



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

AVALIAÇÃO HISTOQUILUMINESCENTE DE TUMORES CUTÂNEOS UTILIZANDO
LECTINAS CONJUGADAS A ÉSTER DE ACRIDINA

Aluna: Luiza Rayanna Amorim de Lima
Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Co-orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Recife, 2012.

LUIZA RAYANNA AMORIM DE LIMA

**Avaliação histoquimiluminescente de tumores cutâneos utilizando lectinas
conjugadas a éster de acridina**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Co-orientador:

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Recife, 2012.

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Parecer da comissão examinadora da defesa da dissertação de mestrado de

LUIZA RAYANNA AMORIM DE LIMA

**AVALIAÇÃO HISTOQUIMILUMINESCENTE DE TUMORES CUTÂNEOS UTILIZANDO
LECTINAS CONJUGADAS A ÉSTER DE ACRIDINA**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **LUIZA RAYANNA AMORIM DE LIMA** como:

Recife, ____ de novembro de 2011.

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr.
Orientador – Membro interno

Prof. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Membro Interno

Prof. Dr Mário Ribeiro de Melo-Júnior
Membro externo

Lima, Luiza Rayanna Amorim de

Avaliação histoquimiluminescente de tumores cutâneos utilizando lectinas conjugadas a éster de acridina/ Luiza Rayanna Amorim de Lima. – Recife: O Autor, 2012.

73 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Coorientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, Biotecnologia, 2012.

Inclui bibliografia

1. Tumores 2. Carboidratos 3. Histoquímica I. Carvalho Junior, Luiz Bezerra de II. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro III. Título.

571.978

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-101

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, pela vida e força dada para superar todas as dificuldades que apareceram ao longo do caminho.

Aos meus pais e meus avós pelo exemplo que sempre foram para mim e por todo amor, carinho, apoio e compreensão que recebi durante toda minha vida.

Às minhas tias Naide e Leda pelo apoio e confiança que sempre depositaram em mim.

Ao meu irmão, Filipe, pela amizade e companheirismo.

Ao Prof. Luiz Bezerra de Carvalho Junior, pelos ensinamentos, apoio e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, pelo apoio, ensinamentos, confiança e companheirismo em todos os momentos.

Ao meu namorado, Luis Filipe e a sua família pelo apoio, compreensão e companheirismo.

Ao meu amigo Matheus, pelo apoio e ajuda fundamental para realização deste trabalho.

Aos amigos Mariana Cabrera, Vanessa Brustein, Roziana Jordão, Nara Barbosa, Jorge Luiz, Vasco Patú por todo carinho, apoio, dedicação e pela ajuda primordial no desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas amigas de infância Gabriela, Raquel, Maria Christina e Andréa pela grande amizade que dedicaram a mim.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica do LIKA Sinara, Lúcia, Ricardo, Natália, Amanda, Larissa, Camila, Adriana, Fábio, Milena, Isabela e Taciana pela amizade, apoio, estímulo e ajuda presentes desde o início.

Aos amigos do Laboratório de Patologia do LIKA Juliana Vasconcelos, João Quirino, Moacyr Barreto, Juliana Brandão, Marek Ekert, Carmelita Cavalcanti, Marina Cartaxo, Steffany Ferreira, Ana Rosa, Renato Silva, Eduardo Ramalho, Bruno Trajano, Marina Ferraz e Renato Ferreira pela amizade e por terem me acolhido com todo carinho.

Aos amigos que fazem o PPGCB e o LIKA Adenilda, Eliete Rodrigues, Rafael Padilha, Vera, Edson, Moisés, Sr, Otaviano, Ilma e Conceição pela amizade e auxílio concedido sempre que solicitado.

A CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método histoquimiluminescente para avaliação quantitativa da expressão de carboidratos em tumores cutâneos utilizando lectinas conjugadas a éster de acridina (EA). As lectinas Con A, PNA e UEA-I foram conjugadas a EA. A atividade hemaglutinante da lectina-EA foi avaliada e a quimiluminescência quantificada e expressa em Unidades Relativas de Luz (URL). Biópsias de pele normal e de tumores cutâneos (ceratose actínica, ceratoacantoma, carcinoma espinocelular e basocelular) foram incubadas com o conjugado lectina-EA. A emissão de fótons foi quantificada e correlacionada com a marcação de tecidos normais e transformados. Os tumores cutâneos apresentaram uma maior expressão de resíduos de Gal- β (1-3)-GalNAc e uma menor expressão de α -D-glicose/manose e α -L-fucose, evidenciados pelas diferenças nos valores de URL. O método histoquimiluminescente, utilizando lectinas conjugadas a éster de acridina, permitiu a avaliação quantitativa direta da expressão de carboidratos em neoplasias de pele, combinando a especificidade da interação lectina-carboidrato e a sensibilidade dos ensaios quimiluminescentes, contribuindo para eliminar a subjetividade da avaliação histoquímica convencional de carboidratos.

Palavras chaves: carboidratos; Con A; histoquímica; lectinas; PNA; quimiluminescência; tumores cutâneos; UEA-I.

ABSTRACT

The aim this work is development a chemiluminescent histochemistry procedure for the direct quantitative evaluation of carbohydrates expression in cutaneous tumors using lectins conjugated to acridine ester (AE). The lectins Con A, PNA and UEA-I was conjugated to AE. After conjugation, lectin-AE was evaluated regarding the maintenance of its carbohydrate recognition property (hemagglutinating activity) and chemiluminescence quantified and expressed in relative light units (RLU). Biopsies of normal skin and cutaneous tumors (actinic keratosis, keratoacantoma, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma) were incubated with lectin-AE. Photon emission was measured and correlated to the labeling of the normal and transformed tissues. Cutaneous tumors presented a higher expression of β -Gal (1-3)-GalNAc, and lower expression of α -D-glucose/mannose and α -L-fucose residues, evidenced by differences in RLU values. The procedure chemiluminescent histochemistry, using lectins conjugated to acridine ester, allowed the direct quantitative evaluation of carbohydrate expression in tumors of the skin, combining the specificity of lectin-carbohydrate interactions and sensitivity of chemiluminescent assays, contributing to eliminate the subjectivity of conventional histochemical evaluation of carbohydrates.

Keywords: carbohydrates; chemiluminescence; Con A; cutaneous tumors; histochemistry; lectins; PNA; UEA-I.

LISTA DE FIGURAS (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)

Figura		Pág
Figura 1	Imagem histológica da ceratose actínica: queratinócitos ocupando a porção mais baixa da epiderme (seta vermelha); paraceratose (seta verde); ortoceratose (seta azul); folículo piloso (seta amarela); elastose na derme (seta verde claro).	20
Figura 2	Apresentação clínica da ceratose actínica.	21
Figura 3	Imagem histológica da fase proliferativa do Ceratoacantoma.	22
Figura 4	Imagem histológica da fase involutiva do Ceratoacantoma.	23
Figura 5	Ceratoacantoma com placas rosa, bordas elevadas e presença de úlcera crateriforme no centro da lesão.	23
Figura 6	Sequência de eventos que contribuem para o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas após dano por radiação UVB.	25
Figura 7	Imagem histológica do Carcinoma Invasivo de Células Escamosas.	27
Figura 8	Apresentação clínica do Carcinoma Cutâneo de Células Escamosas.	28
Figura 9	Imagem histológica do carcinoma basocelular padrão nodular.	29
Figura 10	Apresentação clínica do carcinoma de células basais.	30
Figura 11	Principais carboidratos envolvidos em importantes funções fisiológicas.	33
Figura 12	Representação esquemática dos carboidratos que participam dos principais eventos fisiopatológicos durante a progressão do tumor.	34

Figura 13	Interações de superfície celular lectina-carboidratos.	36
Figura 14	Representação da estrutura tridimensional da Con A (A), PNA (B) e UEA-I (C).	38
Figura 15	Reação de conjugação do Éster de Acridina modificado com N-hidroxisuccinimida à proteína.	41
Figura 16	Reação de quimiluminescência do Éster de Acridina.	43

LISTA DE FIGURAS (ARTIGO)

Fig		Pág
Fig 1	Con A-AE, UEA-AE and PNA-AE purification profile from a Sephadex G-25 column (10 x 1 cm). Elution was carried out with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2. Fractions (aliquots of 1 mL) were collected and chemiluminescence Con A-AE (A), UEA-AE (C) and PNA-AE (E), and hemagglutinating activity Con A-AE (B), UEA-AE (D) and PNA-AE (F) were assayed	64
Fig 2	Comparison between the chemiluminescence of normal epidermis (NE, n = 15), actinic keratosis (AK, n = 9), keratoacanthoma (KA, n = 13) squamous cell carcinoma (SCC, n = 13) and basal cell carcinoma (BCC, n = 17) labeled with Con A-AE, UEA-AE and PNA-AE	65

LISTA DE TABELAS (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)

Tabela		Pág
	Estimativas para o ano de 2010 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de número de casos novos por câncer, em homens, segundo localização primaria.	
Tabela 1		16
	Estimativas para o ano de 2010 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primaria.	
Tabela 2		16

LISTA DE ABREVIACÕES

CA – Ceratose actínica

CBC – Carcinoma Basocelular

CEC – Carcinoma Espinocelular

CMM – Cirurgia Micrográfica de Mohs

Con A – Concanavalina A

CS – Ceratose Seborréica

EA – Éster de Acridina

FDA – Food and Drug Administration

HAPs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV – Papilomavírus Humano

IGF 1R – Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

KA – Ceratoacantoma

LTA – *Lotus tetragonolobus purpurea* agglutinin

NMSC – Nonmelanoma Skin Cancers

PNA – Peanut agglutinin

QL – Quimiluminescência

ROS – Reactive oxygen species

UEA-I – *Ulex europaeus* agglutinin

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	Câncer de pele não melanoma (NMSC).....	15
2.1.1	<i>Ceratose Actínica (CA)</i>	19
2.1.2	<i>Ceratoacantoma (KA)</i>	21
2.1.3	<i>Carcinoma de Células Escamosas (CEC)</i>	26
2.1.4	<i>Carcinoma de Células Basais (CBC)</i>	28
2.2	Glicosilação e câncer	30
2.3	Lectinas	35
2.3.1	<i>Aplicações</i>	38
2.4	Quimiluminescência.....	40
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
4.	OBJETIVOS.....	55
4.1	Geral.....	55
4.2	Específicos	55
5.	ARTIGO: CHEMILUMINESCENT QUANTITATIVE HISTOCHEMISTRY DETERMINATION OF CUTANEOUS TUMORS GLYCOPHENOTYPE.....	56
6.	CONCLUSÕES	73

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas (INCA, 2011).

O câncer de pele é o tipo de neoplasia mais freqüente, correspondendo a cerca de 25% de todos os tumores malignos registrados no Brasil. Quando detectado precocemente, este tipo de câncer apresenta altos percentuais de cura. Os tratamentos se baseiam em excisão cirúrgica, crioterapia, radiação ionizante e quimioterapia tópica (INCA, 2009).

As neoplasias cutâneas estão relacionadas a alguns fatores de risco, como raça, idade, gênero, exposição crônica a agentes mutagênicos (químicos e físicos), processo irritativo crônico (úlceras de Marjolin), genodermatoses (xeroderma pigmentosum), fatores genéticos e, principalmente, a exposição excessiva à radiação ultravioleta (UV), em especial ao ultravioleta tipo B (UVB) (OGDEN; TELFER, 2009).

Os neoplasmas cutâneos podem ser classificados em dois grandes grupos: melanoma e câncer de pele não-melanoma. O último grupo inclui, principalmente, os carcinomas basocelular (CBC) e espinocelular ou de células escamosas (CEC), ceratoacantoma (KA) e ceratose actínica (CA). Estes tumores apresentam crescimento rápido, quando diagnosticados e tratados tardiamente podem ser funcionalmente destrutivos (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2011).

Alterações na expressão de glicosiltransferases e glicosidases, enzimas que determinam os padrões de glicosilação de lipídeos e proteínas, podem desencadear uma

cascata de eventos que estão envolvidos na transformação oncogênica das células (BLOMME et al., 2009).

Os glicanos coordenam importantes atividades biológicas, tais como, interações proteína-proteína, transporte e dobramento de proteínas, reconhecimento imunológico, adesão e migração celular, e sinalização entre células (ZENG et al., 2010). O processo de glicosilação é severamente alterado durante a transformação oncogênica de células animais (HAKOMORI, 1996). Alterações na estrutura e/ou na distribuição de glicanos estão relacionadas às características de malignidade do tumor, como proliferação e crescimento das células tumorais, capacidade de invasão e de metástase, angiogênese e silenciamento do sistema imune (FUSTER; ESKO, 2005). Portanto, a investigação das interações lectina-carboidrato torna-se necessária para a compreensão da origem histogenética e o comportamento do tumor durante a sua diferenciação, e confirma a hipótese de que mudanças bioquímicas na célula são eventos que podem sinalizar a morfodiferenciação celular (HERLING et al., 2000).

Lectinas são glicoproteínas de origem não imunológica que possuem a habilidade de se ligar especificamente a mono ou oligossacarídeos de forma reversível (HONG et al., 2001) e atuam como moléculas de reconhecimento dentro das células, na superfície celular e em fluídos fisiológicos (SOUZA et al., 2001).

Na histoquímica, lectinas com diferentes especificidades a carboidratos podem fornecer um sistema de detecção sensível para mudanças na expressão de carboidratos (MELO-JÚNIOR et al., 2008). Esta ferramenta tem sido utilizada para mostrar diferenças no padrão glicosilação celular durante diversas doenças tais como, infecções por patógenos (MELO-JÚNIOR et al., 2008), colite ulcerativa (MELO-JÚNIOR et al., 2004), tumores cutâneos (MELO-JÚNIOR et al., 2006), carcinoma mucoepidermóide de glândula

parótida (SOBRAL et al., 2010), tumor meningotelial (BELTRÃO et al., 2003), carcinoma ductal invasivo (KOROURIAN et al., 2008) e carcinoma prostático (LIMA et al., 2010)

Quimiluminescência (QL) é definida como a emissão de radiação eletromagnética, geralmente na faixa do visível - infravermelho próximo, produzida por uma reação química (GARCIA-CAMPAÑA et al., 2003). A aplicação da QL na química analítica depende da acoplagem da substância de interesse a um dos participantes da reação quimiluminescente ou ao produto no estado excitado. A concentração da amostra desconhecida será proporcional à produção de luz total emitida (CAMPBELL et al., 1985). O éster de acridina (EA) tem sido introduzido em imunoenaios a partir da necessidade de substituir os marcadores radioisótopos devido à sua curta meia vida, ao perigo potencial à saúde e aos problemas quanto aos dejetos gerados (WEEKS et al., 1986).

A sensibilidade, a possibilidade de quantificação, a escala dinâmica e a diversidade dos ensaios quimiluminescentes, largamente empregados na revelação de proteínas, ácidos nucleicos (KRICKA, 2003) e, atualmente, carboidratos (CAMPOS et al., 2006), tornam a “histoquimiluminescência” uma importante ferramenta auxiliar na histoquímica dos tumores cutâneos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer de pele não melanoma (NMSC)

Câncer de Pele Não-Melanoma (NMSC) é originado das células epidérmicas e constituem uma categoria que engloba todos os tipos de cânceres de pele, excetuando os melanomas, sendo os mais incidentes na população brasileira. Estes tumores são classificados como carcinoma basocelular (CBC), carcinoma espinocelular ou de células escamosas (CEC), ceratoacantoma (KA), ceratose actínica (CA) e ceratose seborréica (CS). É tipicamente encontrado na cabeça, no pescoço, na face e nos braços, mas pode ocorrer em qualquer região do corpo. Estes neoplasmas são raramente fatais, entretanto são considerados tumores de crescimento rápido e quando diagnosticados e tratados tardiamente podem ser funcionalmente destrutivos. Estima-se que o câncer de pele não melanoma esteja em alta e que um milhão de casos irão ocorrer a cada ano. Estudos demonstram que 40 a 50% das pessoas nos EUA que viverem até 65 anos terão câncer de pele não melanoma (DERGHAM et al., 2004).

Segundo o INCA, no Brasil, o NMSC continua sendo o tipo mais incidente para ambos os sexos (114 mil casos novos). O número de casos novos estimado para o Brasil no ano de 2010 foi de 53.410 entre homens e de 60.440 nas mulheres, correspondendo a um risco estimado de 56 casos novos a cada 100 mil homens e 61 para cada 100 mil mulheres (Tabelas 1 e 2).

Os tumores cutâneos são os mais incidentes em homens na maioria das regiões do Brasil, exceto na região Centro-Oeste, prevalecendo o câncer de próstata. Nas mulheres são os mais freqüentes nas regiões Sul, Centro-Oeste, Nordeste e Norte. Os carcinomas basocelulares e de células escamosas são os dois tipos mais frequentes de câncer de pele não melanoma. A Sociedade Americana de Câncer estimou, em 2007, mais de um milhão de casos de CBC e CEC (INCA, 2009).

Tabela 1. Estimativas para o ano de 2010 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de número de casos novos por câncer, em homens, segundo localização primária.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	52.350	53,84	14.050	66,25
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.800	18,37	4.980	23,53
Estômago	13.820	14,25	3.490	16,48
Cólon e Reto	13.310	13,73	4.570	21,61
Cavidade Oral	10.330	10,64	2.920	13,74
Esôfago	7.890	8,12	1.610	7,37
Leucemias	5.240	5,40	1.440	6,84
Pele Melanoma	2.960	3,04	850	3,72
Outras Localizações	59.130	61,01	18.590	87,67
Subtotal	182.830	188,66	52.500	247,59
Pele não Melanoma	53.410	55,12	11.880	55,97
Todas as Neoplasias	236.240	243,77	64.380	303,50

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Tabela 2. Estimativas para o ano de 2010 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	49.240	49,27	17.540	74,56
Colo do Útero	18.430	18,47	5.280	22,50
Cólon e Reto	14.800	14,80	5.530	23,54
Traqueia, Brônquio e Pulmão	9.830	9,82	3.130	13,37
Estômago	7.680	7,70	2.340	9,94
Leucemias	4.340	4,33	1.330	5,52
Cavidade Oral	3.790	3,76	1.090	4,48
Pele Melanoma	2.970	2,92	860	3,38
Esôfago	2.740	2,69	660	2,55
Outras Localizações	78.770	78,83	28.510	121,33
Subtotal	192.590	192,74	66.270	282,03
Pele não Melanoma	60.440	60,51	12.800	54,45
Todas as Neoplasias	253.030	253,23	79.070	336,52

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

A maioria dos cânceres de pele ocorre devido à exposição excessiva à radiação ultravioleta (UV), , em especial ao ultravioleta tipo B (UVB) a qual promove mutações em proto-oncogenes e/ou genes supressores do tumor p53 formando dímeros de timina

(RICOTTI et al., 2009). Falhas na reparação destas mutações podem resultar na formação do tumor (GROSSMAN; LEFFELL, 1997).

Outros fatores de risco incluem: cor da pele; idade; gênero; exposição crônica a agentes mutagênicos, como por exemplo, raios X, gama e grenz, (ALAM; RATNER, 2001), e exposição ao alcatrão (WEEDON, 2003), arsênico e Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) (ALAM; RATNER, 2001); processo irritativo crônico (OGDEN; TELFER, 2009), fatores genéticos (albinismo) e genodermatoses (WONG; STRANGE; LEAR, 2003).

Além disso, o estado de imunossupressão, traumas e queimaduras (WEEDON, 2003), infecções pelo Papilomavírus Humano (HPV) (BUTANI et al., 2005), dietas com baixa ingestão de gordura e baixo consumo de vitaminas (MALONEY, 1996; DAVIES et al., 2002; GRANGER et al., 2006) são fatores que podem contribuir para o desenvolvimento de tumores cutâneos

No Brasil, a ceratose actínica é a doença de pele mais frequentemente diagnosticada pelos dermatologistas em pacientes do sexo masculino com mais de 40 anos (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2011). Estima-se que na Europa Ocidental 23% da população é diagnosticada com este tipo de lesão. Entretanto, na Austrália a ceratose actínica é bastante comum atingindo 60% dos indivíduos acima de 40 anos de idade (SMITS; MOOR, 2009). Segundo Cockerell (2000) CA e CEC representam a mesma lesão em diferentes estágios de evolução, considerando a ceratose actínica como o estágio mais precoce. Outros estudos computam que 20 a 25% dos casos de ceratose evoluem para carcinoma (DERGHAM et al., 2004).

Dados sobre a incidência do ceratoacantoma são incertos, pois 50% dos casos envolvem espontaneamente. Entretanto, sabe-se que este tipo de lesão ocorre,

principalmente, em pessoas de pele clara com idade entre 50 e 69 anos. Sua incidência está ligeiramente aumentada em homens numa razão de 3:1 (RICOTTI et al., 2009).

Segundo a Sociedade Brasileira de Dermatologia (2011), o CEC é o segundo de tipo de câncer mais frequente, correspondendo 20% do total de tumores malignos registrados no Brasil. A ocorrência de CEC é maior em homens acima de 60 - 70 anos de idade (PETTER; HAUSTEIN, 2000). Estudos epidemiológicos relatam que desde 1960 a incidência global do carcinoma espinocelular aumenta anualmente. Presume-se que dois fatores estão relacionados ao aumento: alterações nos hábitos de exposição ao sol e a depleção na camada de ozônio. Apesar da baixa taxa de mortalidade do CEC (INCA, 2009), a sua morbidade é significativamente elevada, provocando incapacitação por desfiguramento (POULSEN et al., 2003). O carcinoma espinocelular tem comportamento biológico que permite, além da recorrência local, a ocorrência de metástases linfáticas e em órgãos à distância (CHERPELIS; MARCUSEN; LANG., 2002).

No Brasil, o carcinoma basocelular é a mais frequente das neoplasias cutâneas, representando 70% do total de casos (INCA, 2011). Sua ocorrência é mais comum em homens (após 40 anos de idade) do que em mulheres, numa proporção 2:1 (STAPLES; MARKS; GILES, 1998). O risco médio para caucasianos desenvolverem CBC é de aproximadamente 30% (LEAR; SCHMITH, 1997), principalmente indivíduos com cabelos loiros ou ruivos, olhos claros e que apresentam queimaduras, e não bronzeamento, quando expostos ao sol (GREEN et al., 1996). Entretanto, Nouri e colaboradores (2002) relataram casos de CBC em indivíduos de pele escura, incluindo descendentes africanos.

A prevenção do câncer de pele, inclusive os melanomas, inclui ações de prevenção primária, por meio de proteção contra luz solar, que são efetivas e de baixo custo. Em geral, as lesões possuem índices de cura superiores a 95% quando tratados precoce e corretamente (INCA, 2011).

Diversos tipos de tratamentos para os NMSCs têm sido descritos, como por exemplo, excisão cirúrgica, crioterapia, radiação ionizante, terapia fotodinâmica e quimioterapias tópicas. A escolha do tratamento depende, principalmente, do tipo de neoplasia, da preferência do paciente e do custo (RICOTTI et al., 2009).

Ceratose Actínica (CA)

O termo “ceratose actínica” significa crescimento ceratótico (espesso, escamoso) causado por um dano induzido por radiação eletromagnética, incluindo luz solar. Outras fontes de radiação, tais como fontes de luz artificial, incluindo camas de bronzamento, e radiação ultravioleta, podem causar o desenvolvimento deste tipo de lesão.

A ceratose actínica tem sido conceituada por dermatologistas como uma lesão pré-neoplásica com a proliferação de queratinócitos atípicos. Alguns pesquisadores afirmam que CA pode representar uma forma intra-epitelial do carcinoma de células escamosas mantidas sob vigilância imunológica do organismo, permanecendo estático ou regredindo espontaneamente (OGDEN; TELFER, 2009).

Histopatologia

Histologicamente a ceratose actínica caracteriza-se por alterações epidérmicas de caráter atrófico e distrófico, associadas à degeneração hialina do colágeno da derme superficial subjacente. A camada espinhosa da pele é irregular, com zonas atróficas alternando com zonas hiperplásicas, e presença de várias depressões digitiformes. A superfície coberta por hiperkeratose orto e paraceratósica é irregular, por vezes papilomatosa. As células da camada espinhosa, quer do corpo mucoso quer da camada

basal, perdem gradualmente as suas características normais, ou seja, são de maior volume, tem citoplasma mais claro, núcleos irregulares e maior número de mitoses (ESTEVES, BAPTISTA e RODRIGO, 1980) (Figura 1).

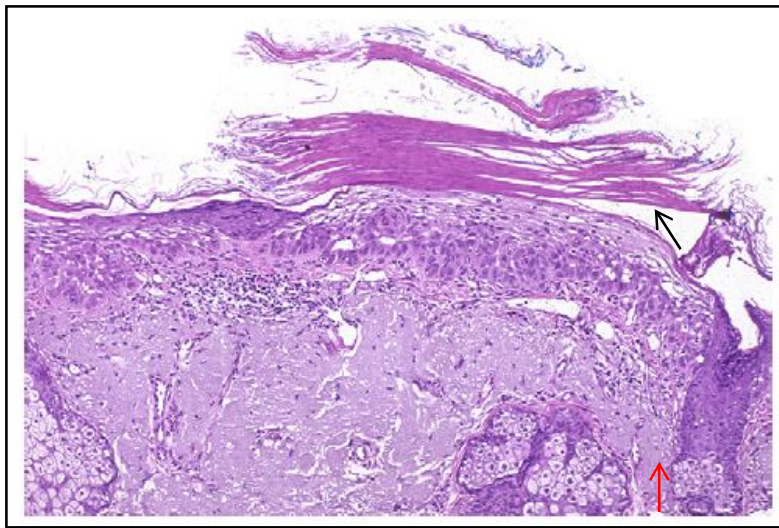


Figura 1. Imagem histológica da ceratose actínica (magnificação original 200x): presença de paraceratose (seta preta) e elastose solar da derme (seta vermelha). Presença de infiltrado inflamatório.

Fonte: RICOTTI et al., 2009.

Manifestações clínicas

Manifesta-se, de início, por pequena mancha acastanhada de limites irregulares, mal marcados, plana ou ligeiramente saliente, de superfície lisa ou um pouco rugosa e ceratósica (Figura 2). Após alguns anos de evolução, a lesão espessa-se, infiltra-se, os bordos tornam-se mais elevados e nítidos, o centro erosiona-se ou cobre-se com espessa camada córnea (papiloma córneo) adquirindo as características dos carcinomas de células escamosas ou dos basocelulares (ESTEVES, BAPTISTA e RODRIGO, 1980).



Figura 2. Apresentação clínica da ceratose actínica.

Fonte: RICOTTI et al., 2009.

Ceratoacantoma (KA)

O termo ceratoacantoma foi primeiramente descrito como “úlceras crateriformes da face” por Sir Jonathan Hutchinson em 1889. O KA é um tumor cutâneo crateriforme derivado da bainha epitelial externa dos folículos pilosos, que pode ser confundido com o carcinoma espinocelular, entretanto caracteriza-se por ciclo evolutivo de crescimento rápido e regressão espontânea.

Este tipo de tumor apresenta-se como lesão solitária ou múltiplas lesões, de forma esporádica ou em uma síndrome hereditária, ou ainda em associação com doenças inflamatórias. Histologicamente, pode ter características diferentes dependendo da apresentação clínica, e alguns tipos podem realizar metástase (KO, 2010).

Histopatologia

Há três estágios na história natural dos ceratoacantomas: a fase proliferativa, a fase de maturidade e a fase involutiva.

Segundo Ricotti et al. (2009), na fase proliferativa (2 a 10 semanas), observa-se invaginação da epiderme atrofiada originando-se de folículos pilosos e preenchida por lâminas de queratina. Pode haver numerosas figuras de mitose e infiltrado inflamatório dérmico (Figura 3).

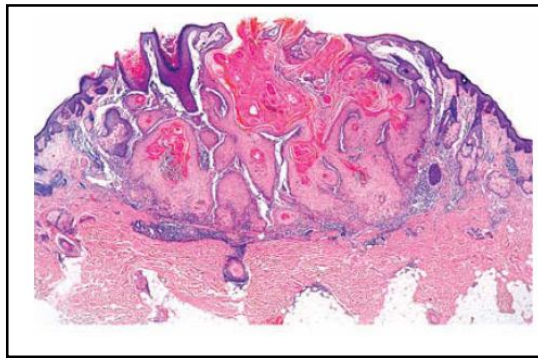


Figura 3. Imagem histológica da fase proliferativa do Ceratoacantoma (magnificação original 100x).

Fonte: TAN e LEE, 2009.

Na fase de maturidade o ceratoacantoma apresenta depressão central crateriforme preenchida de queratina (ortoceratósica) e cuja abertura é bem limitada por um esporão formado pela invaginação da epiderme atrofiada que recobre lateralmente a massa tumoral. A diferenciação ceratósica é bem evidente, as mitoses e as anomalias nucleares são relativamente numerosas. Nesta fase, a queratinização das células escamosas é intensa resultando em aspecto eosinofílico pálido. A proliferação displásica não ultrapassa o nível das glândulas sudoríparas. O infiltrado inflamatório do estroma é relativamente

denso, linfocitário, com eosinófilos no início e posteriormente com plasmócitos (Figura 4) (ESTEVEZ; BAPTISTA; RODRIGO, 1980).

A fase involutiva ocorre após 3 ou 4 meses e se caracteriza pela reabsorção do tumor e expulsão do plug central de queratina. A derme adjacente ao epitélio exibe aspecto de tecido de granulação seguido de fibrose (Figura 5). O mecanismo de regressão parece ser devido, em parte, à manutenção das relações entre a derme e os folículos pilosos (ciclo evolutivo dos pêlos) e a mecanismos imunológicos desencadeados pela reação proliferativa e displásica (ESTEVEZ; BAPTISTA; RODRIGO, 1980).

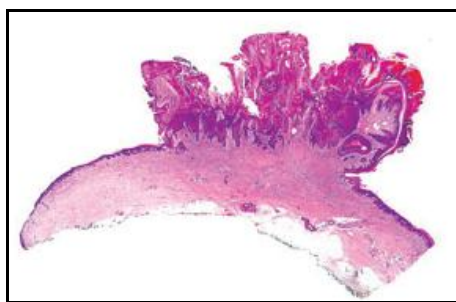


Figura 4. Imagem histológica da fase de maturidade do Ceratoacantoma (magnificação original 100x).

Fonte: TAN e LEE, 2009.

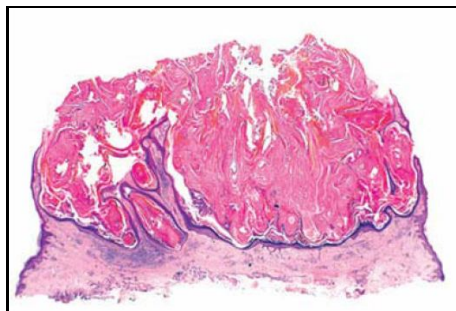


Figura 5. Imagem histológica da fase involutiva do Ceratoacantoma (magnificação original 100x).

Fonte: TAN e LEE, 2009.

A importância do conhecimento do ceratoacantoma reside no seu diagnóstico diferencial com o carcinoma espinocelular, tumor biologicamente maligno caracterizado pelo potencial de progressão e destruição tecidual. De modo geral, o exame clínico fornece elementos diferenciais: desenvolvimento rápido em 3 ou 4 semanas; características morfológicas típicas; ausência de infiltração profunda; tendência involutiva após o 3º ou 4º mês (TAN; LEE, 2009).

Contudo, alguns casos, com aspectos clínicos e histológicos atípicos são de difícil diferenciação, levantando o problema de transformação carcinomatosa. Esta, embora rara, é possível, em especial nos ceratoacantomas múltiplos (TAN; LEE, 2009).

Apesar da semelhança entre as características celulares do KA e do CEC, a arquitetura do tumor pode funcionar como uma ferramenta valiosa na distinção das lesões. Outro fator importante a ser analisado na diferenciação é a capacidade de invasão dos tumores. Excisões de ceratoacantoma não estão associadas com elevado risco de comportamento agressivo. Entretanto a presença de invasão profunda é característica marcante do carcinoma de células escamosas. Quanto ao padrão macroscópico, os KAs tendem a ser tanto exofíticos quanto endofíticos com cratera central de queratina, enquanto o CEC é predominantemente endofítico apresentando frequente ulceração. A cratera é cercada por “lábios” epiteliais, os quais estão ausentes no CEC. Abscessos intraepidérmicos, com células acantolíticas e leucócitos polimorfonucleares são bastante comuns no KA e raramente vistos no carcinoma espinocelular (SCHWARTZ, 1994).

Manifestações clínicas

Ceratoacantoma inicia-se por pequena lesão ceratósica e saliente de crescimento rápido (3 a 4 semanas). São usualmente solitários, centrado por zona arredondada

hiperceratósica, em forma de cúpula com nódulos rosa, de 0,5 a 2,0 cm de diâmetro (atingindo grandes dimensões), de limites nítidos e regulares (Figura 6) (WEEDON, 2003).



Figura 6. Ceratoacantoma com placas rosa, bordas elevadas e presença de úlcera crateriforme no centro da lesão.

Fonte: RICOTTI et al., 2009.

Após 2 a 3 meses de evolução, inicia-se a fase involutiva, com aumento de diâmetro da zona central ceratósica, a massa córnea é eliminada, os bordos da lesão esbatem-se gradualmente. A cicatriz é ligeiramente deprimida, lisa, limitada por vezes por bordo filiforme que persiste. O tempo total de evolução espontânea é, em geral, de 3 a 6 meses (ESTEVES; BAPTISTA; RODRIGO, 1980).

O KA é geralmente solitário, mas múltiplas lesões podem ocorrer. Existem diversos tipos especiais morfológicos, dentre eles: KA centrífugo, KA gigante, KA subungueal, KA intraoral e de membranas mucosas, KA eruptivo generalizado, KA múltiplo, etc. Os subtipos morfológicos especiais não foram incluídos no presente estudo.

Carcinoma de Células Escamosas (CEC)

O Carcinoma de Células Escamosas ou Carcinoma Espinocelular (CEC) é um tumor maligno que surge na epiderme através da proliferação descontrolada de queratinócitos transformados (DOOLEY et al., 2003; GARCIA- ZUAZAGA; OLBRICHT, 2008).

Histopatologia

Existem múltiplos subtipos de CEC que diferem entre si quanto à histopatologia e ao prognóstico. Entretanto, a forma convencional do carcinoma espinocelular consiste em proliferação irregular e anárquica de queratinócitos atípicos, ricos em anomalias nucleares e mitoses. O CEC também apresenta acentuado componente estromal com invasão perineural, formação de pérolas de queratina e de pontes intercelulares (Figura 7). O tumor é formado por massas ou trabéculas de dimensões muito diversas, de limite mal marcado e em contato, mais ou menos extenso, com a superfície malpighiana, invadindo a derme (ESTEVES; BAPTISTA; RODRIGO, 1980; GURUDUTT; GEDEN, 2010).

Todos os aspectos intermediários podem ser observados, entre as formas muito diferenciadas, ricas em pérolas de queratina, e as formas quase completamente indiferenciadas ou anaplásicas, as quais são dificilmente diferenciáveis das células conjuntivas. De modo geral, admite-se que quanto mais elevado for o grau de diferenciação melhor é o prognóstico.

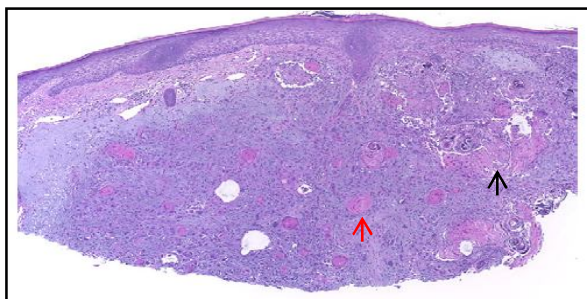


Figura 7. Imagem histológica do Carcinoma Invasivo de Células Escamosas (magnificação original 100x). Presença de células epiteliais escamosas que surgem na epiderme e estende-se profundamente na derme (seta preta). Nesta lesão observa-se a presença de pérolas córneas (seta vermelha).

Fonte: RICOTTI et al., 2009.

Manifestações clínicas

O CEC surge em regiões danificadas pelo sol, principalmente na cabeça e pescoço. Inicialmente, as lesões apresentam-se como pápulas vermelhas escamosas. Posteriormente, evoluem para placas ou nódulos firmes, lisos ou hiperkeratóticos, com ulceração presente (Figura 8). Pacientes podem descrever essas lesões como feridas pruriginosas ou dolorosas, que sagram quando traumatizadas (ALAM; RATNER, 2001; GARCIA-ZUAZAGA; OLBRICHT, 2008).



Figura 8. Apresentação clínica do Carcinoma Cutâneo de Células Escamosas.

Fonte: GARCIA-ZUAZAGA; OLBRICHT, 2008.

Carcinoma de Células Basais (CBC)

O carcinoma de células basais ou carcinoma basocelular (CBC) é o tumor maligno cutâneo localmente invasivo com maior incidência em indivíduos de pele clara (TELFER; COLVER; BOWERS, 1999). As células neoplásicas originam-se de células epiteliais imaturas pluripotentes da camada basal da epiderme e mais raramente de partes do complexo cutâneo pilo-sebáceo ou outros apêndices cutâneos (SAMPAIO, 2000).

Histopatologia

As diferentes variedades clínicas dos carcinomas basocelulares têm características citológicas e arquiteturais comuns, bastante típicas.

As células tumorais possuem citoplasma reduzido, mal limitado, com núcleo oval ou arredondado, muito basófilo com mitoses numerosas. A arquitetura do tumor resulta do modo de agrupamento das células em massas arredondadas ou alongadas e trabeculares, mais ou menos anastomosadas entre si, de dimensões variáveis, densas, muito basófilas, cujos limites são nítidos. Na periferia, as células tomam forma alongada, dispondo-se perpendicularmente à linha de delimitação, em paliçada, lembrando a camada basal epidérmica. As “ilhas” de células basalóides estão em contato com a epiderme suprajacente (Figura 9), ulcerada ou não, ou com a bainha epitelial externa dos folículos pilosos, ou ainda mostram-se dispersa na derme (ESTEVES; BAPTISTA; RODRIGO, 1980).

Admite-se que os carcinomas basocelulares são tumores originados de células epiteliais imaturas pluripotentes da camada basal da epiderme. Deste modo, de acordo com a maior ou menor diferenciação celular, e conforme as relações entre o tecido

epitelial e a derme circundante, observam-se diversas variedades histológicas (MALONEY, 1995).

Manifestações clínicas

Os carcinomas basocelulares exibem vários subtipos diferentes que ocorrem em diferentes localizações anatômicas. Aproximadamente 80% dos casos ocorrem na cabeça e pescoço, e o restante no tronco e membros inferiores, principalmente em mulheres (WONG; STRANGE; LEAR, 2003).

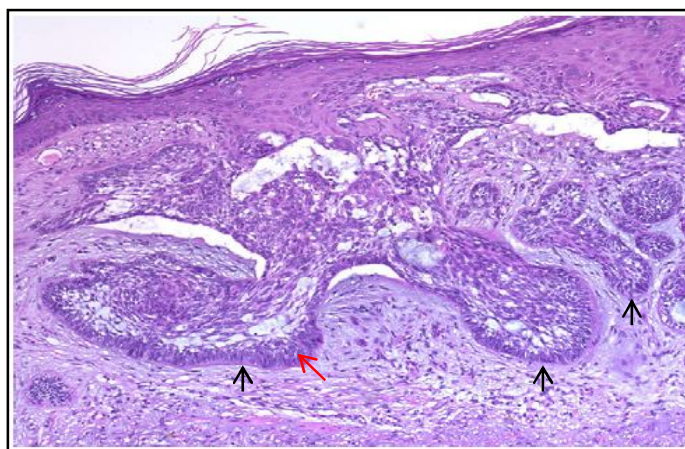


Figura 9. Imagem histológica do carcinoma basocelular padrão nodular (magnificação original 200x). Observa-se a presença de “ilhas” de células basalóides (setas pretas), com disposição em paliçada (seta vermelha) das células na periferia e arranjo desorganizado das células no interior do tumor.

Fonte: RICOTTI et al., 2009.

A apresentação clínica mais comum é o carcinoma basocelular nódulo-ulcerativo, que inicialmente apresenta-se como pápula rósea perlácea crescendo progressivamente a nódulo, com posterior ulceração central, recoberta de crosta, ocorrendo sangramentos

quando traumatizadas (Figura 10). As bordas geralmente são cilíndricas, translúcidas mostrando formações perláceas e eventualmente finas teleangiectasias (SAMPAIO, 2000).

O CBC é um tumor de crescimento lento, entretanto apresenta comportamento biológico agressivo e invasivo, e se negligenciado pode espalhar-se profundamente causando grande destruição nos tecidos adjacentes, como músculo, cartilagem e osso (WONG; STRANGE; LEAR, 2003).



Figura10. Apresentação clínica do carcinoma de células basais. A lesão apresenta grande nódulo com ulceração central, aparência perolada e presença de teleangiectasia.

Fonte: RICOTTI et al., 2009.

2.2Glicosilação no câncer

Os carboidratos são as moléculas orgânicas mais abundantes encontradas na natureza, e a maioria dos organismos sintetiza e metaboliza. A complexa heterogeneidade dos hidratos de carbono em sistemas vivos é o resultado direto de várias características: capacidade dos resíduos de açúcar formar ligações glicosídicas um com os outros, característica estrutural dessas moléculas, tipo de ligação anomérica, a posição e a ausência ou presença de ramificações (MODY; JOSHI; CHANEY, 1995).

É estimado que 50% de todas as proteínas das células dos mamíferos são glicosiladas em um determinado momento (APWEILER; HERMJAKOB; SHARON, 1999). Deste modo, a glicosilação é uma das mais importantes modificações pós-traducionais (MPTs) das proteínas. A adição de carboidratos pode influenciar a carga, a conformação e a estabilidade das proteínas, conferindo heterogeneidade a biomoléculas, tendo como consequência direta o surgimento de várias glicoformas possíveis, ou seja, glicoformas heterogêneas da mesma proteína podem ter propriedades ou atividade biológica diferentes. Os glicanos ligados às proteínas são compostos por sete monossacarídeos diferentes, manose (Man), glicose (Glc), galactose (Gal), N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), fucose (Fuc) e ácidos siálicos (SA) ou ácidos neuramínicos (NeuNAc) (DWEK, 1996; LAZAR et al., 2011).

Os glicoconjugados são componentes estruturais dos receptores de proteínas que transmitem informações entre as células e o ambiente para controlar aspectos fundamentais do comportamento celular (Figura 11), e a variabilidade estrutural e complexidade desses glicanos de superfície celular permitem que os mesmos funcionem como moléculas de sinalização, reconhecimento e adesão celular (SHARON; LIS, 1989; DENNIS; GRANOVSKY; WARREN, 1999).

Os glicanos da superfície celular estão envolvidos em importantes funções fisiológicas, tais como, desenvolvimento embrionário normal, diferenciação e crescimento celular, inibição por contato, reconhecimento célula-célula, interação patógeno-hospedeiro, reconhecimento imunológico, desenvolvimento de doenças, metástase, tráfico, localização e degradação intracelular de biomoléculas e rigidez da membrana (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Todos os tipos de células malignas demonstraram alterações em seus padrões de glicosilação quando comparados às células normais (POWLESLAND et al., 2009). Os

níveis de glicosiltransferases e glicosidases no retículo endoplasmático e aparelho de Golgi determinam os padrões de glicosilação de lipídeos e proteínas (SHARON, 1980). Portanto, alterações na expressão dessas enzimas pode desencadear uma cascata de eventos que estão envolvidos na transformação oncogênica das células (BLOMME et al., 2009).

No microambiente do tumor, alterações na estrutura e/ou distribuição dos carboidratos permitem que as células neoplásicas interfiram em alguns eventos que propiciam a invasão e disseminação de células tumorais pelo organismo (metástase), angiogênese e silenciamento do sistema imune, tais como, ativação de receptores, adesão e motilidade celular (FUSTER; ESKO, 2005).

Vários carboidratos foram reconhecidos como mediadores de eventos fisiopatológicos durante as etapas de progressão do tumor (Figura 12). A progressão tumoral envolve uma série de alterações na sinalização intracelular e intercelular, que promovem a desregulação do ciclo celular e facilitam a proliferação para promover o surgimento de um subconjunto de células invasoras que se dissociam do tumor, digerem a membrana basal e a matriz extracelular e migram para outras regiões. As células tumorais que se dissociam formam uma rede neovascular de células endoteliais do hospedeiro (angiogênese), se aderem a plaquetas, leucócitos ou a células endoteliais dos vasos sanguíneos ou linfáticos para facilitar a evasão do sistema imune inato. Finalmente, uma célula remanescente invade, neovasculariza e se prolifera em um novo tecido (FUSTER; ESKO, 2005).

Girnita e colaboradores (2000) observaram que o tratamento de células neoplásicas do melanoma e do sarcoma com inibidores da N-glicosilação *in vitro* inibiu o crescimento de tumores dependentes da sinalização pelo receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF 1R). A N-glicosilação do IGF 1R é necessária para fosforilação e

translocação desta proteína na superfície celular, e o subsequente crescimento e sobrevivência das células neoplásicas.

Experimentos recentes comprovaram que uma maior expressão da glicoproteína mucina em células de melanoma induz um rápido crescimento celular e a inibição da apoptose das células neoplásicas (KOMATSU et al., 2001).

Dentre as inúmeras técnicas existentes para análise da mudança na composição de glicanos, as lectinas funcionam como eficientes ferramentas para detecção e análise de carboidratos devido ao seu baixo custo e elevada especificidade da interação lectina-carboidrato (BROOKS, 2009).

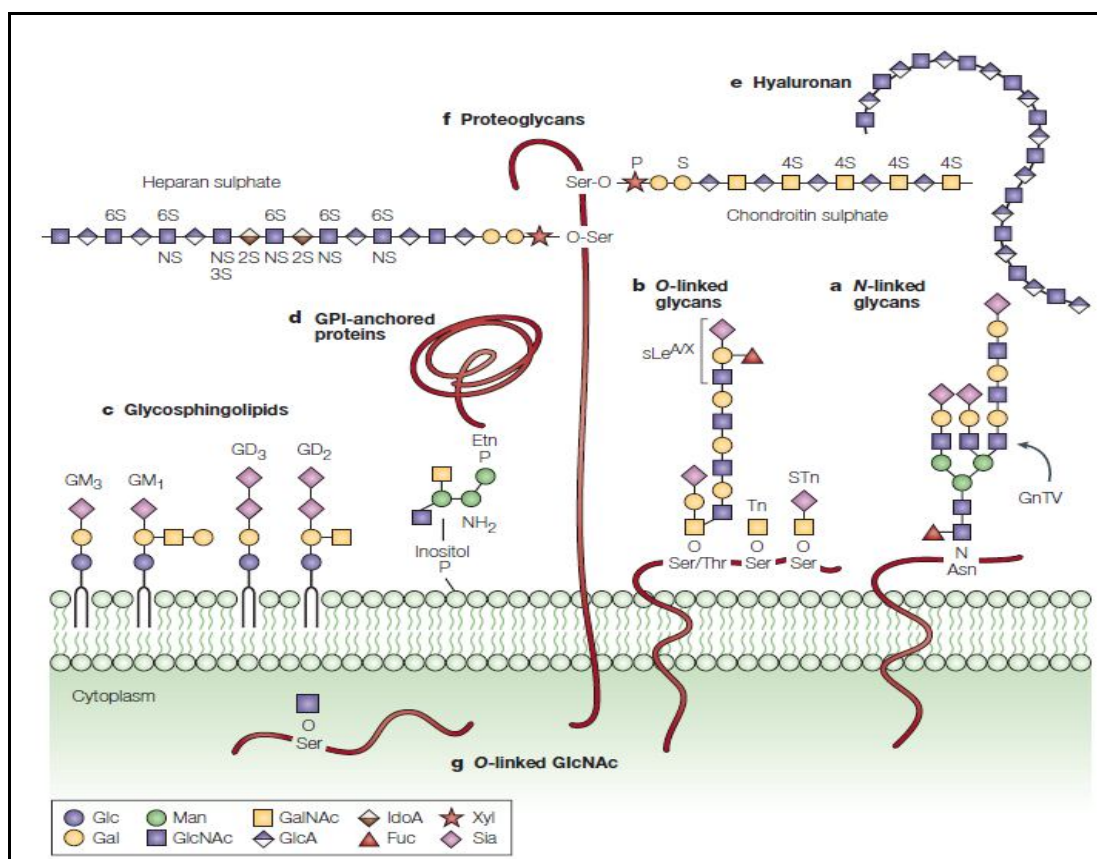


Figura 11. Principais carboidratos envolvidos em importantes funções fisiológicas.

Fonte: FUSTER; ESKO, 2005.

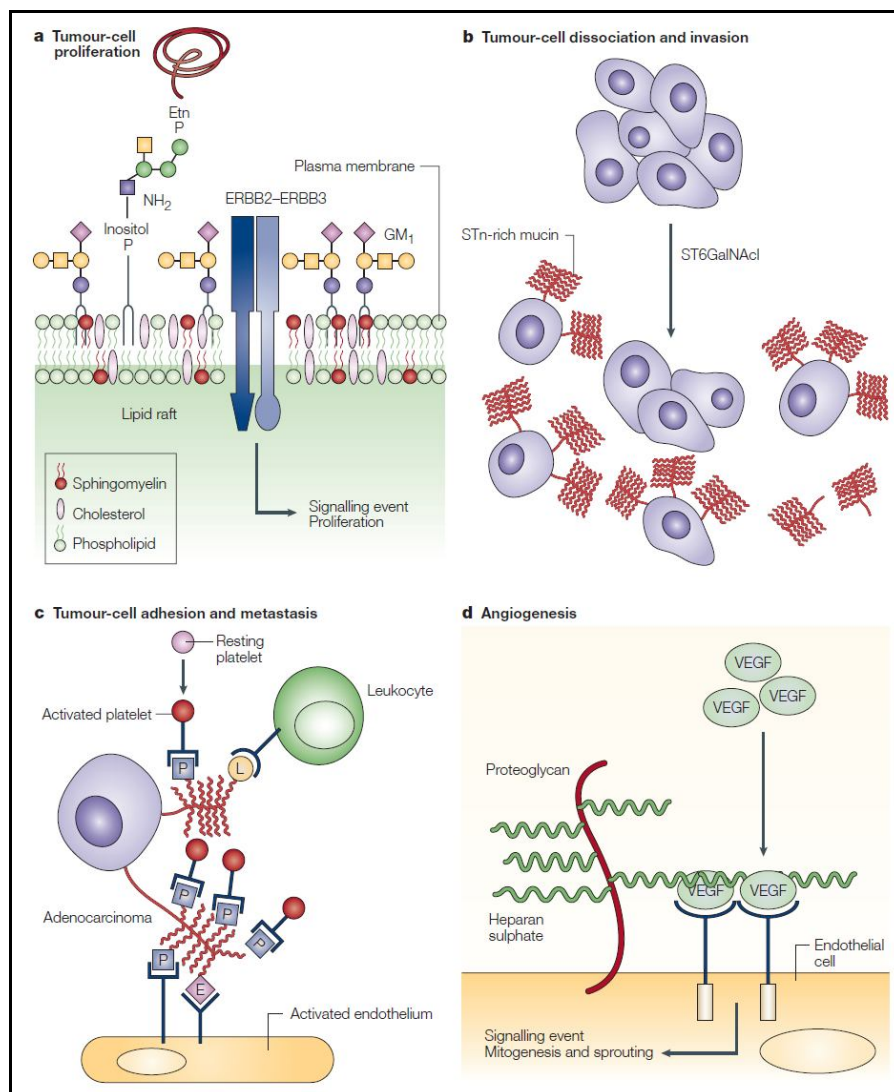


Figura 12. Representação esquemática dos carboidratos que participam dos principais eventos fisiopatológicos durante a progressão do tumor.

Fonte: FUSTER; ESKO, 2005.

2.3 Lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas, de origem não imune, que possuem a habilidade de se ligar especificamente a mono ou a oligossacarídeos de forma reversível, sendo frequentemente encontradas na superfície celular ou em partículas intracelulares (SHARON; LIS, 1989; MODY; JOSHI; CHANEY, 1995; MINKO, 2004; SHARON; LIS, 2004; BOUCKAERT et al., 2005; RABINOVICH et al., 2007). Estas moléculas contêm dois ou mais sítios de ligação a açúcares e podem aglutinar células e/ou precipitar complexos de carboidratos conjugados a proteínas e lipídeos (MODY; JOSHI; CHANEY, 1995).

O termo lectina é derivado da palavra *legere*, cujo significado em latim é “escolher” ou “selecionar”. Os estudos sobre lectinas foram iniciados em 1888, quando Herrmann Stillmark descreveu a capacidade de aglutinação da ricina (KENNEDY et al., 1995). Essas proteínas foram inicialmente encontradas e descritas em plantas, e posteriormente isoladas de microrganismos e animais (SHARON; LIS, 2004).

As lectinas funcionam como mediadores da transferência de informações em sistemas biológicos, exercendo suas funções através da interação com glicoproteínas, glicolipídeos e oligossacarídeos (NILSSON, 2007). Este grupo de proteínas pode ser encontrado em diferentes compartimentos celulares dos organismos, e a sua localização reflete a sua diversidade de função. Lectinas endógenas participam de vários processos biológicos, tais como, reconhecimento célula-célula, interações célula-matriz extracelular, fertilização, desenvolvimento embrionário, crescimento, diferenciação, sinalização, adesão e migração celular, apoptose, imunomodulação e inflamação, interação patógeno-hospedeiro, dobramento e endereçamento de glicoproteínas, indução mitogênica e homeostase (Figura 13) (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

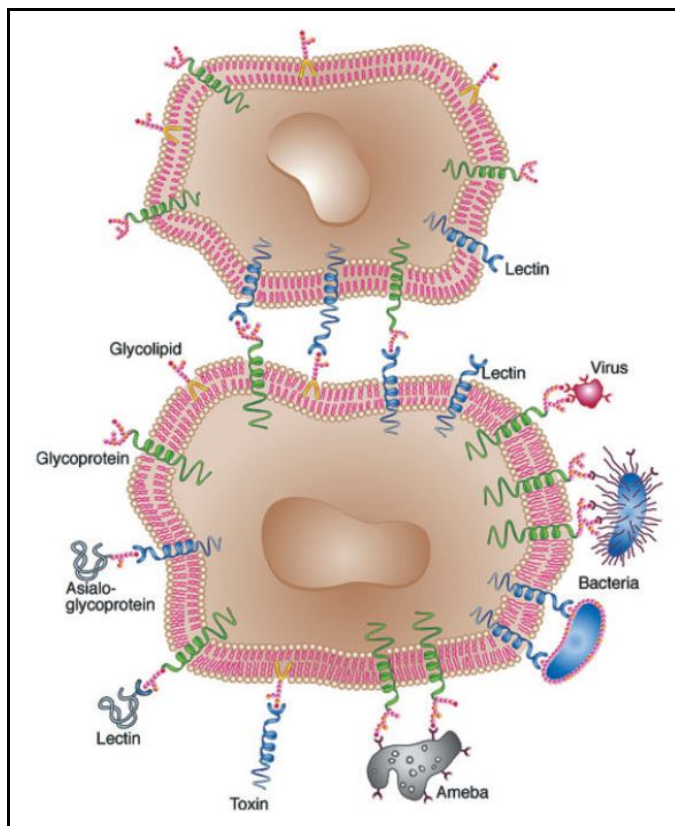


Figura 13. Interações de superfície celular lectina-carboidratos.

Fonte: SHARON; LIS, 2004.

A Concanavalina A (Con A) é uma lectina de origem vegetal, obtidas das sementes de *Canavalia ensiformes* (Família Leguminosae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae) que se liga especificamente às unidades de α -D-manose/glicose de carboidratos complexos. Sua estrutura molecular, reportada por Reeke e colaboradores (1975), é composta por duas subunidades idênticas de 237 resíduos de aminoácidos de 25,5 KDa cada uma (Figura 14A). Ela se apresenta como dímero em pH 4,5 a 6,0, e em pH maior que 7,0, é predominantemente um tetrâmero (DAM; BREWER, 2002).

O reconhecimento dos carboidratos pela Con A ocorre através de ligações do tipo pontes de hidrogênio formadas entre os resíduos de aminoácidos apolares Asn14,

Arg228, Try100 e Asp208 e os átomos de oxigênio do anel glicosídico, formando o chamado “cluster effect”. Além disso, para a molécula de Con A se ligar aos resíduos de carboidratos, dois íons metálicos, Mn^{2+} e Ca^{2+} , devem estar presentes no meio. Cada íon Mn^{2+} está coordenado aos resíduos Glu8, His24, Asp10 e Asp19 da unidade monomérica da lectina, e duas moléculas de água, enquanto o Ca^{2+} está coordenado aos resíduos Asp10, Asp19, Try12 e Arg228, e mais duas moléculas de água (GRIMALDI; SYKES, 1975; LORIS et al., 1998).

A Peanut agglutinin (PNA), lectina isolada do amendoim *Arachis hypogaea*, possui especificidade pela sequência Gal- β (1-3)-GalNAc e apresenta estrutura multimérica (Figura 14B) com quatro monômeros idênticos de ligação a carboidratos com peso molecular de 110 KDa. O nome “peanut agglutinin” foi originado a partir da sua habilidade em aglutinar linfócitos T e hemácias tratadas com a enzima neuraminidase (RAVISHANKAR et al., 2001).

A lectina *Ulex europaeus* agglutinin-I (UEA-I) reconhece especificamente resíduos de α -L-fucose e oligossacarídeos que contêm fucose, como por exemplo, α -L-Fuc (1 $\rightarrow$ 2) β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 4) β -D-GlcNAc (CAZAL; LALAUERIE, 1952), e forma um homotetrâmero (Figura 14C) com peso molecular 63 KDa (MEISSNER et al., 1995). Trabalhos comprovaram que a isoforma UEA-I se liga às células do epitélio olfativo e nasal (HOLMES et al., 1985; TUORI, VIRTANEN e UUSITALO, 1994), córneo-conjuntival (HASSID et al., 1997; MALZ, SCHWARTZ e KUHN, 1999), do trato digestivo e às células M da placa de Peyer (CLARK et al., 1995; KESSIMIAN et al., 1986; SHARMA, SCHUMACHER e ADAM, 1998), na membrana celular de células do carcinoma mucoepidermóide de glândula parótida (SOBRAL et al., 2010) e aos tumores derivados de células endoteliais e epiteliais (MIETTINEN et al., 1983).

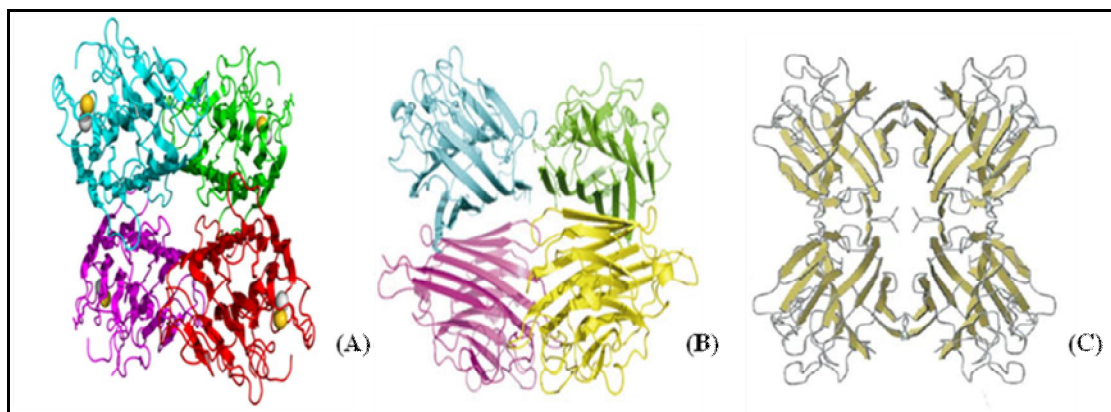


Figura 14. Representação da estrutura tridimensional da Con A (A), PNA (B) e UEA-I (C).

Fonte: LORIS et al., 1998; RAVISHANKAR et al., 2001.

2.3.1 Aplicações

As lectinas são importantes ferramentas para investigação em diversos processos médicos, químicos e biológicos (KARASAKI et al., 2001; OHBA et al., 2003). A distribuição de um grande número de lectinas com diferentes especificidades para carboidratos tem levado à sua utilização como reagentes para explorar essas moléculas, sendo este, o ponto mais importante no avanço de numerosas áreas da biologia celular.

Lectinas são promissores agentes inseticidas e têm sido aplicadas com sucesso no combate de pragas em diversos tipos de colheitas através da inibição da atividade enzimática da larva. Atuam como citotoxinas capazes de induzir a apoptose em células tumorais através da ativação de caspases (LAM; NG, 2011). Possuem a capacidade de inibir a fusão e a replicação do vírus HIV em células CD4 (SWANSON et al., 2010). podem ser utilizadas como moléculas de direcionamento de drogas contra glicoconjugados tumor-específico (MINKO, 2004).

Outras aplicações das lectinas podem ser citadas, tais como, cromatografia de afinidade (LAM; NG, 2011), atividade antimicrobiana (JACK; TURNER, 2003), atividade

mitogênica (BANERJEE et al., 2004), caracterização epidemiológica de parasitas (WU et al., 2001) e terapia antiadesiva (REK; KRENN; KUNG, 2009).

Devido a sua ligação específica, lectinas têm sido empregada como sondas bioquímicas cito e histoquimicamente confiáveis no estudo de diferenças dos glicoconjugados de superfície celular em células normais e malignas, as quais não são detectáveis com anticorpos monoclonais. Entre as que mais se destacam estão a lectina extraída de amendoim – *Peanut Agglutinin* (PNA) – e a lectina extraída da *Cannavalia ensiformis* (Con A) [Herling et al., 2000].

A aplicação das lectinas como instrumento analítico depende da conjugação dessas proteínas a uma substância reveladora, importante para a visualização da ligação lectina-carboidrato. Como exemplo de tais substâncias tem-se: peroxidase com ou sem o sistema de amplificação avidina-biotina (BELTRÃO et al., 1998; ARENAS et al., 1999; BROOKS; WILKINSON, 2003; MELO-JÚNIOR et al., 2004, 2006), substâncias fluorescentes (SANTOS et al., 2006; MELO-JÚNIOR et al., 2008) e quimiluminescentes (CAMPOS et al., 2006).

Desta forma, lectinas têm sido amplamente utilizadas em histoquímica como sondas na detecção de mudanças na glicosilação em fibroadenoma (SANTOS et al., 2006), carcinoma ductal infiltrante de mama (BELTRÃO et al., 1998; BROOKS; CARTER, 2002; CAMPOS et al., 2006), carcinoma cervical (BANERJEE et al., 1995], carcinoma prostático (ARENAS et al., 1999), adenocarcinoma de pulmão (SHIO et al., 2007], câncer de pele (MELO-JÚNIOR et al., 2006), trato gastrointestinal (SCILLITANI et al., 2007).

2.4 Quimiluminescência

A primeira referência ao fenômeno quimiluminescente remonta a 1877, quando Radziszewski observou que a lofina emitia luz verde ao reagir com o oxigênio na presença de uma base forte. Entretanto, o termo “quimiluminescência” só foi introduzido por Wiedemann, em 1888, que classificou o fenômeno da luminescência em seis tipos diferentes de acordo com a sua forma de excitação (GARCÍA-CAMPAÑA; BAEYENS, 2000).

A quimiluminescência é definida como emissão de radiação eletromagnética (UV, visível ou infravermelho) produzida por uma reação química (GARCIA-CAMPAÑA et al., 2003). O fenômeno pode ser observado quando um dos intermediários ou produtos da reação é produzido em estado eletronicamente excitado, que pode emitir radiação ao regressar ao estado fundamental, ou transferir sua energia para outra molécula que, posteriormente, emitirá radiação (CALOKERINOS; DEFTEREOS; BAEYENS, 1995).

Substâncias quimiluminescentes podem ser detectadas na faixa de fentomoles ou atomoles (10^{-15} a 10^{-18} mol), com sensibilidade superior aos ensaios espectrofotométricos (10^{-6} a 10^{-9} mol) e fluorimétrico (10^{-9} a 10^{-12} mol) (CAMPBELL et al., 1985). Vários compostos orgânicos exibem QL em condições apropriadas, dentre os quais se destacam o luminol, isoluminol, éster de acridina ou seus derivados como alguns dos marcadores utilizados em imunoensaios quimioluminescentes (RODA et al., 2000).

A exploração da QL para fins analíticos começou na década de 70, para reações em fase gasosa e, na década seguinte, para reações em fase líquida. Desde então, o número de reações que produzem quimiluminescência descritas na literatura tem aumentado com aplicações analíticas na área biomédica, química, ambiental, alimentar e toxicológica (GARCÍA-CAMPAÑA; BAEYENS, 2000).

A aplicação da QL na química analítica depende da acoplagem da substância de interesse a um dos participantes da reação quimiluminescente ou ao produto no estado excitado (Figura 15). A concentração da amostra desconhecida será proporcional à produção de luz total emitida ou a um parâmetro físico associado à luminescência, tal como cor ou polarização da luz emitida (CAMPBELL et al., 1985).

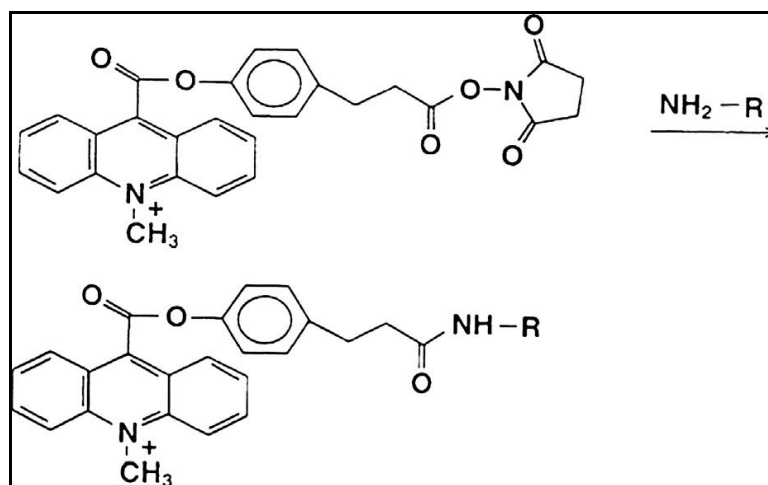


Figura 15. Reação de conjugação do Éster de Acridina, modificado com N-hidroxisuccinimida, à proteína.

Fonte: CAMPOS et al., 2006.

A detecção quimiluminescente apresenta inúmeras vantagens, tais como, baixos limites de detecção (na faixa de fentomoles); simplificação do sistema óptico, uma vez que não necessita de uma fonte de radiação externa; ensaios rápidos; substituição aos radioisótopos, os quais se tornaram poucos populares devido à sua curta meia vida, ao perigo potencial à saúde e aos problemas quanto aos dejetos gerados (GAMIZ-GRACIA et al., 2009).

A QL pode ser utilizada, como método de detecção, em técnicas separativas como cromatografia líquida de alta performance, eletroforese capilar, imunoenaios e biossensores (DODEIGNE et al., 2000), agregando a elevada especificidade destas técnicas com os baixos limites de detecção proporcionados pelos ensaios quimiluminescentes.

Vários sais de acridina podem ser estimulados a produzir luz em presença de solução alcalina de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na ausência de catalisador. Tais compostos incluem os derivados de acridina, moléculas que possuem um nitrogênio quaternário central e uma ramificação no carbono 9 onde está inserido um radical éster fenil instável (WEEKS et al., 1983). A figura 16 ilustra o mecanismo proposto para reação quimiluminescente do EA. Em condições alcalinas, o ânion peróxido de hidrogênio (HOO^-) ataca a molécula de acridina, e a mesma sofre um rearranjo intermolecular formando o intermediário dioxetano (IV). Este composto se decompõe rapidamente produzindo o N-metilacridona (V) que quimiluminesce a 470 nm (KING et al., 2007).

Ésteres de acridina substituíram rapidamente os compostos quimiluminescentes luminol e isoluminol por apresentarem ensaios mais rápidos e maior sensibilidade (KRICKA, 2003). Portanto, essas moléculas têm sido amplamente utilizadas na detecção de DNA, RNA e enzimas, em imunoenaios (KRICKA, 2003), em análise de água (KING et al., 2007) e na histoquímica com lectinas (CAMPOS, et al., 2006).

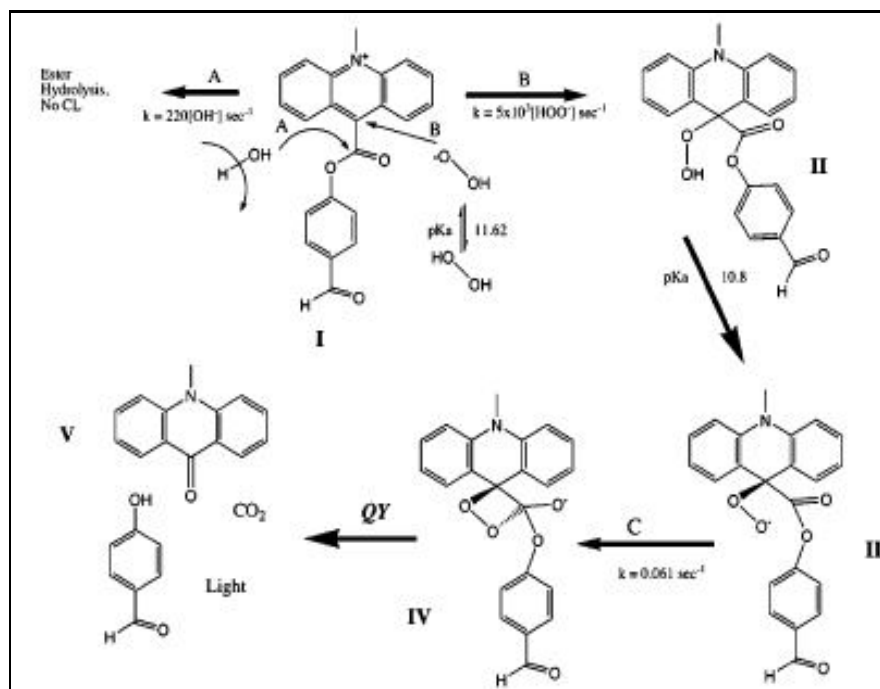


Figura 16. Reação de quimiluminescência do Éster de Acridina.

Fonte: KING et al., 2007.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, M.; RATNER, D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. **N Engl J Med**, v. 344, p. 975-983, 2001.
- APWEILER, R.; HERMIAKOB, H.; SHARON, N: On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*, v. 1473, p. 4-8, 1999.
- ARENAS, M. I. et al. A lectin histochemistry comparative study in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma. *Glycoconjugate Journal*, v. 16, p. 375–382, 1999.
- BANERJEE, S. et al. Mucin binding mitogenic from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 421, p. 125-134, 2004.
- BELTRÃO, E. I. C. et al. Parkia pendula lectin histochemistry marker for meningothelial tumor. **European Journal Histochemistry**, v. 47, p. 139-42, 2003.
- BLOMME, B. et al. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. *J Hepatol*, v. 50, p. 592-603, 2009.
- BOUCKAERT, J. et al. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the Escherichia coli FimH adhesion. **Mol Microbiol**, v. 55, p. 441-455, 2005.
- BROOKS, S. A. Strategies for Analysis of the Glycosylation of Proteins: Current Status and Future Perspectives. *Mol Biotechnol*, v. 43, p. 76 – 88, 2009.
- BROOKS, S.A; CARTER, T.M. N-acetilgalactosamine, N-acetilglucosamine and sialic expression in primary breast cancers. **Acta Histochemica**, v. 103, p.37-51, 2001.

- BROOKS, S. A.; WILKINSON, D. Validation of a simple avidin-biotin detection method for *Helix pomatia* lectin (HPA) binding as a prognostic marker in cancer. **Acta Histochem.**, v. 105, p. 205–212, 2003.
- BUTANI, A.; ARBESFELD, D. M.; SCHWARTZ, R. A. Premalignant and Early Squamous Cell Carcinoma. **Clin Plastic Surg**, v. 32, p. 223-235, 2005.
- CALOKERINOS, A. C.; DEFTEREOS, N. T.; W.R.G. Baeyens, W. R. G. Chemiluminescence in drug assay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13, p. 1063-1071, 1995.
- CAMPBELL, A.K., HALLET, M.B. e WEEKS, I. Chemiluminescence as na analytical tool in cell biology and medicine. **Methods in Biochemical Analysis**, v. 31, p. 317-416, 1985.
- CAMPOS, L. M. et al. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. **Biomarkers**. v. 5, p. 480-484, 2006.
- CAZAL, P.; LALAUERIE, M. Recherches sur quelques phyto-agglutinines spécifiques des groupes sanguins ABO. **Acta Haematol**, v. 8, p. 73-82, 1952.
- CHERPELIS, B.S.; MARCUSEN, C.; LANG, P. G. Prognostic Factors for Metastasis in Squamous Cell Carcinoma of the Skin. **Dermatologic surgery**, v. 28, p. 268-273, 2002.
- CLARK, M.A. et al. Selective binding and transcytosis of *Ulex europaeus* I lectin by mouse Peyer's patch M-cells in vivo. **Cell Tissue Res**, v. 282, p. 455-461, 1995.
- COCKEREL, C. J. Histopathology of incipient intrapidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis"). **J Am Acad Dermatol.**, v. 42, p. 11-17, 2000.
- DAM, T. K.; BREWER, C. F. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry, **Chemical Reviews**, v. 102, p. 387-429, 2002.

DAVIES, T. W. et al. Diet and basal cell skin cancer: Results from the EPIC-Norfolk cohort.

Br J Dermatol, v. 146, p. 1017-1022, 2002.

DENNIS, J. W.; GRANOVSKY, M.; WARREN, C. E. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1473, p. 21-34, 1999.

DERGHAM, A. P. et al. Distribution of diagnosis of neoplastic and pre neoplastic skin lesions at Evangelical Hospital in Curitiba. **An bras Dermatol**, v. 79, p. 555-559, 2004.

DODEIGNE, C., THUNUS, L. e LEJEUNE, R. Chemiluminescence as diagnostic tool: a review. *Talanta*, v. 51, p. 415–439, 2000.

DOOLEY, T. P. et al. Biomarkers of human cutaneous squamous cell carcinoma from tissues and cell lines identified by DNA microarrays and qRT-PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 306, p. 1026-1036, 2003.

DWEK, R. A. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. **Chem Rev**, v. 96, p. 683-720, 1996.

ESTEVEZ, J.A.; BAPTISTA, A.P.; RODRIGO, F.G. Dermatologia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1980. 1485 p.

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

GAMIZ-GRACIA, L. et al. Chemiluminescence detection in liquid chromatography: Applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 640, p. 7-28, 2009.

GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; BAEYENS, W. R. G. Principles and recent analytical applications of chemiluminescence. *Analysis*, v. 28, p. 686-698, 2000.

- GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. et al. Derivatization of biomolecules for chemiluminescent detection in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 793, p. 49-74, 2003.
- GARCIA-ZUAZAGA, J.; OLBRICHT, S. M. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. **Advances in Dermatology**, v. 24, p. 33-57, 2008.
- GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, p. 236-254, 2011.
- GIRNITA, L. et al. Inhibition of *N*-linked glycosylation downregulates insulin-like growth factor-1 receptor at the cell surface and kills Ewing's sarcoma cells: therapeutic implications. **Anticancer Drug Des**, v. 15, p. 67-72, 2000.
- GRANGER, R. H. et al. Association between dietary fat and skin cancer in an Australian population using casecontrol and cohort study designs. **BMC Cancer**, v. 6, p. 1-7, 2006.
- GREEN, A. et al. Skin cancer in a subtropical Australian population: incidence and lack of association with occupation. **Am J Epidemiol**, v. 144, p. 1034-1040, 1996.
- GRIMALDI, J. J.; SYKES, B. D. Concanavalin A – stopped flow nuclear magnetic resonance stud of conformational changes induced by Mn ++, Ca ++, and alpha-methyl-D-mannoside. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 1618-1624, 1975.
- GURUDUTT, V. V.; GENDEN, E. M. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. **Journal of Skin Cancer**, v. 2011, p. 1-10, 2010.
- HAKOMORI, S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. **Cancer Res**, v. 56, p.5309–5318, 1996.

- HASSID, S. et al. Histochemical study of the epithelia of nasal polyps by biotinylated lectins and neoglycoprotein a comparison with the normal human respiratory epithelium. **Eur J Morphol**, v.35, p. 79-86, 1997.
- HERLING, M. et al. Glycohistochemical monitoring of chemically induced sarcomas at different stages of tumorigenesis. **In Vivo**, v. 14, p. 499-506, 2000.
- HOLMES, M.J. et al. Lectin receptors in the human cornea. **Cornea**, v. 86, p. 30-34, 1985.
- INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009. 98 p.
- INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=334> Acesso em 02 mai. 2011.
- JACK, D. L.; TURNER, M. W. Anti-microbial activities of mannose-binding. **Lectin Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 753-757, 2003.
- KARASAKI, Y. et al. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. **Food Research international**, v. 34, p. 7-13, 2001.
- KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.
- KESSIMIAN, N. et al. Lectin binding to parietal cells of human gastric mucosa. **J Histochem Cytochem**, v. 34, p. 237-243, 1986.
- KING, D.W. et al. Flow Injection Analysis of H₂O₂ in Natural Waters Using Acridinium Ester Chemiluminescence: Method Development and Optimization Using a Kinetic Model. **Anal. Chem.**, v. 79, p. 4169-4176, 2007.
- KO, C. Keratoacanthoma: Facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 254-261, 2010.

- KOMATSU, M. et al. Muc4/sialomucin complex, an intramembrane modulator of ErbB2/HER2/ Neu, potentiates primary tumor growth and suppresses apoptosis in a xenotransplanted tumor. **Oncogene**, v. 20, p. 461-470, 2001.
- KOURORIAN, S. et al. Expression analysis of carbohydrate antigens in ductal carcinoma insitu of the breast by lectin histochemistry. **BMC Cancer**, v. 8, p. 136-145, 2008.
- KRICKA, L. J. Clinical applications of chemiluminescence. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, p. 279-286, 2003.
- LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, p. 45-55, 2011.
- LAZAR, I. M. et al. Recent advances in the MS analysis of glycoproteins: Theoretical considerations. **Electrophoresis**, v. 32, p. 3 – 13, 2011.
- LEAR, J. T.; SCHMITH, A. G.; Basal cell carcinoma. **Postgrad Med J**, v. 73, p. 538-542, 1997.
- LIMA, A. L. R. et al. Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with Cratylia mollis Seed Lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-6, 2010.
- LORIS et al. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, p. 9-36, 1998.
- MALONEY, M. E. Arsenic in dermatology. **Dermatol Surg**, v. 22, p. 301-304, 1996.
- MALZ, C.R., SCHWARTZ, P. E KUHN, H.J. Lectin binding sites in the vomeronasal organ and the olfactory epithelium of the tree shrew tupaia belangeri. **J Hirnforsch**, v. 39, p.481-487, 1999.

- MEISSNER, C. et al. L-fucose residues o cellulose-based dialysis membranes: quantification of membraneassociated l-fucose and analysis of specific lectin binding. **Glycoconj J**, v. 12, p. 632-638, 1995.
- MELO-JÚNIOR, M. R. et al. Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, p. 123-125, 2004.
- MELO-JÚNIOR, M. R. et al. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumour differential diagnosis. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, p. 455-460, 2006.
- MELO-JÚNIOR, M. R. et al. Carbohydrates detection in the hepatic egg-granuloma system using lectin histochemistry. **Int J Morphol**, v. 26, p. 967-972, 2008.
- MELO-JUNIOR, M. R. et al.. Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to *Helicobacter pylori*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 238-240, 2008.
- MIETTINEN, M. et al. *Ulex europaeus* I lectin as a marker for tumors derived from endothelial cells. **Am J Clin Pathol**, v. 79, p. 32-36, 1983.
- MINKO T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 56, p. 491-509, 2004.
- MODY, R.; JOSHI, S.; CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 33, p. 1-10, 1995.
- NILSSON, C. L. Lectins: Analytical Tools from Nature. In: Lectins: Analytical Technologies. Nilsson, C. L editor. Florida: Elsevier B.V. 2007. 456 p.
- NOURI, K. et al. Rare presentation of basal cell carcinoma. **J Cutan Med Surg**, v. 6, p. 226-228, 2002.

OGDEN, S.; TELFER, N. Skin cancer. **Medicine**, v. 37, p. 305-308, 2009.

OHBA, H. et al. Cytoagglutination and cytotoxicity of Wheat Germ Agglutinin isolectins against normal lymphocytes and cultured leukemic cells lines- relationship between structure and biological activity. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1619, p. 144-150, 2003.

PETTER, G.; HAUSTEIN, U. Histologic subtyping and malignancy assessment of cutaneous squamous cell carcinoma. **Dermatol Surg**, v. 26, p. 521-530, 2000.

POULSEN, M.; BURMEISTER, B.; KENNEDY, D. Preservation of form and function in the management of head and neck skin cancer. **World J Surg**, v. 27, p. 868-874, 2003.

POWLESLAND, A. S. et al. Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. **Glycobiology**, v. 19, p. 899-909, 2009.

RABINOVICH, G. A. et al. Functions of cell surface galectin–glycoprotein lattices. **Curr Opin Struct Biol**, v. 17, p. 513-520, 2007.

RAVISHANKAR, R. et al. Structures of the peanut lectin-lactose complex at acidic pH: retention of unusual quaternary structure, empty and carbohydrate bound combining sites, molecular mimicry and crystal packing directed by interactions at the combining site. **Proteins**, v. 43. p. 260-270, 2001.

REK, A.; KRENN, E.; KUNGL, A. J. Therapeutically targeting protein–glycan interactions. **Br J Pharmacol**, v. 157, p. 686-694, 2009.

REEKE. G. N.; BECKER, J. W.; EDELMAN, G. M. Covalent and 3-dimensional structure of concanavalin A. 4. Atomic coordinates, hydrogen-bonding and quaternary structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 1525-1975, 1975.

RICOTTI, C. et al.: Malignant Skin Neoplasms. **Med Clin North Am**, v. 93, p. 1241-1264, 2009.

- RODA, A. et al. Bio-and chemiluminescence in bioanalysis. **Fresenius J Analyt Chem**, v. 366, p. 752-759, 2000.
- SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. Dermatologia 2^a. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000. 1155 p.
- SANTOS, B. S. et al. CdS-Cd(OH)₂ core shell quantum dots functionalized with Concanavalin A lectin for recognition of mammary tumors. **Phys. Stat. Sol. (c)**, v. 3, p. 4017-4022, 2006.
- SCHWARTZ, R. A. Keratoacanthoma. **J Am Acad Dermatol**, v. 30, p. 1-19, 1994.
- SCILLITANI, G. et al. Lectin histochemistry of gastrointestinal glycoconjugates in the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum* (Schreber, 1774). **Acta histochemica**, v. 109, p. 347-357, 2007.
- SHARMA, R., SCHUMACHER, U. e ADAM, E. Lectin histochemistry reveals the appearance of M-cells in Peyer's patches of SCID mice after syngeneic normal bone marrow transplantation. **J Histochem Cytochem**, v. 46, p. 143-148, 1998.
- SHARON, N. Carbohydrates. **Sci Am**, v. 243, 90-116, 1980.
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, p. 227-234, 1989.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, p. 53-62, 2004.
- SHIO, Y. et al. Carbohydrate status detecting by PNA is changeable through cancer prognosis from primary to metastatic nodal site: A possible prognostic factor in patient with node-positive lung adenocarcinoma. **Lung Cancer**, v. 57, p. 187-192, 2007.

SMITS, T.; MOOR, A. C. E. New aspects in photodynamic therapy of actinic keratosis.

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 96, 159-169, 2009.

SOBRAL, A. P. V. et al. ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. **Journal of Oral Science**, v. 52, p. 49-54, 2010.

Sociedade Brasileira de Dermatologia. Disponível em:

<<http://www.sbd.org.br/medicos/atualidade/Noticia.aspx>> Acesso em 18 abr. 2011.

SOUZA, S. R. et al. A novel model to characterize the double electric layer of lectin from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* in metallic surface. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 191-193, 2001.

STAPLES, M.; MARKS, R.; GILES, G. Trends in the incidence of non-melanocytic skin cancer (NMSC) treated in Australia 1985–95: are primary prevention programs starting to have an effect? **Int J Cancer**, v. 78, p. 144-148, 1998.

SWANSON, M. D. et al. A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. **J Biol Chem**, v. 285, p. 8646-8655, 2010.

TAN, K. B.; LEE, Y. S. Immunoexpression of Bcl-x in squamous cell carcinoma and keratoacanthoma: differences in pattern and correlation with pathobiology. **Histopathology**, v. 55, p. 338-345, 2009.

TELFER, N. R.; COLVER, G. B.; BOWERS, P. W. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. British Association of Dermatologists. **Br J Dermatol**, v.141, p. 415-423, 1999.

TUORI, A., VIRTANEN, I. e UUSITALO, H. Lectin binding in the anterior segment of the bovine eye. **Histochem J**, v. 26, p. 787-798, 1994.

WEEDON, D. Keratoacanthoma: a personal perspective. **Current Diagnostic Pathology**, v. 9, p. 259-265, 2003.

WEEKS, I. et al. AcridiniumEsters as High-Specific-ActivityLabels in Immunoassay. **Clin Chem**, v. 29, p. 1474-1479, 1983.

WONG, C. S. M.; STRANGE, R. C.; LEAR, J. T. Basal cell carcinoma. **BMJ**, v. 327, p. 794-798, 2003.

WU, A. M. et al. Carbohydrate specificity of an agglutinin isolated from the root of *Trichosanthes kirilii*. **Life Science**, v. 66, p. 2571-2581, 2001.

ZENG, Z. et al. The development of an integrated platform to identify breast cancer glycoproteome changes in human serum. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3307–3315, 2010.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Desenvolvimento de método quimiluminescente para o diagnóstico de lesões tumorais cutâneas empregando lectinas conjugadas a éster de acridina comercial.

4.2 Específicos

- Conjugar lectinas comerciais (Con A, UEA-I e PNA) ao éster de acridina (EA);
- Purificar o conjugado lectina-EA através de cromatografia de peneira de exclusão utilizando Sephadex G-25;
- Marcar tecidos cutâneos humanos diagnosticados como carcinoma basocelular, ceratoacantoma, carcinoma epidermóide e ceratose actínica, com os conjugados lectinas-EA;
- Quantificar a marcação através dos fótons emitidos durante a hidrólise do EA conjugado às lectinas;
- Estabelecer a correlação entre os fótons emitidos com o perfil de carboidratos dos tumores avaliados.

**5. ARTIGO: HISTOCHEMISTRY CHEMILUMINESCENT EVALUATION OF
GLYCOPHENOTYPE OF CUTANEOUS TUMORS**

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico Journal of Histochemistry &
Cytochemistry

Fator de impacto: 2.381

Luiza Rayanna Amorim de Lima, Matheus Filgueira Bezerra, Carmelita Lima Bezerra
Cavalcanti, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA),
Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil

ABSTRACT

Chemiluminescence assay is an effective technique for quantitative analysis of proteins, nucleic acids and carbohydrates due to its high sensitivity, specificity and rapid testing. Tumor cells show alterations in their glycosylation patterns when compared to normal cells. The chemiluminescent histochemistry lectin was used as tool for the investigation of glycophenotype changes in cutaneous tumors. The lectins Con A, PNA, UEA-I and MAA were conjugated to AE and the derivative collected by molecular filtration in Sephadex G-25. Biopsies of normal skin and cutaneous tumors were incubated with the lectins-AE. Chemiluminescence was quantified and expressed in relative light units (RLU) and correlated to the labeling of the normal and transformed tissues. Actinic keratosis (AK), keratocanthoma (KA), squamous cell carcinoma (SCC) and basal cell carcinoma (BCC) showed lower expression of α -D-glucose/mannose and α -L-fucose residues, compared with the normal tissue. On the other hand, cutaneous tumor higher expression of Gal- β (1-3)-GalNAc residues than normal tissue. AK and SCC exhibited higher expression of Neu5Ac-a(2,3)Gal residues than normal epidermis. KA and BCC showed equal RLU values compared with the normal tissue. The chemiluminescent histochemistry allowed quantitative assessment of carbohydrates expression, contributing to eliminate the subjectivity of conventional techniques used in the histopathological diagnosis cutaneous tumors.

Keywords: chemiluminescence, carbohydrates; ConA, cutaneous tumors, glycophenotype, histochemistry, lectins, MAA, PNA, UEA-I.

Introduction

Chemiluminescence (CL), which is the phenomenon observed when the vibronically excited product of an exoergic reaction relaxes to its ground state with emission of photons, therefore can

be defined as chemical reactions that emit light (Weeks 1992). The sufficiently low limits of detection (attomole-zeptomole), the excellent sensitivity and the versatility of the chemiluminometric methods of analysis are the main reasons for the interest in CL (Calokerinos et al. 2003).

Acridinium ester (AE) labels quickly superseded luminol and isoluminol because low detection limits (attomolar range) and specificity (Kricka 2003). These features have led to AE-CL methods being used for many applications. Exposure of an acridinium ester label to an alkaline hydrogen peroxide solution triggers a flash of light. AE forms an unstable dioxetane, which decays yielding *N*-methylacridone and produce light at a wavelength of 470 nm (King et al. 2007).

Chemiluminescence assay is a promising and effective technique for quantitative analysis of proteins, nucleic acids and carbohydrates, eliminating subjective analyses of microscopic preparations. Guardigli et al. (2005) developed a chemiluminescent immunohistochemistry procedure for the direct quantitative evaluation of MRP2 expression in liver biopsies, using a sensitive enzyme substrate based on the luminol/H₂O₂/enhancer CL system. In addition, the CL intensity is proportional to the amount of the biomolecule label over a wide range of concentration, and depends on the conjugation of a biomolecule specific to chemiluminescence reaction participants or electronically excited product for recognition of the substance of interest (Araújo Filho et al. 2011).

In our laboratorie the acridinium ester was used as marker to *Trypanosoma cruzi* and *Schistosoma mansoni* antigens in chemiluminescent immunoassay. By this method, small amounts (nanogram scale) of circulating antibodies were detected in patients serum (Coêlho et al. 2002). The glycode of normal, fibroadenoma and invasive duct carcinoma tissues were investigated using lectins labeled with AE (Campos et al. 2006; Brustein et al. 2011)

The cutaneous neoplasms arise from the cells of epidermis and can be classified into two major groups: melanoma and non-melanoma skin cancers. The last group includes mainly basal cell carcinoma (BCC), squamous cell carcinoma (SCC), keratoacanthoma (KA) and actinic keratosis

(AK). Non-melanoma skin cancers are the most common form of cancer, with the incidence increasing considerably. These tumors are rarely fatal, but are considered to be fast growing and if neglected may be locally and functionally destructive (Ricotti et al. 2009). The diagnosis of skin neoplasias becomes inaccurate, in some cases, due to variety of factors that affect the accuracy of the test, such as a huge spectrum of tumors and their variants and the lower differentiation (Melo Júnior et al. 2006).

In addition to genetic alterations, phenotypic alterations also provide malignant characteristics to cells. The phenotypic alterations of interest in this work are those of the cell surface glycans. Carbohydrates are molecules with structural variability and complexity and them to function as signaling, recognition and adhesion molecules. Nearly all types of malignant cells and cells of many types of diseased tissues demonstrate alterations in their glycosylation patterns when compared to their normal counter-parts (Ghazarian et al. 2011). In the tumor environment, underexpression, truncation or altered branching patterns of certain glycans and/or changes in glycosylation allow neoplastic cells to usurp many of the events that occur in development, such as receptor activation, cell adhesion and cell motility, which allows tumor cells to invade and spread throughout the organism (Fuster and Esko 2005).

The investigation of lectin-carbohydrates interactions is necessary for the understanding of glycophenotype and behavior of the tumour during their differentiation, and confirms the hypothesis the biochemical changes in the cell are events that may signal the cell differentiation (Herling et al. 2010). Lectins are proteins or glycoproteins of nonimmune origin, which have the ability to binds specifically to mono or oligosaccharides reversibly and are often found on the cell surface or intracellular particles (Sharon and Lis 2004). Concanavalin A (Con A), Peanut agglutinin (PNA), Ulex europaeus agglutinin-I (UEA-I) and Maackia amurensis (MAA) lectins that recognize residues α -D-glucose/mannose, Gal- β (1-3)-GalNAc, α -L-fucose and Neu5Ac- α (2,3)Gal, respectively, were used in present study for evaluation of expression these carbohydrates in cutaneous tumors.

Material and Methods

Reagents

N-hydroxysuccimide-activated dimethyl acridinium ester (DMAE-NHS)/1966-1-53-2/Organic Lab kindly supplied by Dr. H. H. Weetall. Con A, PNA, UEA-I, MAA, N,N-dimethylformamide and Sephadex G-25 were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, Mo, USA). All other chemical reagents used were of analytical grade.

Samples

Skin fragments were obtained through paraffin-embedded biopsies from Tissue Bank of the Clinic Hospital at the Federal University of the State of Pernambuco – UFPE, Northeast Brazil and diagnosed as basal cell carcinoma (BCC = 17), squamous cell carcinoma (SCC = 13), keratoacanthoma (KA = 13) and actinic keratosis (AK = 9). The normal human epidermis (NE = 14) were obtained from the same anatomical site on the opposite side of the tumors of the patients of Hospital Santa Clara at Recife, Northeast, Brazil. The diagnosis of cutaneous tumors was based on histopathology.

Lectins conjugation with Acridinium Ester (AE)

Lectins (1 mL containing 2 mg of protein) were incubated with 10 μ L of acridinium ester solution (0.2 mg diluted in 400 μ L of N,N-dimethylformamide) for 1 h at 25 °C under rotary stirring. The conjugate (lectin-AE) was applied to a column of Sephadex G-25 (10 x 1 cm), previously equilibrated with 10 mM phosphate buffer, containing 0.15 M NaCl (PBS), pH 7.2, and eluted with this buffer. Aliquots (1 mL) were collected and their protein content was

spectrophotometrically determined at 280 nm. The aliquots corresponding to the protein peak had their chemiluminescence assayed. After conjugation, Con A-AE, PNA-AE and MAA-AE were evaluated regarding the maintenance of its carbohydrate recognition property (hemagglutinating activity) using glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes, and human erythrocytes for UEA-AE according to Beltrão et al. (1998). Protein concentration was measured according to Lowry et al. (1951).

Chemiluminescent lectin-histochemistry

Paraffin sections (8 μm) of samples were cut, transferred to glass slides, deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohols (3 x 100% and 1 x 70% - 10 dips each). Slides were treated with 0,1% (w/v) trypsin solution at 37°C for two minutes and washed (twice, 5 minutes each time) with PBS. Afterwards tissue slices were incubated with lectins-AE (100 μL - 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for 2 h at 4 °C, followed by washings (3 x 5 min) with 100 mL of PBS. The area corresponding to the tissue section (square-shaped) was defined (0.25 cm^2). Then the tissues were cut and transferred to polypropylene test tubes containing 50 μL of PBS. Finally, solutions of 0.5% H_2O_2 in 0.1 N HNO_3 (50 μL) and 0.25 M NaOH (50 μL) were added for chemiluminescent measurement using a luminometer Modulus Single Tube 9200-001 (Turner BioSystems, USA). The emission intensity was determined as relative light units (RLU) with a counting time of 5 seconds per sample. Triplicate measurements were carried out throughout in this study. Lectin binding inhibition assays were accomplished by incubating each lectin solution with 300 nM methyl- α -D-mannoside (Con A), D-galactose (PNA), α -L-fucose (UEA-I) and n-acetylneuraminic acid (MAA) for 45 min at 25°C prior to their incubation with tissues. The following steps were as described previously for the binding protocol.

Statistical analysis

The software OriginPro 8 (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA) was used for the statistical analysis and data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (s.d.). Obtained data were compared using F test ($p < 0.05$) through Microsoft Office Excel software (Washington, USA).

Results

The purification profile by Sephadex G-25 chromatography of Con A, PNA, UEA-I and MAA conjugated to acridinium ester is demonstrated in Figures 1A, 1C, 1E and 1G, respectively. The coincidence of the protein peak (absorbance at 280 nm) and chemiluminescence around the 10th fractions (excluded proteins) indicated that all lectins were labeled with the AE. The second chemiluminescent peaks (Figures 1A, 1C, 1E and 1G) show the non reacted AE. The lectin derivative Con A-AE, PNA-AE, UEA-AE and MAA-AE were still capable to recognize the specific carbohydrates according to the hemagglutinating activity presented in Fig 1B, 1D, 1F and 1H.

These lectin derivatives were used to investigate the glycophenotype of cutaneous tumors. Lower expression of α -D-glucose/mannose was presented for all tumors comparing with the normal tissue. Actinic keratosis, keratocanthoma, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma showed values of RLU equal to $143,694 \pm 28,626$; $140,704 \pm 29,009$; $148,238 \pm 38,333$ and $134,007 \pm 30,537$, respectively, whereas the normal tissue was $271,435 \pm 64,329$. The α -L-fucose expression pattern was also lower for cutaneous tumors (RLU values of $11,831 \pm 1,935$; $28,773 \pm 6,468$; $14,586 \pm 3,464$ and $13,880 \pm 2,926$ for AK, KA, SCC and BCC, respectively) compared with the normal tissue ($33,743 \pm 5,182$). On the other hand, they presented higher expression of Gal- β (1-3)-GalNAc compared with the normal skin tissues. Actinic keratosis; keratocanthoma; squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma presented RLU values of $23,766 \pm 2,525$; $32,567 \pm 6,127$; $31,172 \pm 5,134$ and $18,007 \pm 4,618$, respectively, whereas a value of $7,567 \pm 1,799$ was found for

the normal tissue. Actinic keratosis and SCC exhibited higher expression of Neu5Ac- α (2,3)Gal than normal epidermis ($35,687 \pm 8,226$), $65,370 \pm 16,811$ and $44,864 \pm 11,644$, respectively. However, KA ($26,927 \pm 6,942$) and BCC ($29,836 \pm 6,179$) showed equal RLU values compared with the normal tissue. For all lectins the mean RLU values of cutaneous tumors and normal epidermis were significantly different as observed using F test (parametric test). However, statistically significant variations were not observed among RLU values of cutaneous tumors, except for AK and SCC labeled with MAA-AE and KA labeled with UEA-AE. These results are also displayed in Figure 2. Lectins-AE inhibition binding assay using specific carbohydrates (300 mM) resulted in a decrease in RLU values indicating that unspecific binding between the conjugates and cell surface molecules did not occur (data not shown).

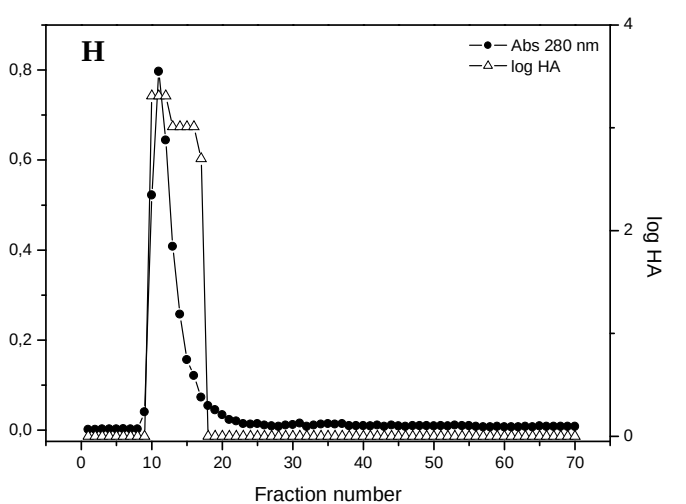
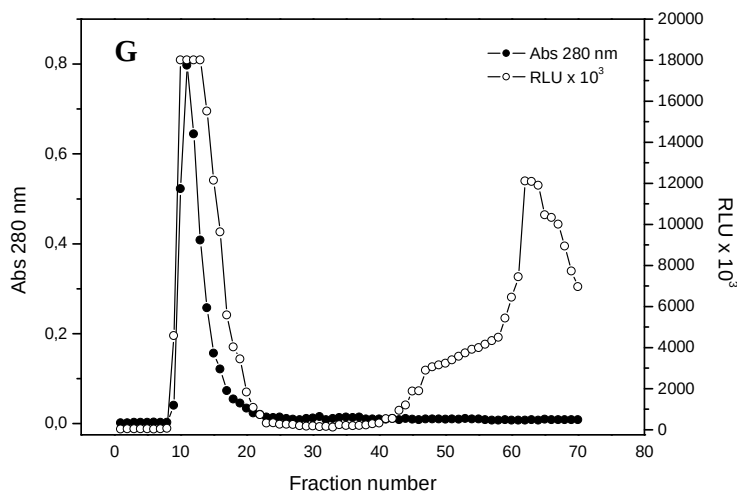
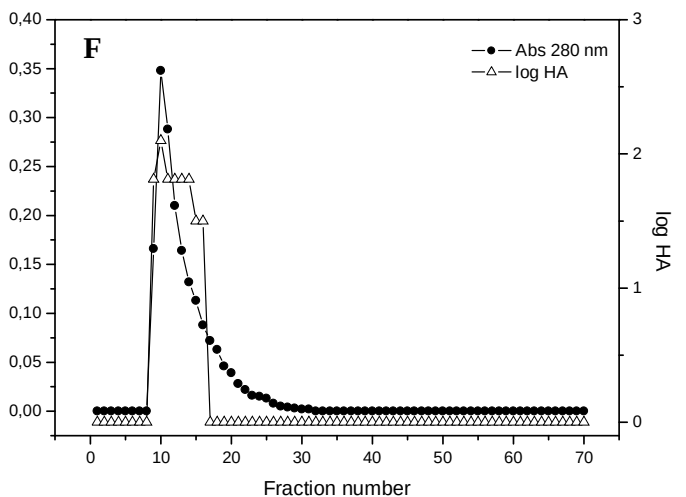
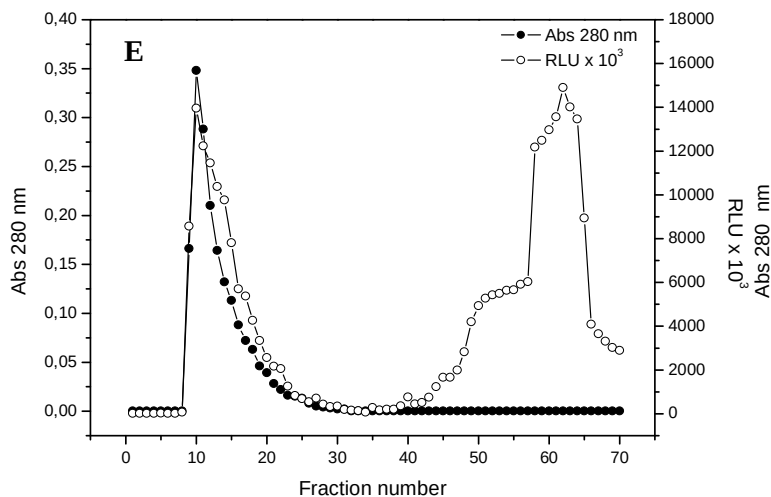
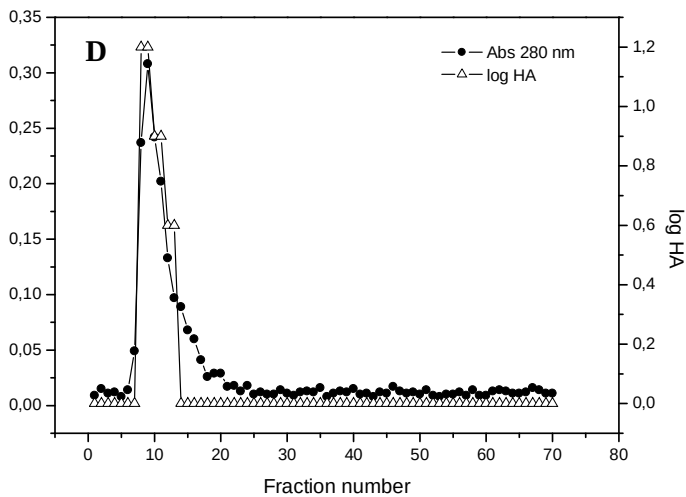
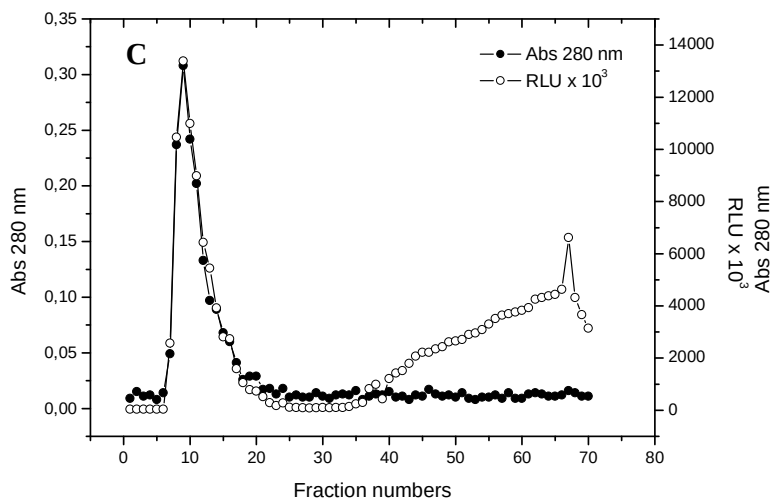
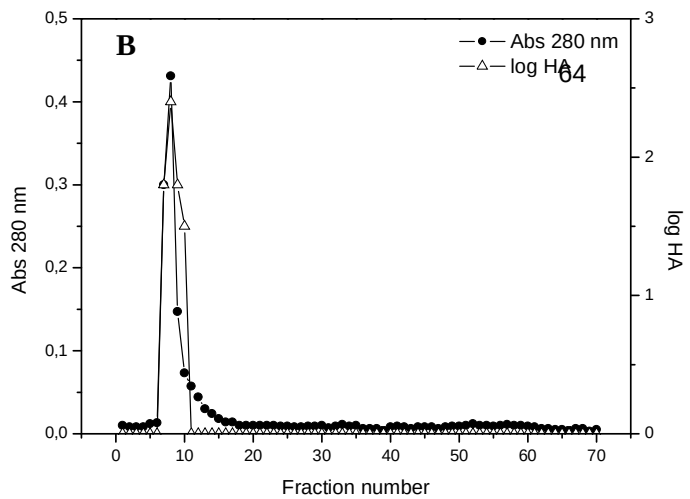
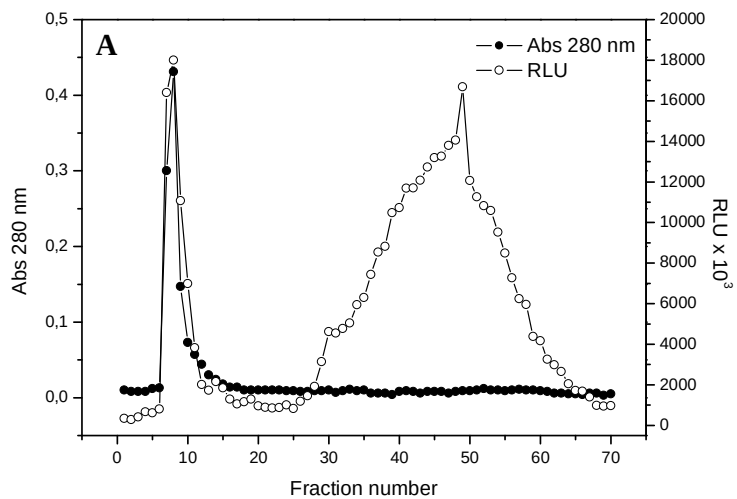


Fig 1. ConA-AE, PNA-AE, UEA-AE and MAA-EA purification profile from a Sephadex G-25 column (10 x 1 cm). Elution was carried out with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2. Fractions (aliquots of 1 mL) were collected and chemiluminescence Con A-AE (A), PNA-AE (C), UEA-AE (E) and MAA-EA (G), and hemagglutinating activity Con A-AE (B), PNA-AE (D), UEA-AE (F) and MAA-EA (H) were assayed.

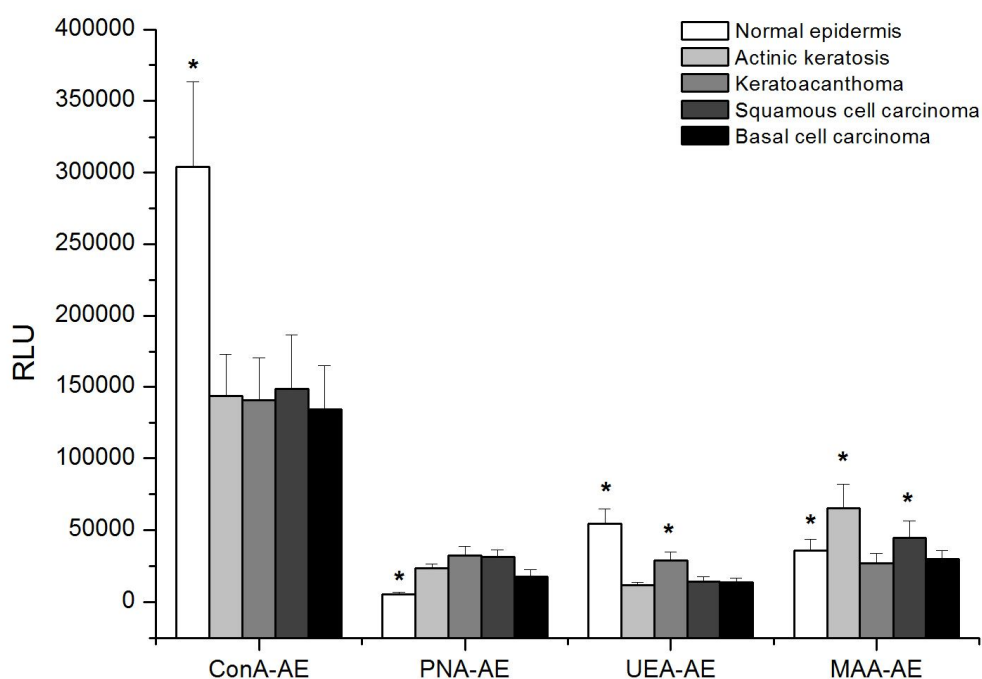


Fig 2 Comparison between the chemiluminescence of normal epidermis (NE, n = 14), actinic keratosis (AK, n = 9), keratoacanthoma (KA, n = 13), squamous cell carcinoma (SCC, n = 13) and basal cell carcinoma (BCC, n = 17) labeled with Con A-AE, PNA-AE, UEA-AE and MAA-AE.

* statistically significant variations were observed among RLU values of cutaneous tumors and normal epidermis.

Discussion

Cell surface glycans are highly related to cell-cell communication, host-pathogen interaction, cell matrix interaction (Zhou et al. 2011). Tumor invasion is dependent on a loss of intercellular adhesion and transmigration of cells through the basement membrane (BM) as well as the surrounding extracellular matrix (ECM) (Schnegelsberg et al. 2011). Metastasis is a multistep phenomenon, which involves the loosening of the tumor cells from the primary tumor, the degradation of the extracellular matrix and the invasion of the blood vessels at the site of the primary tumour (Thies et al. 2001). These steps require adhesive interactions which are mediated by cell surface glycans and their interactions with endogenous carbohydrate binding proteins (lectins).

Aberrant glycosylation is a key feature of malignant transformation and the glycans involved influence the adhesive interactions of cancer cells often providing favorable conditions for tumor dissemination (Rambaruth and Dwek 2011). The molecular organization and stability of adherents junctions formation is influenced by the presence of altered glycans on the cell surface, phenotypic change commonly observed in malignancy (Jamal et al. 2009).

Alterations in the expression of cell surface carbohydrate between benign and malignant lesions of skins have been previously reported using lectin histochemistry and computer image analysis (Melo Júnior et al. 2006). This study showed that skin malignant tumors exhibited distinct binding patterns.

In the present work transformed tissues showed lower expression of α -D-glucose/mannose compared with the normal skin tissues but there was not difference regarding benign and malignant tumors. Smetana et al. (2003) reported that laminins, principal component of BM, exhibit unique saccharidic epitopes (Man-rich oligosaccharides). Therefore, aberrant α -D-glucose/mannose expression in this protein may modify the adhesive interactions between transformed cells contributing for detachment of cancer cells from the primary tumor mass and acquisition of a more motile and invasive phenotype.

Several common structural changes occur in tumor glycans and can affect interactions between tumor cell-surface glycans and endogenous lectins which may determine the metastatic potential of the tumor cell, including increases in the level of truncation and branching of structures as well as an increased expression of unusual terminal sequences (Kim and Varki 1997). These changes often result in increased exposure of terminal galactose residues, such as those found in the cancer-associated T antigen (Gal β 1-3 GalNAc) and the Lewis x trisaccharide (Gal β 1 4(Fuc α 1-3)GlcNAc) (Powlesland et al. 2009). The higher expression of galactose residues, observed by increase of RLU, could be related to potential role of galactose ligands in tumor cell metastasis by the correlation between increased expression of the galectin, family of galactose binding proteins, and the ability of many tumor cell types to metastasize (Takenaka et al. 2004).

Fucosylation is one of the most common modifications involving oligosaccharides on glycoproteins or glycolipids, and regulates the biological functions of adhesion molecules and growth factor receptors (Miyoshi et al. 2008). In this study, fucosylation pattern changes were observed by the decrease chemiluminescence signal using the lectin UEA-I conjugated to AE for labeling of cutaneous tumors.

It is known that both integrins and E-cadherin are associated with the characteristics of cancer cells through regulation of the cell-extracellular matrix interaction and homotypic cell-cell adhesion, respectively (Moriwaki and Miyoshi 2010). Zhao et al. (2006) showed that core fucosylation is essential for the function of α 3 β 1 integrin, protein that connects many biological functions, such as development, the control of cell proliferation, protection against apoptosis and malignant transformation. Osumi et al. (2009) suggested a possible role of core fucosylation in the regulation of cell-cell adhesion in cancer. Therefore, based on the information above, can be conclude that the fucose would be involved in the biological behavior of cancer cells through regulation of the functions of many membrane associated proteins.

Sialic acids (Sias) are typically the outermost monosaccharide units on the glycan chains of glycolipids and glycoproteins, which usually occurs as a terminal component at the nonreducing

end of their carbohydrate chains (Lehmann et al. 2006). Because their terminal localization on glycans and variety of linkages to the underlying sugar chain, sialic acid has been utilized by wide variety of Sia-binding proteins, mainly proteins of viral and bacterial pathogens, selectins and Siglecs (Varki and Varki 2007).

The increase in the expression of cell surface sialic acid between benign and malignant lesions of skin, AK and SCC, respectively was observed by increase of RLU values. The differences in the degree of sialylation of glycoconjugates on a tumor cell surface of SCC may play an important role in the process of cell malignization and metastasis (Bergler et al. 1997). Vural et al. (1999) reported the increase of Total Sialic Acid (TSA) levels between patients with AK and controls, probably related to increased turnover of cells (Hakamory 1984). Plzák et al. (2005) observed differentiated squamous cell carcinoma express 2,3-linked-NeuAc residues (recognized by lectin MAA), and the poorly differentiated squamous cell carcinoma 2,6-linked-NeuAc (recognized by *Sambucusnigra*lectin).

Sialyl-glycoconjugates may regulate the interaction of cancer cells with other cells and with the cell matrix. Therefore, they may be responsible for adhesion as well as anti-adhesion, and for extending the survival time of cancer cells in the blood stream. Moreover, sialic acid may also be involved in growth regulation (Carraway et al. 1992).

Conclusion

The method chemiluminescent lectin-histochemistry allowed the direct quantitative evaluation of the glycophenotype characterization of skin tumors, combining the specificity lectin-carbohydrates interaction and sensitivity of chemiluminescent assay. Cutaneous tumors presented a higher expression of β -Gal (1-3)-GalNAc and Neu5Ac- α (2,3)Gal, and lower expression of α -D-glucose/mannose and α -L-fucose residues, evidenced by differences in RLU values. These results

confirm the importance of lectins as potencial biomarkers for detection of changes in glycophenotype of skin neoplasms. This procedure is an effective tool to eliminate subjective analyses of microscopic preparations.

References

- Araújo Filho JLS, Melo Júnior MR, Carvalho Júnior LB. 2011. Potential applications of the chemiluminescent methods in tumoral diseases investigation. *Int J PharmBioSci.* 2(2): 392-400.
- Beltrão EIC, Correia MTS, Figueredo Silva J, Coelho LCBB. 1998. Binding evaluation of Isoform 1 from Cratylia mollis lectin to human mammary tissues. *Appl Biochem Biotechnol.* 74(3): 125-134.
- Bergler W, Riedel F, Schwartz-Albiez R, Gross HJ, Hormann K. 1997. A new histochemical method to analyze sialylation on cell-surface glycoproteins of head and neck squamous-cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 254 (9-10): 437-441.
- Brustein VP, Cavalcanti CLB, Melo Júnior MR, Correia MT, Beltrão EIC, Carvalho Júnior LB. 2011. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. *Appl Biochem Biotechnol.* 166(2): 268-275.
- Calokerinos AC, Deftereos NT, Baeyens WRG. 1995. Chemiluminescence in drug assay. *J Pharm Biomed Anal.* 13 (9): 1063-1071.
- Campos LM, Cavalcanti CLB, Lima-filho JL, Carvalho Júnior LB, Beltrão EIC. 2006. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers.* 11(5): 480-484.
- Carraway KL, Fregien N, Carraway KL III, Carraway CA. 1992. Tumor sialomucin complexes as tumor antigens and modulators of cellular interactions and proliferation. *J Cell Sci.* 103(Pt 2): 299-307.
- Coelho RAL, Jaques GA, Barbosa AD, Velazquez G, Montenegro SML, Azevedo WM, Carvalho Júnior, LB. 2002. Magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol composite as solid-phase in chemiluminescent assays. *Biotechnol Lett.* 24(20): 1705-1708.

- Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB. 2011. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *ActaHistochem*.113(3): 236-254, 2011.
- FusterMM.,Esko JD. 2005. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature*. 5(7): 526-542.
- Guardigli M, Marangi M, Casanova S, Grigioni WF, Roda E, Roda A. 2005. Chemiluminescence quantitative immunohistochemical determination of MRP2 in liver biopsies. *J Histochem Cytochem*. 53(12):1451-1457.
- Hakamory S I. 1984. Tumor-associated carbohydrate antigens.*Annu Rev Immunol*.2(1): 103-126.
- Herling M, Knolle J, Bahn H, Gabius HJ, Richter KK, Rath FW, Hinze R. 2000.Glycohistochemical monitoring of chemically induced sarcomas at different stages of tumorigenesis. *In Vivo*. 14(4): 499-506.
- Jamal BT, Nita-Lazar M, Gao Z, Amin B, Walker J, Kukuruzinska MA. 2009. N-glycosilation status of E-cadherin controls cytoskeletal dynamics through the organization of distinct β -catenin and γ -catenin-containing AJs. *Cell Health Cytoskeleton*. 2009(1): 67-80.
- Kim YJ, Varki A. 1997.Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer.*Glycoconj J*. 14(5): 569-576, 1997.
- King DW, Cooper WJ, Rusak SA, Peake BM, Kiddle JJ,O'Sullivan DW, Melamed ML, Morgan CR, Theberge SM. 2007. Flow Injection Analysis of H₂O₂ in Natural Waters Using Acridinium Ester Chemiluminescence: Method Development and Optimization Using a Kinetic Model. *Anal Chem*. 79 (11): 4169-4176.
- Kricka LJ. 2003. Clinical applications of chemiluminescence.*Anal ChimActa*.500(1): 279-286.
- Lehmann F, Tiralongo E, Tiralongo J. 2006. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cell Mol Life Sci*. 63(12): 1331-1354.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J BiolChem*. 193(1): 265-275.

- Melo Júnior MR; Araújo Filho JLS; Patu VJRM; Machado MCFP; Beltrão EIC; Carvalho Júnior LB. 2006. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumour differential diagnosis. *J Bras Patol Med Lab.* 42(6): 455-460.
- Miyoshi E, Moriwaki K, Nakagawa T. 2008. Biological function of fucosylation in cancer biology. *J Biochem.* 143(6): 725-729.
- Moriwaki K, Miyoshi E. 2010. Fucosylation and gastrointestinal cancer. *World J Hepatol.* 2(4): 151-161.
- Osumi D, Takahashi M, Miyoshi E, Yokoe S, Lee SH, Noda K, Nakamori S, Gu J, Ikeda Y, Kuroki Y et al. 2009. Core fucosylation of E cadherin enhances cell-cell adhesion in human colon carcinoma WiDr cells. *Cancer Sci.* 100(5): 888-895.
- Plzák J, Smetana K Jr, Chovanec M, Betka J. 2005. Glycobiology of head and neck squamous epithelia and carcinomas. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 67(2): 61-69.
- Powlesland AS, Hitchen PG, Parry S, Graham SA, Barrio AM, Elola MT, Mordoh J, Dell A, Drickamer K, Taylor ME. 2009. Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. *Glycobiology.* 19(8): 899-909.
- Rambaruth ND, Dwek MV. 2011. Cell surface glycan-lectin interactions in tumor metastasis. *Acta Histochem.* 113(6): 591-600.
- Ricotti C, Bouzari N, Agadi A, Cockerell CJ. 2009. Malignant Skin Neoplasms. *Med Clin North Am.* 93(6): 1241-1264.
- Schnegelsberg B, Schumacher U, Valentiner U. 2011. Lectin Histochemistry of Metastasizing and Non-metastasizing Breast and Colon Cancer Cells. *Anticancer Res.* 31(5): 1589-1597.
- Sharon N, Lis H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology.* 14(11): 53-62.
- Smetana Jr K, Plzák J, Dvoránková B, Holíková Z. 2003. Functional consequences of the glycophenotype of squamous epithelia - practical employment. *Folia Biol (Praha).* 49(3): 118-127.

- Thies A, Moll I, Berger J, Schumacher U. 2001. Lectin binding to cutaneous malignant melanoma: HPA is associated with metastasis formation. *Br J Cancer*. 84(6): 819-823.
- Takenaka Y, Fukumori T, Raz A. 2004. Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J*. 19(7-9): 543-549.
- Varki NM, Varki A. 2007. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest*. 87(9): 851-857.
- Vural P, Canbaz M, Selçuki D. 1999. Total and lipid-bound Sialic acid levels in actinic keratosis and basal cell carcinoma. *Turk J Med Sci*. 29 (4): 419-423.
- Weeks I. 1992. Chemiluminescence immunoassay. In: Svehla G, editor. *The Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry*. Amsterdam: Elsevier Publishers BV. p. 1.
- Zhao Y, Itoh S, Wang X, Isaji T, Miyoshi E, Kariya Y, Miyazaki K, Kawasaki N, Taniguchi N, Gu J. 2006. Deletion of core fucosylation on $\alpha 3\beta 1$ integrin down-regulates its functions. *J Biol Chem*. 281(50): 38343-38350.
- Zhou SM, Cheng L, Guo SJ, Zhu H, Tao SC. 2011. Lectin Microarray: A Powerful Tool for Glycan Related Biomarker Discovery. *Comb Chem High Throughput Screen*. 14(8): 711-719.

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento do método histoquimiluminescente, a partir da conjugação de lectinas ao éster de acridina, permitiu a avaliação quantitativa direta da expressão de carboidratos em neoplasias de pele, combinando a especificidade da interação lectina-carboidrato e a sensibilidade dos ensaios quimiluminescentes. Os tumores cutâneos apresentaram uma maior expressão de resíduos de Gal- β (1-3)-GalNAc e uma menor expressão de α -D-glicose/manose e α -L-fucose, evidenciados pelas diferenças nos valores de RLU. Estes resultados comprovam a importância das lectinas como potenciais biomarcadores para detecção de alterações no glicofenótipo de neoplasias de pele. Portanto, a histoquímica quimiluminescente é uma ferramenta eficaz para eliminação da subjetividade das técnicas convencionais utilizadas no diagnóstico histopatológico das neoplasias cutâneas.