o direcionamento dos nanossistemas ao tumor (ISHIDA et al., 2008).

Taxa de Encapsulação

Dois técnicas foram utilizadas para separar a proteína não encapsulada e avaliar a taxa de encapsulação. Na técnica de ultracentrifugação o sobrenadante foi dosado quanto ao seu conteúdo proteico pelo método de Peterson-Lowry e mostrou uma taxa de encapsulação de 57,3% ± 0,3. O segundo método avaliado consistia na separação da proteína não encapsulada por meio da técnica de diálise, sendo assim, esta metodologia revelou uma taxa de encapsulação de 59,3% ± 1,5, tabela 6. As duas técnicas mostraram-se eficientes para avaliação da taxa de encapsulação e não apresentaram diferenças estatisticamente significativas $p > 0,05$.

Tabela 6 - Avaliação da Taxa de Encapsulação por dois métodos: Diálise e Ultracentrifugação

	Teor (%)	Taxa de Encapsulação (%)
Diálise	95,82 ± 0,79	57,3 ± 0,3
Ultracentrifugação	95,82 ± 0,79	59,3 ± 1,5

Atividade Antitumoral de rCramoll livre e encapsulada em lipossomas furtivos

A avaliação da atividade antitumoral revelou que a lectina recombinante de *C. mollis* apresentou uma inibição do crescimento do tumor de 68% com média de peso do tumor de

0,94 \pm 0,29 g enquanto a sua forma encapsulada apresentou um percentual de inibição de 80% com média de tumor de 0,60 \pm 0,11g, figura 1, sendo assim, a encapsulação da lectina recombinante em lipossomas furtivos apresentou um aumento significativo de 12% no potencial de inibição do crescimento tumoral em relação à proteína livre, figura 2.

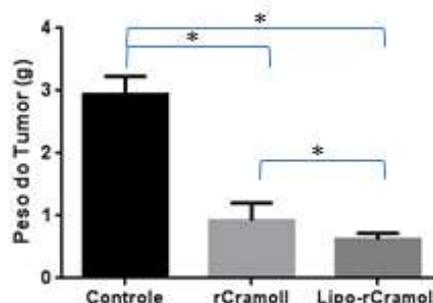


Figura 1 - Peso do tumor após o ensaio de inibição do crescimento do Sarcoma 180. Resultados expressos como Média \pm DP. * ($p < 0,05$).

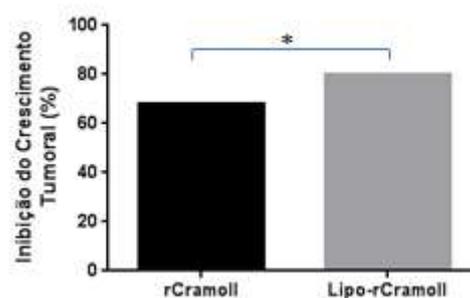


Fig 2 - Porcentagem de inibição do Crescimento tumoral dos grupos tratados com a proteína livre e a proteína encapsulada em lipossomas furtivos * ($p < 0,05$).

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Como pode ser observado na tabela 7, todos os grupos experimentais com o tumor apresentaram os parâmetros hematológicos alterados significativamente em relação aos animais saudáveis. A lectina livre promoveu uma redução significativa em muitos dos parâmetros observados tanto em relação ao grupo controle (+) com tumor como no grupo controle (-) dos animais saudáveis. Entretanto, a encapsulação desta lectina promoveu um aumento desses parâmetros. Ao observar os níveis de glóbulos brancos é perceptível o aumento significativo do número dessas células nos grupos tratados com a lectina encapsulada em relação aos controles.

Tabela 7 - Parâmetros Hematológicos.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	GRUPOS			
	^a Controle (-)	^b Controle (+)	rCramoll	Lipo-rCramoll
Leucócitos (10 ³ /μl)	3,2±0,12	11,4 ±1,7 [‡]	8,1± 3,0 [‡]	17,1±3,2 ^{‡,*}
Hemácias (10 ⁶ /μl)	10,4±0,03	7,93 ±1,6 [‡]	6,56±2,1 ^{‡,*}	8,6±0,9 [‡]
Hemoglobina (g/DL)	18,5±0,05	12,6 ±2,4 [‡]	10,3±3,1 ^{‡,*}	13,4±1,3 [‡]
Hematócrito (%)	51,0± 0,44	39,1 ± 7,3 [‡]	31,3±9,8 [‡]	40,7±3,8 [‡]
VCM (μm ³)	52,8±0,49	50±1,7 [‡]	48±1,4 [‡]	47±0,5 [‡]
HCM (pg)	17,8±0,05	16,0±0,5 [‡]	15,8±0,3 [‡]	15,6±0,2 [‡]
CHCM (g/dL)	33,4±0,57	32,4±0,3 [‡]	33,0±0,4 [‡]	33,0±0,2 ^{‡,*}

Dados representados como média ± D.P (n=4).Diferenças estatísticas entre os controles foram determinados pelo método de ANOVA. [‡]P<0.05 para grupos comparados com o grupo (-) controle normal);*P<0.05 para grupos comparados com grupo controle (+) tratado com salina.

Os parâmetros bioquímicos para avaliação de possíveis danos renais não tiveram alterações significativas em todos os grupos experimentais com relação aos animais saudáveis. Para avaliação hepática, foi verificado que os grupos experimentais apresentaram alterações significativas dos níveis de AST em relação aos animais saudáveis, entretanto, é possível verificar uma diminuição significativa dos níveis de dessa enzima nos grupos tratados com a lectina livre ou encapsulada em relação aos animais tratados apenas com soro fisiológico (controle positivo).

Tabela 8 - Parâmetros Bioquímicos

	Controle(-)	Controle(+)	rCramoll	Lipo-rCramoll
Glicemia (mg / dl)	116.1 ± 10.4	178,3± 36,2	148,5± 26,0	177,7± 43,9

Uréia (mg/dL)	27.67 ± 3.78	37,6± 15,5	35,5± 5,3	33,8± 3,3
AST (U/L)	79,43±7,50	276± 19 [‡]	183± 50 ^{‡*}	217±30 ^{‡*}
ALT (U/L)	31,4± 2,1	20,4±3,6	25,7±18,5	9,4 ±4,0 ^{‡*}

Dados representados como média ± D.P (n=4). Diferenças estatísticas entre os controles foram determinados pelo método de ANOVA. [‡]P<0.05 para grupos comparados com o grupo controle normal (-); *P<0.05 para grupos comparados com grupo controle positivo tratado com salina (+).

Análise histopatológica

A determinação do Índice Mitótico (IM) foi realizado com os tumores através da técnica de HE por meio da análise morfológica e contagem das mitoses (metáfase, anáfase e telófase) a fim de se determinar o índice mitótico nos grupos estudados.

Independente do grupo estudado, o tumor invadiu a musculatura, o tecido ósseo e gorduroso. Também foram observadas áreas de necrose e hemorragia. As células neoplásicas apresentaram-se arranjadas predominantemente em padrão sólido, pleomórficas, grandes, com citoplasma abundante e sem bordas definidas. Os núcleos apresentaram-se hiper cromáticos, grandes, variando de ovais a alongados. Foram observadas muitas mitoses (figura 3), sendo algumas atípicas.

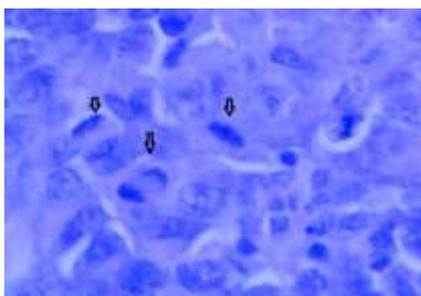


Figura 3 - Tecido tumoral do grupo controle. As setas indicam a presença de mitoses nesse tecido.

A inibição da divisão celular observada através dos valores dos índices mitóticos demonstram que os animais tratados com rCramoll encapsulada em lipossomas furtivos apresentaram uma redução de 5% do número de mitoses em relação ao controle e de mais de 20% em relação a lectina livre. A proteína livre apresentou um aumento da proliferação celular significativo p<0,05.

A análise histopatológica dos órgãos como fígado, baço e rins dos grupos experimentais revelou que não houve alteração na morfologia dos rins e baço, entretanto, foi possível observar áreas de vacualizações em hepatócitos que pode indicar começo de esteatose e presença de microabcesso que está relacionada a infiltrado inflamatório em alguns animais do grupo tratado com a lectina encapsulada (figura 4).

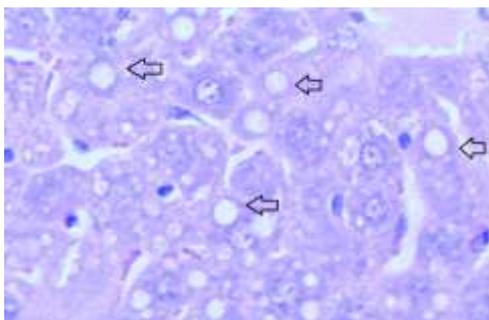


Figura 4 - Hepatócitos do grupo tratado com a lectina encapsulada. Presença de vacualizações indicando começo de esteatose.

Avaliação dos níveis de glutathione peroxidase no sangue dos grupos experimentais

Foi avaliado os níveis de glutathione peroxidase no sangue dos animais submetidos ou não ao tratamento com a proteína livre ou encapsulada para avaliação do efeito da lectina na ação dessa enzima. Como pode ser visto na figura 5 não houve diferença significativa de expressão dessa enzima entre os grupos.

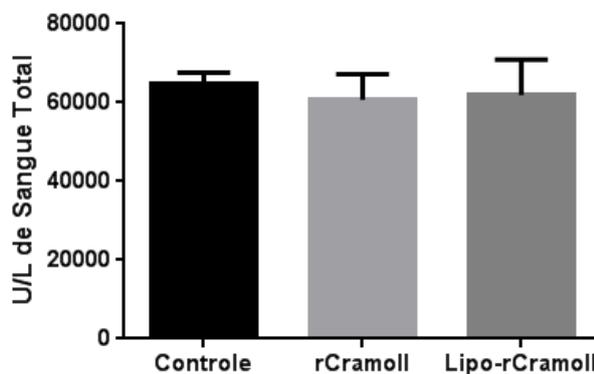


Figura 5 - Níveis de expressão sanguíneo de glutathione peroxidase nos grupos experimentais.

DISCUSSÃO

A tecnologia do DNA recombinante possibilita a utilização de microrganismos modificados capazes de sintetizar proteínas em grandes quantidades de forma menos onerosa, como no caso da insulina (LIMA, 2001). A expressão heteróloga de proteínas de leguminosas oferece vantagens como a não dependência da coleta de sementes, que em muito afeta a homogeneidade das amostras devido à sazonalidade, além de evitar a contaminação com outras proteínas durante o processo de purificação (VAREJÃO et al., 2010).

Sendo assim, uma nova lectina, rCramoll, foi produzida de forma heteróloga em *Escherichia coli*. Esta proteína apresenta algumas atividades biológicas semelhantes à lectina da planta, mas difere quanto a alguns aspectos de estabilidade quando submetida a determinadas situações desnaturantes (VAREJÃO et al., 2010; 2011), o que impulsionou o estudo da atividade antitumoral desta nova lectina livre e encapsulada em lipossomas furtivos.

A avaliação da estabilidade da lectina recombinante frente à agitação mecânica e diferentes tempos de sonicação revelou que mesmo esta proteína apresentando apenas monômeros intactos em sua constituição (VAREJÃO et al., 2011) o que confere maior estabilidade frente a algumas situações, ela apresenta a mesma capacidade de aglutinação de eritrócitos que a lectina da planta, quando submetida às condições de estresse como agitação mecânica e sonicação.

Muitas lectinas apresentam atividade antitumoral, entretanto, a utilização destas proteínas nesta terapia esbarra em alguns obstáculos (CLELAND & DAUGHERT, 2001) que podem ser resolvidos com o encapsulamento em nanossistemas, em especial, os lipossomas (TORCHILIN, 2011). Os lipossomas furtivos escolhidos para encapsular a lectina recombinante rCramoll visam aumentar o tempo de meia vida e proporcionar um maior direcionamento e acumulação passiva dos nanossistemas furtivos devido ao fenômeno EPR, onde macromoléculas seletivamente atravessam os vasos sanguíneos que permeiam o tumor e se acumulam nestes tecidos, processo esse que não ocorre em tecidos normais (MATSUMURA & MAEDA, 1986; MAEDA, 2001; FANG et al., 2003; SEKI et al., 2009; MAEDA et al., 2006; MAEDA et al., 2009; IYER et al., 2006; FANG et al., 2011). Este fenômeno tem se tornado o padrão ouro no desenho de nanossistemas anticâncer (TORCHILIN, 2011; FANG et al., 2011).

DOS SANTOS e colaboradores (2007) mostraram que lipossomas incorporando entre 2 e 5 mol% DSPE-PEG₂₀₀₀ podem formar vesículas estáveis que exibem grandes tempos de

circulação. Dessa forma, os lipossomas foram formulados com 5% de lipídio peguilado visando garantir a furtividade dos nanossistemas para a aplicação *in vivo*.

Contudo, a adição do PEG (polietilenoglicol) utilizado para garantir o efeito furtivo dos lipossomas pode influenciar na eficiência de encapsulação de moléculas solúveis em água devido à própria presença de cadeias de PEG dentro das vesículas que podem restringir o espaço interno disponível para encapsulação, como foi visto por NICHOLAS e colaboradores (2000). Quanto menor o tamanho da vesícula, maior o impacto causado nessa redução, em adição, a mesma ação da barreira estérica do PEG pode atrapalhar na encapsulação de substâncias pelo fenômeno de exclusão (AWASTHI et al., 2003).

O PEG em sua forma escova de 5 nm pode provocar em lipossomas de 200 nm uma redução de quase 15% do espaço disponível para fármacos encapsulados. Esta certa redução na encapsulação influenciada pelo PEG pode ser uma função do comprimento da cadeia e da quantidade deste lipídio peguilado (NICHOLAS et al., 2000; AWASTHI et al., 2003). Segundo WANG & HUANG (2003) devido à barreira estérica, vesículas unilamelares grandes (LUV's) contendo PEG tiveram sua eficiência de encapsulação reduzida dramaticamente, mesmo utilizando uma pequena quantidade de PEG. O que pode explicar a redução na taxa de encapsulação de rCramoll em lipossomas furtivos quando comparado com taxas de 84% de encapsulação encontrada por ANDRADE e colaboradores (2004) para pCramoll em lipossomas convencionais carregados positivamente.

Devido ao fato de proteínas serem macromoléculas cujo peso molecular é maior que os produtos farmacêuticos convencionais (GUPTA & SHARMA, 2009) a encapsulação de proteínas em lipossomas unilamelares apresenta alguns gargalos a respeito de sua eficiência e muitas metodologias têm sido propostas visando melhorar este parâmetro. Lectina de *Mistletoe* (ML) possuiu baixa encapsulação em lipossomas de diversas misturas lipídicas com eficiências menores que 4% mostrando a dificuldade de integrá-las no compartimento aquoso das vesículas (MANOJLOVIC et al., 2008).

Diversos parâmetros influenciam esse rendimento de encapsulação de proteínas, entre eles a concentração dos lipídios e o tamanho (diâmetro) dos lipossomas (HEEREMANS et al., 1995; HWANG et al., 2012). O aumento na concentração de lipídios reflete um maior volume interno disponível, que foi visto por HWANG e colaboradores em 2012 ao verificar que o aumento da taxa de encapsulação de tripsina em lipossomas com 194 nm aumentou de 1,5% para 17,5% quando a concentração de lipídios aumentou de 1,25 para 20 mM.

Visando uma maior encapsulação de rCramoll os lipossomas foram formulados com 80 mM de lipídios e diâmetro das vesículas de $168 \pm 0,7$, tamanho considerado dentro da faixa ideal para terapia antitumoral, pois mesmo sem o direcionamento específico, nanossistemas tem mostrado habilidade para se acumularem passivamente nos sítios com aumento da permeabilidade vascular, quando sua faixa de diâmetro é menor que 200 nm (ALLEN & CULLIS, 2013). O índice de polidispersão (PDI) da formulação lipossomal foi de $0,265 \pm 0,025$, este parâmetro avalia a distribuição de tamanho, tendo um valor entre 0 e 1 (a proximidade do valor 0 indica partículas monodispersas) (JAIN et al., 2012).

Outro importante parâmetro a ser considerado para encapsular proteínas em nanossistemas é a seleção da metodologia, considerada uma das etapas cruciais (WALDE & ICHIKAWA, 2001). Há grandes desafios a serem superados, dentre estes, a baixa eficiência de encapsulação e o cuidado com a estabilidade da proteína durante a preparação, especialmente se as condições do processo são agressivas ou envolvem solventes orgânicos (XU et al., 2012).

A encapsulação de rCramoll em lipossomas foi realizada por meio hidratação do filme lipídico seguido de ciclos de congelamento e descongelamento, freeze and thaw (FAT) (PICK, 1981). Esta técnica é amplamente utilizada para encapsular moléculas hidrofílicas em lipossomas, sendo conveniente para aumentar o volume interno dessas vesículas (SRIWONGSITANONT & UENO, 2011). Para formulação lipossomal foram utilizados dois ciclos de congelamento (-196°C) e descongelamento (35°C), que através do ensaio preliminar da estabilidade protéica revelou não alterar a atividade hemaglutinante da lectina.

Os lipossomas formulados foram capazes de encapsular cerca de 60% da proteína mantendo a estabilidade da lectina na formulação. XU e colaboradores (2012), utilizando a mesma metodologia conseguiram encapsular cerca de 50% da enzima superóxido dismutase (SOD) em vesículas unilamelares com cerca de 150 nm com apenas dois ciclos de congelamento e descongelamento, mantendo constante a atividade desta enzima. Além disso, o aumento do número de ciclos de congelamento e descongelamento também está relacionado a um aumento na taxa de encapsulação (COLLETIER et al., 2002; HWANG et al., 2012), mas para isto um estudo a respeito da estabilidade da proteína deve ser antecipadamente realizado.

Entretanto, para determinar a taxa de encapsulação protéica faz-se necessário a separação adequada do material não encapsulado. A determinação do verdadeiro valor da eficiência de encapsulação (EE) de proteínas encapsuladas em lipossomas não é tão trivial

quanto parece e é comum que muitos valores reportados podem ser superestimados devido à incompleta separação das proteínas não encapsuladas das vesículas (WALDE & ICHIKAWA, 2001).

Algumas técnicas são amplamente utilizadas para separação do material não encapsulado das vesículas. Em nosso estudo, dois métodos foram avaliados para separação da lectina não internalizada em lipossomas para quantificação da taxa de encapsulação. Uma das metodologias testadas foi a ultracentrifugação (VAFABAKHSH et al., 2013; KIM et al., 2009; MURAKAMI et al., 2006).que mesmo sendo uma técnica amplamente utilizada, a alta pressão aplicada na ultracentrifugação (>100.000g) poderia danificar os lipossomas e liberar seu conteúdo (HEEREMANS et al., 1995; HWANG et al., 2012), sendo assim, a técnica de diálise em membrana (*cut off 300kDa*) também foi utilizada. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas metodologias sugerindo que as duas podem ser utilizadas para verificação da taxa de encapsulação.

Após o estabelecimento dos melhores parâmetros para formulação de lipossomas furtivos encapsulando rCramoll, esses nanossistemas foram utilizados para verificação do potencial antitumoral da lectina livre e encapsulada em lipossomas furtivos. A avaliação dessa atividade biológica revelou que a lectina recombinante apresentou uma inibição do tumor de 68% e ao ser encapsulada em lipossomas furtivos provocou um aumento de 28% desta inibição.

PARK e colaboradores (2002) mostraram a eficácia substancial no tratamento de câncer de mama e de ovário de lipossomas furtivos contendo doxorrubicina assim como na monoterapia e em combinação com outros fármacos quimioterápicos. Um aumento da deposição de doxorrubicina encapsulada em lipossomas furtivos (PLD- Doxil®) em células tumorais, promoveu um maior efeito antitumoral de Doxil® quando comparado ao fármaco livre (GABIZON et al., 2002) de forma semelhante, rCramoll também apresentou um aumento na inibição do tumor quando encapsulada em lipossomas furtivos em relação a sua forma livre.

A nova lectina recombinante promoveu um aumento de 25% na inibição do tumor em comparação com os reportados por ANDRADE e colaboradores (2004) para a lectina da planta, mostrando o maior potencial antitumoral de rCramoll. Os lipossomas furtivos encapsulando apenas cerca de 60% da lectina recombinante promoveu um aumento de 9% de inibição do tumor quando comparado a lipossomas convencionais encapsulando 84% da

lectina da planta. Esses resultados demonstram o aumento da inibição tumoral da lectina recombinante ao ser encapsulada em lipossomas furtivos quando comparada a lipossomas convencionais.

PITRUBHAKTA e colaboradores (2012), mostraram que o hidrocloreto de gencitabina (GEM), um potente fármaco anticâncer, apresentou um aumento significativo da atividade antitumoral quando encapsulado em lipossomas. Esse aumento foi acentuado quando internalizado em lipossomas furtivos. Essa ação diferenciada estava associada, segundo estudos de farmacocinética, a liberação prolongada do fármaco, aumento do tempo de meia vida e baixa taxa de eliminação das formulações furtivas em relação às convencionais.

Um dos parâmetros para avaliar a inibição tumoral além da redução do peso do tumor é utilizando o índice mitótico. O número de mitoses expressa a atividade da divisão celular, então, quanto maior a atividade proliferativa de um tecido, maior será o número de mitoses verificadas (WEINBERG, 2008) sendo a análise do índice mitótico um importante indicador de proliferação adequada das células (GADANO et al., 2002) possibilitando o conhecimento do nível de atividade celular do tecido em estudo, fornecendo informações sobre o seu comportamento biológico (BARROS & FREITAS, 1997)

Esta técnica revelou que a lectina rCramoll livre foi capaz de induzir proliferação de algumas células tumorais. Resultados intrigantes também foram obtidos por CAMACHO e colaboradores (2007) ao observar que a lectina recombinante de *Bauhinia forficata* (rBFL) apresentou um comportamento inibitório da proliferação celular *in vitro* quando em baixas concentrações, e estimulante da proliferação celular quando em altas concentrações. Muitas das ações de concanavalina A *in vitro* são inibitórias da divisão celular, entretanto, FITZGERALD e colaboradores (2001), revelou o potencial mitogênico desta lectina em células epiteliais de intestino de rato. Esses resultados corroboram com os achados em nosso estudo, onde rCramoll encapsulada em lipossomas furtivos inibiu o número de mitoses de forma significativa ($p < 0,05$) em relação a lectina livre. Esses resultados sugerem que nanossistemas proporcionam a liberação de fármacos de forma controlada que pode influenciar positivamente nas células em processo de divisão quando comparada a doses únicas e altas da proteína livre.

Além disso, o tumor merece ser entendido como um microambiente (WEINBERG, 2008) sendo assim, existe células com distintas funções, de modo que nem todas elas estão

em constante divisão. Como foi visto por LI e colaboradores (2011), ao verificarem que o ácido trans-retinóico é mais potente em células tronco do microambiente tumoral do que em células transformadas do câncer, mostrando que diferentes moléculas podem agir nas mais diversas células do tecido tumoral.

A ação da lectina livre pode estar relacionada ao bem conhecido potencial imunomodulatório reportado na literatura para lectina da planta, Cramoll 1,4 (MELO et al., 2010). De forma semelhante, rCramoll pode agir no recrutamento de células do sistema imunológico culminando na redução do tumor. Essa redução foi intensificada quando a lectina é encapsulada em lipossomas que ao liberá-la de forma controlada pode agir tanto em células transformadas do câncer como recrutando células imunes para reduzir o crescimento do tumor.

Outras metodologias complementares podem ser utilizadas para avaliar a principal ou as principais vias para inibição do tumor causado pela lectina recombinante livre como a técnica de TUNEL que avalia a extensão de apoptoses no tecido tumoral ou imunohistoquímica que avalia células inflamatórias ao redor do tumor.

Devido à capacidade das lectinas reconhecerem especificamente e se ligarem de forma reversível a resíduos de carboidratos elas podem induzir, através dessas interações, mudanças significativas nas cascatas de sinalização celular (PARK et al., 2000). Outras lectinas também tem mostrado potencial antitumoral (BAINS et al., 2005), como as lectinas de mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) que são potentes agentes imunomodulatórios do câncer (PARK et al., 2000).

Embora os mecanismos moleculares causadores dos efeitos antiproliferativos das lectinas de plantas não estejam esclarecidos até o momento, hipóteses sugerem que este efeito está associado com a habilidade das lectinas para modular o crescimento, diferenciação, proliferação e apoptose de células *in vitro* e *in vivo* (BAINS et al., 2005; CAMACHO et al., 2007).

As análises dos parâmetros hematológicas e bioquímicos fornecem importantes informações com relação ao estado clínico do animal, balanço nutricional, situações deficitárias, monitorações de tratamentos e prognósticos (GONZÁLEZ et al, 2001).

Pacientes portadores de doenças neoplásicas apresentam alta frequência de anormalidades das células sanguíneas. A mielosupressão e anemia são grandes problemas

encontrados causados por tumores o que provoca uma diminuição nos níveis de hemoglobina e hemácias (SREELATHA et al., 2011).

Como era esperado, o tumor foi capaz de reduzir significativamente o número de hemácias e a quantidade de hemoglobina como pode ser observado nos grupos experimentais. Entretanto, nos animais tratados com a proteína encapsulada houve um aumento do número desses parâmetros que estavam significativamente diminuídos no grupo com a proteína livre, sugerindo que a encapsulação da lectina em lipossomas previne uma possível toxicidade às células sanguíneas. Além disso, o aumento dos níveis de células brancas na corrente sanguínea dos grupos tratados com a lectina encapsulada pode estar relacionado ao efeito imunomodulatório de rCramoll de forma semelhante a lectina da planta (MELO et al., 2010). O encapsulamento da lectina em lipossomas permite sua liberação controlada que pode estar estimulando de forma significativa as células imunes.

O estudo da imunologia do tumor tem-se dedicado ao entendimento dos mecanismos de evasão do sistema imune das células tumorais e ao desenvolvimento de estratégias de modulação do sistema imunológico para reconhecimento e erradicação dos tumores (ROBERT & COHEN, 1998; OLIVEIRA, 2009), por meio da elaboração de terapias utilizando moléculas imunomodulatórias (AGHA-MOHAMMADI & LOTZE, 2000). Esses resultados podem sugerir que o efeito imunomodulatório da lectina pode ser a via para inibição do crescimento tumoral.

A análise bioquímica visou avaliar a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade da lectina recombinante livre e encapsulada, por meio da verificação de marcadores para funções hepáticas e renais. Gerada no fígado, a ureia é a principal fonte de excreção do nitrogênio do organismo, principalmente pela urina, sendo, portanto, também um importante parâmetro bioquímico utilizado para avaliar funções renais (BURTIS et al, 2008; OMARA et al., 2012). Nesse estudo, a uréia não apresentou alteração significativa nos grupos experimentais. Esses resultados corroboram com as análises histopatológicas dos rins que não apresentaram alterações morfológicas, o que sugere que o tratamento com a proteína livre e encapsulada não promoveu alteração na fisiologia renal.

A avaliação hepática mede as respostas às alterações anatômicas ou bioquímicas do fígado (YEN et al, 2005). Dentre os testes utilizados para esta avaliação pode-se incluir as dosagens de alanina aminotransferase (ALT/TGP) e aspartato aminotransferase (AST/TGO). Após lesões hepáticas o valor de ALT pode ser elevado rapidamente, enquanto que elevações

no padrão de AST indicam um comprometimento celular mais profundo (SCHUMANN et al, 2002). Em pequenos animais, o aumento de AST é verificado em situações de desordens inflamatórias e degenerativas da musculatura esquelética, bem como em cardiomiopatias, isquemia, congestão, necrose, trauma e neoplasias (COLES, 1986).

A análise de hepatotoxicidade revelou que os grupos tratados com a lectina livre e encapsulada não apresentaram alterações significativas dos níveis de AST. Entretanto, foi observada diminuição significativa dos níveis de ALT no grupo tratado com a lectina encapsulada. Aas análises histopatológicas também mostraram alterações hepáticas onde foi possível observar a presença de infiltrados inflamatórios e áreas de microesteatose no fígado de animais tratados com a lectina encapsulada. Em um estudo de radiomarcagem de pCramoll esta lectina encontrou-se biodistribuída em grande quantidade no fígado dos animais (PATRICIO et al., 2011)

Entretanto, nas análises histopatológicas do fígado não foi possível verificar fibrose intersticial, nem ocorrência de necrose ou comprometimento do parênquima. Dessa forma, sem a ocorrência de danos mais graves, o fígado é capaz de promover regeneração hepatocelular com a ausência da exposição à substância teste (SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000).

Níveis de expressão da enzima glutathiona peroxidase (GPX) consitui uma das bases do sistema de defesa antioxidante junto com superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (KARLSSON et al., 1990; SZATROWSKI & NATHAN, 1991; FALCK et al., 2010). Perda na expressão dessas enzimas pode estar associada à vulnerabilidade celular aos danos causados pelos radicais livres. Células de tumor humano, em geral, produzem bem mais espécies reativas de oxigênio do que as linhagens não transformadas e a expressão das enzimas protetoras do estresse oxidativo podem estar comprometidas em alguns tipos de câncer como no adenocarcinoma endometrial (FALCK et al., 2010) e no câncer de pâncreas (HU & DIAMOND, 2003). Entretanto, outros trabalhos também mostram que em alguns tipos de células de tumor, a inibição da remoção de peróxido, associado à diminuição da expressão de glutathiona peroxidase, pode melhorar o efeito supressor tumoral da enzima manganês Superoxide Dismutase (*MnSOD*), que também é outra importante enzima antioxidante (LIU et al., 2004).

Nosso estudo não verificou diferença significativa de expressão entre os grupos. A ação de GPX depende da concentração de glutathiona reduzida (GSH). É válido ressaltar que a

indução de espécies reativas por pela lectina da planta já foi demonstrada em diversos modelos murinos (MELO et al., 2010), deste modo, não se pode descartar a participação de espécies reativas na ação antitumoral da lectina, que agiriam oxidando a glutatona e consequentemente inibindo a ação de GPX. A indução de radicais livres é relacionada com a atividade de diversos fármacos antitumorais (LAMPIASI et al., 2012; CHUNG et al., 2013), sendo importante a utilização de outros testes para investigar a participação destes na capacidade antitumoral de rCramoll.

CONCLUSÃO

Dessa forma, nosso estudo verificou que a lectina expressa de forma heteróloga rCramoll é tão estável quanto a lectina purificada da planta (pCramoll) e apresentou maior potencial de inibição do sarcoma 180 que foi intensificado após a encapsulação em lipossomas furtivos revelando os benefícios do uso desses nanossistemas no carreamento dessa lectina. Sendo assim, os dados obtidos revelam o potencial antitumoral da lectina expressa de forma heteróloga que além de proporcionar uma proteína mais pura sem interferências sazonais proporcionou a síntese de uma macromolécula com maior potencial antitumoral para futuras aplicações na terapia do câncer.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

REFERÊNCIAS

- AGHA-MOHAMMADI, S.; LOTZE, M.T. Immunomodulation of cancer: potential use of selectively replicating agents. **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 105, n 9, 2000.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 65:36–48, 2013.
- ANDRADE, C.A.S.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHAES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **Int J Pharma** 278(2): 435–445, 2004.
- AWASTHI, V. D; GARCIA, D; KLIPPER, R. B; GOINS, A; PHILLIP, W. T. Neutral and Anionic Liposome-Encapsulated Hemoglobin: Effect of Postinserted Poly(ethylene glycol)-distearoylphosphatidylethanolamine on Distribution and Circulation Kinetics. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**. Vol 309: 241-248, 2003.
- BAINS, J. S.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S.; NIJJAR, K. K.; AGREWALA, J. N.; KUMAR, V.; KUMAR, A.; SAXENA, A. K. Mitogenic and anti-proliferative activity of a lectin from the tubers of Voodoo lily (*Sauromatum venosum*). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1723, p. 163-174, 2005.
- BARROS, S.S.L.V.; FREITAS, R. A. Argyrophilia in nucleolar organizer regions in epithelial dysplasia of the oral mucosa, **Rev. Odontol. UNESP** 26 (1), 189-202, 1997
- BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E (Eds). Tietz Fundamentos de Química Clínica. 6^a Ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**; 2008.
- CAMACHO, N.N.; PINTO, L.S.; HÄDRICH, G.; BEIRA, F.T.A.;DELLAGOSTIN, O.A. Atividade da lectina recombinante de *Bauhinia forficata* sobre a proliferação celular de linhagens tumorais humanas. In: **XVI Congresso de Iniciação Científica-UFPel**, Pelotas, 2007.
- CHOI, S.H.; LYU, S.Y.; PARK, W.B. Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of Akt, **Arch. Pharm. Res.** 27 68–76, 2004.
- CHUNG, K.S.; HAN, G.; KIM, B.K.; KIM, H. M.; YANG, J. S.; AHN, J.; WON, M. A novel antitumor piperazine alkyl compound causes apoptosis by inducing RhoB expression via ROS-mediated c-Abl/p38 MAPK signaling. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 72(6), 1315-1324, 2013.
- CLELAND, J.L.; DAUGHERTY, A.; MRSNY, R. Emerging protein delivery methods **Curr Opin Biotechnol**. Apr;12(2):212-9., 2001.
- COLES, E.H. Veterinary Clinical Pathology. **W.B. Saunders**; 4th ed. Philadelphia: 1986.

COLLETIER, J.P. B.; WINTERHALTER, C.M.; FOURNIER, D. Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer, **BMC Biotechnol.** 2, 2002.

CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Purification of glucose / manose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Appl Biochem Biotechnol**; 55:261–73, 1995.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release** 148, 135–146, 2010.

DAVID, A.R.; ZIMMERMAN, M.R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? **Nature reviews-cancer.** VOLUME 10, 2010.

DE MEJÍA, E.G.; PRISECARU, V.I. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. **Crit Rev Food Sci Nutr**;45:425–45, 2005.

DOS SANTOS, N.; ALLEN, C.; DOPPEN, A.M.; ANANTHA, M.; COX, K.; GALLAGHER, R.C.; KARLSSON, G.; EDWARDS, K.; KENNER, G.; SAMUELS L.; WEBB, M.S.; BALLY, M.B. Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: Relating plasma circulation lifetimes to protein binding. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes.**;1768:1367–1377, 2007.

FALCK, E.; KARLSSON, S.; CARLSSON, JESSICA.; HELENIUS, G.; KARLSSON, MATS.; KLINGA-LEVAN, K. Loss of glutathione peroxidase 3 expression is correlated with epigenetic mechanisms in endometrial adenocarcinoma. **Cancer Cell International**, 10 :46, 2010.

FANG, J.; SAWA, T.; MAEDA, H. Factors and mechanism of “EPR” effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS, **Adv. Exp. Med. Biol.** 519, 29–49, 2003.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced Drug Delivery Reviews** 63, 136–151, 2011.

FITZGERALD, A. J.; JORDINSON , M.; RHODES, J. M.; SINGH, R.; CALAM, J.; GOODLAD, R. A. Comparison of the effects of concanavalin-A and epidermal growth factor on epithelial cell proliferation in the rat intestine. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 15, p. 1077-1084, 2001.

FU, L. L.; ZHOU, C.C.; YAO, S.; YU J.Y.; LIU, B.O.; BAO, J. K. Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** 43 1442– 1449, 2011.

GABIZON, A.; TZEMACH, D.; MAK, L.; BRONSTEIN, M.; HOROWITZ, A.T. Dose dependency of pharmacokinetics and therapeutic efficacy of pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL) in murine models. **J Drug Target.** 2002.

GADANO, A.; GURNI, A.; LÓPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacol.** 81, 11-16, 2002.

GONZÁLEZ, F.H.D.; CARVALHO, V.; MÖLLER, V.A.; DUARTE, F.R. Perfil bioquímico sanguíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Arq Fac Vet UFRGS.** 29:1-6, 2001.

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

GUPTA, H.; SHARMA, A. Recent trends in protein and peptide drug delivery systems. **Asian J Pharm** [serial online] [cited 2013 Jul 13];3:69-75, 2009.

HEEREMANS, J.L.; GERRITSEN, H.R.; MEUSEN, S.P.; MIJNHEER, F.W.; GANGARAM, R.S. P.; PREVOST, R.; KLUFT, C.; CROMMELIN, D.J. The preparation of tissue-type plasminogen activator (t-PA) containing liposomes: entrapment efficiency and ultracentrifugation damage, **J. Drug Target.** 3, 301–310, 1995.

HU, Y. J.; DIAMOND, A. M. Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. **Cancer Research** 63, 3347–3351, June 15, 2003.

HWANG, S. Y.; KIM, H.K.; CHOO, J. G.; SEONG, H.; HIEN, T. B. D. LEE, E.K. Effects of operating parameters on the efficiency of liposomal encapsulation of Enzymes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 94, 296–303, 2012.

ISHIDA, O.; MARUYAMA, K.; TANAHASHI, H.; IWATSURU, M.; SASAKI, K.; ERIGUCHI, M.; YANAGIE, H. Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo. **Pharm Res.** 18:1042–8, 2001.

IYER, A.K.; GREISH, K.; FANG, J.; MAEDA, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting, **Drug Discov. Today** 11, 812–818, 2006.

JAIN, S.; KUMAR, D.; SWARNAKAR, N.K.; THANKI, KAUSHIK. Polyelectrolyte stabilized multilayered liposomes for oral delivery of paclitaxel. **Biomaterials.** 33, 2012.

KARLSSON, J.O.G.; SJÖSTEDT, A.; WAHLSTRÖM, J.; AXELSSON, K.L.; ANDERSSON, R.G.G. Cyclic guanosine monophosphate metabolism in human amnion cells trisomic for chromosome 21. **Biology of the Neonate** 57 :343-348, 1990.

KIM, J.Y.; KIM, J.K.; PARK, J.S.; BYUN, Y.; KIM, C.K. The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator. **Biomaterials** 30, 5751–5756, 2009.

LAMPIASI, N.; AZZOLINA, A.; UMEZAWA, K.; MONTALTO, G.; MCCUBREY, J.A.; CERVELLO, M. The novel NF- κ B inhibitor DHMEQ synergizes with celecoxib to exert antitumor effects on human liver cancer cells by a ROS-dependent mechanism. **Cancer Lett.** 1; 322(1):35, 2012.

LI, R.J.; YING, X.; ZHANG, Y.; JU, R. J.; WANG, X.X.; YAO, H.J.; MEN, Y.; TIAN, W.; YU, Y.;ZHANG, L.; HUANG, R.J.; LU, W.L.; All-trans retinoic acid stealth liposomes prevent the relapse of breast cancer arising from the cancer stem cells. **Journal of Controlled Release**, 149 281–291, 2011.

LIMA, B. D. A produção de insulina humana por engenharia genética. **Biociência & Desenvolvimento**, nº 23, 2001.

LIU, G.; ZHOU, W.; WANG, L.I.; PARK, S.; MILLER, D.P.; XU, L.L.; WAIN, J.C.; LYNCH, T.J.; SU, L.; CHRISTIANI, D.C.MPO and SOD2 polymorphisms, gender, and the risk of non-small cell lung carcinoma. *Cancer Lett*;214:69–79, .2004.

LIU, B.; BIAN, H.J; BAO, J.K. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Lett** 287(1):1–12 2010.

MAEDA, H.; GREISH, K.; FANG, J. The EPR effect and polymeric drugs: a paradigm shift for cancer chemotherapy in the 21st century, **Adv. Polym. Sci.** 193, 103–121, 2006.

MAEDA, H.; BHARATE, G.Y.; DARUWALLA, J. Polymeric drugs and nanomedicines for efficient tumor targeted drug delivery based on EPR-effect. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 71, 409–419, 2009.

MAEDA, H. SMANCS and polymer-conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy, **Adv. Drug Deliv. Rev.** 46,169–185, 2001.

Manojlovic, V; Winkler, K., Bunjes, V., Neub, A., Schubert, R. Bugarski, B., Leneweit, G. Encapsulation of a RIP II protein in liposomes. **XVIth International Conference on Bioencapsulation**, Dublin, Ireland. Sept 4-6, 2008.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS, **Cancer Res.** 46, 6387–6392, 1986.

MELO, C.M; PAIM, B.A.; ZECCHIN, K.G.; MORARI, J.; CHIARATTI, M.R.; CORREIA, M.T.S.;COELHO, L.C.B.; PAIVA, P.M. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. **Mol Cell Biochem**, v. 342, p. 163-9, 2010.

MURAKAMI, S.; ONO, T.; SAKAI, S.; IJIMA, H. KAWAKAMI, K. Effect of Diglucosamine on the Entrapment of Protein into Liposomes. **Journal of Liposome Research**, 16:103–112, 2006.

Nicholas AR, Scott MJ, Kennedy NI, and Jones MN. Effect of grafted polyeth-ylene glycol (PEG) on the size, encapsulation efficiency and permeability of vesicles. **Biochim Biophys Acta** 1463:167–178, 2000.

OLIVEIRA, A.L. O papel dos simbióticos na prevenção, tratamento e modulação da resposta inflamatória em pacientes com carcinoma colorretal. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 4, p. 23 - 31, 2009.

OMARA, E.A., NADA, S.A., FARRAG, A.R.H., SHARAF, W.M., EL-TOUMY, S.A. Therapeutic effect of *Acacia nilotica* pods extract on streptozotocin induced diabetic nephropathy in rat. **Phytomedicine** 19, 1059-1067, 2012.

PARK, J.W. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. **Breast Cancer Res**; 4:95–99, 2002.

PARK, R.; KIM, M. S.; SO, H. S.; JUNG, B. H.; MOON, S. R.; CHUNG, S. Y.; KO, C. B.; KIM, B. R.; CHUNG, H. T. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK 1) in mistletoe lectin II induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1685-1691, 2000.

PATRICIO, B.F.C.; LIMA-RIBEIRO, M. H. M.; CORREIA, M. T. S. , CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; ALBERNAZ, M. S., BARBOZA, T.; SOUZA, S.A.L.; SANTOS-OLIVEIRA, R. Radiolabeling of Cramoll 1,4: Evaluation of the Biodistribution. **International Journal of Peptides**, Volume 2011, Article ID 945397, 3 pages, 2011.

PICK, U. Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixture. **Arch. Biochem. Biophys.**, 212, 186-194, 1981.

PITA , J.C.L.R. Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do trachylobano-360 de *Xylopiya langsdorffiana* st. hil. & tul. (annonaceae). 2010. 105f. **Dissertação** (Mestrado em PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS), Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2010.

PITRUBHAKTA, A.B.; SHINDE, A.J.; JADHAV, N. R. Design, Development and Characterization of PEGylated Liposomes of Gemcitabine Hydrochloride. **Der Pharmacia Lettre**, 4 (1):314-329, 2012.

ROBERT, J.; COHEN, N. Evolution of immune surveillance and tumor immunity: Studies in xenopus immunology. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 166, p. 231-243, 1998.

ROLIM-SANTOS, H. M. L.; QUEIROZ, F. B.; MAIOR, R. M. S.; NASCIMENTO, S.C.; MAGALHAES, N. S. S. Cytotoxicity of doxorubicin-loaded Con A-liposomes.. **Drug Development Research**, v. 67, p. 430-437, 2006.

SCHEUER, P.J.; LEFKOWITCH, J.H. Drugs and toxins. In:Liver Biopsy Interpretation, Scheuer PJ, Lefkowitz JH (eds). **WB Saunders**, 6th edição, London, 134–150p. 2000.

SCHUMANN, G.; BONORA, R.; CERIOTTI, F.; FÉRARD, G.; FERRERO, C.A.; FRANCK, P.F.; HOELZEL, W.; JORGENSEN, P.J.; KANNO, T.; KESSNER, A.; KLAUKE, R.; KRISTIANSEN, N.; LESSINGER, J.M.; LINSINGER, T.P.; MISAKI, H.; MUELLER, M.M.; PANTEGHINI, M.; PAUWELS, J.; SCHIELE, F.; SCHIMMEL, H.G.; VIALLE, A.; WEIDEMANN, G.; SCHUMANN, G. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. **Clin Chem Lab Med**. 2002 Jul; 40(7): 725-33. Erratum in: Clin Chem Lab Med. May; 48(5): 615-621, 2010.

SEKI, T.; FANG, J.; MAEDA, H. Tumor targeted macromolecular drug delivery based on the enhanced permeability and retention effect in solid tumor, in: Y. Lu, R.I. Mahato (Eds.), **Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics**, Springer Publishing Co., New York, pp. 93–120, 2009.

SREELATHA, S., PADMA, P.R., UMASANKARI, E. Evaluation of anticancer activity of ethanol extract of *Sesbania grandiflora* (Agati Sesban) against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Journal of Ethnopharmacology** 134, 984-987, 2011.

SRIWONGSITANONT, S.; UENO, M. Effect of Freeze-Thawing Process on the Size and Lamellarity of PEG-Lipid Liposomes. **The Open Colloid Science Journal**, 4, 1-6, 2011.

SZATROWSKI, T.P.; NATHAN, C.F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. **Cancer Res.** 51(3) :794-798, 1991

TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect, **Adv. Drug Deliv. Rev.** 63, 131–135, 2011.

VAFABAKHSH, Z.; KHOSRAVI-DARANI, K.; KHAJEH, K.; JAHADI, M.; KOMEILI, R.; MORTAZAVIAN, A. M. Stability and catalytic kinetics of protease loaded liposome. **Biochemical Engineering Journal** 72, 11– 17, 2013.

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

VAREJÃO, N.; ALMEIDA, M. S.; DE CICCO, N. N.T.; ATELLA, G. C.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; FOGUEL, D. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). *Biochimica et Biophysica Acta*. **Proteins and Proteomics**, v. 1804, p. 1917-1924, 2010.

VAREJÃO, N.; CORREIA, M. T. S; FOGUEL, D . Characterization of the unfolding process of the tetrameric and dimeric forms of *Cratylia mollis* seed lectin (CRAMOLL 1): effects of natural fragmentation on protein stability. **Biochemistry (Easton)**, v. 50, p. 7330-7340, 2011

WALDE, P.; ICHIKAWA, S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. **Biomolecular Engineering** 18 143–177, 2001.

WANG, CHING-HUA & HUANG, YI-YOU. Encapsulating Protein into Preformed Liposomes by Ethanol-Destabilized Method. **Artificial Cells Blood Substitutes, and Biotechnology**, Vol31, 303-312, 2003.

WEINBERG, R.A. A biologia do câncer. Porto Alegre: **Artmed**. 844p. CAO et al., 2011), 2008.

XU ,X.; COSTA, A.; BURGESS, D.J. Protein Encapsulation in Unilamellar Liposomes: High Encapsulation Efficiency and A Novel Technique to Assess Lipid-Protein Interaction. **Pharm Res**29:1919–1931, 2012.

YEN, M.H.; WENG, T.C.; LIU, S.Y.; CHAI, C.Y.; LIN, C.C. The hepatoprotective effect of Bupleurum kanoi, an endemic plant to Taiwan, against dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. **Biol Pharm Bull.** Mar; 28(3): 442-8, 2005.

6 CONCLUSÕES

- A lectina recombinante rCramoll apresentou-se tão estável quanto pCramoll quando submetida a agitação mecânica e sonicação;
- Foram obtidos lipossomas furtivos pela técnica de congelamento e descongelamento (FAT) com valores de pH, tamanho de partícula e índice de polidispersão adequados para o estudo da atividade antitumoral e estáveis a longo prazo;
- Duas metodologias foram utilizadas para separação da lectina não encapsulada dos lipossomas mostrando a viabilidade dos dois métodos para avaliação da taxa de encapsulação protéica;
- Lipossomas furtivos apresentando eficiências de cerca de 60% de encapsulação da proteína foram formulados;
- Na avaliação *in vivo* rCramol apresentou atividade antitumoral superior a reportada na literatura para lectina da planta em 25% e sua forma encapsulada em lipossomas furtivos promoveu um aumento de 9% em relação a lipossomas convencionais encapsulando pCramoll;
- Análises hematológicas revelaram que a lectina encapsulada em lipossomas promoveu o aumento da concentração de hemoglobina e hemáceas diminuídos significativamente no grupo tratado com a lectina livre;
- Análises bioquímicas verificaram que tanto a lectina livre como encapsulada não apresentou toxicidade para os rins;
- A utilização de rCramoll encapsulada foi capaz de promover um aumento significativo dos níveis de células brancas sugerindo o mesmo potencial imunomodulador apresentado pela lectina da planta;
- Os dados obtidos revelam o potencial antitumoral da lectina recombinante que foi intensificado quando encapsulada em lipossomas furtivos. A expressão heteróloga além de proporcionar uma proteína mais pura sem interferências sazonais proporcionou a síntese de uma macromolécula com maior potencial para futuras aplicações na terapia do câncer.

7 ANEXOS

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A **REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS / *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*** tem por finalidade publicar os seguintes tipos de publicação: **Artigos originais** relacionados com as áreas de conhecimento das Ciências Farmacêuticas, **Trabalhos de atualização ou de revisão**, que serão incluídos quando solicitados a especialistas pela Comissão de Publicações ou quando submetidos em forma de Abstract para avaliação quanto ao interesse. Ressalta-se a necessidade de se incluir visão crítica dos autores, inserindo os seus trabalhos no tema e avaliando em relação ao estado de arte no País. **Notas Prévias** relativas a novas metodologias e resultados parciais, cuja originalidade justifique a publicação rápida. Nesse caso, o limite é de 2.000 palavras, excluindo-se tabelas, figuras e referências. Pode-se incluir, no máximo, uma figura, tabela e 10 referências. **Resenhas** elaboradas por especialistas segundo sugestão da Comissão de Publicações. Suplementos temáticos e aqueles relativos a eventos científicos podem ser publicados mediante aprovação prévia da Comissão de Publicações. Os trabalhos elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros podem ser apresentados em língua portuguesa, inglesa ou espanhola. Devem ser originais e inéditos e destinar-se exclusivamente à **REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS / *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences***.

Escopo e política

Os manuscritos submetidos à Revista, que atenderem as "Instruções aos autores", são encaminhados ao Editor Científico, que indicará dois revisores especialistas no tema abordado (veja Relação dos Consultores - 2003 e gráfico 10). Após a revisão, cujo caráter anônimo é mantido durante todo o processo, os manuscritos são enviados à Comissão de Publicação, que decidirá sobre a publicação. Manuscritos recusados, passíveis de reformulação, poderão ser re-submetidos após reestruturação, como novo trabalho, iniciando outro processo de avaliação. Manuscritos condicionados à reestruturação serão reavaliados pelos revisores. Manuscritos enviados aos autores para revisão devem retornar à Editoria dentro de, no máximo, dois meses, caso contrário terão o processo encerrado.

Forma e preparação de manuscritos

Instruções para apresentação dos trabalhos

1. Estrutura dos originais

1.1. Cabeçalho: constituído por:

- Título do trabalho: deve ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho.

- Autor(es) por extenso, indicando a(s) instituição(ões) a(s) qual(is) pertence(m) mediante números. O autor para correspondência deve ser identificado com asterisco, fornecendo o endereço completo, incluindo o eletrónico. Estas informações devem constar em notas de rodapé.

Resumo e Abstract: Os artigos deverão vir acompanhados do resumo em português e do abstract em inglês. Devem apresentar os objetivos do estudo, abordagens metodológicas, resultados e as conclusões e conter no máximo 250 palavras.

Palavras-chave: Deve ser apresentada uma lista de 3 a 6 termos indexadores em português e inglês, utilizando Tesouro Medline, ou descritores da área da Saúde.

Introdução: Deve determinar o propósito do estudo e oferecer uma breve revisão da literatura, justificando a realização do estudo e destacando os avanços alcançados através da pesquisa.

Material e Métodos: Devem oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo possa ser repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas podem ser apenas referenciadas.

Resultados: Devem oferecer uma descrição clara e concisa dos resultados encontrados, evitando-se comentários e comparações. Não repetir no texto todos os dados contidos nas figuras e tabelas.

Discussão: Deve explorar o máximo possível os resultados obtidos, relacionando-os com os dados já registrados na literatura. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

1.10 Agradecimentos: Devem se restringir ao necessário. O suporte financeiro deve ser incluído nesse item.

1.11 Referências: devem ser organizadas de acordo com as

normas da ABNT NBR-6023, ordenadas alfabeticamente no fim do artigo incluindo os nomes de todos os autores.

A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores.

3.2 Ilustrações: As ilustrações (gráficos, tabelas, fórmulas químicas, equações, mapas, figuras, fotografias, etc) devem ser incluídas no texto, o mais próximo possível das respectivas citações. Mapas, figuras e fotografias devem ser, também, apresentados em arquivos separados e reproduzidas em alta resolução(800 dpi/bitmap para traços) com extensão tif. e/ou bmp. No caso de não ser possível a entrega do arquivo eletrônico das figuras, os originais devem ser enviados em papel vegetal ou impressora a laser.

Ilustrações coloridas somente serão publicadas mediante pagamento pelos autores.

As tabelas devem ser numeradas consecutivamente em algarismos romanos e as figuras em algarismos arábicos, seguidos do título. As palavras TABELA e FIGURA devem aparecer em maiúsculas na apresentação no texto e na citação com apenas a inicial em maiúsculo.

Envio de manuscritos

Os trabalhos devem ser remetidos por correio eletrônico, anexando à mensagem os arquivos correspondentes.

E-mail: rbcf@edu.usp.br

Secretaria de edição:

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 950

Caixa Postal 66083

05315-970 - São Paulo - SP - Brasil

Contato telefônico: Fone: (011) 3091.3804 FAX: (011) 3097.8627