

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**CLÁUDIO ÂNGELO VENTURA**

**Estudo da Citotoxicidade em Células Animais Induzida  
Pela Ação da Lectina de Sementes de *Talisia esculenta***

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Cláudio Ângelo Ventura  
Wainirika  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

*Tese Apresentada ao Instituto  
de Biologia da Universidade  
Estadual de Campinas para  
Obtenção do Título de Doutor  
em Biologia Funcional e  
Molecular – Área de Bioquímica*

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo  
**Co-Orientador:** Prof. Dr. Tomomasa Yano

**Campinas - SP  
2006**

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
CÉSAR LATTES  
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

JNIDADE BC  
Nº CHAMADA UNICAMP  
V567e  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BC/ 71674  
PROC. 16.15.07  
C \_\_\_\_\_ D X  
PREÇO 1,00  
DATA 13/03/07  
BIB-ID 403285

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

V567e Ventura, Cláudio Ângelo  
Estudo da citotoxicidade em células animais pela ação da lectina de sementes de *Talisia esculenta* / Cláudio Ângelo Ventura. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Maria Lígia Rodrigues Macedo.  
Co-orientador: Tomomasa Yano.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Lectinas. 2. *Talisia esculenta*. 3. Citotoxicidade.  
4. Cultura celular. 5. Morte celular I. Macedo, Maria Lígia Rodrigues. II. Yano, Tomomasa. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(scs/ib)

876077007

**Título em inglês:** Cytotoxicity in animals cells induced by lectin from *Talisia esculenta* seeds.

**Palavras-chave em inglês:** Lectins; *Talisia esculenta*; Citotoxicity; Cell culture; Cell death.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Maria Lígia Rodrigues Macedo, Sérgio Marangoni, Selma Candelária Genari, Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior, Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira.

**Data da defesa:** 18/08/2006.

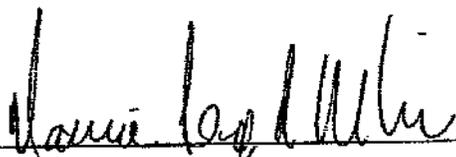
**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

**DATA DA DEFESA: 18 / 08 / 2006**

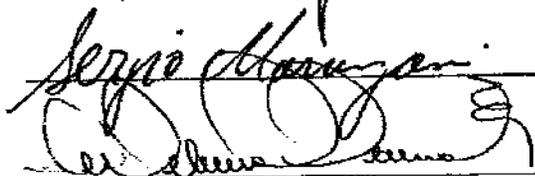
**BANCA EXAMINADORA**

**Titulares:**

Profa. Dra. Maria Lígia R. Macedo (Orientadora)



Prof. Dr. Sérgio Marangoni



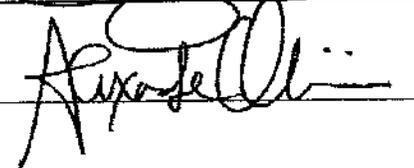
Profa. Dra. Selma Candelária Genari



Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior



Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira



**Suplentes:**

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

---

Profa. Dra. Patrícia da Silva Melo

---

Profa. Dra. Fátima Aparecida Bötcher Luiz

---

*"A pesquisa científica me faz compreender mais um pouco sobre a surpreendente complexidade das reações químicas que podem acontecer no corpo humano, me aproximando cada vez mais da crença de um Criador do mundo".*

Cláudio Ventura

---

*...aos meus queridos pais, Maria Lena Ventura e Elias Ângelo Ventura,  
por nunca terem medido esforços para incentivar  
a minha formação acadêmica.*

*...a minha irmã, Jacqueline A. Ventura Bevenuto, e sua família, pelo incentivo  
e por compartilharem as dificuldades e os momentos difíceis.*

*...a meu amigo, Carlos Henrique Oliveira Dias, pelo incentivo, companheirismo  
e ajuda, principalmente na etapa final desse trabalho.*

*Dedico*

*Àqueles que torcem por mim e que me incentivam, mesmo que distantes:*

*...meus queridos irmãos: Sérgio, Lílíana e Guth.*

*...meus amigos inesquecíveis: Vânia Andrade, Simone M. Conceição,*

*Silvânia Freire, Isana Freire, Cândida Araújo,*

*André Laurentino e Joslaine Oliveira.*

# *Ofereço*

# Agradecimentos

*A DEUS, por me conceder tranquilidade e a perseverança necessária para enfrentar os momentos de atribulações.*

*A minha mãe, Maria Lena Ventura, por me apoiar em tudo aquilo que me proponho a fazer, pelos inestimáveis ensinamentos de vida e, pelo seu amor incondicional.*

*Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela confiança, pela sua imensa generosidade e, por ter sido graças a ele, que todo esse trabalho pôde ser realizado, em todos os sentidos. Muito Obrigado !*

*Pela amizade solidificada e fraterna, pela presença nos momentos difíceis, pelo apoio e sugestões na realização de experimentos, meus singelos agradecimentos a Luciano M. Martins, meu grande amigo.*

*A minha querida amiga, Estela M. Gonçalves, pelo companheirismo, pela amizade verdadeira, e pela ajuda na realização de experimentos e na confecção final da tese.*

*A Prof. Dra. Maria Lígia R. Macedo, pela orientação científica e por disponibilizar as preparações da lectina utilizada nesse trabalho.*

*Aos Profs. Drs. Paulo P. Joazeiro, José Camillo Novello e Aureo T. Yamada , pelas sugestões e participação no Exame de Qualificação.*

*A Rodrigo Rostodella, pelo companheirismo e por ter me incentivado durante grande parte do Doutorado.*

*As Dras. Márcia R. Salvadori e Rosabel M. Falcón, pela amizade e pelos ensinamentos sobre cultivo de células.*

*As amigas, Dra. Cleide e Dra. Gleize, pelos momentos agradáveis e principalmente pela ajuda e valiosas sugestões.*

*A Stella e Ana Paula, pela disponibilidade, amizade e apoio técnico.*

*Aos colegas do laboratório, Ana Rita, Ana Carolina, Fábria, Daniel, Daniela, Jaqueline, Lucinha, Márcia, Márcia Tommy, Márcia Amaducci, Mariana, Patrícia, Rosimary e Stephanie, pelo convívio e pela troca de experiências que enriqueceram a minha vida.*

*Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelos subsídios financeiros aplicados.*

Este Trabalho foi desenvolvido em laboratórios dos Departamentos de Microbiologia / Imunologia, Bioquímica, Biologia Celular do I.B. / UNICAMP e, no Laboratório de Purificação de Proteínas e Seus Efeitos Biológicos / UFMS. Para sua realização, nos foi concedida bolsa de doutorado pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

# Índice

<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1 Morte Celular.....	2
1.2 Lectinas de Plantas e Suas Aplicações Biológicas.....	8
1.3 Lectina de Sementes de <i>Talisia esculenta</i> (TEL).....	14
<b>2. Objetivos</b> .....	17
<b>3. Material e Métodos</b> .....	19
<b>Parte I: "Estudo da Ação Tóxica Induzida por TEL Sobre Uma Linhagem Celular Não-Tumoral (Células Vero)"</b> .....	20
3.1 Obtenção da Lectina de Sementes de <i>Talisia esculenta</i> (TEL).....	20
3.2 Preparo e Manutenção das Células Vero.....	20
3.3 Teste de Citotoxicidade (Microscopia de Contraste de Fase).....	21
3.4 Ensaio de Viabilidade Celular.....	21
3.5 Dosagem de Lactato Desidrogenase (LDH).....	22
3.6 Estudo das Alterações Morfológicas Induzidas por TEL.....	23
3.6.1 Coloração com Azul de Toluidina (AT).....	23
3.6.2 Reação de Feulgen.....	23
3.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	24
3.7 Marcação do Citoesqueleto de Actina.....	24
3.8 Fragmentação do DNA.....	24
3.8.1 Ensaio de TUNEL (terminal dUTP nick-end labeling).....	25
3.8.2 Extração do DNA e Eletroforese em Gel de Agarose.....	25
3.9 Estudo da Internalização de TEL.....	26
3.9.1 Conjugação de TEL a Biotina (TEL-Biotina).....	26
3.9.2 Revelação de TEL-biotina.....	27
3.10 - Determinação da Atividade das Caspase-3 e Caspase-9.....	27
3.11 Análise Estatística.....	28
<b>Parte II: "Estudo da Ação Tóxica Induzida por TEL Sobre Uma Linhagem Celular Tumoral (câncer do colo uterino)"</b> .....	28

3.12 Preparo e Manutenção das Células Tumorais.....	29
3.13 Ensaio de Atividade Anti-proliferativa.....	29
<b>4. Resultados.....</b>	<b>31</b>
<b>Parte I: "Estudo da Ação Tóxica Induzida por TEL Sobre Uma Linhagem</b>	
<i>Celular Não-Tumoral (Células Vero)"</i> .....	32
4.1 Citotoxicidade Induzida por TEL nas Células Vero.....	32
4.2 Alterações Morfológicas e Intracelulares nas Células Vero Induzidas por	
TEL.....	34
4.3 Internalização e Tráfego de TEL nas Células Vero.....	38
4.4 Ativação de caspases em células Vero.....	39
<b>Parte II: "Estudo da Ação Tóxica Induzida por TEL Sobre Uma Linhagem</b>	
<i>Celular Tumoral (câncer do colo uterino)"</i> .....	41
4.5 Avaliação da Suscetibilidade de Diferentes Linhagens de Células Tumorais	
Tratadas com TEL.....	41
4.6 Citotoxicidade Induzida por TEL Sobre as Células Hela.....	42
4.7 Alterações Morfológicas e Intracelulares nas Células Hela induzidas por	
TEL.....	45
4.8 Internalização de TEL nas Células Hela.....	49
4.9 Ativação de Caspases em Células Hela.....	49
<b>5. Discussão.....</b>	<b>51</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>59</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>61</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Diferentes tipos de Morte Celular.....	3
<b>Figura 2</b> - Múltiplas Vias de Sinalização de Morte Celular Programada.....	6
<b>Figura 3</b> - Estrutura Molecular de Uma Lectina Formada por 4 Subunidades e Domínio Reconhedor de Carboidrato.....	8
<b>Figura 4</b> - Interações Onde Lectinas Podem Estar Envolvidas.....	11
<b>Figura 5</b> - Arvore, frutos e sementes de <i>Talisia esculenta</i> .....	15
<b>Figura 6</b> - Perfil de Eluição de TEL na Coluna de Quitina e Eletroforese SDS-PAGE das Proteínas Eluídas.....	16
<b>Figura 7</b> - Fotomicrografia de Contraste de Fase das Células Vero.....	33
<b>Figura 8</b> - Efeito de TEL Sobre a Viabilidade das Células Vero.....	34
<b>Figura 9</b> - Efeito de TEL Sobre a Liberação de LDH Pelas Células Vero.....	35
<b>Figura 10</b> - Coloração com Azul de Toluidina e Microscopia Eletrônica de Varredura em Células Vero.....	36
<b>Figura 11</b> - Reação de Feulgen e Percentual de Células Vero com Núcleos Alterados (fenótipo apoptótico) Identificados pela Reação de Feulgen...	37
<b>Figura 12</b> - Marcação do Citoesqueleto de Actina em Células Vero.....	38
<b>Figura 13</b> - Fragmentação do DNA das Células Vero Tratadas com TEL Através do Método de TUNEL e Eletroforese em Gel de Agarose.....	39
<b>Figura 14</b> - Internalização e Tráfego de TEL em Células Vero.....	40
<b>Figura 15</b> - Efeito de TEL Sobre Atividade das Caspases -3 e -9 nas Células Vero.	41
<b>Figura 16</b> - Suscetibilidade de Diferentes Células Tumorais a Ação de TEL.....	42
<b>Figura 17</b> - Efeito de TEL Sobre a Viabilidade das Células Hela.....	43
<b>Figura 18</b> - Efeito de TEL Sobre a Liberação de LDH Pelas Células Hela.....	44
<b>Figura 19</b> - Efeito de TEL Sobre a Proliferação das Células Hela.....	45
<b>Figura 20</b> - Coloração com Azul de Toluidina (a-d) e Reação de Feulgen (e-g) em Células Hela.....	46
<b>Figura 21</b> - Marcação do Citoesqueleto de actina em Células Hela.....	47
<b>Figura 22</b> - Fragmentação do DNA das células Hela detectada através do método de TUNEL.....	48

<b>Figura 23 - Internalização e Tráfego de TEL nas Células Hela.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 24 - Efeito de TEL Sobre Atividade das Caspases -3 e -9 nas Células Hela..</b>	<b>50</b>

## Lista de Abreviaturas

<b>Apaf-1</b>	Ativador de protease apoptótica fator 1
<b>Bax</b>	Proteína X associada a Bcl-2
<b>Bcl-2</b>	Proteínas de células B (Linfoma tipo 2)
<b>BH3</b>	Grupo de proteínas proapoptóticas em <i>Homo sapiens</i>
<b>Bid</b>	Proteína próapoptótica
<b>Con A</b>	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
<b>CRD</b>	Domínio reconhecedor de carboidrato
<b>DD</b>	Domínio de morte
<b>DED</b>	Domínio efetor de morte
<b>DISC</b>	Complexo de sinalização de morte
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>FADD</b>	Domínio de morte associado ao Fas
<b>Fas</b>	Membro da superfamília de receptores TNF (ou CD95, ou APO-1)
<b>FITC</b>	Isotiocianato de Fluoresceína
<b>GSA</b>	Lectina <i>Griffonia simplicifolia</i>
<b>Hela</b>	Linhagem celular estabelecida de células de carcinoma cervical humano
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>Man</b>	Manose
<b>MEM</b>	Meio mínimo essencial de Eagle
<b>ML-I</b>	Lectina Mistletoe - I ( <i>Viscum album</i> )
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<b>PARP</b>	Polimerase poli-ADP-ribose (enzima reparadora do DNA)
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfato
<b>PCD</b>	Morte celular programada
<b>PHA-L</b>	Leuco-aglutinina de <i>Phaseolus Vulgaris</i>
<b>RIP-2</b>	Proteína inativadora de ribossomos tipo-II
<b>RPMI</b>	"Roswell Park Memorial Institute" (meio de cultura)

<b>SDS-PAGE</b>	Eletoforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>tBid</b>	Proteína próapoptótica ativada
<b>TEL</b>	Lectina de <i>Talisia esculenta</i>
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TNFADD</b>	Domínio de morte associado ao receptor TNF
<b>TNFR</b>	Receptor do fator de necrose tumoral
<b>TRITC</b>	Isotiocianato de Tetrametil-rodamina
<b>Vero</b>	Linhagem celular estabelecida de células de rim de macaco verde africano <i>Cercopithecus aethiops</i>
<b>WGA</b>	Lectina de <i>Triticum vulgare</i>

## Resumo

Lectinas constituem uma classe de proteínas ou glicoproteínas que são capazes de ligar-se, reversivelmente e seletivamente, a carboidratos sem causar transformação química. Estudos têm mostrado que a ligação de lectinas a carboidratos de superfície celular de células normais e malignas leva a vários efeitos biológicos tais como proliferação celular e apoptose. Neste trabalho, nós investigamos os efeitos citotóxicos induzidos por TEL (uma lectina, isolada de sementes de *Talisia esculenta*, a qual preferencialmente liga-se a resíduos de manose) sobre linhagens de células tumorais e não-tumorais. Células Vero (rim de macaco verde africano) e Hela (carcinoma cervical humano) tratadas com TEL exibiram perda da integridade da membrana plasmática, retração celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos. Além disso, células Vero e Hela tratadas com TEL também revelaram uma drástica desorganização do citoesqueleto de actina. A Fragmentação internucleossomal do DNA foi detectada pelo método de TUNEL e eletroforese em gel de agarose. Os efeitos citotóxicos induzidos por TEL foram progressivos e mostraram que as alterações morfológicas e os danos ao DNA ocorreram após a perda da integridade da membrana. Adicionalmente, TEL inibiu significativamente a proliferação das células Hela de maneira dependente da concentração. Nós também mostramos através de microscopia de fluorescência que TEL é internalizada nas células Vero dentro de pequenas vesículas que depois se acumulam da região perinuclear; nas células Hela, a internalização não foi observada. Foi estabelecido que a atividade das caspases-3 e -9 aumentaram nas células Vero e Hela de uma maneira dependente do tempo. Em contraste com as células Vero, a atividade da caspase-3 precedeu a ativação da caspase-9 nas células Hela. Os efeitos citotóxicos e a internalização de TEL foram bloqueados pela manose, sugerindo que a ligação de TEL ao carboidrato específico na superfície celular é um pré-requisito para esses processos. Os resultados mostraram que a morte celular induzida por TEL nas células Vero e Hela seguiu uma série de eventos que culminou em um modo apoptótico de morte celular. Finalmente, uma vez que as células Hela foram altamente sensíveis a citotoxicidade induzida pela lectina, TEL merece futuras investigações porque suas propriedades podem ser uma ferramenta útil na terapia contra câncer cervical humano.

**Palavras-chave:** Lectina; *Talisia esculenta*; Citotoxicidade; Cultura celular; Morte celular.

## Abstract

Lectins constitute a class of proteins or glycoproteins which are capable of binding carbohydrates selectively and reversibly without causing their chemical transformation. Studies have shown that lectin binding to cell surface carbohydrates of normal and malignant cells triggers various biological effects such as cellular proliferation and apoptosis. In this work, we investigate the cytotoxic effects induced by TEL (a lectin, isolated from *Talisia esculenta* seeds, which binds preferentially to mannose residues), on tumoral and non-tumoral cell lines. TEL-treated Vero (African green monkey kidney) and HeLa (human cervical carcinoma) cells exhibited loss of plasma membrane integrity, cellular retraction, chromatin condensation, nuclear fragmentation and formation of apoptotic bodies. Furthermore, TEL-treated Vero and HeLa cells also revealed a drastic disorganization of the actin cytoskeleton. Internucleosomal DNA fragmentation was detected by TUNEL method and agarose gel electrophoresis. TEL-induced cytotoxic effects were progressive and showed that the morphological alterations and DNA damage occurred after the loss of membrane integrity. Additionally, TEL significantly inhibited the proliferation of HeLa cells in a concentration-dependent manner. We also show through fluorescence microscopy that TEL is internalized in Vero cells into small vesicles that further coalesce in the perinuclear region; in HeLa cells, TEL internalization was not observed. It was established that caspase-3 and -9 activity increased in Vero and HeLa cells after TEL treatment in a time-dependent manner. In contrast to Vero cells, caspase-3 activity preceded the activation of caspase-9 in HeLa cells. The cytotoxic effects and the internalization of TEL was blocked by mannose, suggesting that the binding of TEL to specific carbohydrate on the cell-surface is a prerequisite for these processes. The results showed that TEL-induced cell death in Vero and HeLa cells followed by downstream events leading to apoptotic mode of cell death. Finally, since HeLa cells were highly sensitive to lectin-induced cytotoxicity, TEL merits further investigation due to its properties can be a useful tool in therapy against human cervical cancer.

**Keywords:** Lectin, *Talisia esculenta*, Cytotoxicity, Cell culture, Cell death.

# *1. Introdução*

---

## **1.1 Morte Celular**

Os estudos ultraestruturais clássicos de Kerr e colaboradores (1972) fornecem evidências que células podem submeter-se a, pelo menos, dois tipos distintos de morte celular; e essa classificação ainda tem sido utilizada durante os últimos 30 anos. O primeiro tipo de morte celular, conhecida como necrose, é uma forma rápida e violenta de degeneração que afeta populações celulares extensas, caracterizada por “inchaço” do citoplasma, destruição de organelas e rompimento da membrana plasmática. Nesse processo, a perda da integridade da membrana plasmática com liberação do conteúdo celular, tais como proteases e lisozimas, induz uma resposta inflamatória com liberação de citocinas por macrófagos. Um outro tipo distinto de morte celular foi chamado de apoptose a qual possui características como retração celular, perda da integridade da membrana plasmática, manutenção da integridade das organelas, condensação e fragmentação do DNA (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1981; Israels and Israels, 1999).

O termo necrose é usado para descrever danos teciduais irreversíveis e constitui o tipo de morte celular que não é programado e de característica acidental. Em contraste com apoptose, a necrose é uma forma passiva de morte e sem mecanismos regulatórios intrínsecos. As causas de morte celular necrótica tais como agentes tóxicos podem, em muitos casos, também induzir morte celular por apoptose. Frequentemente, será a intensidade do insulto que fará com que a morte celular seja necrótica ou apoptótica ou, que ainda, desenvolva uma via alternativa de degeneração (Fig. 1) (Majno and Joris, 1995; Assunção-Guimarães and Linden, 2004).

A morfologia das células que morrem por necrose é altamente diversa. A membrana plasmática torna-se rapidamente permeável. As organelas podem dilatar-se, e os ribossomos podem dissociar-se do retículo endoplasmático. Os núcleos, mais tardiamente, se desintegram, e em alguns casos, ocorre condensação da cromatina. Entretanto, núcleos fragmentados e picnose não são características comuns na morte celular necrótica (Clarke, 1990).

Morte celular programada (PCD) é um evento presente durante doenças e o desenvolvimento normal. PCD é um processo importante para modelar tecidos e destruir

células que causam danos, como as células imuno autoreativas. O excesso de PCD pode ser prejudicial e contribuir para o surgimento de várias patologias degenerativas, enquanto que

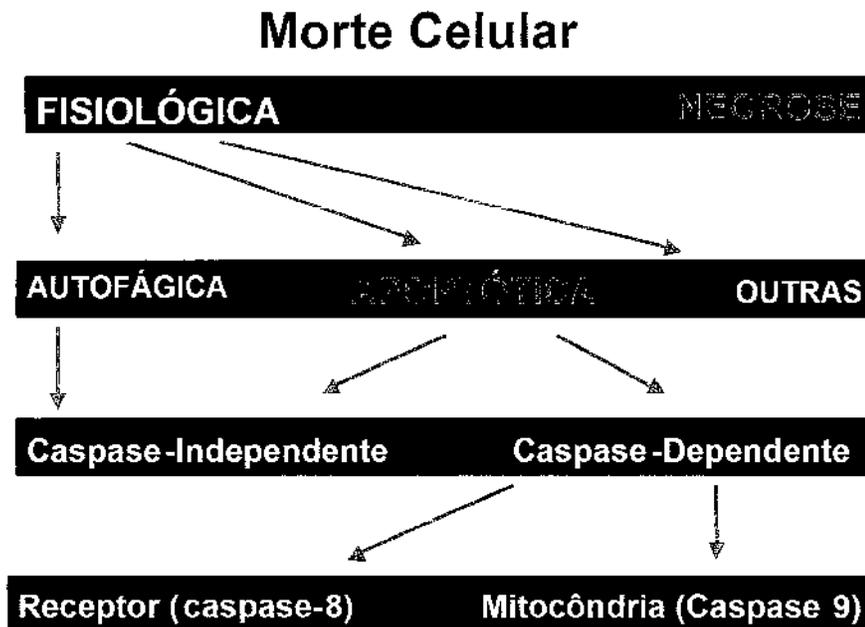


Fig. 1 - Diferentes tipos de Morte Celular (Adaptado de Assunção-Guimarães and Linden, 2004).

a falta da PCD pode favorecer significativamente o desenvolvimento de doenças proliferativas como o câncer (Thompson, 1995; Hanahan and Weinberg, 2000; Green and Evan, 2002). Evidências, durante o processo de morte celular, do desaparecimento das células mortas e de eventos controlados, foram a base para justificar a utilização do termo operacional "programada". Muitos grupos de pesquisa começaram a considerar PCD e apoptose como sinônimos; entretanto, esse esquema generalizado e simplificado, negligencia as exceções; por exemplo, as morfologias de morte celular que não se ajustam na classificação original (Clarke, 1990; Assunção-Guimarães and Linden, 2004).

Apoptose refere-se a uma forma específica de PCD importante durante o desenvolvimento e para manutenção da homeostase em muitos organismos (Wang, 2001; Rathmell and Thompson, 2002; Horvitz, 2003; Hay et al., 2004;). Pesquisas nas últimas duas décadas têm levado a identificação de centenas de genes que estão envolvidos na iniciação, execução e regulação da apoptose em diversas espécies (Danial and Korsmeyer 2004). As vias de apoptose são evolutivamente conservadas, levando a ativação das

proteases de morte, conhecidas como caspases (Thornberry and Lazebnik 1998; Riedl and Shi, 2004;).

As alterações morfológicas de morte celular apoptótica, consideravelmente importantes, estão relacionadas às mudanças no núcleo e que são, em geral, similares em diferentes espécies e tipos celulares (Hacker, 2000; Saraste and Pulkki, 2000; Leist and Jaattela, 2001). Características morfológicas marcantes de apoptose que ocorrem no núcleo são a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear a qual acontece nos estágios mais tardios do processo de apoptose (Majno and Joris, 1995). Usualmente, algumas horas são necessárias desde a iniciação da morte celular até o seu estágio final; entretanto, o tempo de execução de morte é dependente do tipo celular, do estímulo e da via de morte a qual foi ativada (Kerr et al., 1972; Ziegler and Groscurth, 2004).

Durante o processo de morte por apoptose, numerosas proteínas são ativadas em uma sequência altamente regulada. O início do processo pode ser induzido por vários estímulos, como a interação de "ligantes" a receptores de superfície celular, injúrias à integridade do DNA por vários fatores de estresse (por exemplo: drogas), radiação ou grandes mudanças na homeostase celular. A principal via de transdução de muitos desses sinais ocorre através da oligomerização e interação de proteínas com domínios efetores de morte (DED) nos receptores de membrana (Tibbetts et al., 2003). Essas proteínas, com unidade de domínio de morte (DD) e de DED evolutivamente conservados, têm um número de diferentes funções na célula, incluindo, a conexão de receptores de membrana as caspases efetoras citosólicas (Thornberry et al., 1992).

Caspases são proteases, cujos diversos estudos, indicam serem elas a chave executora da morte celular por apoptose, clivando seus substratos específicos em resíduos de aspartato. As caspases são sintetizadas como proproteínas (zimógenos) possuindo pouca atividade. Quando clivadas, em um resíduo de asparagina interno, as procaspases são convertidas em enzimas maduras com atividade aumentada (Cerretti et al., 1992; Thornberry et al., 1992). As caspases envolvidas em morte celular podem ser divididas em dois subgrupos funcionais baseado nos papéis que desempenham durante o processo: caspases iniciadoras (caspase-2, -8, -9 e -10) e caspases efetoras (caspase-3, -6 e -7). Geralmente, caspases iniciadoras, uma vez ativadas, irão iniciar um processo em cascata que envolve, posteriormente, as caspases efetoras (Slee et al., 1999a,b). Finalmente, após

recrutamento das caspases efetoras, desencadeia-se uma série de alterações bioquímicas e morfológicas características da morte apoptótica (Cohen, 1997).

Em células de mamíferos, a apoptose sucede-se de duas formas, intrínseca ou extrínseca, as quais são ativadas por estímulos de morte celular do meio intra ou extracelular, respectivamente (Fig. 2). O estímulo intracelular, tal como o dano no DNA, geralmente resulta na ativação das proteínas BH3 da família das proteínas Bcl-2, as quais causam a liberação de fatores proapoptóticos do espaço intermembrana das mitocôndrias para o citoplasma (Wang, 2001; Cory and Adams, 2002). Um desses fatores protéico liberado pela mitocôndria, o citocromo *c*, indiretamente induz a ativação das caspases iniciadoras, caspase-9, a qual subsequente ativa as caspases efetoras, caspases -3 e -7 que são responsáveis, em muitos casos, pela desintegração da célula apoptótica (Salvesen and Duckett, 2002). A via extracelular de morte acontece geralmente através de receptores de morte localizados na superfície celular como a família de proteínas do fator de necrose tumoral (Ashkenazi and Dixit, 1998).

A via de morte intrínseca refere-se a forma de morte cuja participação mitocondrial encontra-se em posição de destaque. Os agentes antitumorais e as radiações ultravioleta, por exemplo, podem levar a ativação dessa via cuja principal característica é o aumento da permeabilidade da membrana externa mitocondrial para passagem de proteínas como citocromo *c* que normalmente se encontra no espaço intermembrana (Green and Kroemer, 1998; Green and Reed, 1998; Jiang and Chang, 2000). A liberação do citocromo *c* leva à formação de um complexo heptamérico denominado apoptosomo. Esse complexo de alto peso molecular formado por citocromo *c*, Apaf-1, dATP e procaspase-9 constituem a plataforma necessária para ativação da caspase-9 (Zou et al., 1999; Jiang and Chang, 2000; Acehan et al., 2002;). A ativação de caspase-9, em "turnover", cliva caspases efetoras (Nicholson and Thornberry, 1997). As caspases efetoras clivam suas proteínas alvo e culmina, quase que obrigatoriamente, na morte da célula. Nesta via de apoptose, as caspases-3 e -9 podem ser as mais importantes atividades que influenciam o processo de morte, bem como estariam envolvidas nas mais recentes propostas da existência de diversos outros tipos de morte celular (Coelho et al., 2000; Martelli et al., 2004).

A morte celular via receptor requer envolvimento de receptores de membrana. Eles são membros da superfamília de receptores de fator necrose tumoral (TNFR)

os quais TNFR e FAS são os mais bem caracterizados e possuem um "DD" citoplasmático (Ashkenazi and Dixit, 1998). Após sua associação com o ligante

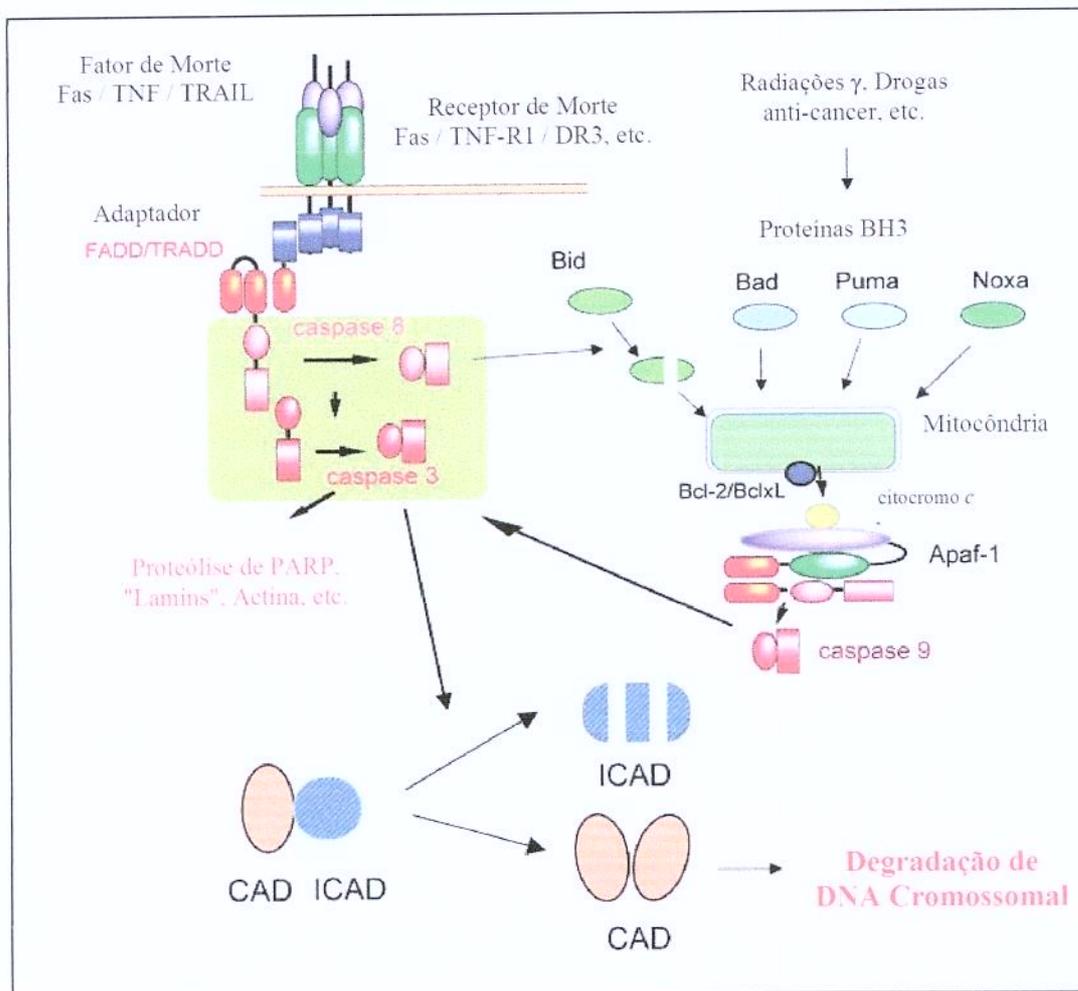


Fig. 2 - Múltiplas Vias de Sinalização de Morte Celular Programada. (Adaptado de Nagata et al., 2005).

correspondente contendo também o "DD", uma mudança conformacional e/ou oligomerização ocorre no receptor. Em seguida, eles recrutam uma molécula adaptadora, domínio de morte associado a "Fas" (FADD) ou domínio de morte associado ao receptor TNF (TNFADD), e procaspase-8 (e provavelmente caspase-10) formando um complexo de sinalização de morte (DISC) (Garg and Aggarwal, 2002; Mirkes, 2002). No DISC, procaspase-8 é convertida a caspase-8 que, por sua vez, leva a ativação direta da caspase-3 (Jiang and Chang, 2000).

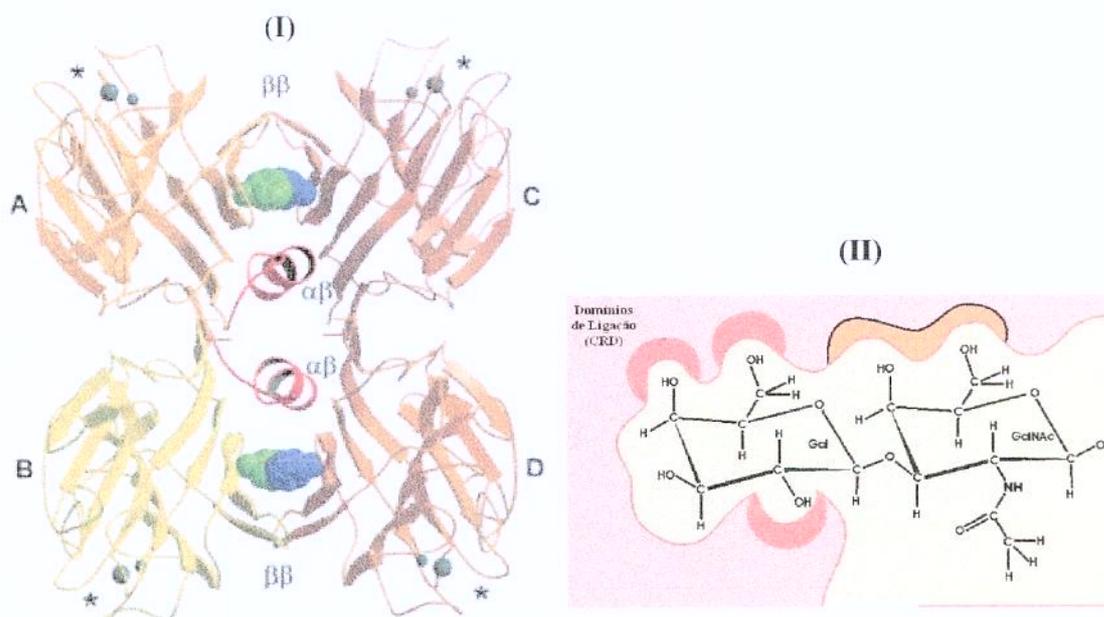
A via mitocondrial de morte também converge na ativação de caspase-3. Caspase -3 pode clivar uma série de proteínas tais como PARP (enzima reparadora do DNA), laminas nucleares, gelsolina, e foldrina (Jiang and Chang, 2000). As duas vias apoptóticas, intrínseca e extrínseca, podem também ser ligadas através da "Bid", um proapoptótico membro da família Bcl-2 (Yin, 2000a,b). Bid é usualmente encontrada no citosol e é clivada pela caspase-8 para originar tBid, a qual é translocada para mitocôndria (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Na mitocôndria tBid eficientemente ativa Bax que inicia a liberação de citocromo *c* e a disfunção mitocondrial. Essa alternativa é a maneira pelo qual a via mediada por receptor se relaciona com a via mitocondrial amplificando a ativação de caspases necessária para apoptose (Haimovitz-Friedman, 1998).

Grandes progressos têm sido feitos nos últimos anos para compreender a estrutura e as funções das caspases. Existem algumas vias conhecidas de ativação de caspases; entretanto, não parecem ser as únicas, pois existem muitas outras as quais vem sendo exploradas, como por exemplo, caspase -2 como uma caspase iniciadora. Apesar das diversas possibilidades, já é de comum acordo que as diferentes vias não acontecem independentemente, mas que estão intimamente correlacionadas. (Bidere and Senik, 2001; Lockshin and Zakeri, 2002; Lockshin and Zakeri, 2004).

Em geral, o modo de execução de morte e suas manifestações biológicas dependem do tipo celular, nível e metabolismo energético, vias de sinalização, estímulos, e ambiente. Dessa forma, existem várias formas intermediárias de morte celular as quais possuem características morfológicas apoptóticas como também necróticas, mas a base de como ocorre a ativação dessas vias infelizmente ainda não são compreendidas. Células podem ainda desenvolver uma morte celular tipo apoptótica sem ativação de caspases, refletindo uma via alternativa onde proteases lisossômicas possuem papel crucial. Nesses casos, a condensação da cromatina é pouco evidente e a fragmentação nuclear usualmente não ocorre. Morte celular pode também ser iniciada por um programa de apoptose padrão, a qual depois é inibida (durante o estágio final de ativação das caspases) e é finalizada por necrose. Este fenótipo aponecrótico é caracterizado pela coexistência de núcleos fragmentados e degeneração de organelas (Formigli et al., 2000)

## 1.2 Lectinas de Plantas e Suas Aplicações Biológicas

Tendo em vista os avanços nos conhecimentos a respeito da estrutura molecular de lectinas, a sua definição inicial como sinônimo de aglutininas (Goldstein et al., 1980) têm sido substituída por um conceito mais moderno e generalizado. Lectinas de plantas constituem um grupo de proteínas funcional e estruturalmente diversificado (Loris, 2002) que possuem, pelo menos, um domínio não catalítico o qual liga-se reversivelmente a carboidratos específicos (Peumans and Van Damme, 1998; Sharon and Lis, 2004). As lectinas de plantas não necessariamente possuem apenas domínios reconhecedores de carboidratos (CRD), mas também podem apresentar um domínio não relacionado, com estrutura e atividade biológicas totalmente diferentes e, em alguns casos, a função chave da lectina pode ser determinada por um domínio diferente do CRD (Fig. 3) (Van Damme et al., 2004a; Komath et al., 2006).



**Fig.3** - (I) Estrutura molecular de uma lectina formada por 4 subunidades (A, B, C e D) mostrando os domínios reconhecedores de açúcar (\*) e outros sítios onde adeninas encontram-se ligadas (Verde e Azul) (Reproduzido de Hamelryck et al., 1999). (II) Domínio Reconhedor de Carboidrato (Adaptado de Sharon, 1977).

A lectina ricina, obtida de sementes de *Ricinus communis*, por exemplo, é constituída por duas cadeias (A e B) unidas por pontes dissulfeto e, cada uma delas, possuindo sítios e/ou domínios com atividades biológicas diferentes. A cadeia B (32 kDa) é ligante de Gal/GalNAc e apresenta ação citotóxica; a cadeia A (30 kDa), uma subunidade também tóxica, tem uma atividade RNA N-glicosidase para a clivagem específica de uma base adenina do RNA ribossomal e, dessa forma, exercendo a função de inibição de síntese de proteína (Lord et al., 1994).

Devido às novas definições e estruturas, as lectinas de plantas são subdivididas em quatro classes: mero, holo, quimero e superlectinas (Van Damme et al., 1998). As merolectinas são proteínas que têm, pelo menos, um domínio ligante de carboidrato. São monovalentes e conseqüentemente incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Diferentemente, a classe das hololectinas compreende todas as lectinas que possuam domínios di-ou multivalentes idênticos ou muito similares. A maioria das lectinas vegetais pertence ao grupo das hololectinas, como exemplo Con A (concanavalina A) (Peumans et al., 1998). As quimerolectinas/hemilectinas são aquelas que consistem de um ou mais domínios ligantes de carboidratos mais um domínio distinto com atividade catalítica ou com outra atividade biológica. Superlectinas também possuem pelo menos dois domínios ligantes de carboidratos, mas difere das hololectinas devido seus domínios serem capazes de reconhecer açúcares estruturalmente não relacionados. Um exemplo é a lectina de Tulipa (TcLC-I) que possui um domínio manose e um não relacionado de ligação a N-acetilgalactosamina (Van Damme et al., 1996). Segundo Van Damme e colaboradores (2004), baseado na similaridade seqüencial e estrutural, lectinas podem ainda ser classificadas em famílias (amarantinas, ligantes de quitina, do floema de Cucurbitaceae, relacionadas a jacalina, legumes, monocotiledôneas ligantes de manose e RIP-2) e que devido à existência de outras lectinas as quais não entram nessa classificação, é bem possível que novas famílias sejam descobertas no futuro.

Geralmente, as lectinas estão distribuídas por toda parte da planta. A maior parte, porém, encontra-se nos órgãos de armazenamento em sementes de cotiledôneas (Moreira et al., 1991). Outras partes da plantas tal como folhas, caule, raízes ou flores principalmente, contêm apenas pequenas quantidades as quais, não são necessariamente, idênticas na estrutura ou especificidade a carboidratos, como as lectinas dos órgãos de armazenamento

(Rüdiger, 1998). As lectinas são sintetizadas na forma de pró-proteínas no retículo endoplasmático, e após sofrerem processamentos co e/ou pós-traducionais originam a proteína madura. Durante ou após o transporte da lectina até os vesículas de armazenamento, via complexo de Golgi, podem ocorrer modificações pós-transducionais nas unidades de carboidratos (Loris et al., 1998).

O papel biológico que as lectinas de planta exercem em seus tecidos de origem, tem sido alvo de muitas especulações e, na maioria dos casos, os estudos têm como alvo o domínio de ligação a carboidratos (Rüdiger and Gabius, 2001; Van Damme et al., 2004a). Uma vez que um grande número de lectinas é isolada de tecidos de armazenamento em plantas, onde elas representam uma grande proporção do conteúdo de proteínas totais, tem sido sugerido que lectinas possivelmente sirvam como proteínas de reserva. Em algumas plantas, lectinas são degradadas durante a germinação e, dessa forma, representam uma importante fonte de nitrogênio para o processo de desenvolvimento (Van Damme et al., 1995; Dannenhoffer et al., 1997). Além disso, lectinas estão implicadas em simbioses específicas entre bactérias fixadoras de nitrogênio e as raízes das plantas hospedeiras (Díaz et al., 1989; Lis and Sharon, 1998). Outras observações demonstram que algumas lectinas específicas para galactose, em plantas, têm correlação com as propriedades de crioproteção nos tecidos onde elas se acumulam (Hincha et al., 1997). Alguns trabalhos sugerem que lectinas podem agir como proteínas de defesa contra invasores patogênicos e insetos em um processo de defesa ativo, junto com outros componentes de baixo peso molecular, os quais atuam como antibióticos (De Souza Filho et al., 2003; Branco et al., 2004). Tem sido reportado que a aglutinina de gérmen de trigo encontra-se acumulada nas raízes da planta infectada por nematódeos e que estariam ali representando uma forma ativa de defesa da planta (Oka et al., 1997). Além disso, existe a possibilidade que lectinas não sejam constitutivamente expressas em toda planta, mas que são sintetizadas em resposta a estímulos (como stress salino, por exemplo) por apenas alguns tecidos ou células (Van Damme et al., 2004a,b).

A atividade inseticida das lectinas de plantas contra diversas espécies de insetos de diferentes ordens já é conhecida (Carlini et al., 2002). Geralmente os bioensaios que tentam avaliar esta característica biológica consistem na inclusão de lectinas, em dietas artificiais que, em seguida, são oferecidas ao inseto alvo durante um determinado período (Macedo et

al., 2002, 2003). Embora o modo exato de ação inseticida das lectinas de plantas não esteja completamente elucidado, parece que a resistência à degradação proteolítica pelas enzimas digestivas e a ligação às estruturas do intestino do inseto sejam os dois pré-requisitos básicos para as lectinas exercerem seus efeitos deletérios (Macedo et al., 2004). Como nos sistemas de animais superiores, os efeitos nocivos das lectinas nos insetos são atribuídos principalmente à ligação destas à superfície das células epiteliais do intestino que induz interferências nas funções digestivas, protetoras ou secretórias do intestino (Pusztai, 1996). Esta característica exercida por lectinas de plantas representa um potencial uso como agentes inseticidas obtidos naturalmente contra as pragas que impedem o crescimento da produção agrícola.

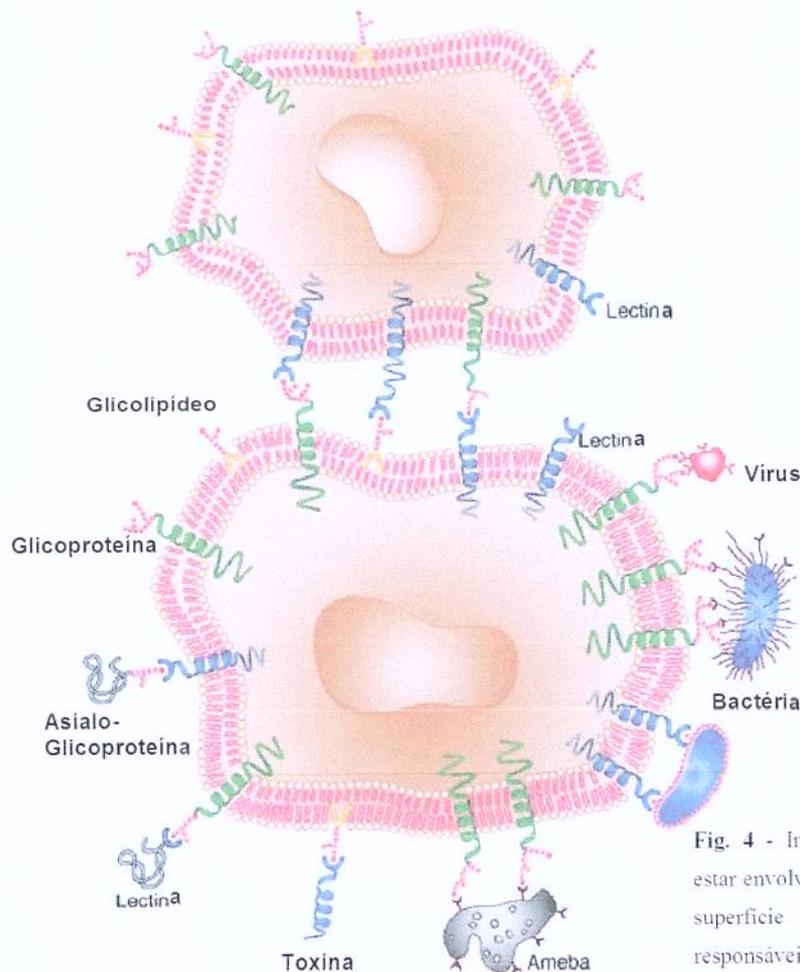


Fig. 4 - Interações onde lectinas podem estar envolvidas. Lectinas podem ligar-se a superfície de células assim como são responsáveis pela interação com microrganismos (Adaptado de Sharon and Lis, 2004).

Uma vez que lectinas reagem especificamente com açúcares não redutores terminais de glicoproteínas e glicolipídeos que compõem a membrana plasmática, elas podem ser usadas para caracterizar esses glicoconjugados de superfície com base nos monossacarídeos que inibem essa ligação (Fig. 4). Algumas lectinas exibem, inclusive, pronunciada especificidade anomérica. Con A, por exemplo, liga-se mais eficientemente as formas  $\alpha$  de manose e glicose, mas é pouco eficaz na sua interação com as formas  $\beta$  (Goldstein and Poretz, 1986). Por isso, devido a essa ação específica, lectinas têm sido usadas de maneira confiável em ensaios bioquímicos, citoquímicos, e em estudos histoquímicos das diferenças sutis entre glicoconjugados de células malignas e não-malignas as quais não são detectáveis com anticorpos monoclonais (Mody et al., 1995). Além disso, pesquisas têm mostrado que lectinas ainda são hábeis em evidenciar diferenças histoquímicas e citoquímicas entre um tecido tumoral e um normal, bem como entre tumores pertencentes à mesma classe (Gabiuss et al., 1998). Para esses fins, entretanto, as lectinas são, geralmente, conjugadas a outras moléculas como isótopos radioativos (Kojima and Jay, 1986), fluorocromos, biotina (McCoy, 1987; Mazumdar et al., 1993) e ouro (Sinowatz and Friess, 1993) para que possam ser detectáveis durante os diferentes estudos nos quais são empregadas.

Lectinas de plantas são empregadas extensivamente em processos biotecnológicos e, dessa forma, podem, por exemplo, ser imobilizadas em matrix sólida (como agarose) para cromatografias de afinidade (Breborowicz and Mackiewicz, 1989; Hirai e Taketa, 1992). Elas ainda podem ser imobilizadas em superfície de poliestireno (como fase sólida) para ensaios de imunoabsorção direta, indireta ou, ainda, imobilizadas sobre membranas de nylon ou nitrocelulose para ensaios de imunofiltração (Pinon et al., 1990). Lectinas podem ser conjugadas a agentes que precisam ser levados até células tumorais como, drogas tumorocidas (Bures et al., 1986; Monsigny et al., 1988), radioisótopos (Kojima and Jay, 1986) e antioxidantes fotoativados (Kreimer-Birnbaum, 1989)

Diversas lectinas de plantas, tal como Con A, aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), são potentes mitógenos para linfócitos humanos (Serke et al., 1989). O efeito estimulatório de crescimento exercido pelas lectinas seria justificado pelas observações de que fatores de crescimento/interleucinas reconhecem seus receptores na superfície das células via interação tal como fazem as lectinas (Sherblom et al., 1988; Sherblom et al., 1989; Yamaoka et al., 1991). Além disso, algumas lectinas têm a capacidade de aumentar, não

especificamente, os mecanismos de defesa do hospedeiro; dessa maneira age a lectina ML-I de *Viscum album*. Essa lectina exerce sua dramática ação antitumoral de maneira indireta devido a seus efeitos imunomoduladores "in vivo" tais como ativação de células NK (natural killer) (Joshi, 1993), aumento da atividade de macrófagos e monócitos (Beuth et al., 1991), estimulação da secreção de citocinas como fator de necrose tumoral, interleucina-6 e sem causar nenhum efeito tóxico (Hajto et al., 1990; Gabius et al., 1992; Bocci, 1993). Uma outra lectina com efeitos imunomodulatórios é a lectina de *Utica dioica* a qual possui efeito estimulatório sobre linfócitos-T e induz a produção de interleucina-2 (Le Moal and Truffa-Bachi, 1988; Lerner e Raikhel, 1992). Tem sido reportado também que efeitos modulatórios de defesa têm sido exercidos por algumas lectinas como Con A e WGA as quais induzem liberação de superóxidos por neutrófilos causando um decréscimo em espécies reativas de oxigênio em pacientes com vários carcinomas (Timoshenko et al., 1993). Lectinas ainda podem atrair células mononucleares para os sítios de injeção ou local de aplicação em dose efetiva bem abaixo da dose tóxica (Wimer, 1990; Wimer, 1997).

Nas duas últimas décadas, tem crescido o número de estudos os quais demonstram, diferentemente da ação tóxica modulada imunologicamente, o uso de lectinas de plantas para induzir efeito tóxico direto sobre células tumorais. O primeiro estudo da atividade antitumoral de lectinas de plantas, *in vitro*, foi publicado em 1970. Nesse trabalho, a lectina Con A teve efeito inibitório sobre o crescimento de diferentes linhagens de células transformadas e, não exerceu nenhum efeito sobre o crescimento de uma linhagem de células não-tumoral (células fibroásticas 3T3) (Shoham et al., 1970). Um grande número de estudos relata o efeito de várias lectinas de plantas sobre linhagens de celulares tumorais onde elas podem atuar através da inibição da síntese de ácidos nucléicos e de proteínas.

Algumas comunidades científicas têm aceitado que o câncer pode ser prevenido e/ou tratado por uma variedade de compostos presentes na natureza. E, seguindo essa proposta, pesquisas têm sido desenvolvidas com intuito de elucidar a maneira como as lectinas interagem com as células (tumoral e não-tumoral), assim como esclarecer detalhes do processo de morte celular induzida por elas (Kulkarni and McCulloch, 1995; Leist and Wendel, 1996; Vervecken et al., 2000; Valentiner et al., 2002; Kim et al., 2003; Abuharbeid et al., 2004; Rao et al., 2005).

O exato mecanismo(s) molecular do efeito antitumoral de lectinas de plantas ainda não se encontra bem esclarecido, embora diversas hipóteses tenham sido reportadas. Muitos desses efeitos de lectinas de plantas são mediados por receptores de superfície celular, mas outros mecanismos podem também estar envolvidos. Um mecanismo geral o qual foi inicialmente proposto para explicar o efeito de lectinas é a diferença na estrutura na superfície da membrana plasmática entre células tumorais e células normal (Sharon and Lis, 1995). Os padrões de ligação da lectina são, em alguns casos, específicos para cada linhagem de célula e isso pode refletir nas distintas maneiras de progressão do efeito de uma lectina sobre diferentes linhagens de células (Tsubura et al., 1991; Remani et al., 1994).

Outros mecanismos da ação tóxica de lectinas os quais culminam com a morte celular tem sido propostos. Assim como drogas anti-tumorais, estudos têm demonstrado que lectinas de plantas induzem apoptose com fragmentação do DNA. Esses dados permitem concluir que apoptose pode controlar a resposta das células após interação com lectinas.

### 1.3 - Lectina de Sementes de *Talisia esculenta* (TEL)

*Talisia esculenta* (sinonímia botânica - *Sapindus esculentus*, *Sapindus edulis*), ou pitomba (nome popular), pertence à família Sapindaceae, com ocorrência no Amazonas, Pará e Maranhão até o Rio de Janeiro, nas florestas pluvial amazônica e atlântica. É particularmente freqüente na Amazônia ocidental e no norte do Espírito Santo (Vale do Rio Doce). Seus frutos (Fig. 5b) são comestíveis e muito saborosos, sendo, inclusive, comercializados nas feiras das regiões norte e nordeste do país. Também são muito procurados por pássaros que atuam como dispersores das sementes desse fruto (Lorenzi, 1992). No Brasil, segundo Silva e colaboradores (1977), os nomes populares mais comuns para *T. esculenta* são pitomba e pitombeira.

As árvores de *T. esculenta* (Fig. 5a) podem medir de 5-15 metros de altura (raramente arbustos) e, geralmente, são muito frondosas; delas, são usados tanto os frutos como as cascas, folhas e a madeira (Guarim Neto et al., 2003). Segundo Lorenzi (1992), a

madeira é empregada para obras internas na construção civil. As cascas e folhas contêm tanino e a seiva é ictiotóxica (Corrêa, 1974). Segundo Prance e Silva (1975), as sementes (Fig. 5c) são tidas como antidiarréicas e usadas como adstringentes. O chá das sementes é utilizado para amenizar os problemas de desidratação. Por outro lado, o chá das folhas é indicado para lombalgia (“dores de cadeira”) e para os problemas renais (Guarim Neto, 1987; Guarim Neto, 1996).

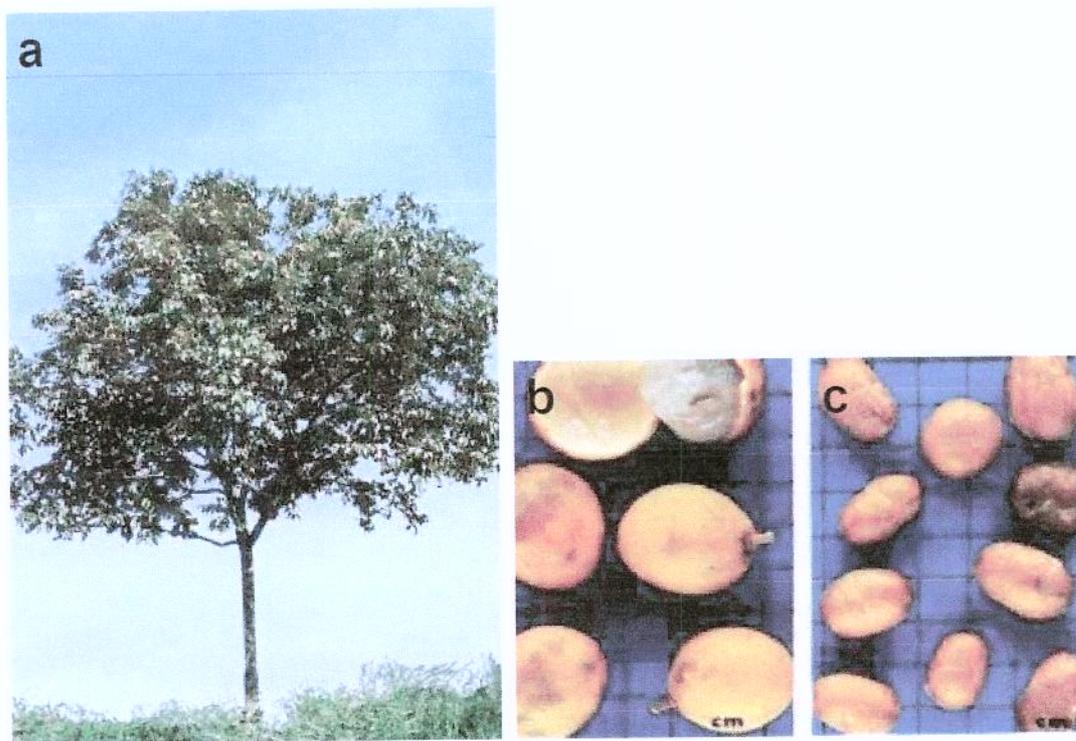
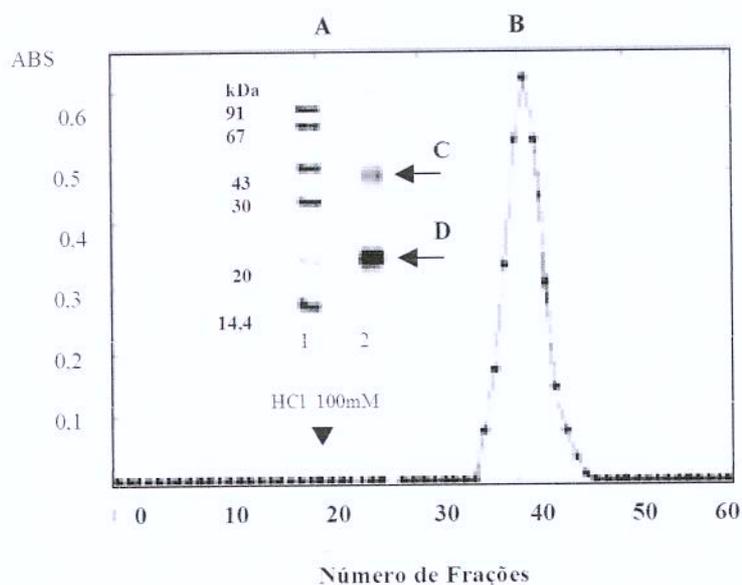


Fig. 5 - Arvore (a), frutos (b) e sementes (c) de *Talisia esculenta* (Reproduzido de Lorenzi, 2º ed., 1992).

Recentemente, Freire e colaboradores (2002) isolaram e caracterizaram uma lectina das sementes de *T. esculenta* a qual denominaram de TEL. Essa lectina foi isolada com uso de apenas duas etapas cromatográficas (Coluna de Sephadex G-100 e Coluna de Quitina). TEL é uma glicoproteína formada por duas bandas (20.000 e 40.000 kDa) (Fig. 6) e com um conteúdo de carboidrato que representa cerca de 18,8%. A atividade hemaglutinante da lectina, a qual mostra-se positiva para eritrócitos humanos e animais, pode ser inibida, preferencialmente com uso de D-manose. A seqüência N-terminal de aminoácidos

demonstrou que a lectina isolada das sementes de *T.esculenta* não possui homologia com nenhuma outra proteína conhecida.

Algumas atividades biológicas exercidas por TEL já foram bem determinadas. Essa proteína possui atividade inseticida (Macedo et al., 2002; Macedo et al., 2004) bem como já foi reportada sua ação inibitória sobre o crescimento de fungos (Freire et al., 2002). Tem sido demonstrado também que TEL possui a capacidade de induzir reposta inflamatória em ratos com recrutamento de células mononucleares e neutrófilos (Freire et al., 2003).



**Fig. 6** - Perfil de eluição de TEL na coluna de quitina (B) e Eletroforese SDS-PAGE (A) das proteínas eluídas mostrando duas bandas protéicas (D=20.000 e C=40.000 kDa) (Adaptado de Freire et al., 2002).

## *2. Objetivos*

---

**GERAL:**

- Estudar a ação da lectina de *Talisia esculenta* (TEL) sobre linhagem de células tumoral (células Hela) e não-tumoral (células Vero) em cultura;

**ESPECÍFICOS:**

- Avaliar, por diferentes parâmetros, a atividade tóxica de TEL e a sua capacidade de causar morte celular;
- Caracterizar as alterações morfológicas e intracelulares induzidas por TEL;
- Propor o mecanismo de ação pelo qual TEL exerce sua ação citotóxica;
- Determinar a possível via envolvida no processo de morte celular;
- Avaliar a ação do monossacarídeo D-manose sobre os efeitos citotóxicos induzidos por TEL;

## *3. Material e Métodos*

---

**Parte I: "Estudo da Ação Tóxica Induzida por TEL Sobre Uma Linhagem Celular Não-Tumoral (Células Vero)"**

**3.1 Obtenção da Lectina de Sementes de *Talisia esculenta* (TEL)**

Os frutos de *T. esculenta* foram adquiridos nos estados do Ceará e/ou Pernambuco. Para obtenção de TEL, foi utilizada a metodologia descrita por Freire et al. (2002). Sementes secas e sem cascas foram trituradas em um macro moinho e a farinha obtida foi delipidada com hexano. Posteriormente, as proteínas presentes na farinha das sementes foram extraídas com 5 volumes de NaCl 150 mM, sob agitação durante 24 h, à 4°C. Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 x g durante 30 minutos à 4°C. O sobrenadante obtido, denominado extrato bruto (EB), foi diluído em NaCl 150mM e aplicado a uma coluna (2,5 cm X 80 cm) de Sephadex G-100 a qual foi equilibrada com o mesmo solvente. A coluna foi inicialmente eluída com NaCl 150 mM seguido por HCl 100 mM. A atividade hemaglutinante foi determinada nas frações resultantes através de ensaios de hemaglutinação. As frações que possuíram atividade hemaglutinante foram reunidas, dializadas e aplicada a uma coluna de quitina (2 cm x 6 cm) equilibrada com Tampão fosfato 50 mM, pH 7,6. Após adsorção das proteínas, a coluna foi lavada com o mesmo tampão e, finalmente, a lectina adsorvida foi eluída com HCl 100 mM. A lectina purificada foi dializada e liofilizada.

**3.2 Preparo e Manutenção das Células Vero**

Foi utilizada a linhagem Vero (células de rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*), proveniente do estoque do Laboratório de Cultura de Células, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia (I.B.), UNICAMP. As células mantidas em nitrogênio líquido foram rapidamente descongeladas em banho a 37°C e transferidas para garrafas de cultura de células contendo meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM) (Nutricell, Campinas, Brasil), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB)

(Nutricell, Campinas, Brasil) e 1 % de uma solução de antibióticos (penicilina 1.000 U/ml e estreptomicina 250 mg/ml). Após a formação de uma monocamada confluenta, as células foram tripsinizadas com uma solução de Tripsina-Versene para dispersão das células e ressuspensas em meio MEM contendo 10 % de SFB e 1 % e, posteriormente, distribuídas em placas de cultura de células (96 ou 24 poços) em uma densidade (nº de células/ml) de acordo com a necessidade de cada ensaio.

### **3.3 Teste de Citotoxicidade (Microscopia de Contraste de Fase)**

Células Vero ( $1 \times 10^5$  células/ml) foram distribuídas em placas de cultura de células de 24 poços e, após formação da monocamada confluenta, TEL (300 µg/ml) foi adicionada, com ou sem mannose (50 mM). As alterações ocorridas nas células vivas, controles e tratadas, foram fotografadas em diferentes intervalos de tempo usando um microscópio invertido de contraste de fase (Olympus IX50) ajustado a uma objetiva de 10X e a um sistema fotomicrográfico (PMC35Dx).

### **3.4 Ensaio de Viabilidade Celular**

O ensaio de viabilidade celular foi realizado como descrito por Mosmann (1983). MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma Chemical) foi dissolvido em meio MEM para uma concentração de 1 mg/ml e filtrado através de uma membrana de 0,22 µm. Células Vero ( $1 \times 10^5$  células/ml), cultivadas em placa de 24 orifícios, foram tratadas com diferentes concentrações de TEL (com ou sem manose 50 mM) durante 24 ou 48 h. Após incubação, o meio foi removido das células e 300 µl da solução de MTT foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas a 37° C por mais 4 h. Após este período, o meio com MTT foi retirado e, em seguida, 100 µl de isopropanol contendo HCl 0,04 N foi adicionado. As placas foram agitadas gentilmente em agitador orbital por 15 min, à temperatura ambiente, para solubilizar os cristais de formazan originados a partir da reação do MTT com enzimas mitocondriais em células viáveis. As

placas foram lidas em um espectrofotômetro a 540 nm. Os valores de absorbância das células tratadas com TEL foram comparados com os valores de absorbância obtidos nas células controle, sem tratamento.

### 3.5 Dosagem de Lactato Desidrogenase (LDH)

A presença da enzima LDH no sobrenadante de cultura de células foi determinada como descrito por Mitchell et al. (1980). As células Vero ( $1 \times 10^5$  células/ml) foram cultivadas em placas de 24 poços e, após 24 h de incubação, TEL (1,5  $CD_{50}$ ) foi aplicada às células e as placas foram incubadas em estufa a 37°C. Durante intervalos de tempo variados (1 - 6 h), o meio foi retirado das células, coletado em tubos *eppendorf* e mantido em banho de gelo. A reação catalisada pela LDH foi realizada em cubetas descartáveis (2,5 ml), contendo 0,1 ml do meio de tratamento das células, 0,2 ml de solução de NADH (2,5 mg/ml em tampão fosfato 0,1 M) e 0,2 ml de solução de piruvato de sódio (1 mg/ml em tampão fosfato 0,1 M). A reação foi acompanhada em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 340 nm por 3 min, a 37°C, fazendo-se leituras da absorbância em intervalos de 30 segundos. O cálculo da variação média da absorbância a 340 nm é feito:

a) Subtraindo-se os valores de:

$$1) A1: A(30s) - A(90s)$$

$$2) A2: A(60s) - A(120s)$$

$$3) A3: A(90s) - A(150s)$$

$$4) A4: A(120s) - A(180s)$$

b) Determinando-se a média MA [(A1+A2+A3+A4): 4] entre eles.

c) A atividade da LDH é então determinada pela fórmula:

$$\text{LDH (Unidades /ml)} = \text{MA (abs)} \times D \times F, \text{ onde:}$$

$$D = \text{fator de diluição} = 1000$$

$$F = \text{fator de temperatura} = 1,16; \text{ a } 30^\circ \text{ C}$$

### **3.6 Estudo das Alterações Morfológicas Induzidas por TEL**

As células Vero foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas, em estufa a 5 % de CO<sub>2</sub>, 37°C, até formação de uma monocamada confluenta. Em seguida, as células foram tratadas com TEL (1,5 CD<sub>50</sub>) durante 3 e 6 h. Após tratamento, foram aplicadas algumas técnicas, descritas a seguir, para observação das alterações morfológicas induzidas pela lectina.

#### **3.6.1 Coloração com Azul de Toluidina (AT)**

As lamínulas foram lavadas com PBS 0,01 M (pH 7,4) e fixadas em uma solução de paraformaldeído a 1% em PBS por 30 min. As lamínulas foram lavadas com água destilada e, em seguida, coradas segundo a metodologia de Mello & Vidal (1980), pelo azul de toluidina (AT) a 0,025 % em tampão McIlvane pH 4,0. Após 15 min de coloração em temperatura ambiente, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com água destilada, secas ao ar e diafanizadas em xilol. As lamínulas foram montadas sobre lâminas utilizando-se o entelan. As alterações induzidas por TEL foram analisadas com uso do microscópio de luz.

#### **3.6.2 Reação de Feulgen**

Após tratamento com TEL, as células foram lavadas com PBS 0,01 M (pH 7,4) e fixadas com etanol/ácido acético (3:1) em PBS por 15 min. Em seguida, foram lavadas com etanol 70 % durante 5 min e hidrolisadas com uso de HCl 4 N durante 1 h a 28°C. As células foram posteriormente lavadas com HCl 1 N (gelado), secas ao ar e tratadas com o Reativo de Schiff durante 40 min. Após 3 lavagens de 5 min com água sulfurosa (Metabissulfito de sódio 10% / HCl 1N / água destilada (1:1:18)), as células foram desidratadas em gradiente crescente de etanol (70 - 100%) e diafanizadas em xilol durante 10 min. As lamínulas foram montadas sobre lâminas utilizando-se o entelan.

### **3.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura**

Células Vero após tratamento foram fixadas com 2.5 % de glutaraldeído e pós-fixadas em 1 % de tetróxido de ósmio. Posteriormente, as células foram desidratadas em um gradiente de etanol, secas ao ponto crítico, e cobertas com ouro. As células foram examinadas em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 5800 LV scanning electron microscope).

### **3.7 Marcação do Citoesqueleto de Actina**

Inicialmente as células Vero foram cultivadas em placas de 24 orifícios contendo lamínulas. Após a formação da monocamada celular, as células foram tratadas com TEL (1,5 CD<sub>50</sub>) durante 3 e 6 h e, em seguida, lavadas 3 vezes com PBS 0,01 M (pH 7,4). Posteriormente, as células foram fixadas com formaldeído 3,7 % em PBS durante 15 min. Após lavagem com PBS para remoção do fixador, as células foram permeabilizadas com o uso de uma solução de Triton X-100 0,1 % em PBS por 5 min. Após este procedimento, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e, em seguida, tratadas com uma solução de Faloidina-FITC (Sigma Chemical) 10 µg/ml em PBS. A placa foi incubada por 30 min e protegida da presença de luz. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS e montadas sobre lâminas com uso de glicerol-PBS (9:1). Finalmente, as lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência.

### **3.8 Fragmentação do DNA**

As células Vero foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas, em estufa a 5 % de CO<sub>2</sub>, 37°C, até formação de uma monocamada confluenta. Em seguida, as células foram tratadas com TEL (1,5 CD<sub>50</sub>) durante 1, 3 ou 6 h. Após tratamento, foram aplicadas duas técnicas, descritas a seguir, para verificação da ocorrência de danos ao DNA.

### 3.8.1 Ensaio de TUNEL (terminal dUTP nick-end labeling)

A fragmentação do DNA foi detectado através do uso de um Kit para marcação de células apoptóticas (ApopTag *In Situ* Apoptosis Detection Kit, Intergen Company, Purchase, NY) o qual tem como princípio a adição de nucleotídeos conjugados a digoxigenina às terminações 3'OH livres em células cujo DNA encontra-se fragmentado. A metodologia foi aplicada de acordo com instruções do fabricante. Após tratamento com a lectina, as células foram fixadas com paraformaldeído 1% em PBS 0,01 M (pH 7,4) durante 10 min e pós-fixadas com etanol/ácido acético (2:1) por 5 min. Em seguida, as células foram tratadas com um tampão de equilíbrio durante 10 segundos a temperatura ambiente e, posteriormente, foi adicionado uma solução que continha a enzima TdT e deoxinucleotídeos trifosfato conjugados à digoxigenina (dNTP-Digoxigenina) durante 1 h a 37°C. Após esse procedimento, as células foram tratadas com um tampão de bloqueio durante 25 segundos (sendo os 15 segundos iniciais sob agitação) a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS durante 1 min e incubadas com uma solução contendo anticorpo anti-digoxigenina conjugada a rodamina (Anti-Digoxigenina-TRITC) durante 30 min, a temperatura ambiente e na ausência de luz. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS e montadas sob lâminas de vidro utilizando-se glicerol-PBS (9:1). As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência.

### 3.8.2 Extração do DNA e Eletroforese em Gel de Agarose

A fragmentação internucleossomal do DNA ("DNA ladder") gênomico das células Vero tratadas foi detectada segundo a metodologia descrita Gross-Bellard *et al.* (1973) com pequenas modificações. Após tratamento, as células existentes em cada poço foram incubadas com 500 µl de um tampão de lise (Tris 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM, SDS 1 %, proteinase K 100 µg/ml) durante 2 h à 55° C. Após este período, foram adicionados 500 µl de fenol; a mistura foi agitada em vortex e, posteriormente, centrifugada a 13.000 rpm por 2 min. A fase aquosa (400 µl) foi removida, transferida para um tubo limpo e 400 µl de clorofórmio foi adicionado. Os tubos novamente foram agitados e, posteriormente, centrifugados a 13.000 rpm por 2 min. Aproximadamente 300 µl da fase aquosa foi

removida e NaCl foi adicionado para uma concentração final de 0,3 M. O DNA foi extraído pela adição de 600 µl de etanol e incubou-se a mistura *overnight* a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após período de incubação, as amostras foram centrifugadas ( $4^{\circ}\text{C}$ , 30 min, 13.000 rpm) e o sedimento obtido foi lavado com etanol 70%. O DNA foi seco em "speed vac", ressuspenso em 20 µl de tampão TE (Tris 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM) e aplicado em gel de agarose 1,5%. A eletroforese foi conduzida a 50V durante aproximadamente 3 h. Em seguida, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio (1µg/ml) e visualizado através da incidência de luz ultravioleta.

### **3.9 Estudo da Internalização de TEL**

Para avaliar se a lectina era internalizada nas células Vero, foi realizada, inicialmente, a conjugação de TEL a biotina (TEL-biotina) e, após incubação com as células, o tráfego da lectina no compartimento intracelular foi acompanhado através da revelação com o uso de estreptoavidina conjugada a fluoresceína (estreptoavidina-FITC). Os procedimentos encontram-se descritos a seguir.

#### **3.9.1 Conjugação de TEL a Biotina (TEL-Biotina)**

A conjugação de TEL a biotina foi realizada utilizando o kit EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit (Pierce Biotechnology, Inc.), conforme as instruções do fabricante. Para uma concentração de 1 mg/ml de TEL em PBS 0,01 M, pH 7,4, foram adicionados 40 µg (aproximadamente 20 vezes o excesso molar) de Sulfo-NHS-LC-biotina. A mistura foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente e sob agitação constante. O conjugado foi dialisado contra PBS, por 8 h a  $4^{\circ}\text{C}$ , com 4 trocas durante o período. Como controle da incorporação da biotina, foi utilizado o método do HABA (Product No. 28010, [2-(4'-hydroxyazobenzene) benzoic acid], Pierce) de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.9.2 Revelação de TEL-biotina**

As células Vero cultivadas sobre lamínulas em placas de 24 orifícios foram tratadas com TEL-biotina (1,5 CD<sub>50</sub> de proteína). As alterações morfológicas nas células foram acompanhadas em microscópio invertido e, a intervalos de tempo variados (durante 6 horas), as células foram fixadas com formaldeído 3,7%. As lamínulas lavadas com 3 vezes com PBS 0,01 M, pH 7,4 e, em seguida, incubadas com solução de streptoavidina-FITC (1:1000) em PBS por 30 min, na ausência de luz. Após incubação, as células foram lavadas com PBS, montadas sob lâminas de vidro utilizando-se glicerol-PBS (9:1) e observadas em microscópio de fluorescência.

### **3.10 - Determinação da Atividade das Caspase-3 e Caspase-9**

Células Vero (2 X 10<sup>6</sup> células) foram tratadas com TEL e, em seguida, a atividade das caspases-3 e -9 foram determinadas utilizando um Kit de ensaio colorimétrico para caspases (R & D Systems, Inc.); sendo os procedimentos realizados de acordo com as instruções do fabricante. O princípio do ensaio baseia-se na ação catalisadora das caspases sobre peptídeos específicos conjugados a cromóforos os quais, quando liberados, são detectados espectrofotometricamente. Em resumo, as células tratadas e não tratadas foram lisadas pela adição de um tampão de lise e, em seguida, incubadas (em gelo) por 10 min. O lisado foi centrifugado a 12.000 rpm por 1 min, e o sobrenadante foi transferido para tubo limpo. Ao sobrenadante foi adicionado o 50 µl de um tampão de reação contendo 0,1 M de DTT e 0,04 mM do substrato específico. Para detecção de caspase-3 o substrato usado foi DEVD-*p*NA (Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitoalanina) e LEHD- *p*NA (Leu-Glu-His-Asp-*p*-nitoalanina) para caspase -9. A mistura foi incubada durante 2h a 37°C e, em seguida, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 405 nm.

### 3.11 Análise Estatística

Análise estatística dos dados experimentais foram determinadas através do Student's *t*-test. Valores de  $p \leq \pm 0,05$  foram considerados significantes, e os resultados foram expressos como média SD das triplicatas. Cada experimento foi realizado, pelo menos, três vezes.

## **PARTE II: "Estudo da Ação Tóxica Induzida por TEL Sobre Uma Linhagem Celular Tumoral (câncer do colo uterino)"**

Na segunda parte do trabalho, a ação tóxica de TEL foi avaliada, inicialmente, em diferentes linhagens de células tumorais. A linhagem celular mais suscetível foi escolhida como modelo para o estudo dos efeitos citotóxicos induzidos pela lectina. Alguns métodos e condições experimentais usadas para avaliação da ação tóxica de TEL nas células Vero foram reproduzidas para a linhagem celular tumoral, incluindo a concentração de TEL (1,5 CD<sub>50</sub>), a qual foi determinada após o teste de viabilidade celular. As metodologias as quais foram utilizadas para caracterizar os efeitos tóxicos de TEL sobre uma linhagem de células de câncer do colo uterino, bem como outros métodos os quais não foram anteriormente descritos, encontram-se relacionadas a seguir:

- 1 - Teste de Viabilidade Celular, como descrito no item "3.4"
- 2 - Estudo das Alterações Morfológicas, como descrito nos itens "3.6", "3.6.1" e "3.6.2".
- 3 - Citoesqueleto de Actina, como descrito no item "3.7"
- 4- Fragmentação do DNA, como descrito no item "3.8.1"
- 5 - Estudo da Internalização, como descrito no item "3.9"
- 6- Atividade Caspases, como descrito no item "3.10"
- 7- Análise estatística, como descrito no item "3.11"

### **3.12 Preparo e Manutenção das Células Tumorais**

Células HT-29 (carcinoma intestinal humano) foram obtidas da "American Type Culture Collection" (ATCC, Rockville, Md). As células HL-60 (leucemia promielocítica humana) foram generosamente cedidas pela Profa. Dra. Carmem V. Ferreira (Departamento de bioquímica, Instituto de biologia, UNICAMP). As células Hep-2 (carcinoma de laringe humana) e HeLa (carcinoma do cérvix uterino humano) foram obtidas do Laboratório de Cultura de Células, Departamento de Microbiologia e Imunologia, UNICAMP. Células HT-29 foram crescidas em Meio McCoy's (Cellgro, Rockville, Md) suplementado com 15% de SFB (v/v). As células HL-60, Hep-2 e HeLa foram crescidas em meio RPMI 1640 (Nutricell, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de SFB (v/v). Todas as linhagens de células foram ainda suplementadas com penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). O preparo e a manutenção das diferentes linhagens foram realizados de maneira similar ao descrito no item "3.2", exceto para as células HL-60 as quais, por não aderirem ao substrato, tiveram a etapa de tripsinização dispensada.

### **3.13 Ensaio de Atividade Anti-proliferativa**

Células HeLa (  $1 \times 10^4$  células/) foram distribuídas em placas de cultura de células de 24 poços. Após 6 h de incubação a 37 ° C, TEL (com ou sem 50 mM de mannose) em diferentes concentrações (2,5-15 mg/ml) foi adicionada e, em seguida, a placa foi incubada por 48 h. A proliferação celular foi determinada através do ensaio do vermelho neutro (VN) (Borenfreund and Puerner,1984). Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS 0,01 M, pH 7,4, e posteriormente foi adicionada a cada cavidade 0,3 ml de meio RPMI 1640 contendo 50 µg/ml de vermelho neutro. A placa foi incubada durante 3 h a 37° C. Para remoção do vermelho neutro não incorporado, as células foram lavadas durante 3 minutos com uma solução de formol-cálcio preparada usando formaldeído 10 % (v/v) e cloreto de cálcio anidro 1 % (p/v). Finalmente, foi adicionado 0,3 ml da mistura de etanol 50 % (v/v) e ácido acético 1 % (v/v) a cada orifício. A placa foi mantida durante 15 min ,a temperatura ambiente, até a realização da leitura a 540 nm em espectrofotômetro.

A proliferação celular após o tratamento com TEL foi expressa em percentual comparando-se com as células controle.

## *4. Resultados*

---

## Parte I: "Avaliação da Ação Tóxica Induzida por TEL Sobre Uma Linhagem Celular Não-Tumoral (Células Vero)"

### 4.1 Citotoxicidade Induzida por TEL nas Células Vero

Inicialmente foi examinado se as células Vero eram suscetíveis a TEL usando uma concentração da lectina (300  $\mu\text{g/ml}$ ) a qual foi selecionada, tendo como referência, dados de estudos similares anteriormente reportados. Células tratadas com TEL mostraram alterações, como retração e arredondamento (Fig. 7), as quais puderam ser vistas após 3 h (Fig. 7c) de tratamento; essas alterações tornaram-se mais evidentes após 6 h (Fig. 7e) de incubação com a lectina. As células também exibiram, após 6 h de tratamento, uma perda de adesão ao substrato (placa de cultura de células). Células não-tratadas (Fig. 7a) e aquelas tratadas com TEL durante 1 h (Fig. 7b) mantiveram a morfologia fibroblástica normal e apresentaram-se bem aderidas à placa de plástico de cultivo de células. Pôde-se observar, durante esse ensaio, que as mudanças morfológicas ocorreram de maneira aleatória e não sincronizada. Adicionalmente, células Vero tratadas com TEL, mas que tiveram manose adicionada, exibiram morfologia similar às células não-tratadas, ou seja, não apresentaram nenhuma mudança morfológica (Fig. 7d).

Como mostrado na Fig. 8, TEL induziu morte celular a qual foi dependente do tempo e da concentração. A concentração mínima da lectina que determinou o início da citotoxicidade foi de 100  $\mu\text{g/ml}$ ; enquanto que a concentração de TEL necessária para causar 50% de morte celular ( $\text{CD}_{50}$ ) foi de aproximadamente 200  $\mu\text{g/ml}$ . No ensaio de viabilidade celular, a adição de manose também bloqueou significativamente a ação tóxica induzida por TEL.

A citotoxicidade induzida por TEL sobre as células Vero também incluiu sua ação sobre a integridade da membrana plasmática a qual foi avaliada através de ensaio que detecta a presença de LDH, uma enzima intracelular, no sobrenadante de cultivo das células após tratamento. Como demonstrado na Fig. 9, a liberação da enzima ocorreu de maneira tempo-dependente e, sua presença no meio de cultivo, foi detectada imediatamente após a primeira hora de incubação com a lectina.

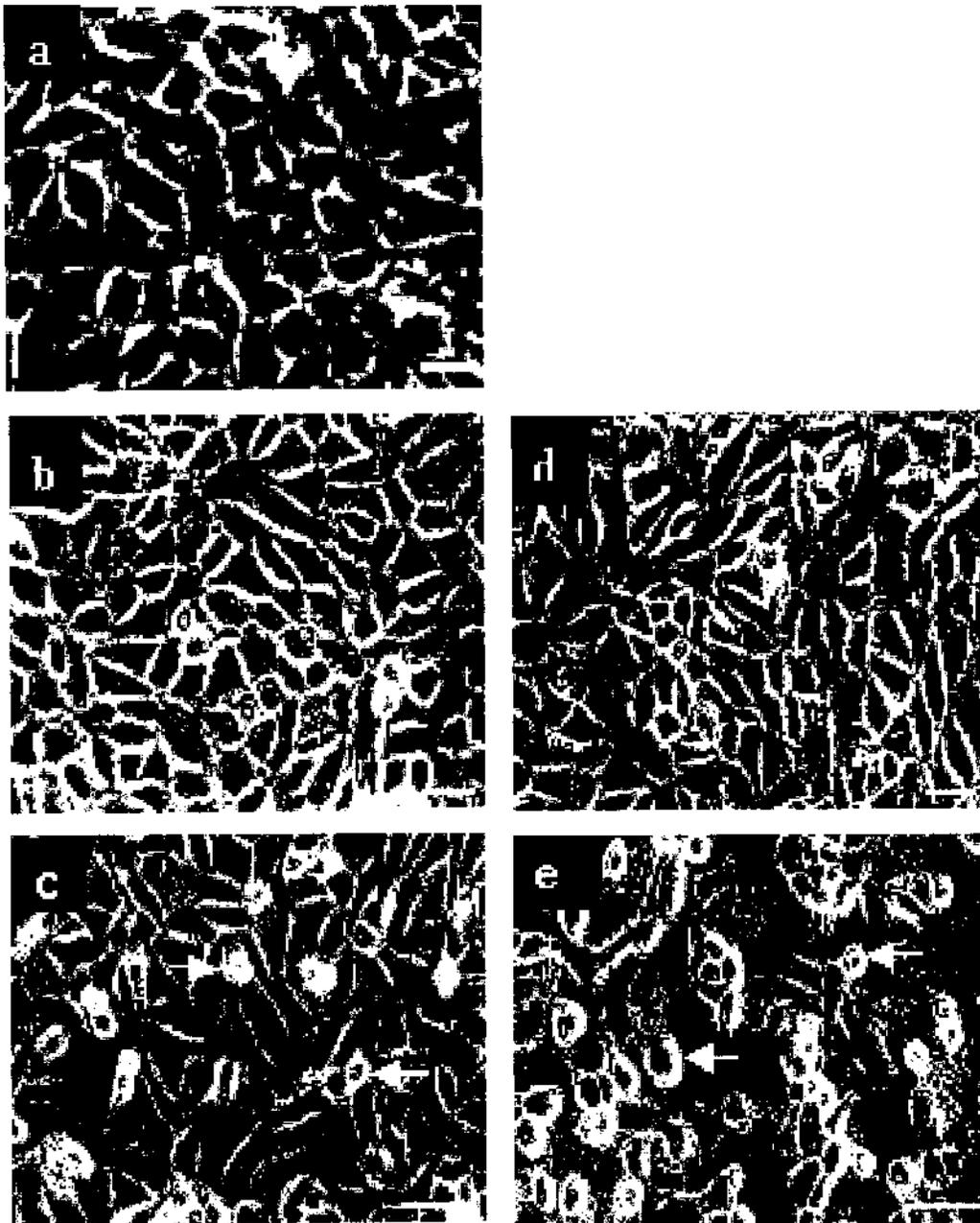


Fig. 7 - Fotomicrografia de Contraste de Fase das Células Vero. Células não-tratadas (a), tratadas com TEL por 1 h (b) e tratadas com TEL+manose durante 6 h (d) mostrando uma típica monocamada confluenta. Após exposição a TEL por 3 h (c) e 6 h (e), as células mostraram retração e arredondamento (indicados por setas). Bars: 50  $\mu$ m

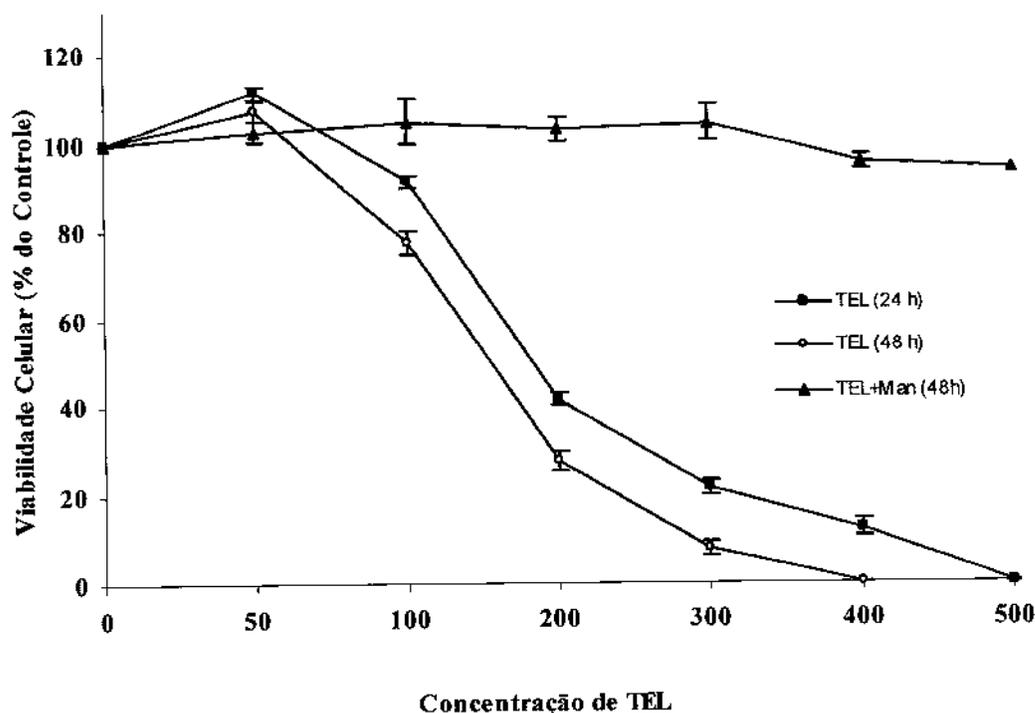
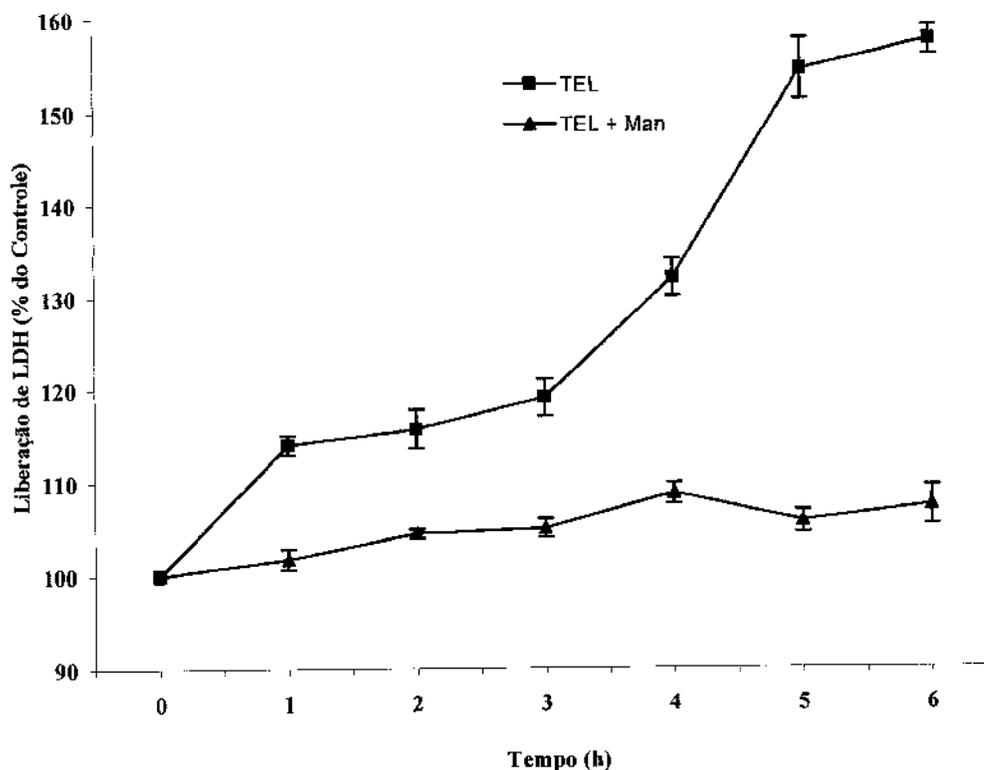


Fig. 8 - Efeito de TEL sobre a viabilidade das células Vero. Células foram tratadas com diferentes concentrações de TEL, com ou sem adição de manose (Man), durante 24 ou 48 h, e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Os dados representam a média  $\pm$  SD de determinações em triplicatas.

#### 4.2 Alterações morfológicas e Intracelulares nas Células Vero Induzidas por TEL

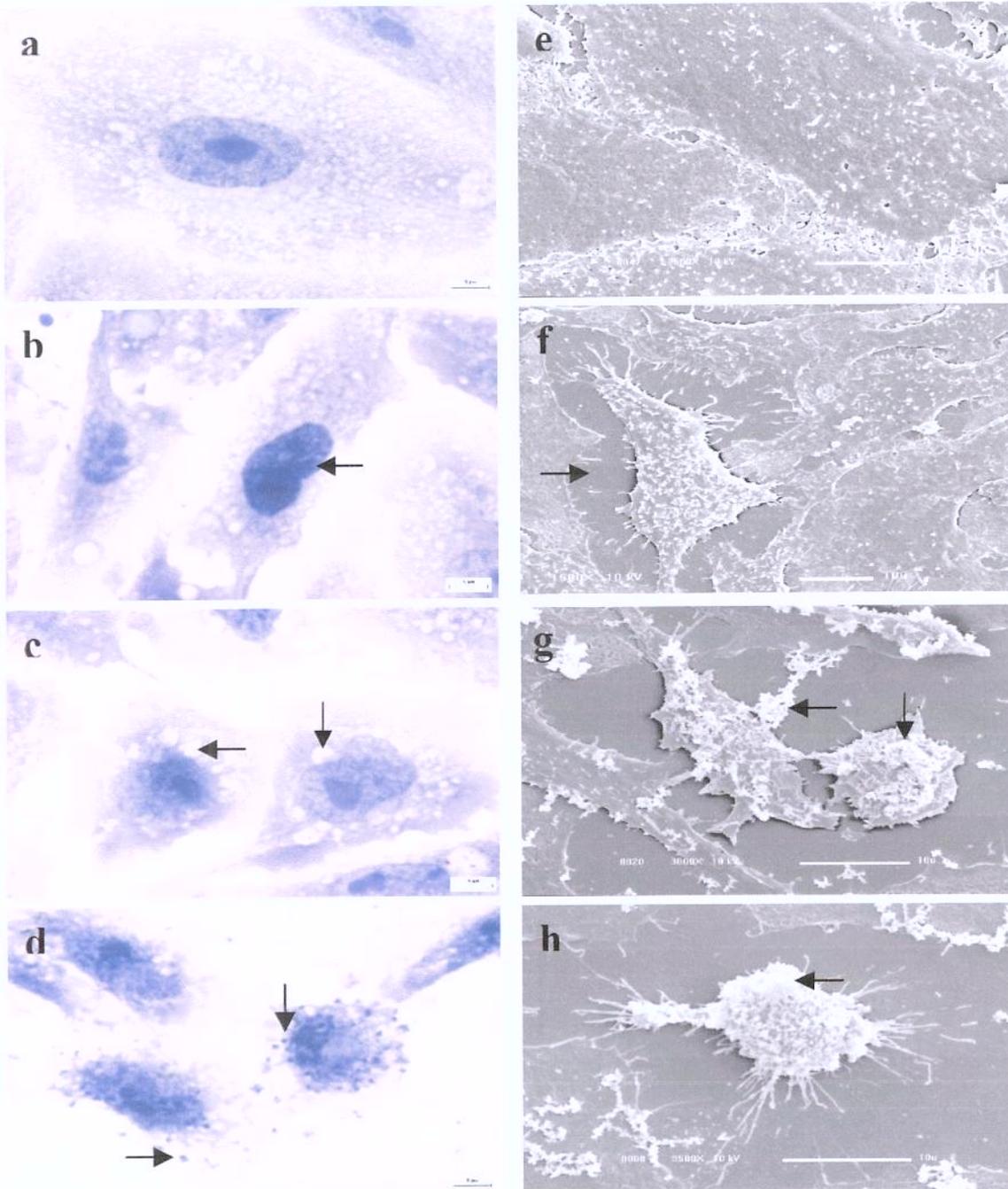
O tratamento das células Vero com TEL resultou em alterações citoplasmáticas e nucleares (Fig. 10 e 11). As células tratadas com TEL durante 3 h mostraram retração celular (Fig. 10f-h), condensação da cromatina (Fig. 10b), e núcleos com diferentes níveis de compactação (Fig. 11a, c). A incubação com a lectina também levou a uma significativa vacuolização citoplasmática (Fig. 10c). Fragmentação nuclear (Fig. 10d), formação de corpos apoptóticos (Fig. 10g, h), núcleos picnóticos (Fig. 11c) e um citoplasma altamente desorganizado (Fig. 10d) foram observados após 6 h de exposição a TEL. Células não-tratadas tinham núcleos com a cromatina dispersa (Fig. 10a e 11b) e nucléolo bem definido (Fig. 10a), assim como formaram uma monocamada confluenta (Fig. 10e). A Fig. 11d mostra que núcleos com um fenótipo tipicamente descrito para células que apresentam



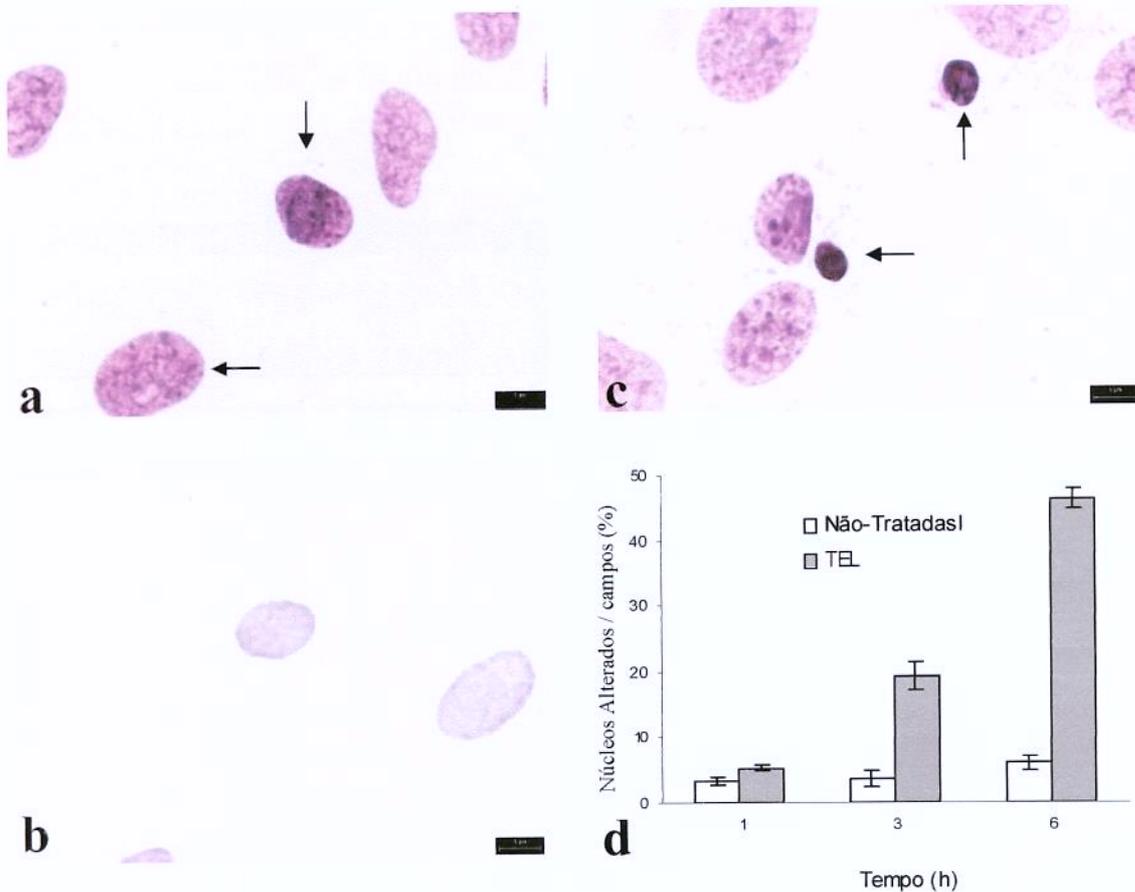
**Fig. 9** - Efeito de TEL sobre a liberação de LDH pelas células Vero. Células foram tratadas com TEL (1,5  $CD_{50}$ ), com ou sem adição de manose (Man), durante diferentes intervalos de tempo (1 - 6 h), e a presença de LDH foi determinada no sobrenadante de cultivo celular. Os dados representam a média  $\pm$  SD de determinações em triplicatas

morte celular tipo apoptótica foram mais freqüentes após 6 h de exposição a TEL, com aproximadamente 46% das células mostrando núcleos alterados.

Além das alterações morfológicas, TEL induziu alterações intracelulares (Fig. 12 e 13). A microscopia de fluorescência revelou mudanças no arranjo dos filamentos de actina em células Vero (Fig. 12). Após 3 h de tratamento com TEL, a disposição dos filamentos de actina foi pobremente definidos e intensos "spots" de actina fluorescente foram vistos no citoplasma (Fig. 12b, d). Adicionalmente, células tratadas com TEL durante 6 h exibiram um colapso de actina ao redor do núcleo (Fig. 12c). As células não-tratadas exibiram filamentos de actina normalmente organizados (Fig. 12a).

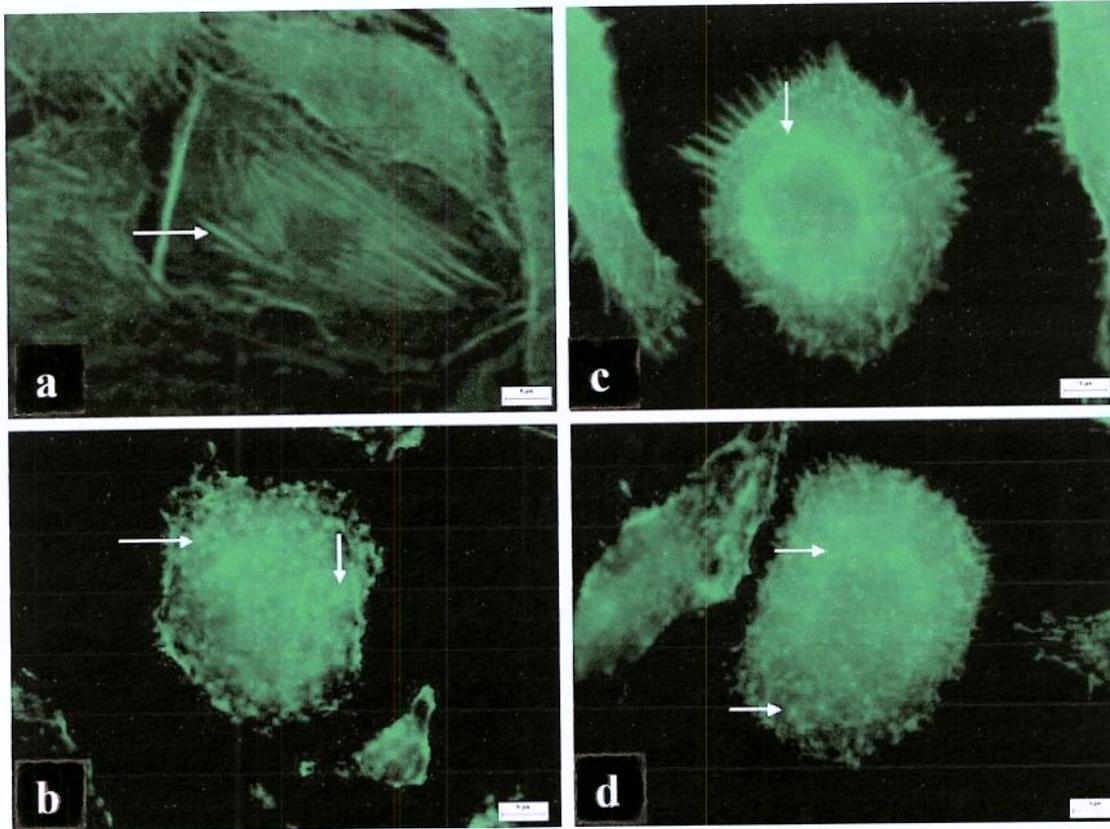


**Fig. 10** - Coloração com Azul de Toluidina (a-d) e Microscopia Eletrônica de Varredura (e-h) em Células Vero. Após 3 h de exposição a TEL, as células mostraram condensação da cromatina (b), retração celular (f) e vacuolização citoplasmática (c). Após 6 h, as células expostas a TEL, mostraram fragmentação nuclear (d) e corpos apoptóticos (g e h). Células não-tratadas tinham núcleos normais com nucléolos bem definidos (a) e uma típica monocamada confluenta (e). As alterações descritas são indicadas por setas. Microscopia de Luz, Bars: 5 $\mu$ m. Microscopia Eletrônica de Varredura, Bars: 10 $\mu$ m.



**Fig. 11** - Reação de Feulgen (a-c) e percentual de células Vero com núcleos alterados (fenótipo apoptótico), identificados pela Reação de Feulgen, após tratamento com TEL (d). Após 3 h de tratamento com a lectina, as células mostraram núcleos com diferentes níveis de compactação (a). Após 6 h, as células tinham núcleos picnóticos (c). Células não-tratadas tinham núcleos com cromatina dispersa (b). As alterações descritas são indicadas por setas. Os dados mostrados em "d" representam a média  $\pm$  SD de determinações em triplicatas. Bars: 5 $\mu$ m.

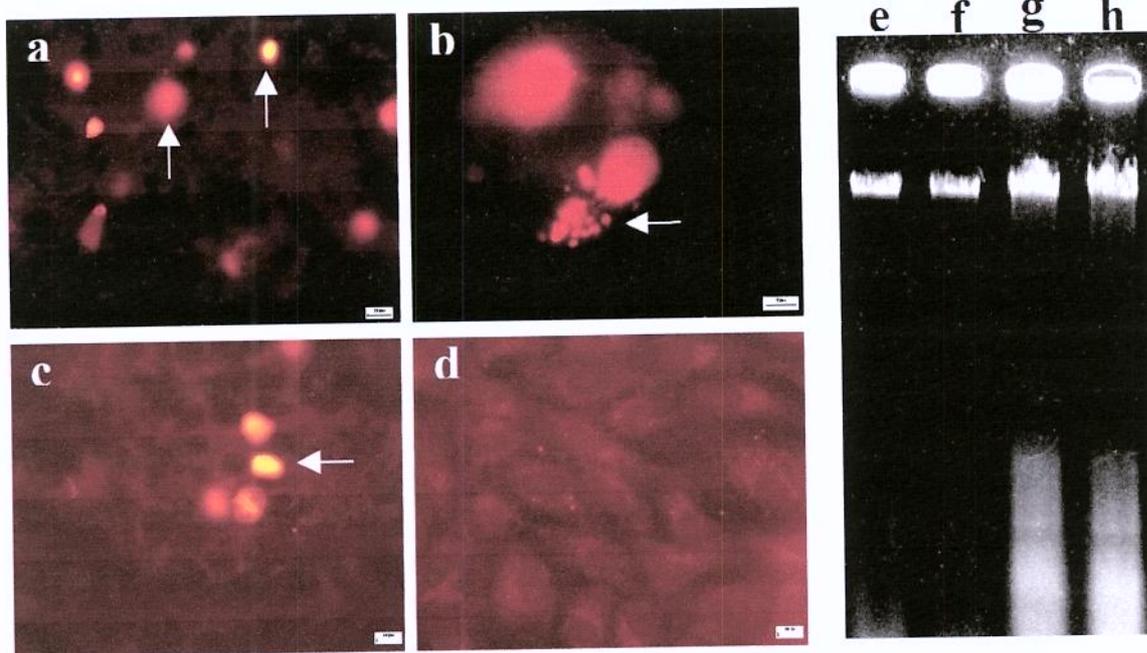
A fragmentação do DNA foi detectada pelo ensaio de TUNEL, o qual mostrou um padrão distintivo de marcação nuclear entre células tratadas e controles (Fig. 13). O ensaio foi positivo para as células Vero tratadas com TEL durante 3 h (Fig. 13c) e 6 h (Fig. 13a, b). As células não-tratadas exibiram pouca ou nenhuma marcação (Fig. 13d). Consistente com as observações em microscopia de luz, a fragmentação nuclear também foi vista após o ensaio de TUNEL (Fig. 13c). Adicionalmente, a eletroforese em gel de agarose revelou o perfil em "ladder" causada pela clivagem internucleossomal do DNA (Fig. 13g, h).



**Fig. 12** - Marcação do Citoesqueleto de actina em Células Vero. Após 3 h de exposição a TEL, as células exibiram intensos "spots" de actina fluorescente dispersos pelo citoplasma (b e d). Após 6 h, células mostraram um colapso dos filamentos de actina ao redor do núcleo (c). Células não-tratadas apresentaram um citoesqueleto de actina bem definido (a). As alterações descritas são indicadas por setas. Bars: 5µm.

### 4.3 Internalização e Tráfego de TEL nas Células Vero

A observação da internalização e do tráfego de TEL-biotina nas células Vero foi realizada após intervalos de tempo variados com uso de streptoavidina-FITC a qual reconhece os resíduos de biotina. Os resultados demonstraram que, entre 1 h e 3 h de incubação, a lectina pôde ser visualizada em estruturas como endossomos dispersas pelo citoplasma, em uma região intermediária, ainda próxima da membrana plasmática (Fig. 14, a-c). Após 5 h de incubação, TEL apresentou-se acumulada na região perinuclear (Fig. 14d) e, observações em período de tempo superior a 5 h de incubação, não



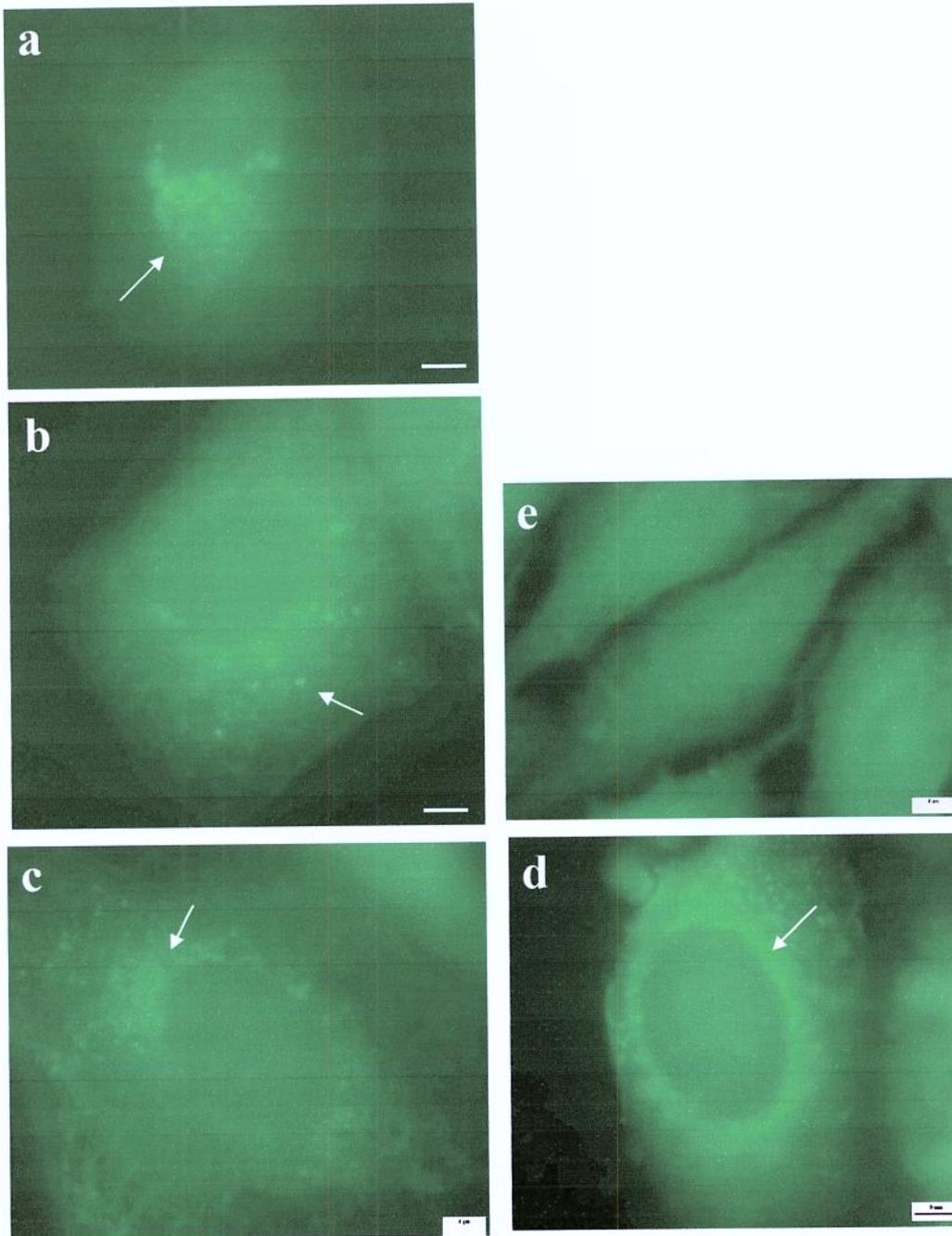
**Fig. 13** - Fragmentação do DNA das células Vero tratadas com TEL através do método de TUNEL (a-d) e eletroforese em gel de agarose (f-h). O DNA das células mostrou-se intensamente marcado após exposição a TEL durante 3h (c) e 6h (a e b). As alterações descritas são indicadas por setas. "DNA ladder" foi detectado após 3h (g) e 6h (h). Nenhuma alteração foi observada no DNA de células não-tratadas (d e e) e tratadas com TEL durante 1h (f). Bars: 10  $\mu$ m (a, c e d); Bars: 5 $\mu$ m (b).

revelaram outra localização da lectina a qual permaneceu no compartimento citoplasmático. Quando as células Vero foram tratadas com TEL, mas com manose adicionada, nenhuma formação do tipo endossômica, característica de transporte intracelular, foi observada (Fig. 14e).

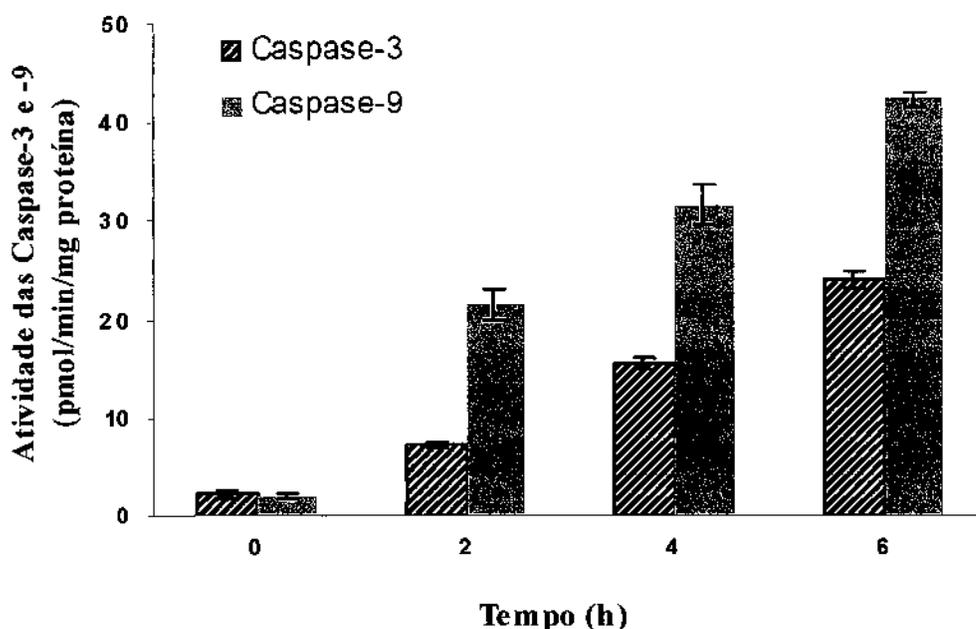
#### 4.4 Ativação de Caspases em Células Vero

A ativação das caspases-3 e -9 no lisado de células Vero, após tratamento com TEL, foi detectado através da utilização de um método colorimétrico. A ativação das caspases ocorreu de maneira tempo dependente (Fig. 15). Uma atividade significativa da caspase-9 foi detectada imediatamente após 2 h de incubação com a lectina. Tanto a caspase-3 quanto a caspase-9, mostraram uma atividade progressiva sendo uma atividade menor para

caspace-3, durante todos os períodos de tempo avaliados, quando comparada a atividade da caspace-9.



**Fig. 14** - Internalização e Tráfego de TEL em Células Vero. Até o período de 3 h de incubação, TEL foi visualizada em estruturas, tipo endossomos, dispersas pelo citoplasma (a - c). Após 5 h, TEL foi vista na região perinuclear (d). Células que tiveram manose adicionada não foi visualizado nenhuma alteração. As alterações descritas são indicadas por setas. Bars: 5 $\mu$ m.



**Fig. 15** - Efeito de TEL Sobre Atividade das Caspases -3 e -9 nas Células Vero. Células foram tratadas com TEL (1,5  $CD_{50}$ ) durante diferentes intervalos de tempo e a atividade das caspases-3 e -9 foram determinadas através de um método colorimétrico. Os dados representam a média  $\pm$  SD de determinações em triplicatas.

## **Parte II: "Avaliação da Ação Tóxica Induzida por TEL Sobre Uma Linhagem Celular Tumoral (Células Hela)"**

### **4.5 Avaliação da Suscetibilidade de Diferentes Linhagens de Células Tumorais Tratadas com TEL**

Células tumorais aderentes (Hep-2, HT-29 e Hela) e não-aderentes (HL-60) foram incubadas com diferentes concentrações de TEL durante 24 h. Diferenças na suscetibilidade das linhagens celulares a ação de TEL, especialmente entre Hela, HL-60 e HT-29, foram observadas (Fig. 16). O teste de citotoxicidade (ensaio do MTT) mostrou que as células Hela foram mais sensíveis que as outras linhagens de células testadas utilizando a concentração de TEL entre 20 e 100  $\mu\text{g/ml}$ , enquanto que as células HT-29 e HL-60 foram

relativamente resistentes e, praticamente, nenhum efeito citotóxico significativo foi observado até a concentração mais elevada da lectina. Nas células Hep-2, TEL manifestou uma pobre citotoxicidade após 24 h de tratamento. Devido a elevada sensibilidade a ação de TEL, as células Hela foram usadas para os ensaios subseqüentes.

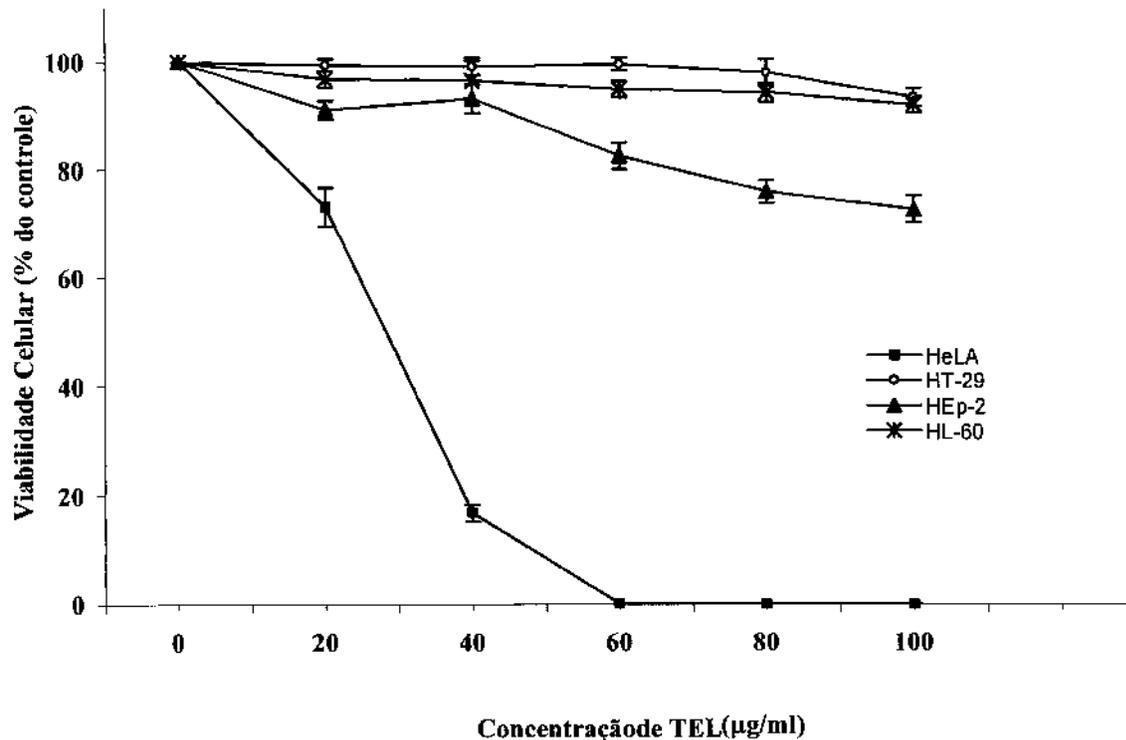


Fig. 16 - Suscetibilidade de diferentes células tumorais a ação de TEL. Células foram tratadas com TEL (20 - 100 µg/ml) durante 24 h e a viabilidade das células foi determinada pelo método do MTT. Os dados representam a média  $\pm$  SD de determinações em triplicatas.

#### 4.6 Citotoxicidade Induzida por TEL Sobre as Células Hela

As células Hela foram tratadas com diferentes concentrações de TEL durante 24 ou 48 h de incubação e, em seguida, a viabilidade celular foi determinada. TEL induziu morte celular nas células Hela a qual foi dependente do tempo de incubação bem como da concentração da lectina (Fig.17). A concentração mínima de TEL responsável pela morte de 50% das células após 24 h foi de aproximadamente 25 µg/ml. Além disso, após 48 h de

tratamento, TEL exibiu um maior potencial citotóxico sobre as células Hela; a 10  $\mu\text{g/ml}$ , a viabilidade foi reduzida a 75% e a 20  $\mu\text{g/ml}$ , a viabilidade foi de 52,3%. Quando foi utilizada a concentração de 30  $\mu\text{g/ml}$ , a viabilidade foi reduzida a menos de 13%. Células Hela incubadas com TEL mas com manose acidionada tiveram sua viabilidade significativamente preservada.

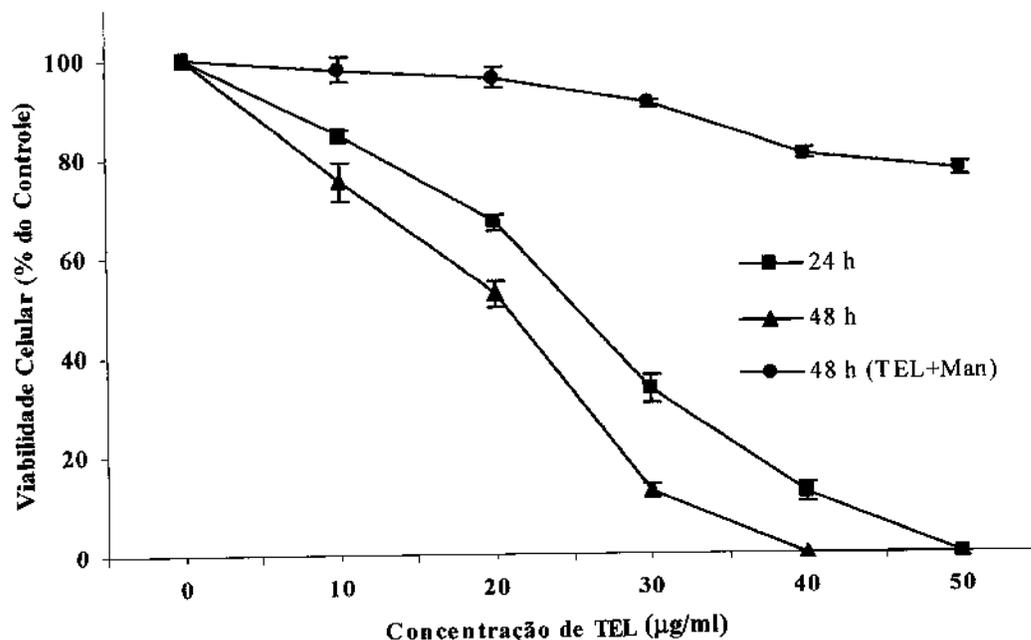
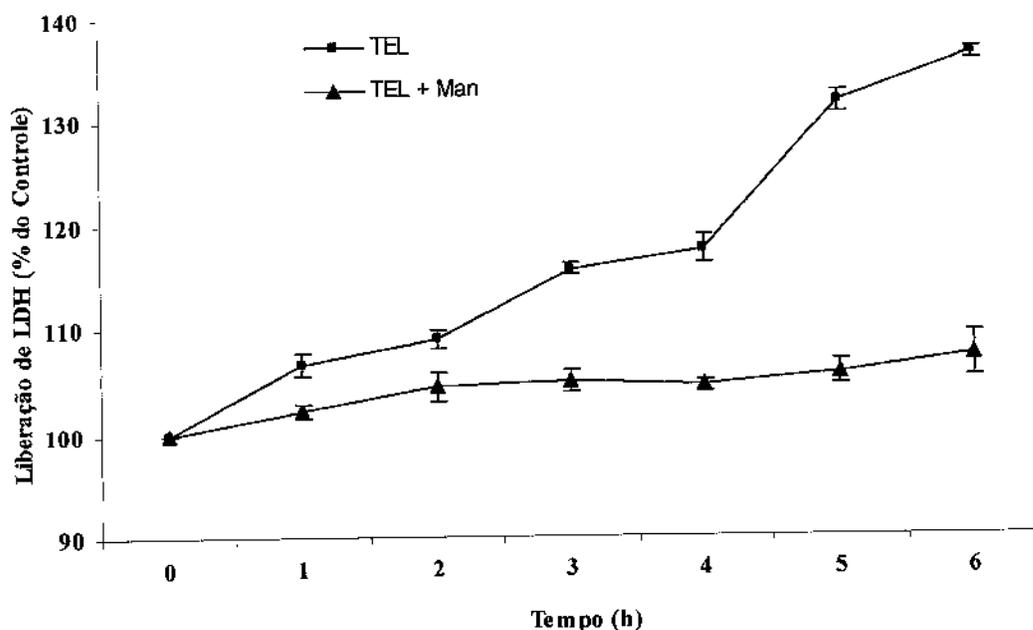


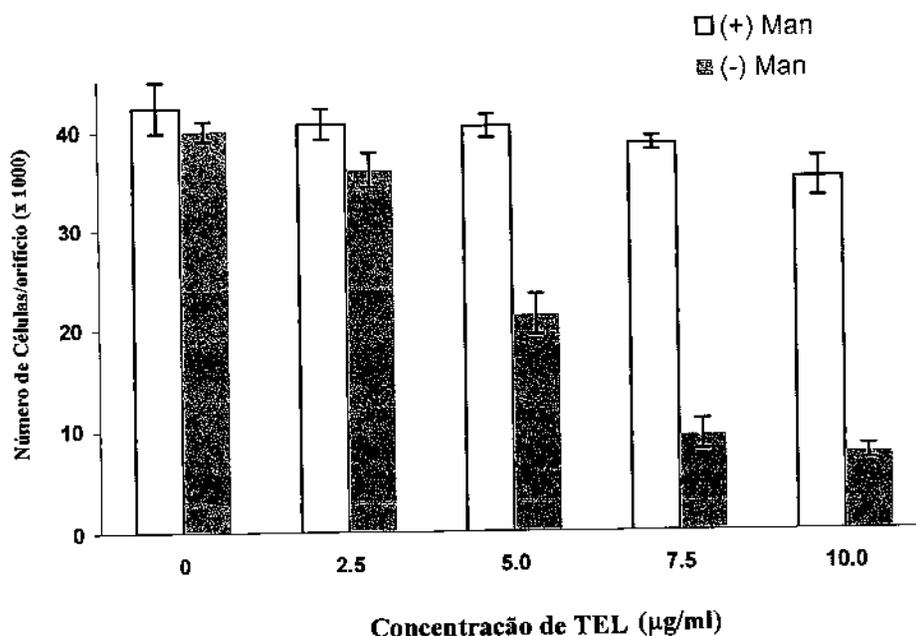
Fig. 17 - Efeito de TEL sobre a Viabilidade das Células Hela. Células foram tratadas com diferentes concentrações de TEL, com ou sem adição de manose (Man), durante 24 ou 48 h, e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Os dados representam a média  $\pm$  SD de determinações em triplicatas.

Como outro critério de citotoxicidade, a presença de LDH no meio de cultivo das células também foi determinada após tratamento com TEL. Como mostrado na Fig. 18, TEL induziu alterações na membrana das células Hela levando à liberação da enzima LDH a qual foi dependente do tempo de incubação. A LDH foi mais evidenciada, diferentemente das células Vero, somente a partir de 3 h de incubação com lectina onde apresentou aproximadamente a mesma quantidade de enzima liberada pelas células Vero após 1 h de incubação. A liberação de LDH foi praticamente inibida quando as células Hela foram incubadas com TEL mas com manose adicionada.



**Fig. 18** - Efeito de TEL sobre liberação de LDH pelas células HeLa. Células foram tratadas com TEL (1,5  $CD_{50}$ ), com ou sem adição de manose (Man), durante diferentes intervalos de tempo e a presença de LDH foi determinada no sobrenadante de cultivo celular. Os dados representam a média  $\pm$  SD de determinações em triplicatas

A capacidade de TEL inibir a proliferação das células HeLa também foi avaliada. Células foram distribuídas em placas e após esperado o tempo suficiente para completar a adesão das células na placa de cultivo, TEL foi adicionada em diferentes concentrações. Os resultados demonstraram que TEL causou uma inibição na proliferação das células HeLa a qual foi dependente da concentração da lectina (Fig. 19). Aproximadamente 7.5  $\mu\text{g/ml}$  de TEL foi suficiente para inibir completamente o crescimento celular e, quando TEL foi utilizada na concentração de 5.0  $\mu\text{g/ml}$ , o crescimento celular foi inibido em 50% ( $IC_{50}$ ). Adicionalmente, o uso de TEL mais manose, bloqueou a capacidade da lectina em inibir o crescimento celular.

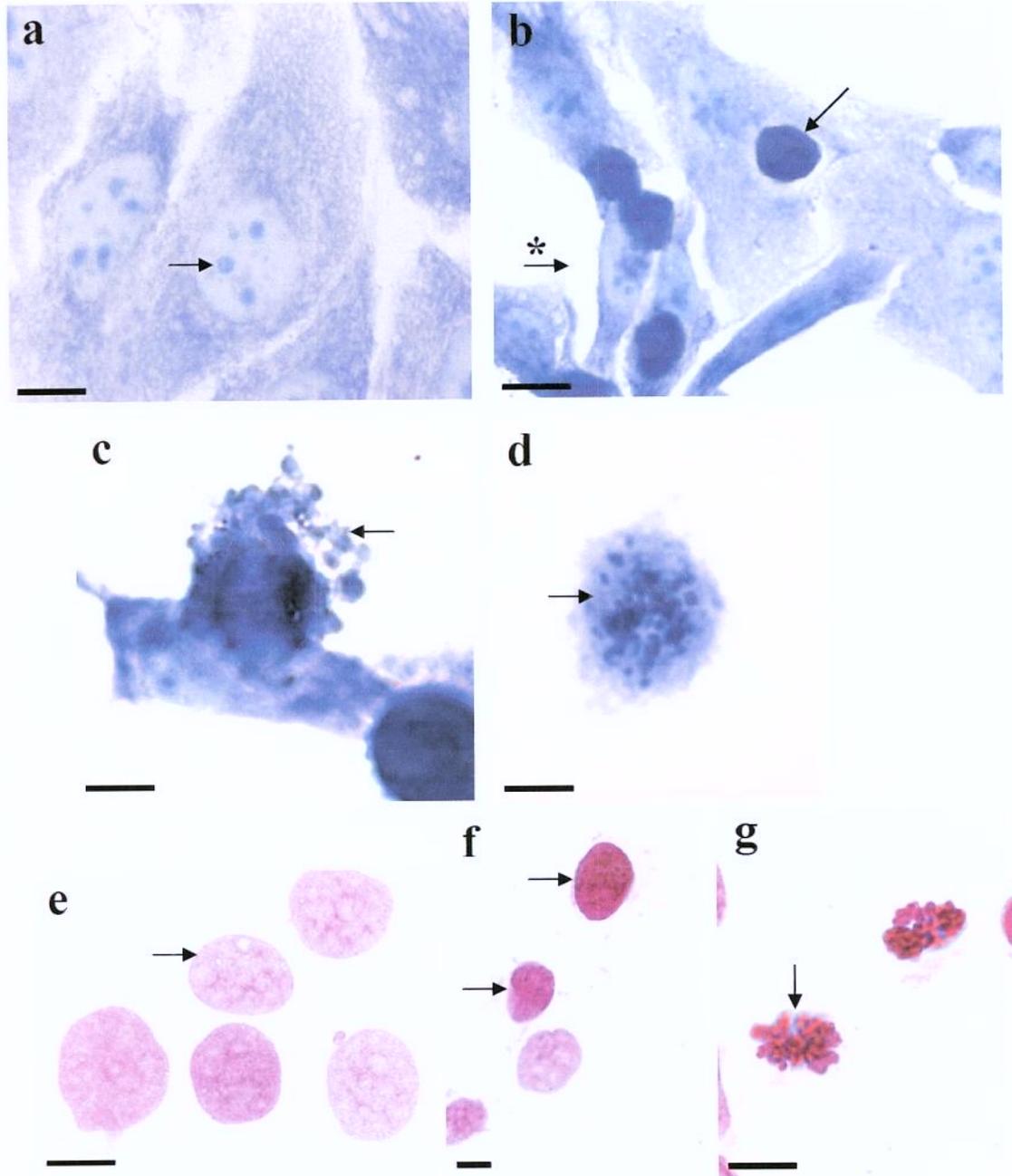


**Fig. 19** - Efeito de TEL Sobre a Proliferação das Células Hela. Células foram tratadas com diferentes concentrações de TEL, com ou sem adição de manose (Man), durante 48 h, e o número de células foi estimado através do método do Vermelho Neutro. Os dados representam a média  $\pm$  SD de determinações em triplicatas.

#### 4.7 Alterações Morfológicas e Intracelulares nas Células Hela induzidas por TEL

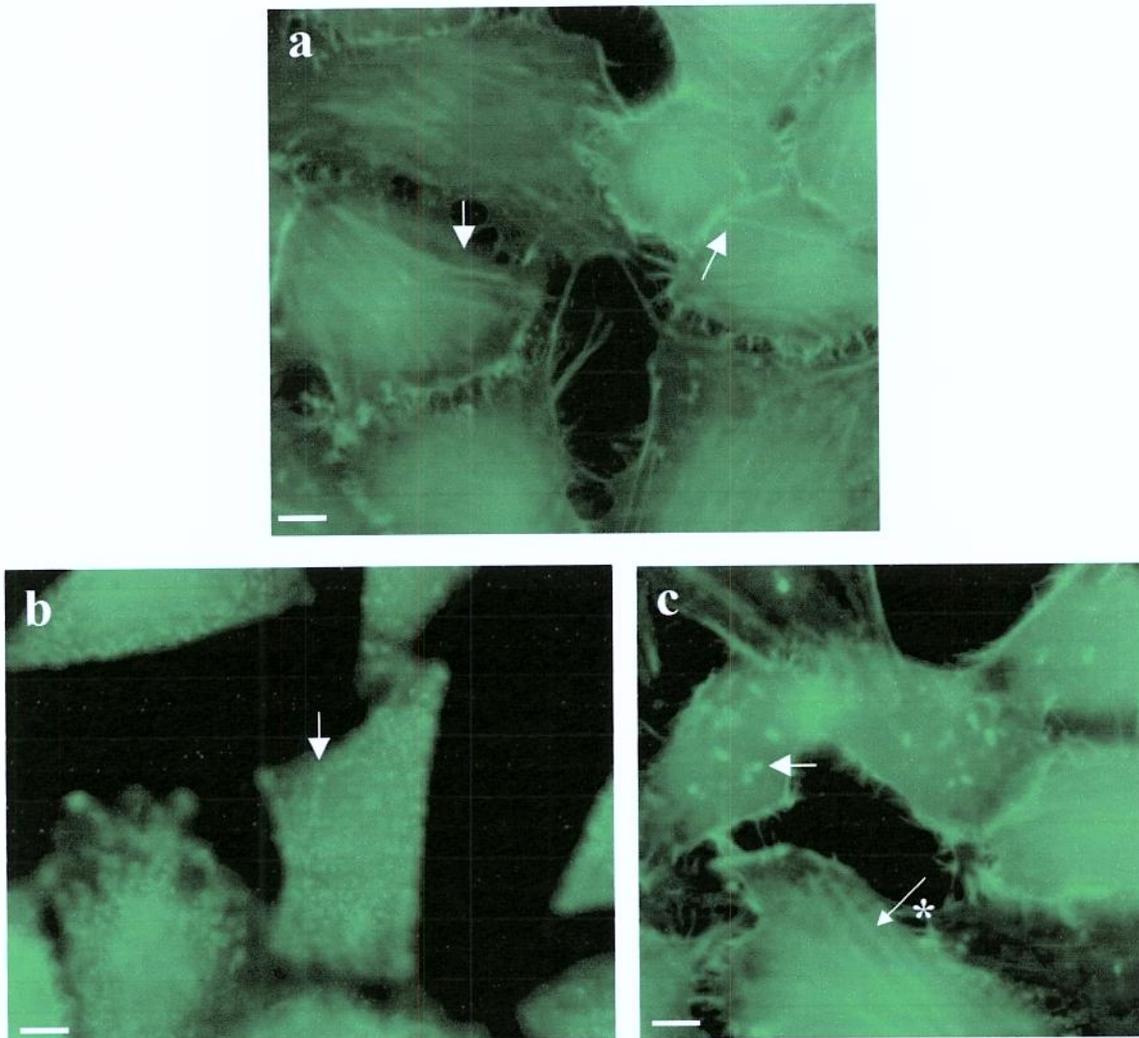
O tratamento das células Hela com TEL resultou em alterações morfológicas as quais puderam ser visualizadas em microscopia de luz após emprego de técnicas de coloração como Azul de Toluidina e Reação de Feulgen; sendo a última somente para identificação do fenótipo nuclear (Fig. 20). As células Hela tratadas com TEL durante 3 h exibiram retração celular (Fig. 20b) e condensação da cromatina (Fig.20b,f). Fragmentação nuclear (Fig. 20d,g) e corpos apoptóticos (c) foram observados após 6 h de exposição a TEL. Células não tratadas tinham núcleos com a cromatina dispersa (Fig. 20e) e a presença de vários nucléolos bem definidos (Fig. 21a).

Mudanças na disposição dos filamentos de actina nas células Hela também foram observados (Fig.21). Após 3 h de tratamento com TEL, os filamentos de actina os quais



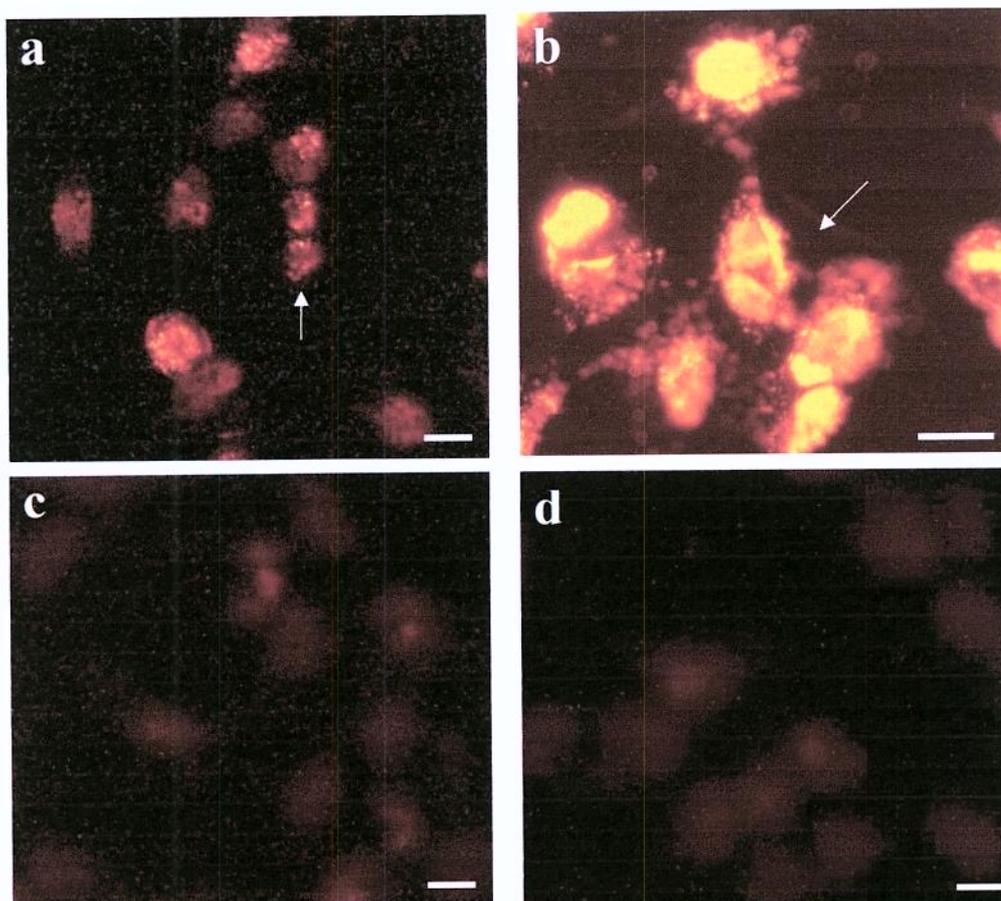
**Fig. 20** - Coloração com Azul de Toluidina (a-d) e Reação de Feulgen (e-g) em Células Hela. Após 3 h de exposição a TEL, as células mostraram condensação da cromatina (b e f), retração celular (b\*). Após 6 h, as células expostas a TEL, mostraram fragmentação nuclear (d e g) e corpos apoptóticos (c). Células não-tratadas tinham núcleos com cromatina dispersa (e) e apresentavam vários nucléolos (a). As alterações descritas são indicadas por setas. Bars: 10µm.

encontraram-se bem definidos nas células não tratadas (Fig 21a.), foram representados por intensos "spots" de actina fluorescente dispersos no citoplasma; entretanto, alguns filamentos de actina ainda puderam ser vistos (Fig. 21c). Adicionalmente, células tratadas com TEL durante 6 h exibiram alterações similares as apresentadas quando às células foram tratadas com a lectina durante 3 h (Fig.21b).



**Fig. 21** - Marcação do Citoesqueleto de actina em Células Hela. Após 3 h (c) e 6 h (b) de exposição a TEL, a actina foi representada por intensos "spots" fluorescente dispersos pelo citoplasma. Alguns filamentos de actina foram vistos após 3 h de tratamento com TEL (c\*). Células não-tratadas apresentaram filamentos de actina definidos (a). As alterações descritas são indicadas por setas. Bars: 10  $\mu$ m.

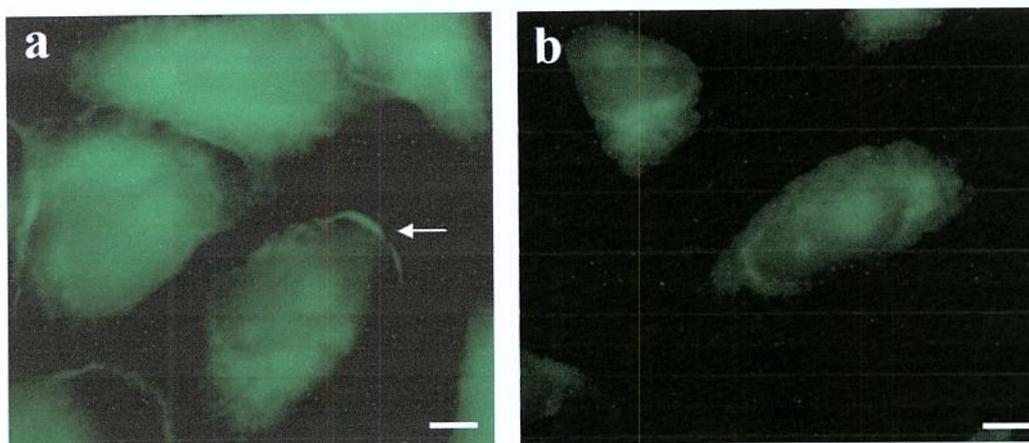
O dano à estrutura do DNA foi detectado através do método de TUNEL. Similar aos achados ocorridos nas células Vero, TEL também levou a fragmentação do DNA das células Hela a qual foi exibida através de intensa fluorescência (Fig. 22). O ensaio foi positivo tanto para as células tratadas durante 3 h (Fig. 22a) quanto para aquelas tratadas por 6 h as quais demonstraram uma pronunciada marcação. As células tratadas com TEL durante 1h (Fig. 22c) e aquelas não tratadas (Fig. 22d) mostraram pouca ou nenhuma fluorescência.



**Fig. 22** - Fragmentação do DNA das células Hela detectada através do método de TUNEL. O DNA das células mostrou-se intensamente marcado após exposição a TEL durante 3 h (a) e 6 h (b). Nenhuma alteração foi observada no DNA de células tratadas com TEL durante 1h (d) e não-tratadas (c). As alterações descritas são indicadas por setas. Bars: 10  $\mu$ m

#### 4.8 Internalização de TEL nas Células Hela

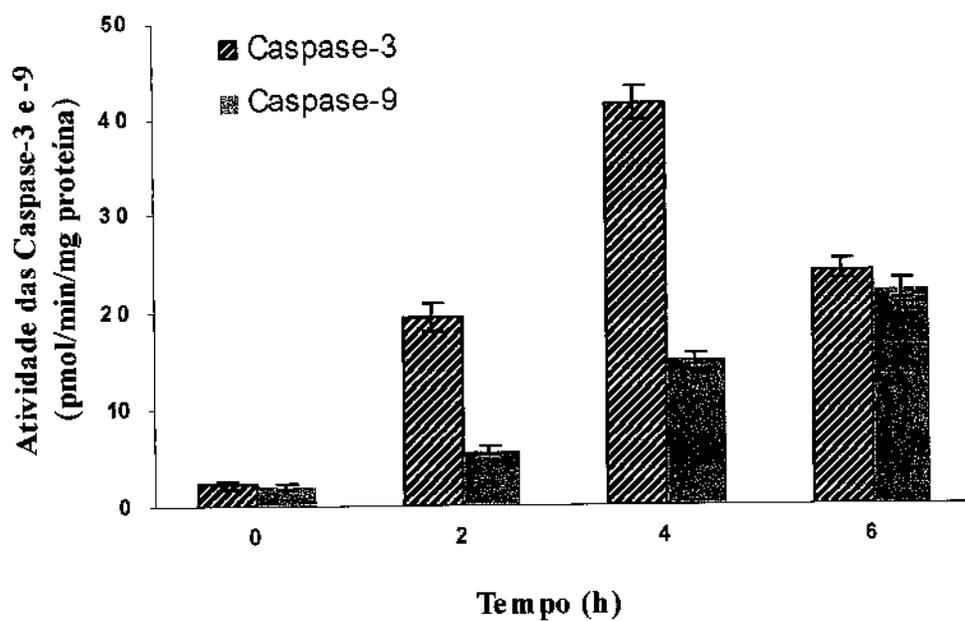
Os procedimentos utilizados para visualização da internalização e tráfego de TEL no interior das células Vero foram reproduzidos nas mesmas condições para células Hela; entretanto, diferentemente das observações feitas nas células Vero, nenhuma estrutura tipo endossomo foi observada até o período de 6 h de incubação com TEL-biotina, com ou sem adição de manose (Fig. 22). Células que não tiveram manose adicionada exibiram uma leve e difusa fluorescência, provavelmente devido à ligação de TEL na superfície (Fig. 22a).



**Fig. 23** - Internalização e tráfego de TEL nas Células Hela. Até o período de 6 h de incubação, nenhuma estrutura, tipo endossomos, foi visualizada nas células (a e b). Pouca fluorescência foi vista nas células Hela que foram tratadas com TEL, mas sem adição de manose (a). As alterações descritas são indicadas por setas. Bars: 10  $\mu$ m.

#### 4.9 Ativação de Caspases em células Hela

A ativação das caspases -3 e -9 nas células Hela ocorreu de maneira tempo dependente (Fig. 24). A caspase -3 foi detectada significativamente após 2 h de tratamento com TEL e atingiu um platô após 4 h. A atividade da caspase-3 antecipou a da caspase-9 a qual foi mais evidenciada a partir de 4 h de tratamento com a lectina. A caspase-9 mostrou uma atividade progressiva ao longo dos períodos de tempo avaliados; entretanto, foi menor quando comparada a atividade exercida pela caspase-3.



**Fig. 24** - Efeito de TEL Sobre Atividade das Caspases -3 e -9 nas Células Hela. Células foram tratadas com TEL (1,5 CD<sub>50</sub>) durante diferentes intervalos de tempo e a atividade das caspases foram determinadas através de um método colorimétrico. Os dados representam a média  $\pm$  SD de determinações em triplicatas.

## *5. Discussão*

---

A ligação de lectinas a carboidratos de superfície celular produz vários efeitos tais como proliferação celular e apoptose (Gastman et al., 2004; Bains et al., 2005). Lectinas de plantas são tóxicas para uma variedade de linhagens de células, e esta toxicidade pode envolver diferentes mecanismos de ação (Leist and Wendel, 1996; Gastman et al., 2004; Rao et al., 2005). Uma vez que lectinas induzem morte celular em células não tumoral (Valtiner et al., 2002; Collins et al., 2005); nós examinamos, na primeira parte desse trabalho, se TEL, uma nova lectina isolada das sementes de uma espécie pertencente à família Sapindaceae, era citotóxica para células de mamíferos cultivadas. Nesta etapa do estudo, a linhagem de células Vero foi utilizada como modelo biológico de investigação. Células Vero constituem uma linhagem fibroblástica não-tumoral, estabelecida a partir de células de rim de macaco verde africanos e possuem um padrão de crescimento característico em cultura (Bianchi and Ayres, 1971). Essa linhagem é recomendada para estudos de citotoxicidade e interações célula-substrato em pesquisas com biomateriais (Kirkpatrick, 1992; Estacia et al., 2002) bem como em estudos de diferenciação e transformação celular (Carvalho et al., 1999; Gonçalves et al., 2006).

Como mostrado aqui, TEL foi citotóxica para células Vero. A faixa de concentração de TEL usada para avaliar a indução de morte não foi baixa, mas foram menores quando comparadas às concentrações usadas em um estudo onde uma lectina isolada de bulbos de alho foi usada para induzir morte em uma linhagem de células de linfoma humano (células U937) (Karasaki et al., 2001) e foram compatíveis com as concentrações utilizadas por Kulkarni and MacCulloch (1995) os quais estudaram a ação tóxica de Con A em células fibroblásticas 3T3.

A ação citotóxica induzida por TEL levou a alterações morfológicas (Fig. 10) e mudanças no conteúdo do DNA (Fig.11 e 13) nas células Vero as quais são características de morte celular do tipo apoptótica. Esses achados estão de acordo com resultados reportados para outras lectinas de plantas. Uma lectina específica para galactose induziu morte celular tipo apoptótica em células normais e tumorais (Verveken et al., 2000; Valtiner et al., 2002;), e abrin-a, uma lectina isolada de sementes de *Abrus precatorius* induz morte celular por apoptose em várias linhagens celulares (Ohba et al., 2004). O tratamento de células Vero com TEL resultou em alterações morfológicas significantes

as quais foram características de morte celular por apoptose. Observações idênticas foram reportadas para lectinas de *Korean mistletoe* (Yoon et al., 1999) e *Canavalia ensiformes* (Kulkarni e MacCulloch, 1995), as quais induziram condensação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos em células Jurkat e células fibroblásticas 3T3, respectivamente. Nossos resultados ainda demonstraram que a morfologia das células Vero tratadas com TEL foi muito similar às alterações produzidas pela lectina ricina em células de mamíferos (Collins et al., 1997). Esses achados são consistentes com a natureza conservada e já bem conhecida desse processo.

A apoptose é caracterizada por arredondamento celular, aparentemente devido à perda da adesão ao substrato, retração celular, condensação da cromatina e fragmentação do DNA nuclear (Majno e Joris, 1995; Häcker, 2000; Abraham e Shahan, 2004). Como mostrado em nossos resultados, a clivagem do DNA nuclear, o maior quadro de apoptose, nas células Vero resultaram em fragmentos oligonucleossomais de DNA (Fig. 13) com a subsequente marcação das terminações 3'OH livres pela ação da enzima transferase deoxinucleotidil terminal, a qual catalisa a adição de deoxinucleotídeos a essas terminações (Teste de TUNEL) (Collins et al., 1997). Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que algumas linhagens de células que desenvolvem o processo de morte celular por necrose podem apresentar o teste de TUNEL positivo e que o acompanhamento do estudo com uma caracterização morfológica se faz necessária (Gold et al., 1994; Vermes et al., 1995). Em nossos resultados, o significativo aumento no número de perfis positivos para o método de TUNEL associados com as alterações morfológicas nas células Vero tratadas com TEL nos faz acreditar na ocorrência de morte celular com um quadro classicamente descrito para morte celular apoptótica.

A citotoxicidade induzida por TEL nas células Vero incluiu sua ação sobre a membrana plasmática. Isso foi detectado pela presença de LDH, utilizada como um "index" de danos à membrana plasmática, no sobrenadante de cultura de células após tratamento (Fig. 9). A perda da integridade da membrana ocorreu antes das alterações morfológicas e dos danos ao DNA das células. Durante morte celular programada a perda da integridade da membrana é um fenômeno observado e acontece, de uma maneira geral, antecedendo ou de forma concomitante aos episódios de mudanças citoplasmáticas e nucleares (Häcker, 2000; Cristea and Esposti, 2004).

A capacidade de TEL induzir morte celular foi dependente do tempo e, parcialmente, envolveu o rompimento dos filamentos de actina. Uma vez que o citoesqueleto de actina tem importante papel na morfogênese e adesão celular (Martry-Detraves et al., 2004), nós investigamos a possibilidade das alterações morfológicas causadas por TEL estivessem associadas com um rearranjo do citoesqueleto de actina. Várias estruturas contendo actina envolvidas nas interações célula-substrato têm sido descritas, incluindo adesão focal, pontos de contato e filipodia (Adams, 1997; Geiger et al., 2001). Em adição a essas alterações morfológicas, o rompimento da integridade do citoesqueleto de actina pode interferir com o transporte vesicular de precursores de proteínas e, conseqüentemente, contribuir para morte celular (Hesketh and Pryme, 1991). O tratamento de células Vero com TEL resultou em um rearranjo dos filamentos de actina (Fig.12), indicando que essa proteína foi um alvo da lectina. Essas observações foram similares àquelas feitas por Kulkarni e MacCulloch (1995) os quais notaram que a lectina Con A levou ao rompimento do citoesqueleto de actina em uma linhagem de células fibroblásticas de gengiva humana (células HGF). Estudos prévios têm mostrado que mediadores da apoptose, como as caspases, são responsáveis pela degradação de várias proteínas, tais como vimentina e actina (Brown et al., 1997; Lavastre et al., 2002).

A ligação de lectinas a oligossacarídeos específicos na membrana das células é uma importante etapa para indução da morte celular mediada por lectinas (Stanley, 1981; Dennis, 1992). Freire e colaboradores (2002) demonstraram que a atividade hemaglutinante causada por TEL foi inibida por manose e Macedo et al. (2004) demonstraram que a atividade inseticida de TEL envolve a interação da lectina com o carboidrato específico em glicoconjugados da superfície de células epiteliais do trato digestivo dos insetos. Nossos resultados mostraram o efeito inibitório do carboidrato manose sobre a morte celular induzida por TEL, indicando que a ação tóxica dessa lectina encontra-se relacionada com a propriedade de reconhecer o açúcar específico em glicoconjugados da membrana celular. Uma vez que diversas lectinas específicas para manose podem ligar-se a carboidratos na superfície das células (Kulkarni and MacCulloch, 1995; Leist and Wendel, 1996), nós sugerimos que TEL exerce sua toxicidade nas células, primeiramente ligando-se a membrana celular por meio de um sítio manose específico e, em seguida, é internalizada por endocitose sendo levada em vesículas endossômicas até a

região perinuclear, sítio de localização do retículo endoplasmático rugoso. Tal como a ação tóxica, o bloqueio da internalização de TEL com o uso de manose indica que a ligação ao carboidrato específico é também um passo importante para que a lectina seja internalizada nas células Vero. Tem sido aceito que a ação tóxica de algumas lectinas requer reconhecimento do carboidrato específico, endocitose, transporte intracelular e translocação por compartimentos intracelulares, tais como retículo endoplasmático e Complexo de Golgi, onde poderiam interagir com subunidades ribossomais e, dessa forma, interferir com a síntese de proteínas (Falnes and Sandvig, 2000; Vetterlein et al., 2002; Sandvig et al., 2002). Entretanto, vale salientar que outras lectinas, além de Con A e TEL, por exemplo, com similar afinidade e especificidade, não são citotóxicas (Leist and Wendel, 1996), levando a suposta idéia que outros eventos, além da especificidade a carboidratos, são envolvidos na citotoxicidade induzida por lectinas.

Morte celular programada do tipo apoptótica é um elemento central no desenvolvimento de muitos processos patológicos e na resposta a terapias sistêmicas em células neoplásicas. As caspases têm sido identificadas como efetoras do processo apoptótico levando a fragmentação do DNA, assim como as mudanças morfológicas nucleares têm sido atribuídas a eventos relacionados à ativação das caspases. Estudos revelam que a fase de execução da apoptose envolve ativação das caspases com subsequente clivagem de diversos substratos (Janicke et al., 1998a,b; Fisher et al., 2003). A morte celular induzida por TEL, levou a ativação das caspases -3 e -9 sendo que o aumento inicial da caspase -9 nos faz sugerir que TEL, ao ser transportada pelo compartimento intracelular, pode agir de maneira direta junto a mitocôndria levando a ativação da caspase-9 que por sua vez ativa a caspase-3. A caspase-3 foi também detectada durante o processo de morte celular sendo provavelmente a chave executora da fragmentação do DNA, conforme dados revisados anteriormente (Abraham and Shaham, 2004). Essa mesma proposta de ação tem sido reportada para a lectina WGA que ao ser internalizada leva ao aumento significativo de caspase-9 através da liberação de citocromo *c* pelas mitocôndrias (Gastman et al, 2004).

Como demonstrado, TEL induz morte celular a qual exibe um quadro tipicamente descrito para morte celular programada do tipo apoptótica e que envolve ativação das proteases caspases em uma linhagem de células não-tumoral. Sem dúvidas, nossas

observações sugerem que TEL merece futuras investigações como um potencial modelo indutor de morte celular em células de mamíferos.

Na segunda parte desse trabalho, nós avaliamos a ação de TEL contra linhagens de células tumorais. Um dos maiores problemas que ocorrem no tratamento sistêmico contra o câncer é a resistência das células tumorais aos quimioterápicos levando a falhas no tratamento (Sikic, 1999a,b). Por isso, diversos estudos têm centralizado na pesquisa de agentes alternativos que sejam hábeis em, preferencialmente, aumentar a morte de células tumorais (Mannel et al., 2000). Estudos epidemiológicos tem mostrado que um maior consumo de frutas e vegetais estão associadas com a prevenção e terapia contra doenças crônicas como diabetes e certos tipos de câncer e, com isso, tem aumentado o interesse em compreender como ocorre essa ação terapêutica (Block et al., 1992; Kris-Etherton et al., 2002). Estudos de identificação de componentes em extratos de plantas têm atribuído as lectinas a ação citotóxica e/ou terapêutica contra células tumoral (Valentiner et al., 2002; Abuharbeid et al., 2004; Mullick and Gasser, 2004)

Diante do exposto, nós nos encorajamos para avaliar a ação tóxica de TEL contra células tumorais. Inicialmente, nós estudamos o efeito citotóxico da lectina contra quatro diferentes linhagens de células as quais são representativas de diferentes órgãos em humanos (Fig. 16). Das linhagens de células tumoral avaliadas, as células de câncer do colo uterino (células Hela) foram as mais sensíveis e, por isso, foram escolhidas como modelo biológico para os estudos subseqüentes (Fig. 17). Tem sido reportado que as diferenças nos efeitos citotóxicos induzidos por uma mesma lectina sobre diferentes linhagens de células pode ser explicado pela quantidade de receptores disponibilizados na membrana de cada tipo celular. Diferentes níveis de glicosilação é a característica chave de muitos processos patológicos. Oligossacarídeos de superfície celular em glicolípídeos e glicoproteínas podem estar alterados em vários tipos de condições patológicas incluindo transformações malignas (Sharon, 1993; Mody et al., 1995). Recentemente, Kuramoto et colaboradores (2005) demonstraram que a quantidade e a eficiência da ligação de lectinas a glicoconjugados de superfície celular é o que justificaria as diferenças na suscetibilidade a ação da lectina por diferentes linhagens de células. Nós acreditamos que as diferenças no nível de glicosilação, entre as diferentes linhagens de células avaliadas, é o que justificaria, pelo menos em parte, o fato de TEL possuir uma maior ação tóxica nas células Hela.

Como parâmetro de citotoxicidade, a atividade antiproliferativa *in vitro* de TEL foi avaliada sobre as células Hela (Fig. 19). Os resultados demonstraram que TEL exerceu a ação inibitória sobre o crescimento das células utilizando concentrações da lectina as quais são menores que aquelas usadas para causar a morte celular. O exato mecanismo(s) molecular do efeito antiproliferativo de lectinas de plantas não se encontra bem esclarecido; entretanto, diversas hipóteses sugerem que este efeito está associado com a habilidade das lectinas em modular o crescimento, diferenciação e proliferação de células prematuras *in vivo* e/ou *in vitro* (Bains et al., 2005). Prévios estudos têm demonstrado que lectinas de plantas atuam como estimuladoras ou inibidoras do crescimento e isso dependerá do tipo celular. A lectina PNA, por exemplo, inibe a proliferação de células de câncer de mama (células ZR-75.1 e 734-B) (Marth and Daxenbichler, 1988) e estimula o crescimento de células pulmonares e da musculatura lisa (Sanford and Harris-Hooker, 1990). Também tem sido reportado que a lectina de *Sauromatum venosum* induz atividade antiproliferativa sobre diferentes linhagens de células de câncer humano (Bains et al., 2005). Além disso, outras lectinas como GSA, Con A e PHA-L exercem efeitos sobre o crescimento de células de câncer do colon intestinal humano. (Kiss et al., 1997).

Como já abordado anteriormente, algumas lectinas de planta para exercerem sua ação tóxica precisam ser internalizadas por endocitose para o compartimento intracelular. Diferentemente das observações feitas com as células Vero, TEL não foi internalizada durante o período de 6 h de incubação com as células Hela e, se a internalização aconteceu, foi de maneira e/ou em quantidades as quais não foram identificadas pelo método utilizado (Fig. 23). Entretanto, as alterações morfológicas bem como outros parâmetros que comprovam a ação tóxica induzida por TEL foram evidenciados dentro desse mesmo período de tempo. Essas evidências nos fazem sugerir um mecanismo de ação direta via interação com glicoconjugados contendo manose, uma vez que o uso desse monossacarídeo inibiu os efeitos tóxicos sobre as células Hela e sem, necessariamente, ser internalizada. A lectina VAA-I, por exemplo, para induzir morte celular por apoptose em neutrófilos humanos precisa ser internalizada (Lavastre et al, 2002). Entretanto, Leist and Wendel (1995) demonstraram que a citotoxicidade induzida por Con A em cultura de hepatócitos humanos não requer internalização da lectina, mas que sua ligação com o carboidrato específico é ponto crucial para sinalização/indução da morte celular.

A ativação das caspases também foi evidenciada quando as células Hela foram tratadas com TEL (Fig. 24). Diferentemente das células Vero, o aumento significativo das caspases proteases nas células Hela, particularmente caspase-3, foi induzida rapidamente após 2 h de tratamento com TEL. Esses dados sugerem que a ligação de TEL a receptores na superfície das células é responsável pela ativação direta da caspase-3, via caspase-8. Tem sido reportado que a caspase-3 pode ser ativada diretamente pela caspase-8 que por sua vez é ativada, geralmente, via receptores alterados devido interação com "ligantes" (Kaufmann and Earnshaw, 2000; Nagata, 2005). Recentemente, Ohba e colaboradores (2004) estabeleceram que a ativação da caspase-3 precede a da caspase-9 em um processo de morte celular apoptótico induzida pela abrin-a sobre diferentes linhagens de células leucêmicas.

Independente das diferenças apresentadas nos perfis de ativação das caspases bem como na condição de TEL ser internalizada ou não, ambas as células em estudo exibiram um quadro morfológico similar. Alterações morfológicas marcantes (retração celular, condensação da cromatina e fragmentação do DNA) que caracterizam morte celular por apoptose as quais foram vistas nas células Vero tratadas com TEL, também foram evidenciadas nas células Hela (Fig. 20). Já é bem estabelecido que em muitas situações, células que morrem por apoptose mostram um padrão similar de mudanças morfológicas (Majno and Joris, 1995), sem levar em consideração as condições ou o agente usado para induzir apoptose experimentalmente (Green et al., 2003; Häcker, 2000). Todos os dados expostos nos faz afirmar que o tipo celular e a maneira pelo qual a lectina interage com as diferentes linhagens celulares é o que irá definir a via de morte a qual poderá culminar em um mesmo tipo de morte celular.

Apesar da clareza dos resultados, outros estudos sobre os mecanismos de ação envolvidos na citotoxicidade e nas alterações morfológicas induzidas por TEL em linhagens de células tumoral e não-tumoral, se faz necessários. Finalmente, a habilidade específica de TEL induzir morte tipo apoptótica em células de câncer do colo uterino parece ser uma linha interessante de investigação, na atual era da "lectinologia", onde uma nova lectina poderá ser empregada como uma ferramenta útil nas pesquisas relacionadas ao câncer, bem como no diagnóstico e terapia na medicina moderna.

## *6. Conclusões*

---

- [1] A lectina isolada de sementes de *Talisia esculenta* (TEL) é tóxica para células tumorais (células Hela) e não-tumorais (células Vero).
- [2] Das linhagens de células tumorais testadas, a linhagem de células de câncer cervical humano (células Hela) foi a mais sensível à ação tóxica induzida por TEL, demonstrando uma seletividade da lectina para essa linhagem celular.
- [3] TEL inibe o crescimento das células de câncer cervical humano.
- [4] A morte celular induzida por TEL nas células Vero e Hela é dependente do tempo e leva a alterações morfológicas e intracelulares, tais como contração celular, condensação da cromatina e fragmentação do DNA, as quais são classicamente descritas para morte celular apoptótica.
- [5] Nas células Hela e Vero, TEL leva a uma desorganização do citoesqueleto de actina.
- [6] A citotoxicidade induzida por TEL nas células Hela e Vero, envolve a perda da integridade da membrana, como um evento inicial.
- [7] Apesar das células Hela e Vero apresentarem um quadro final de morte celular muito similar, a maneira de ativação da sinalização de morte parece diferir, como foi demonstrado pela variação na atividade das caspases e, também, pelo fato de TEL ter sido internalizada nas células Vero, o que não ocorre nas células Hela.
- [8] Os efeitos tóxicos induzidos por TEL nas células Vero e Hela, bem como sua internalização nas células Vero, depende da interação da lectina com o carboidrato específico em glicoconjugados presentes na superfície da membrana.

## *7. Referências Bibliográficas*

---

- Abraham, M.C.; Shaham, S., 2004. Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell. Biol.*, **14**: 184-193.
- Abuharbeid, S.; Apel, J.; Sander, M.; Fiedler, B.; Langer, M.; Zuzarte, M-L.; Czubyko, F.; Aigner A., 2004. Cytotoxicity of the novel anti-cancer drug rViscumin depends on HER-2 levels in SKOV-3 cells. *Biochem Biophys Res Com*, **321**: 403-12.
- Acehan, D; Jiang, X.; Morgan, D. G.; Heuser, J. E.; Wang, X.; Akey, C. W., 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*, **9**: 423-32.
- Adams, J.C., 1997. Characterization of cell-matrix adhesion requirements for the formation of fascin microspikes. *Mol. Biol. Cell*, **8**: 2345-2363.
- Ashkenazi, A.; Dixit, V. M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281**: 1305-8.
- Assuncao Guimaraes C, Linden R., 2004. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem*. **271**: 1638-50.
- Bains, J.S.; Singh, J.; Kamboj, S.S.; Nijjar, K.K.; Agrewala, J.N.; Kumar, V.; Kumar, A.; Saxena, A.K., 2005. Mitogenic and anti-proliferative activity of a lectin from the tubers of Voodoo lily (*Sauromatum venosum*). *Biochim. Biophys. Acta*, **1723** :163-174.
- Beuth J.; Ko, H. L.; Gabius, H. J.; Pulverer, G., 1991. Influence of treatment with the immunomodulatory effective dose of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe on tumor colonization in BALB/c-mice for two experimental model systems. *In Vivo*, **5**: 29-32.
- Bianchi, N.O.; Ayres, J., 1971. Heterochromatin location on chromosomes of normal and transformed cells from African green monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Exp. Cell Res.*, **68**:253-258.
- Bidere, N.; Senik, A., 2001. Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes: a minireview. *Apoptosis*, **6**: 371-5.
- Block, G.; Patterson, B.; Subar, A., 1992. Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, **18** :1-29.
- Bocci, V., 1993. Mistletoe (*Viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. A review. *J Biol Regul Homeost Agents*, **7**: 1-6.
- Borenfreund, E.; Puerner, J.A., 1984. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. Tissue Cult.*, **9** :7-9.
- Branco, A. T.; Bernabe, R. B.; dos Santos, Ferreira B.; de Oliveira, M. V.; Garcia, A. B.; de Souza Filho, G. A., 2004. Expression and purification of the recombinant SALT lectin from rice (*Oryza sativa* L.). *Protein Expr Purif*, **33**: 34-8.

- Breborowicz, J.; Mackiewicz, A., 1989. Affinity electrophoresis for diagnosis of cancer and inflammatory conditions. *Electrophoresis*, **10**: 568-73.
- Brown, S.B.; Bailey, K.; Savil, J., 1997. Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem. J.*, **323** :233-237.
- Bures, L.; Motycka, K.; Bostik, J.; Slavik, K.; Jirasek, A., 1986. The use of protein as a carrier of methotrexate for experimental cancer chemotherapy. II. Chemotherapy of Gardner lymphosarcoma with pea seed lectin-methotrexate derivative. *Neoplasma*, **33**: 409-16.
- Carlini, C. R.; Grossi-de-Sá, M. F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, **40**: 1515-39.
- Carvalho, C.E.; Santos Jr., A. R.; Wada, M.L.F., 1999. Dexamethasone-induced chromosome number alterations in cell culture. *Med. Sci Res.*, **27**:219-221.
- Cerretti, D. P.; Kozlosky, C. J.; Mosley, B.; Nelson, N.; Van, Ness K.; Greenstreet, T. A.; March, C. J.; Kronheim, S. R.; Druck T.; Cannizzaro, L. A. *et al*, 1992. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*, **256**: 97-100.
- Clarke, P.G., 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol. (Berl)*, **181**: 195-213
- Coelho, D.; Holl, V.; Weltin, D.; Lacornerie, T.; Magnenet, P.; Dufour, P.; Bischoff, P., 2000. Caspase-3-like activity determines the type of cell death following ionizing radiation in MOLT-4 human leukaemia cells. *Br J Cancer*, **83**: 642-9.
- Cohen, G. M., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, **326**: 1-16.
- Collins, J.A.; Schandl, C.A.; Young, K.K.; Vesely, J.; Willingham, M.C., 1997. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.*, **45** :923-934.
- Corrêa, P. M., 1974. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura / IBDF. Vol. V, p. 513-514.
- Cory, S.; Adams, J. M., 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, **2**: 647-56.
- Cristea, I.M.; Degli Esposti, M., 2004. Membrane lipids and cell death: an overview. *Chem. Phys. Lipids*, **129**:133-160.
- Daniel, N.N.; Korsmeyer, S.J., 2004. Cell death: critical control points. *Cell*, **16**: 205-19.
- Dannenhoffer, J. M.; Schulz, A.; Skaggs, M. I.; Bostwick, D. E.; Thompson, G. A., 1997. Expression of the phloem lectin is developmentally linked to vascular differentiation in cucurbits. *Planta*, **201**: 405-414.

- De Souza Filho, G. A.; Ferreira, B. S.; Dias, J. M.; Queiroz, K. S.; Branco, A.T.; Bressan-Smith, R. E.; Oliveira, J. G.; Garcia, A.B., 2003. Accumulation of SALT protein in rice plants as a response to environmental stresses. *Plant Sci.*, **164**: 623-628
- Dennis, J.W., 1992. Changes in glycosylation associated with malignant transformation and tumor progression. In: Fukuda M (ed) Cell surface carbohydrates and cell development, CRC Press, Boca Raton, 1992; pp 161-194.
- Díaz, C. L.; Melchers, L. S.; Hooykaas, P. J. J.; Lugtenberg, B. J. J.; Kijne, J. W., 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the Rhizobium-legume symbiosis. *Nature*, **338** :579-581
- Estacia, P.; Santos Jr, A.R.; Moreira, P.L. *et al.*, 2002. The cytotoxicity in Vero cells of a perfluorocarbon used in vitreoretinal surgery. *Braz. J. Morphol. Sci.*, **19** :41-7.
- Falnes, P.O.; Sandvig, K., 2000. Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **12** : 407-13.
- Fisher, P.B.; Gopalkrishnan, R.V.; Chada, S.; Ramesh, R.; Grimm, E.A.; Rosenfeld, M.R.; Curiel, D.T.; Dent, P., 2003. mda-7/IL-24, a novel cancer selective apoptosis inducing cytokine gene: from the laboratory into the clinic. *Cancer Biol. Ther.*, **2** : 23S -37S.
- Formigli, L.; Papucci, L.; Tani, A.; Schiavone, N.; Tempestini, A.; Orlandini, G. E.; Capaccioli, S.; Orlandini S. Z., 2000. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol*, **182**: 41-9.
- Freire, M. G. M.; Gomes, V. M.; Corsini, R. E.; De Simone, S. G.; Novello, J. C.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R., 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 61-68.
- Freire, M. G. M.; De Souza, I. A.; Silva, A. C. M.; Macedo, M .L. R.; Lima, M. S.; Tamashiro, W. M. S. C.; Antunes, E.; Marangoni, S., 2003. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. *Toxicon* **42**: 275-280.
- Gabius, H. J.; Walzel, H.; Joshi, S. S.; Kruij, J.; Kojima, S.; Gerke, V.; Kratzin, H.; Gabius, S., 1992. The immunomodulatory beta-galactoside-specific lectin from mistletoe: partial sequence analysis, cell and tissue binding, and impact on intracellular biosignalling of monocytic leukemia cells. *Anticancer Res*, **12**: 669-75.
- Gabius, H. J.; Unverzagt, C.; Kayser, K., 1998. Beyond plant lectin histochemistry: preparation and application of markers to visualize the cellular capacity for protein-carbohydrate recognition. *Biotech Histochem*, **73**: 263-77.
- Garg, A. K.; Aggarwal, B. B., 2002. Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Mol Immunol*, **39**: 509-17.

- Gastman, B.; Wang, K.; Han, J.; Zhu, Z. Y.; Huang, X.; Wang, G. Q.; Rabinowich, H.; Gorelik, E., 2004. A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation. *Biochem Biophys Res Commun*, **316**: 263-71.
- Geiger, B.; Bershadsky, A.; Pankov, R.; Yamada, K.M., 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2** :793-805.
- Gold, R.; Schied, M.; Giegerich, G.; Breitschopf, H.; Hartung, H.P.; Toyka, K.V.; Lassmann, H., 1994. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab. Invest.*, **71**: 219-225
- Goldstein, I. J.; Hughes, R. C.; Monsigny, M.; Osawa, T.; Sharon, N., 1980. What should be called a lectin? *Nature*, **285**: 66.
- Goldstein, I. J.; Poretz, R. D., 1986. Isolation physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. Eds., FE Liemer, N. Sharon, and I.J. Goldstein. Orlando, Florida: Academic Press, pp. 33-248
- Goncalves, E. M.; Ventura, C. A.; Yano, T.; Rodrigues Macedo, M. L.; Genari, S.C., 2006. Morphological and growth alterations in Vero cells transformed by cisplatin. *Cell Biol Int.*, **30**:485-494.
- Green, D. R.; Reed, J. C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**: 1309-12.
- Green, D.; Kroemer, G., 1998 The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* **8**: 267-71.
- Green, D.R.; Evan, G.I., 2002. A matter of life and death. *Cancer Cell*, **1**:19-30.
- Gross-Bellard, M.; Oudet, P.; Chambom, P., 1973. Isolation of high-molecular weight DNA from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* **36**: 32-38.
- Guarim-Neto, G., 1987. Plantas utilizadas na medicina popular do estado de Mato Grosso. Brasília, MCT / CNPq. 58p.
- Guarim-Neto, G., 1996. Plantas medicinais do Estado de Mato Grosso. Brasília, ABEAS. 72p.
- Guarim-Neto, G.; Santana, S. R.; Silva, J. V. B., 2003. Repertório botânico da "pitombeira" (*Talisia esculenta* (A. St.-Hil.) Radlk. - Sapindaceae. *Acta Amazônica* **33**: 237-242.
- Hacker, G., 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*, **301**: 5-17.
- Haimovitz-Friedman, A., 1998. Radiation-induced signal transduction and stress response. *Radiat Res*, **150**: S102-8.

- Hajto, T.; Hostanska, K.; Frei, K.; Rordorf, C.; Gabius, H. J., 1990. Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res*, **50**: 3322-6.
- Hamelryck, T. W.; Loris, R.; Bouckaert, J.; Dao-Thi, M. H.; Strecker, G.; Imberty, A.; Fernandez, E.; Wyns, L.; Etzler, M. E., 1999. Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. *J Mol Biol*, **286**: 1161-77.
- Hanahan, D.; Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**: 57-70.
- Hay B.A.; Huh JR, Guo M., 2004. The genetics of cell death: approaches, insights and opportunities in *Drosophila*. *Nat Rev Genet*, **5**: 911-22.
- Hesketh, J.E.; Pryme, I.F., 1991. Interaction between mRNA, ribosomes, and the cytoskeleton. *Biochem. J.*, **277** :1-10.
- Hincha, D. K.; Meins Jr., F.; Schmitt, J. M., 1997. [beta]-1,3-Glucanase Is Cryoprotective in Vitro and Is Accumulated in Leaves during Cold Acclimation. *Plant Physiol*, **114**: 1077-1083.
- Hirai, H.; Taketa, K., 1992. Lectin affinity electrophoresis of alpha-fetoprotein. Increased specificity and sensitivity as a marker of hepatocellular carcinoma. *J Chromatography*, **604**: 91-4.
- Horvitz H.R., 2003. Worms, life, and death (Nobel lecture). *Chembiochem*, **4**: 697-711.
- Israels, L.G.; Israels, E.D. (1999). Apoptosis. *Stem Cells*, **17**:306-13.
- Janicke, R.U.; Sprengart, M.L.; Porter, A.G., 1998a. Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **273** :15540-15545.
- Janicke, R.U.; Sprengart, M.L.; Wati, M.R.; Porter, A.G., 1998b. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **273** :9357-9360.
- Jiang, X.; Wang, X., 2000. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem*, **275**: 31199-203.
- Joshi, S. S., 1993. Determination of lectin-mediated augmentation of natural killer cell-mediated cytotoxicity. In *Lectins and Glycobiology*. Eds., H.J. Gabius and S. Gabius. New York: Springer-Verlag, pp. 376-379.
- Karasaki, Y.; Tsukamoto, S.; Mizusaki, K.; Sugiura, T.; Gotoh, S., 2001. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. *Food Res. Int.*, **34**: 7-13.

- Kaufmann, S.H.; Earnshaw, W.C., 2000. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell Res.*, **256** :42-9.
- Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Braz. J. Cancer*, **26**: 239-57.
- Kim, M. S.; Lee, J.; Lee, K. M.; Yang, S. H.; Choi, S.; Chung, S. Y.; Kim, T. Y.; Jeong, W. H.; Park, R., 2003. Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin-II-induced apoptosis of myeloleukemic U937 cells. *Life Sci*, **73**: 1231-43.
- Kirkpatrick, C.J., 1992. Biological testing of materials and medical devices – A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity *in vitro*. *Reg. Affairs*, **4** :13-32.
- Kiss, R.; Camby, I.; Duckworth, C.; De Decker, R.; Salmon, I.; Pasteels, J.L.; Danguy, A.; Yeaton, P., 1997. *In vitro* influence of *Phaseolus vulgaris*, *Griffonia simplicifolia*, concanavalin A, wheat germ, and peanut agglutinins on HCT-15, LoVo, and SW837 human colorectal cancer cell growth. *Gut*, **40** :253-261.
- Kojima, S.; Jay, M., 1986. Applications of lectins to tumor imaging radiopharmaceuticals. *Eur. J. Nucl. Med.* **13**: 366-370
- Komath, S. S.; Kavitha, M.; Swamy, M. J., 2006. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Org Biomol Chem*, **4**: 973-88.
- Kreimer-Birnbaum, M., 1989. Modified porphyrins, chlorins, phthalocyanines, and purpurins: second-generation photosensitizers for photodynamic therapy. *Semin Hematol*, **26**: 157-73.
- Kris-Etherton, P.M.; Hecker, K.D.; Bonanome, A.; Coval, S.M.; Binkoski, A.E.; Hilpert, K.F.; Griel, A.E.; Etherton, T.D., 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.*, **113** :71S-88S.
- Kulkarni, G. V.; McCulloch, C. A., 1995. Concanavalin A induced apoptosis in fibroblasts: the role of cell surface carbohydrates in lectin mediated cytotoxicity. *J Cell Physiol*, **165**: 119-33.
- Kuramoto, T.; Uzuyama, H.; Hatakeyama, T.; Tamura, T.; Nakashima, T.; Yamaguchi, K.; Oda T., 2005. Cytotoxicity of a GalNAc-specific C-type lectin CEL-I toward various cell lines. *J. Biochem. (Tokyo)*, **137** :41-50.
- Le Moal, M. A.; Truffa-Bachi, P., 1988. *Urtica dioica* agglutinin, a new mitogen for murine T lymphocytes: unaltered interleukin-1 production but late interleukin 2-mediated proliferation. *Cell Immunol*, **115**: 24-35.
- Leist, M.; Jaattela, M., 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**: 589-98.

- Leist, M.; Wendel, A., 1996. A novel mechanism of murine hepatocyte death inducible by concanavalin A. *J Hepatol*, **25**: 948-59.
- Lerner, D. R.; Raikhel, N. V., 1992. The gene for stinging nettle lectin (*Urtica dioica* agglutinin) encodes both a lectin and a chitinase. *J Biol Chem*, **267**: 11085-91.
- Li, H.; Zhu, H.; Xu, C. J.; Yuan, J., 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**: 491-501.
- Lis, H.; Sharon, N., 1998. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem Rev*, **98**: 637-74.
- Lockshin, R. A.; Zakeri, Z., 2002. Caspase-independent cell deaths. *Curr Opin Cell Biol*, **14**: 727-33.
- Lockshin, R. A.; Zakeri, Z., 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**: 2405-19.
- Lord, J. M.; Roberts, L. M.; Robertus, J. D., 1994. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J*, **8**: 201-8.
- Lorenzi, H., 1992. Árvores Brasileiras - Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Harri Lorenzi (Ed.). Editora Plantarum LTDA, 1, 322.
- Loris, R., 2002. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta*, **1572**: 198-208.
- Loris, R.; Hamelryck, T.; Bouckaert, J.; Wyns, L., 1998. Legume lectin structure. *Biochim Biophys Acta*, **1383**: 9-36.
- Luo, X.; Budihardjo, I.; Zou, H.; Slaughter, C.; Wang, X., 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**: 481-90.
- Macedo, M. L.; das Gracias, Machado Freire M.; Novello, J. C.; Marangoni S., 2002. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochim Biophys Acta*, **1571**: 83-8.
- Macedo, M. R. L.; Freire, M. G. M.; Cabrini, E. C.; Toyama, M. H.; Novello, J. C.; Marangoni, S., 2003. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effects on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochem. Biophys. Acta* **1621**: 170-182.
- Macedo, M. L.; de Castro, M. M.; Freire, M. G., 2004. Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Arch Insect Biochem Physiol*, **56**: 84-96.
- Majno, G.; Joris, I., 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, **146**: 3-15.

- Mannel, R.S.; Blessing, J.A.; Boike, G., 2000. Cisplatin and pentoxifylline in advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the cervix: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *Gynecol. Oncol.*, **79** :64-66.
- Martelli, A. M.; Cappellini, A.; Tazzari, P. L.; Billi, A M; Tassi, C.; Ricci, F.; Fala, F.; Conte, R., 2004. Caspase-9 is the upstream caspase activated by 8-methoxypsoralen and ultraviolet-A radiation treatment of Jurkat T leukemia cells and normal T lymphocytes. *Haematologica*, **89**: 471-9.
- Marth, C.; Daxenbichler, G., 1988. Peanut agglutinin inhibits proliferation of cultured breast cancer cells. *Oncology*, **45** :47-50.
- Marty-Detraves, C.; Francis, F.; Baricault, L.; Fournier, D.; Paquereau, L., 2004. Inhibitory action of a lectin from *Xerocomus chrysenteron* on cell-substrate adhesion. *Mol. Cell. Biochem.*, **258** :49-55.
- Mazumdar, S.; SenGupta, S. K.; Param, R.; Sinha, S. N., 1993. Binding pattern of eight different lectins in healthy subjects and patients with dysplastic and malignant lesions of the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg*, **22**: 301-5.
- McCoy, J. P. Jr., 1987. The application of lectins to the characterization and isolation of mammalian cell populations. *Cancer Metastasis Rev*, **6**: 595-613.
- Mello, M. L.; Vidal, B., 1980. Práticas em Biologia Celular, Edgard Blucher, **71**, R.J.
- Mirkes, P. E., 2002. Warkany lecture: to die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development. *Teratology*, **65**: 228-39.
- Mitchell, D. B.; Santone, K.; S.; Acosta, D., 1980. Evaluation of cytotoxicity in cultured cells by enzyme leakage. *J. Tissue Cult. Meth.* **6**:113-116.
- Mody, R.; Joshi, S.; Chaney, W., 1995. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **33** :1-10
- Monsigny, M.; Roche, A. C.; Midoux, P., 1988. Endogenous lectins and drug targeting. *Ann N Y Acad Sci*, **551**: 399-413
- Moreira, R. de A.; Ainouz, I. L.; De Oliveira, J. T.; Cavada, B. S., 1991. Plant lectins, chemical and biological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **86** Suppl 2:211-8.
- Mosmann T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65** :55-63.
- Mullick, T.; Gasser, E., 2004. Nutrition in the chemoprevention of gastrointestinal cancer: Where are we in the new millennium. Nutrition issues in the gastroenterology. *Pract. Gastroenterol.*, **15** :52-64.
- Nagata, S., 2005. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol*, **23**: 853-75.

- Nicholson, D. W.; Thornberry, N. A., 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, **22**: 299-306.
- Ohba, H.; Moriwaki, S.; Bakalova, R.; Yasuda, S.; Yamasaki, N., 2004. Plant-derived abrin-a induces apoptosis in cultured leukemic cell lines by different mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol*, **195**: 182-93.
- Oka, Y.; Chet, I.; Spiegel, Y., 1997. An immunoreactive protein to wheat-germ agglutinin antibody is induced in oat roots following invasion of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*, and by jasmonate. *Mol Plant Microbe Interact*, **10**: 961-9.
- Peumans, W. J.; Van Damme, E. J. M., 1998. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotech. Gen. Eng. Ver*, **15**: 199-229.
- Pinon, J. M.; Puygauthier-Toubas, D.; Lapan, H.; Marx, C.; Bonhomme, A.; Boulant, J.; Geers, R.; Dupont, H., 1990. Rapid detection of proteins by enzyme-linked immunofiltration assay after transfer onto nitrocellulose membranes. *Electrophoresis*, **11**: 41-5.
- Prance, G. T.; Silva, M. F., 1975. *Árvores de Manaus*. Manaus, CNPq / INPA. 312p.
- Pusztai, A., 1996. Characteristics and consequences of interactions of lectins with the intestinal mucosa. *Arch Latinoam Nutr*, **44**:10S-15S.
- Rao, P. V.; Jayaraj, R.; Bhaskar, A. S.; Kumar, O.; Bhattacharya, R.; Saxena, P.; Dash, P. K.; Vijayaraghavan, R., 2005. Mechanism of ricin-induced apoptosis in human cervical cancer cells. *Biochem Pharmacol*, **69**: 855-65
- Rathmell, J.C.; Thompson, CB., 2002. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell*, **109** Suppl: S97-107.
- Remani, P.; Pillai, K. R.; Haseenabeevi, V. M.; Ankathil, R.; Bhattathiri, V. N.; Nair, M. K.; Vijayakumar, T., 1994. Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. *Neoplasma*, **41**: 39-42.
- Riedl, S.J.; Shi, Y., 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**: 897-907.
- Rüdiger, H.; Gabius, H. J., 2001. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj J*, **18**: 589-613.
- Rüdiger, H., 1998. Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. *Acta Anat (Basel)*, **161**: 130-52.
- Salvesen, G. S.; Duckett, C. S., 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**: 401-10.
- Sandvig, K.; Grimmer, S.; Lauvrak, S.U.; Torgersen, M.L.; Skretting, G.; Van Deurs, B.; Iversen, T.G., 2002. Pathways followed by ricin and Shiga toxin into cells. *Histochem. Cell Biol*, **117**:131-141.

- Sanford, G.L.; Harris-Hooker, S., 1990. Stimulation of vascular cell proliferation by beta-galactoside specific lectins. *FASEB J.*, **4** :2912-2918.
- Saraste, A.; Pulkki, K., 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*, **45**: 528-37.
- Serke, S.; Neubauer, A.; Van Lessen, A., 1989. Binding of mitogenic plant lectins to human lymphocytes. Flow cytometric analysis. *J Immunol Methods*, **121**: 231-5.
- Sharon, N., 1977. Lectins. *Sci Am*, **236**: 108-16, 118-9.
- Sharon, N., 1993. Lectin-carbohydrates complexes of plants and animals. An atomic view. *Trends Biochem. Sci.*, **18** :221-226.
- Sharon, N.; Lis, H., 1995. Lectins--proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. *Essays Biochem*, **30**: 59-75.
- Sharon, N.; Lis, H., 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, **14**: 53R-62R.
- Sherblom, A. P.; Decker, J. M.; Muchmore, A. V., 1988. The lectin-like interaction between recombinant tumor necrosis factor and uromodulin. *J Biol Chem*, **263**: 5418-24.
- Sherblom, A. P.; Sathyamoorthy, N.; Decker, J. M.; Muchmore, A. V., 1989. IL-2, a lectin with specificity for high mannose glycopeptides. *J Immunol*, **143**: 939-44.
- Shoham, J.; Inbar, M.; Sachs, L., 1970. Differential toxicity on normal and transformed cells in vitro and inhibition of tumour development in vivo by concanavalin A. *Nature*, **227**: 1244-6.
- Sikic, B.I., 1999a. New approaches in cancer treatment. *Ann. Oncol.*, **10**: 149S-153S.
- Sikic, B.I., 1999b. Modulation of multidrug resistance: a paradigm for translational clinical research. *Oncology (Williston Park)*, **13** :183-187.
- Silva, M. F.; Lisboa, P. L. B.; Lisboa, R. C. L., 1977. Nomes vulgares de plantas amazônicas. Manaus, INPA / CNPq. 222 p.
- Sinowatz, F.; Friess, A. E., 1983. Localization of lectin receptors on bovine epididymal spermatozoa using a colloidal gold technique. *Histochemistry*, **79**: 335-44.
- Slee, E. A.; Adrain, C.; Martin S. J., 1999a. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ*, **6**: 1067-74.
- Slee, E. A.; Harte, M. T.; Kluck, R. M.; Wolf, B. B.; Casiano, C. A.; Newmeyer, D. D.; Wang, H. G.; Reed, J. C.; Nicholson, D.W.; Alnemri, E. S.; Green, D. R.; Martin, S. J., 1999b. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*, **144**: 281-92.

- Stanley, P., 1992. Surface carbohydrate alterations of mutant mammalian cells selected for resistance to plant lectins. In: Lennarz W (ed) *The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans*, Plenum Press, New York, 1981, pp 161-189(Gorelik, 1994 # 1980).
- Thompson CB., 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**: 1456-62.
- Thornberry, N. A.; Bull, H. G.; Calaycay, J. R.; Chapman, K. T.; Howard, A. D.; Kostura, M. J.; Miller, D.K.; Molineaux, S. M.; Weidner, J. R.; Aunins, J. *et al*, 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, **356**: 768-74.
- Thornberry, N.A.; Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science*, **281**: 1312-6.
- Tibbetts, M. D.; Zheng, L.; Lenardo, M. J., 2003. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol*, **4**: 404-9.
- Timoshenko, A. V.; Kayser, K.; Drings, P.; Kolb, G.; Havemann, K.; Gabius, H. J., 1993. Modulation of lectin-triggered superoxide release from neutrophils of tumor patients with and without chemotherapy. *Anticancer Res*, **13**: 1789-92.
- Tsubura, A.; Morii, S.; Matsuzawa, A., 1991. Lectin-binding patterns in transplantable mouse mammary tumors and their metastases. *Anticancer Res*, **11**: 1719-23.
- Valentiner, U.; Pfuller, U.; Baum, C.; Schumacher, U., 2002. The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II and III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cell lines in vitro. *Toxicology*, **171**: 187-99.
- Van Damme, E. J.; Goossens, K.; Smeets, K.; Van Leuven, F.; Verhaert, P.; Peumans, W. J., 1995. The major tuber storage protein of araceae species is a lectin. Characterization and molecular cloning of the lectin from *Arum maculatum* L. *Plant Physiol*, **107**: 1147-58.
- Van Damme, E. J.; Brike, F.; Winter, H. C.; Van Leuven, F.; Goldstein, I. J.; Peumans, W. J., 1996. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. *Eur J Biochem*, **236**: 419-27.
- Van Damme, E. J.; Peumans, W. J.; Barre, A.; Rougé, P., 1998. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *CRC Crit Rev Plant Sci*, **17**: 575-92.
- Van Damme, E. J. M.; Lannoo, N.; Fouquaert, E.; Peumans, W., 2004a. The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins. *Glycoconjugate J*. **20**: 449-460.
- Van Damme, E. J.; Zhang, W.; Peumans, W. J., 2004b. Induction of cytoplasmic mannose-binding jacalin-related lectins is a common phenomenon in cereals treated with jasmonate methyl ester. *Commun Agric Appl Biol Sci*, **69**: 23-31.

- Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C., 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods*, **184**:39-51.
- Vervecken, W.; Kleff, S.; Pfüller, U.; Bussing, A., 2000. Induction of apoptosis by mistletoe lectin I and its subunits. No evidence for cytotoxic effects caused by isolated A- and B-chains. *Int J Biochem Cell Biol*, **32**: 317-26.
- Vetterlein, M.; Ellinger, A.; Neumüller, J.; Pavelka, M., 2002. Golgi apparatus and TGN during endocytosis. *Histochem. Cell Biol.*, **117**:143-150.
- Wang, J.Y., 2001. DNA damage and apoptosis. *Cell Death Differ*, **8**:1047-8.
- Wimer, B. M., 1990. Characteristics of PHA-L4, the mitogenic isolectin of phytohemagglutinin, as an ideal biologic response modifier. *Mol Biother*, **2**: 4-17.
- Wimer, B. M., 1997. Therapeutic immunostimulating effects of plant mitogens exemplified by the L4 isolectin of PHA. *Cancer Biother Radiopharm*, **12**: 195-212.
- Wyllie, A.H.; Beattie, G. J.; Hargreaves, A.D., 1981. Chromatin changes in apoptosis. *Histochem. J.*, **13**: 681-92
- Yamaoka, K.; Ohno, S.; Kawasaki, H.; Suzuki, K., 1991. Overexpression of a beta-galactoside binding protein causes transformation of BALB3T3 fibroblast cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **179**: 272-9.
- Yin, X. M., 2000a. Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas/TNF-R1 death receptors in hepatocytes. *J Mol Med*, **78**: 203-11.
- Yin, X. M., 2000b. Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Res*, **10**: 161-7.
- Ziegler, U., 2004. Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*, **19**: 124-8.
- Zou, H.; Li, Y.; Liu, X.; Wang, X., 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, **274**: 11549-56.