

SÍLVIA DE BARROS-MAZON

Este Exemplar corresponde a receber
foel da tese defendida pela candidata
Sua. Silvia de Barros-Mazon e aprovada
pela Comissão Julgadora.

12.7.88

M. Ribeiro

**ESTUDO COMPARATIVO DE PROCESSOS
DE FRACIONAMENTO APLICADOS A
PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO CARCINOMA
MAMÁRIO HUMANO**

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Imunologia
do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do
Grau de Mestre.

CAMPINAS-1988

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



Trabalho desenvolvido na Disciplina de Imunologia Clínica do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, com auxílio financeiro da FAPESP e do CNPq.

Orientador

Prof. Dr. LUIZ SEBASTIÃO PRIGENZI

"Foi o tempo que perdeste com tua rosa
que a fez tão importante..."

Antoine de Saint-Exupéry

À memória de meu primeiro mestre:

aquele que em mim despertou a atração pela Ciência - meu pai

Aquela que em mim sempre confiou, pelo seu

exemplo de perseverança e determinação - minha mãe

Às minhas irmãs,

Helena e Cláudia, pelo incentivo constante

Ao Luís Antonio (Totonho),

paciente companheiro e amigo de todas as horas

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz S. Prigenzi pela orientação, amizade e convivência enriquecedora ao longo destes anos.

Aos Profs. Dr. Avelino R. de Oliveira, Dra. Célia Regina R.S. Carlini, Dra. Gláucia M. Santelli, Dr. Marcos G. Costa, Dra. Maria Cristina R.A. Barreira, Dr. Nelson F. Mendes e Dra. Regina de C.B. Pisani, pela valiosa contribuição quando da análise crítica deste trabalho.

Ao Dr. Henrique B. Brenelli, Diretor da Divisão de Oncologia do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, e aos Drs. José B. da Silva Neto e Paulo de Assis, do Setor de Câncer de Mama do Hospital do Câncer A.A.C. Camargo, por terem possibilitado o acesso aos seus respectivos serviços e a obtenção de materiais provenientes de pacientes portadoras de carcinoma mamário.

Ao Dr. Ricardo Baroudi, do Hospital Samaritano de Campinas, pela colaboração no fornecimento de amostras de tecido mamário normal, provenientes de cirurgias plásticas para fins estéticos.

Ao Dr. Caio Auriemo, da TRILAB, e à Srta. Regina Kimura, da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, por terem colaborado com a marcação dos lotes de lectina WGA com ^{125}I .

Aos amigos, colegas de pós-graduação, funcionários e docentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia, que colaboraram direta e/ou indiretamente para a realização do presente trabalho.

Aos amigos, funcionários e docentes do Departamento de Patologia Clínica, em especial aos amigos Prof. Dr. Cláudio L. Rossi pela colaboração na parte técnica do presente trabalho, à Profa. Maria Helena S. Kraemer pelo estímulo frequente e à Sra. Marlene S. Ferreira pelo auxílio na lavagem da vidraria.

A todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Receptores Hormonais pelas contribuições à formalização deste trabalho e, em especial, à Dra. Regina de C.B. Pisani pelo incentivo e prontidão constantes.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	4
3. Objetivo.....	20
4. Materiais e Métodos.....	21
4.1. Purificação de Proteínas Associadas ao Tecido Mamário Normal e ao Carcinoma Mamário.....	21
4.2. Análise Eletroforética em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS.....	26

4.3. Análise por Imunodifusão e Análise Imunoeletroforética.....	27
4.3.1. Produção de Soro Hiperimune anti-fração F-NAG.....	27
4.3.2. Absorções do Soro Hiperimune a-F-NAG.....	28
4.3.3. Imunodifusão e Imunoeletroforose	29
4.4. Ensaio Qualitativo de Ligação à Lectina WGA- ¹²⁵ I...30	
4.4.1. Purificação da Lectina "Wheat Germ Agglutinin" (WGA).....	30
4.4.2. Ensaio Qualitativo	31
5. Resultados.....	33
5.1. Purificação de Proteínas Associadas ao Tecido Mamário Normal e ao Carcinoma Mamário	33
5.2. Análise Eletroforética em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS.....	41

5.3. Análise por Imunodifusão e Análise Imunoeletroforética.....	45
5.3.1. Análise por Imunodifusão.....	45
5.3.2. Análise Imunoeletroforética.....	46
5.4. Ensaio Qualitativo de Ligação à Lectina WGA- ¹²⁵ I.....	53
6. Discussão e Conclusão.....	55
7. Resumo.....	68
8. Bibliografia Consultada.....	70

ABREVIATURAS

BSA - soroalbumina bovina
BTA - "breast tumor antigen"
DOC - desoxicolato de sódio
NAcGlc - N-acetil-D-glicosamina
PBS - solução salina tamponada com fosfato
SDS - dodecil sulfato de sódio
WGA - "wheat germ agglutinin"

FI/T, FII/T, FIII/T e FIV/T - frações resultantes da cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose, realizada para o produto do fragmento tumoral 1 da paciente D.B.M.

FI/N e FII/N - frações resultantes da cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose, realizada para o produto de tecido mamário normal.

F-NAG - fração resultante da cromatografia de afinidade (WGA-Sepharose 6MB), realizada para o extrato relativo ao fragmento tumoral 2, da paciente D.B.M.

a-F-NAG - soro de coelho anti-fração F-NAG.

a-F-NAG abs.I - soro de coelho anti-fração F-NAG, absorvido com proteínas de tecido mamário normal.

a-F-NAG abs.II - soro de coelho anti-fração F-NAG, absorvido com linfócitos da paciente D.B.M.

1. INTRODUÇÃO

Muitos são os métodos disponíveis para a obtenção de preparações enriquecidas em proteínas associadas a tumores, baseados em diferentes combinações de processos físico-químicos. As variações metodológicas ocorrem desde a etapa de homogeneização e extração proteica de tecidos ou células, até a obtenção do produto final, purificado ou semi-purificado. Desta forma, com a variação metodológica surge a possibilidade de descobrir-se um novo componente que tanto pode ser original, como pode tratar-se de simples modificação comportamental de um componente já descrito, face a um novo sistema utilizado. Como todas as manipulações são realizadas em sistemas artificiais, deve-se ter em mente que a variação da manipulação inicial pode incorrer na variação do produto final.

No caso particular do câncer mamário humano, para um único tipo de tumor, várias abordagens para purificação de antígenos associados ao tumor são propostas e os resultados encontrados nem sempre são passíveis de correlação.

A inexistência de sistemas de referência padronizados, frente aos quais uma determinada preparação tumoral pudesse ser analisada, representa uma lacuna nesta área experimental. Como consequência, quando se pretende a purificação ou mesmo a semi-purificação de componentes antigênicos associados a um determinado tipo de tumor, a ausência de um controle padrão suscita questionamentos em torno do produto final.

Desta forma, quando o interesse de investigação é voltado para o estudo da resposta imune do hospedeiro frente ao crescimento neoplásico, a situação torna-se crítica. Isto porque além dos aspectos de reatividade e especificidade exigidos das preparações antigênicas, dever-se-ia considerar, como mais um critério de exigência, a existência de relação entre tal preparação e a determinação da condição maligna.

Com o intuito de se realizar, a posteriori, um estudo da resposta imune de pacientes portadoras de carcinoma mamário foi que se originou a proposta desta investigação.

Para obtenção de preparação antigênica, elegeu-se a metodologia descrita por KAMIYAMA et alii (1980). Todavia, por não se dispor de qualquer informação a respeito da relação entre a preparação resultante e o processo de malignização, julgou-se pertinente analisar esse critério indiretamente, pelo confronto com uma segunda preparação. Esta última foi obtida através de metodologia empregada por

ASHALL et alii (1982), quando da detecção de um marcador tumoral comprovadamente presente em células de tumores mamários (McGEE et alii, 1982) e resistente ao teste de fusão celular e, conseqüentemente, estritamente associado à determinação da condição maligna.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A biologia dos tumores, tanto experimentais como humanos, representa ainda um grande desafio, a despeito dos progressos científicos alcançados nos últimos anos. Como consequência direta desta situação, muitas controvérsias foram geradas ao longo das várias décadas de estudo, acerca da existência ou não de uma resposta imune efetiva, frente ao crescimento neoplásico.

A teoria da vigilância imunológica, proposta por ERLICH (1909), reformulada por THOMAS (1959) e, posteriormente, por BURNET (1971), a princípio foi recebida com muito entusiasmo, mas com o decorrer do tempo passou a ser alvo de fortes críticas, em virtude de novas abordagens experimentais contraporem-se àquelas que serviram de base para o estabelecimento dos preceitos teóricos (BRODT, 1983; KLEIN, 1980; OLD, 1981).

Todavia, o valor da pesquisa imunológica em câncer independe da validade da teoria da vigilância imunológica, porque seu princípio básico reside na constatação de

que as células cancerosas são antigenicamente distintas de suas progenitoras normais. Entretanto, ainda não se pode afirmar se essas diferenças induzem ou não um reconhecimento imunológico, sendo necessário um conhecimento mais detalhado dos antígenos de superfície da célula neoplásica. A análise histórica permite concluir que as tentativas feitas nesse sentido, basearam-se em análises incompletas ou inadequadas, do ponto de vista da especificidade das reações observadas. Os primeiros estudos sorológicos em câncer, realizados com soros heterólogos, trouxeram pequena contribuição à área ; seu avanço propriamente dito resultou, basicamente, do uso experimental de camundongos isogênicos e das análises resultantes, assim como, do conhecimento genético da imunidade dos transplantes. Foram os trabalhos pioneiros de GROSS (1943), FOLEY (1953) e PREHN (1957), que iniciaram a era moderna da imunologia dos tumores, ao revelarem que camundongos isogênicos podiam ser imunizados com transplantes de sarcomas induzidos quimicamente, em animais da mesma linhagem (OLD, 1981).

Há mais de duas décadas, OLD e seu grupo têm se ocupado da análise sorológica dos antígenos de superfície celular de tumores experimentais e humanos. No caso particular de tumores humanos, o grupo tenta responder a duas questões fundamentais: se os antígenos específicos de tumores existem e se eles podem estimular uma resposta imunológica no homem. Na evolução de seu estudo sorológico, foi estabelecido um rigoroso método, voltado para a especificidade.

Tal método é referido como tipagem autóloga, na qual a análise é restrita ao estudo de reações entre soro e células tumorais do mesmo paciente; o controle da especificidade é realizado através de testes de absorção do soro, frente a células normais, autólogas e alogênicas. O resultado deste estudo foi o reconhecimento de três classes de antígenos de superfície, definidos por anticorpos autólogos. Os antígenos de classe 1 são restritos ao tumor autólogo e não podem ser detectados em células normais autólogas ou em qualquer outro tipo celular normal ou maligno; os antígenos de classe 2 são compartilhados por outros tumores alogênicos, de origem relacionada e, em certos casos, por uma limitada faixa de tipos celulares normais; já os antígenos de classe 3 são amplamente distribuídos em células normais e malignas, autólogas, alogênicas e xenogênicas. A maior parte das reações detectadas pela tipagem autóloga, deve-se aos anticorpos dirigidos contra antígenos da classe 3. Tais anticorpos, em adição a aloanticorpos, indubitavelmente foram responsáveis pela grande maioria das reações positivas, obtidas nos estudos sorológicos do passado e, conseqüentemente, pelos muitos enganos e frustrações quanto à sua especificidade (OLD, 1981).

Sem dúvida alguma, a introdução da tipagem autóloga nos estudos sorológicos trouxe grande contribuição à análise da especificidade, uma vez que os resultados dos testes realizados com soro ou células linfóides de um paciente e células tumorais de outro, são frequentemente difíceis de se interpretar, pela participação desconhecida de aloantígenos nas reações observadas (SHIKU et alii, 1976).

No sistema de tipagem autóloga preconizado, o estudo imunológico de tumores sólidos foi realizado através de reações sorológicas entre soro e células tumorais provenientes de cultura. E, muito embora tenham sido obtidos excelentes resultados com células cultivadas *in vitro* (CAREY et alii, 1976; LLOYD et alii, 1979; OLD, 1981; PUKEL et alii, 1982; REAL et alii, 1984; SHIKU et alii, 1976 e 1977; WATANABE et alii, 1982) alguns autores alertam para a desvantagem de seu uso, ao informarem que a integridade celular original nem sempre é mantida em cultura, quer por perda (EGAN & HENSON, 1982; IMAN et alii, 1985; SCHLOM et alii, 1984) ou por aquisição de determinantes antigênicos (GINGRICH et alii, 1981). A coerência destas observações repousa no fato de as linhagens celulares mantidas *in vitro*, serem produtos de grande pressão seletiva exercida sobre populações celulares, originariamente encontradas *in vivo*. Sendo assim, as células selecionadas pela capacidade de crescimento em cultura, podem apresentar um fenótipo antigênico muito diferente daquele encontrado nas células presentes no tumor primário ou nas massas metastáticas (ASHALL et alii, 1982; SCHLOM et alii, 1984).

Ao lado do exposto acima, somam-se as exigências de ordem prática, envolvendo as culturas de longa duração, que acabam por restringir sua utilização a laboratórios especializados. Desta forma, a viabilização de extratos de tumores surge como alternativa para emprego em análises imunológicas. Nos extratos entretanto, os possíveis antígenos

tumorais encontram-se em meio a grande variedade de outros componentes, também constituintes das células. Além disso, é fato bem documentado que extratos brutos podem conter fatores bloqueadores (HOLLINSHEAD et alii, 1974), que pela interferência nas reações imunológicas, poderiam gerar falsas interpretações dos resultados observados. Portanto, um fracionamento seletivo do extrato bruto, resultando na obtenção de preparação proteica, ao menos semi-purificada, seria a condição necessária.

As metodologias disponíveis para a obtenção de preparações de proteínas associadas ao tumor são muito diversificadas, seja a partir de fragmentos tumorais (ALFORD et alii, 1973; BRAATZ et alii, 1978; DE CARVALHO, 1964; HOLLINSHEAD et alii, 1974; KAMIYAMA et alii, 1980; TAYLOR & ODILI, 1970; VELTRI et alii, 1977; YU et alii, 1980), linhagens celulares in vitro (ABE & KUFE, 1987; ASHALL et alii, 1982; BHAVANANDAN et alii, 1977; HOLTON et alii, 1979; KAMIYAMA et alii, 1982; RONAI & SULITZEANU, 1986), líquido ascítico (CHU et alii, 1977; PINTO et alii, 1986) ou ainda leite humano (ASHORN & KROHN, 1985; CERIANI et alii, 1982; HEYDERMAN et alii, 1979), baseadas em diferentes combinações de processos físico-químicos.

Em relação ao câncer mamário humano, a análise de uma pequena amostragem de trabalhos realizados confirma a grande variedade metodológica que tem sido empregada, na tentativa de se isolar e/ou caracterizar, um antígeno específico do tumor.

Na tentativa de obter grandes quantidades de preparação antigênica, para emprego subsequente em análises bioquímicas e imunológicas, DE CARVALHO (1964) propôs a utilização de coluna de afinidade, constituída de gamaglobulina insolúvel, anti-tecido humano normal, à qual foi aplicada uma mistura homogênea, obtida a partir da reunião de quatro amostras de tecido tumoral mamário, resultando na absorção dos antígenos compartilhados pelos tecidos normais. O material não retido correspondeu à preparação antigênica, na qual foram detectados seis diferentes componentes especificamente associados ao adenocarcinoma mamário, através de análise por imunodifusão.

Após centrifugação diferencial de homogeneizados de onze fragmentos tumorais mamários, tratados com solução de sacarose isotônica, TAYLOR & ODILI (1970) detectaram um "neoantígeno" de carcinoma mamário, nas frações nucleares de seis dos onze fragmentos manipulados, através de reações imunológicas realizadas em sistema autólogo e alogênico.

No estudo de reações de hipersensibilidade tardia em pacientes com câncer mamário, ALFORD et alii (1973) utilizaram dois tipos de preparações antigênicas: a) extrato solúvel de membranas celulares de tumores mamários e b) fração resultante de cromatografia em Sephadex G-200, realizada para o extrato solúvel. As diferentes preparações antigênicas foram testadas em sistema autólogo, alogênico e em pacientes com outros tipos de tumores, ou doença benigna da mama. O extrato solúvel demonstrou reatividade tumor-específica, ao passo que a fração cromatográfica, apesar de

reagir mais intensamente em pacientes com carcinoma mamário, também reagiu em pacientes com outros tipos de câncer.

Em continuidade a esse trabalho, HOLLINSHEAD et alii (1974) separaram os componentes reativos presentes na fração cromatográfica, através de eletroforese em gel de poliacrilamida, que permitiu a detecção de um antígeno associado ao tumor. Desta forma os autores puderam demonstrar que a purificação é necessária, no sentido de eliminar os antígenos inespecíficos, responsáveis pelas reações cruzadas.

HOLTON et alii (1979) descreveram um antígeno associado a carcinoma mamário humano, isolado a partir de membranas plasmáticas de células obtidas da linhagem celular de tumor mamário, SW-527. Os autores obtiveram em primeiro lugar, IgG, considerada específica, anti-tumor mamário, proveniente do soro de paciente com câncer de mama. Após precipitação do soro com sulfato de amônio, seguiu-se purificação por cromatografias de troca iônica, proteína-A e afinidade, esta última constituída de células tumorais intactas, ligadas covalentemente à Sepharose 6 MB. Para o isolamento do antígeno, as membranas plasmáticas das células tumorais foram solubilizadas com Triton X-100 a 0,5%. As glicoproteínas resultantes foram então fracionadas através de cromatografia de afinidade, cuja matriz era composta pelos anticorpos IgG anti-tumor mamário. No material eluído foram identificadas duas proteínas, com pesos moleculares estimados respectivamente em 69 e 19 kd.

A partir de membranas de glóbulos de gordura do leite humano, que correspondem às membranas plasmáticas das células epiteliais mamárias, HEYDERMAN et alii (1979) obtiveram anti-soro heterólogo, que após absorção com tecidos não-relacionados, foi empregado em estudo imunocitoquímico (imunoperoxidase), de tecido mamário humano normal e maligno. Os autores detectaram um antígeno de membrana nas células de tecidos malignos e normais, que embora não tenha mostrado restrição ao tecido mamário, mostrou especificidade para o epitélio secretor. O componente foi caracterizado como antígeno de diferenciação tecidual e a sua localização celular, foi relacionada ao potencial de metastização do tecido tumoral.

Ao submeterem um carcinoma medular mamário, a tratamento com KCl 3M, YU et alii (1980) obtiveram extrato tumoral, que após cromatografia em Sephadex G-200, resultou em fração de alto peso molecular, utilizada como imunógeno. Empregando o soro policlonal produzido contra a fração antigênica, em técnica de imunoperoxidase indireta, os autores detectaram um antígeno citoplasmático, associado ao câncer mamário, nos tecidos tumorais de trinta pacientes examinadas. Reações mais fracas foram também observadas, em fibroadenomas, melanomas e carcinoma de cólon, possivelmente pelo fato do soro hiperimune ter sido produzido contra fração antigênica que ainda continha muitos componentes não exclusivos de tecido mamário tumoral.

A partir da homogeneização de fragmentos de adenocarcinoma mamário, em tampão hipertônico Tris-KCl 3M ou Tris-Triton X-100 a 0,1%, seguida da combinação de vários fracionamentos cromatográficos e eletroforese preparativa em gel de poliacrilamida, KAMIYAMA et alii (1980) isolaram um antígeno associado ao tumor, denominado BTA ("breast tumor antigen"). A análise eletroforética revelou tratar-se de glicoproteína de migração lenta, com peso molecular estimado em 67 kd, com afinidade pelo corante "Coomassie blue" e reação PAS positiva. As amostras de tecido mamário normal, pulmonar, hepático e esplênico, que foram tratadas de maneira similar ao tecido tumoral mamário, não demonstraram a presença de tal componente, sugerindo a sua restrição ao tumor.

Em trabalho posterior (KAMIYAMA et alii, 1982), valendo-se de células em cultura de linhagem SW-527, o mesmo grupo isolou dois antígenos distintos, também associados ao tumor mamário. Os componentes isolados apresentaram pesos moleculares de 112 e 65 kd, sendo respectivamente denominados, BTA 1 e BTA 2. Muito embora em termos estruturais somente o antígeno BTA 2 tenha se mostrado similar ao antígeno previamente isolado de tecido tumoral (KAMIYAMA et alii, 1980), ambos demonstraram compartilhar propriedades imunológicas com o mesmo.

CERIANI et alii (1982) observaram a presença de antígenos epiteliais mamários no soro de mulheres sadias e mulheres portadoras de carcinoma mamário disseminado. Estes antígenos são considerados antígenos de diferenciação,

com localização na membrana de células epiteliais de mama normal, neoplásica, fibroadenomatosa, displásica ou obtida de ginecomastia. Todavia, altos títulos dos antígenos só são detectados, no soro de pacientes com câncer mamário. Desta forma os autores propuseram o uso destes componentes como marcadores específicos, de alta prevalência para o câncer mamário. Com o objetivo de caracterizá-los, efetuaram os seguintes passos: primeiramente produziram soro hiperimune policlonal anti-epitélio mamário humano, que posteriormente foi ligado covalentemente a microesferas; o complexo microesferas-soro hiperimune foi incubado com soro de pacientes portadoras de carcinoma mamário, seguindo-se "iodinização" in situ. Finalmente, através de eletroforese em gel de poliacrilamida, foram detectados três antígenos liberados das microesferas, apresentando pesos moleculares de 150, 70 e 46 kd.

Apesar de sumária, a citação de diferentes abordagens na tentativa de se descobrir um marcador específico de tumor mamário humano, revela a grande variedade de metodologias empregadas. Assim, para um único tumor, várias abordagens são propostas e os resultados nem sempre são passíveis de correlação, mesmo porque este tipo de preocupação parece estar ausente da grande maioria das publicações.

Quando então, a atenção é voltada para os antígenos detectados pelos anticorpos monoclonais, o problema parece se amplificar, pois a cada dia, novos trabalhos descrevem novos antígenos. Segundo EGAN e KENSON (1982), este

fato é justificado pela grande variedade de abordagens utilizadas na produção de anticorpos monoclonais reativos com tecido mamário normal ou maligno.

Os anticorpos monoclonais, por sua especificidade mais restrita, têm sido largamente utilizados no estudo de antígenos tumorais nos últimos anos. Seu uso tem se revelado importante, por demonstrar a grande heterogeneidade antigênica entre células de um mesmo tumor ou entre diferentes tumores, quanto ao epitopo particular que é reconhecido (CERIANI et alii, 1984; EDWARDS & BROOKS, 1984; EGAN & HENSON, 1982; HAND et alii, 1983; KUFE et alii, 1983; NATALI et alii, 1983; NORTH et alii, 1986; PAPSIDERO et alii, 1984; PETERSON et alii, 1983; SCHLOM et alii, 1984; THOR et alii, 1986). Todavia, alguns autores informam que estes anticorpos reconhecem epitopos similares em diferentes moléculas de proteínas (ASHORN & KROHN, 1985; HELLE & KROHN, 1986; LINSLEY et alii, 1986), presentes inclusive em diferentes tecidos tumorais ou normais (HELLE & KROHN, 1986). Desta forma, HELLE & KROHN (1986) sugerem que o isolamento de proteínas que contêm tais epitopos, a partir de tecidos malignos, para produção subsequente de novos anticorpos monoclonais, poderia favorecer a produção de anticorpos com maior especificidade para os respectivos tumores.

Por outro lado, o significado funcional dos muitos componentes detectados não é claro até o momento. A preocupação vigente é voltada para a tentativa de se detectar em células tumorais mamárias, um marcador imunológico

que possa ser útil em termos de diagnóstico e/ou imunoterapia. Assim, a grande maioria das publicações tem registrado diferenças qualitativas e/ou quantitativas entre células malignas e não-malignas, sem contudo discutir em profundidade essas diferenças ou pesquisar sua base biológica, sua função e a relação com o processo de transformação maligna. Em outras palavras, o valor da detecção de diferenças entre células tumorais e normais por si só é questionável, se não for explorada a sua relação com a determinação da condição maligna.

Nesse sentido, BRAMWELL & HARRIS (1978,a) destacam a contribuição gerada pela técnica de fusão celular, na verificação da relação entre um determinado marcador celular e o estado maligno. Quando células tumorais são fundidas com células diplóides normais, os híbridos inicialmente formados são, em geral, incapazes de crescer progressivamente em hospedeiros imunossuprimidos e geneticamente compatíveis. Entretanto, no cultivo contínuo de células híbridas in vitro, ocorre segregação de elementos genéticos, normalmente na forma de perdas cromossômicas e, eventualmente, células malignas reaparecem na população. O desaparecimento e reaparecimento da condição maligna, como consequência da segregação genética, fornece um método para se pesquisar a existência ou não, de estrita associação entre um determinado marcador celular e o estado maligno. Seja qual for o marcador, deverá estar presente nas células parentais malignas, deverá desaparecer com a supressão da malignidade (pela fu-

são da célula maligna com a não-maligna) e deverá reaparecer em todos os tumores, derivados da segregação gerada subsequentemente, pela população de células híbridas.

Através da utilização de linhagens celulares humanas e murinas, tumorais e normais, em teste de fusão celular e segregação genética, os autores acima mencionados, analisaram as glicoproteínas de membrana dos vários tipos celulares resultantes. Na fase inicial do trabalho, células malignas, células diplóides, e células híbridas não-malignas com suas variantes malignas, foram submetidas à extração proteica, sendo as suas glicoproteínas de membrana analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida, com o corante "Coomassie blue". Numerosas diferenças foram encontradas, porém estas não foram descritas, visto que os marcadores corados por "Coomassie blue", detectados nas células malignas, não desapareceram em híbridos nos quais a malignidade foi suprimida, para reaparecerem em segregantes malignos derivados destes híbridos; ou vice-versa, confirmando desta maneira, que nem todas as diferenças encontram-se associadas à determinação da condição maligna. Os autores dirigiram então sua atenção para os açúcares das glicoproteínas e, através de experimentos que envolviam afinidade por lectinas, detectaram um marcador de membrana, uma glicoproteína de 100 kd, presente em grande variedade de células tumorais e sobrevivente ao teste de segregação genética.

Pelas características bioquímicas da glicoproteína de 100 Kd, os autores consideraram a possibilidade de tratar-se do receptor para insulina e talvez também para outros polipeptídeos, envolvidos na regulação do crescimento celular. Sendo assim, uma aberração estrutural nesta molécula particular, poderia acarretar perda de controle do crescimento normal. Todos os tumores examinados nesse trabalho demonstraram possuir o mesmo tipo de anormalidade estrutural, afetando a mesma glicoproteína de membrana.

Em publicação posterior BRAMWELL & HARRIS (1978,b) informaram que a glicoproteína em questão apresentava-se como dímero na membrana celular e possuía um sítio de ligação para glicose. Nesta fase foi concluído que em uma grande variedade de tumores, inclusive em tumores humanos, algo agia sobre a glicoproteína, resultando em uma estrutura polissacarídica anormal. Os autores relacionaram esta conclusão, ao fato bem conhecido de muitas células malignas frente a polipeptídeos hormonais, demonstrarem anomalias no transporte da glucose e na sua resposta de crescimento.

ASHALL et alii (1982) descreveram um novo marcador para células cancerosas humanas, presente em uma grande variedade de tumores, inclusive em carcinoma mamário (McGEE et alii, 1982), e ausente de tecidos normais, com exceção do epitélio das trompas de Falópio e do epitélio de transição do trato urinário. O referido marcador foi detectado por anticorpo monoclonal produzido em camundongo, imunizado com proteínas de membrana de células provenientes da

linhagem tumoral H.Ep.2, relativa a tumor de laringe humana, sendo que a preparação antigênica foi obtida após purificação das proteínas solubilizadas, através de cromatografia de afinidade, cuja matriz era constituída de Sepharose ligada à lectina WGA. O anticorpo monoclonal, denominado Ca1, discriminou híbridos malignos, daqueles em que o estado maligno foi suprimido, permitindo desta forma, relacionar a presença do antígeno com a capacidade das células crescerem progressivamente in vivo, ou seja, com a determinação do estado maligno. Através de experimentos de imunoprecipitação, verificou-se que o antígeno podia ser precipitado pelo anticorpo Ca1, a partir de extratos de células malignas, mas não de extratos de células normais. O antígeno imunoprecipitado, após redução com ditioneitol, foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, que permitiu sua revelação em duas bandas, com pesos moleculares estimados em 390 e 350 kd. Estes componentes mostraram propriedades de glicoproteínas com alto conteúdo de carboidrato, não coráveis pelo "Coomassie blue". O experimento de ligação por afinidade, utilizando WGA-¹²⁵I, revelou que ambos os componentes ligaram-se à lectina. Até o ponto em que foi possível constatar na literatura, o determinante antigênico detectado, não pareceu corresponder a qualquer dos antígenos de superfície celular anteriormente descritos e, desta forma, os autores propuseram nomeá-lo "antígeno Ca".

Em trabalho posterior, BRAMWELL et alii (1983) informaram que o antígeno Ca é uma glicoproteína do tipo mu-

cina, sendo sua porção carboidrato formada principalmente de ácido siálico, N-acetil-galactosamina e galactose, sendo sua interação com a lectina WGA, realizada via ácido siálico. Diante das observações imunohistológicas anteriores, que revelaram a presença desta glicoproteína nos epitélios normais do trato urinário e das trompas de Falópio (McGEE et alii, 1982), os autores decidiram investigar sua função no epitélio urinário. As análises realizadas revelaram que sua síntese era induzida e que exercia papel protetor junto às células especializadas do epitélio normal, contra concentrações excessivas de íons hidrogênio. Considerando ainda que as glicoproteínas isoladas do tecido normal e de células malignas H. Ep 2 guardavam relação entre si, e que os problemas ambientais enfrentados pelas células tumorais, não são diferentes daqueles enfrentados pelos epitélios especializados, aventaram a possibilidade de o antígeno Ca exercer função similar junto às células malignas. Na concepção dos autores, a visão do papel biológico do antígeno Ca e do mecanismo de sua síntese, poderia implicar na possibilidade do mesmo ser induzido nos tumores primários. Baseados nesta possibilidade e em sua própria observação de que o antígeno Ca pode ser detectado em lesões pré-malignizantes ou carcinoma in situ, consideraram plausível a atribuição de um significado prognóstico para a presença deste antígeno.

3. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo a análise comparativa dos produtos resultantes de dois diferentes métodos de fracionamento proteico, aplicados a fragmentos de carcinoma mamário, provenientes de massa tumoral única. Os parâmetros de análise utilizados foram: 1) análise eletroforética em gel de poliacrilamida, na presença de SDS; 2) análise imunoquímica, através de imunodifusão dupla e imunoeletroforese frente a soro hiperimune de coelho, produzido contra uma das preparações antigênicas resultantes; 3) teste qualitativo de ligação à lectina WGA-¹²⁵I.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Purificação de Proteínas Associadas ao Tecido Mamário Normal e ao Carcinoma Mamário

Os dois fragmentos provenientes da massa tumoral da paciente D.B.M., submetida à mastectomia radical por ser portadora de carcinoma ductal infiltrativo, grau histológico III e grau nuclear I, foram manipulados independentemente, segundo metodologias distintas, no sentido de fornecerem preparações enriquecidas em proteínas associadas ao tumor mamário. Um dos fragmentos (fragmento 1) foi essencialmente manipulado segundo metodologia descrita por KAMIYAMA et alii (1980). O outro fragmento (fragmento 2) foi submetido à metodologia descrita por ASHALL et alii (1982), modificada.

Para obtenção de preparações homogêneas, ambos os fragmentos foram totalmente seccionados em micrótomo-criostato (DAMON/IEC Division), em cortes de 16 μ m de espessura (LEWINSOHN, 1981). Os cortes relativos ao fragmento 1 foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 0,05M - KCl 3M, pH 8,0 (3 ml/g de tecido) através de agitação mecânica a 4° C, durante 16 horas. A preparação homogênea foi centrifugada a 105.000 x g (Ultracentrífuga Beckman L5-75B) durante 2 horas sendo que o precipitado (P-0) foi descartado e o sobrenadante (S-0) necessitou centrifugação adicional a 105.000 x g por 30 minutos para eliminar a turbidez e viscosidade remanescentes. O segundo precipitado (P-1) também foi descartado e o novo sobrenadante (S-1), correspondente ao extrato tumoral, após concentração em sistema Millipore e diálise contra o tampão Tris-HCl 0,05M-NaCl 2M, pH 8,0, foi aplicado a uma coluna de Bio-Gel A-50 (62 x 2,5 cm), equilibrada e submetida à eluição com o mesmo tampão. A fração predominantemente proteica resultante (F2/T), após concentração em sistema Millipore e diálise contra o tampão Tris-HCl 0,05M-NaCl 0,04M, pH 8,0 foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose (17,5 x 1,5 cm), realizada sob alimentação de um gradiente contínuo, com molaridade crescente de NaCl (0,04-0,4M) contido em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. Desta cromatografia resultaram as frações FI/T; FII/T; FIII/T e FIV/T (figura I). Uma amostra de tecido mamário normal, proveniente de cirurgia plástica para fins estéticos, foi manipulada de maneira análoga ao fragmento 1,

resultando na obtenção das frações FI/N e FII/N (figura II). Todas as frações resultantes, após diálise contra PBS, foram concentradas em sistema Millipore.

Os cortes relativos ao fragmento 2 foram homogeneizados através de agitação manual em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8,0, contendo Triton X-100 a 1% (2 ml/g de tecido) e incubados a 4°C durante uma hora. Em seguida, a preparação foi centrifugada a 3.000 x g por 10 minutos, sendo que o sobrenadante (S-2), correspondente ao extrato tumoral, foi separado e o precipitado (P-2) descartado. Após adição de DOC ao extrato na concentração final de 1%, este foi separado em três alíquotas. Cada alíquota foi incubada individualmente em uma coluna com 5 ml de WGA-Sepharose 6MB (Sigma), durante 1 hora à temperatura ambiente, com agitação ocasional. Ao final de cada período de incubação, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8,0, para remoção do material que não se ligou à matriz. A eluição do material proteico especificamente ligado à lectina WGA, foi efetuada com tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8,0, contendo NAcGlc 0,7M (figura I). A fração resultante, denominada F-NAG, foi dialisada contra PBS e concentrada em membrana de diálise, contra sacarose. Uma alíquota desta fração foi tratada com etanol absoluto a -20°C, sendo que o precipitado obtido foi lavado duas vezes e reconstituído com PBS, correspondendo à fração F-NAG/E.

Os produtos resultantes a cada etapa dos diferentes processos de fracionamento, após diálise contra PBS, foram alíquotados e estocados a -80°C. Uma alíquota de cada

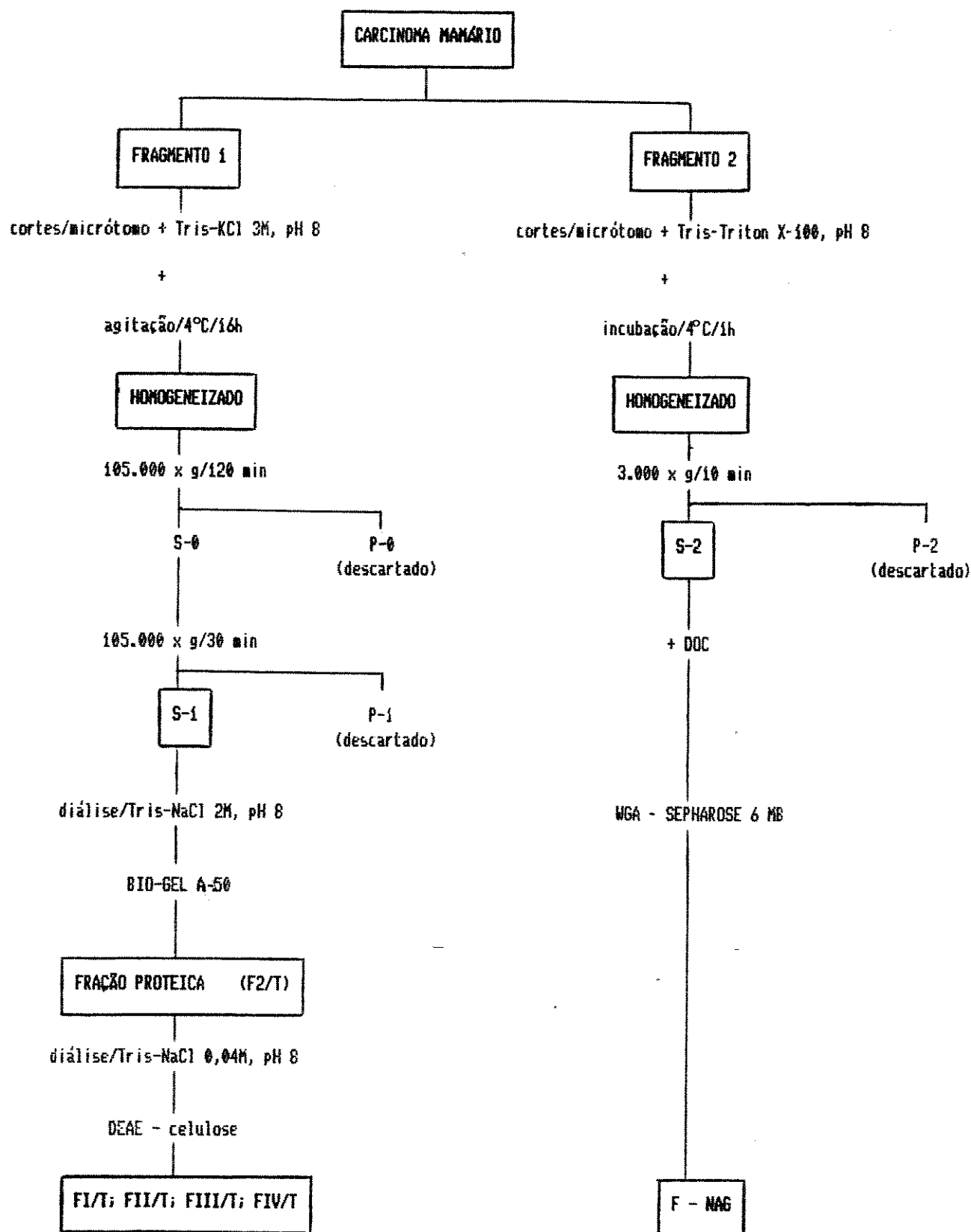


Figura I - Representação esquemática dos diferentes métodos de purificação de proteínas associadas ao carcinoma mamário.

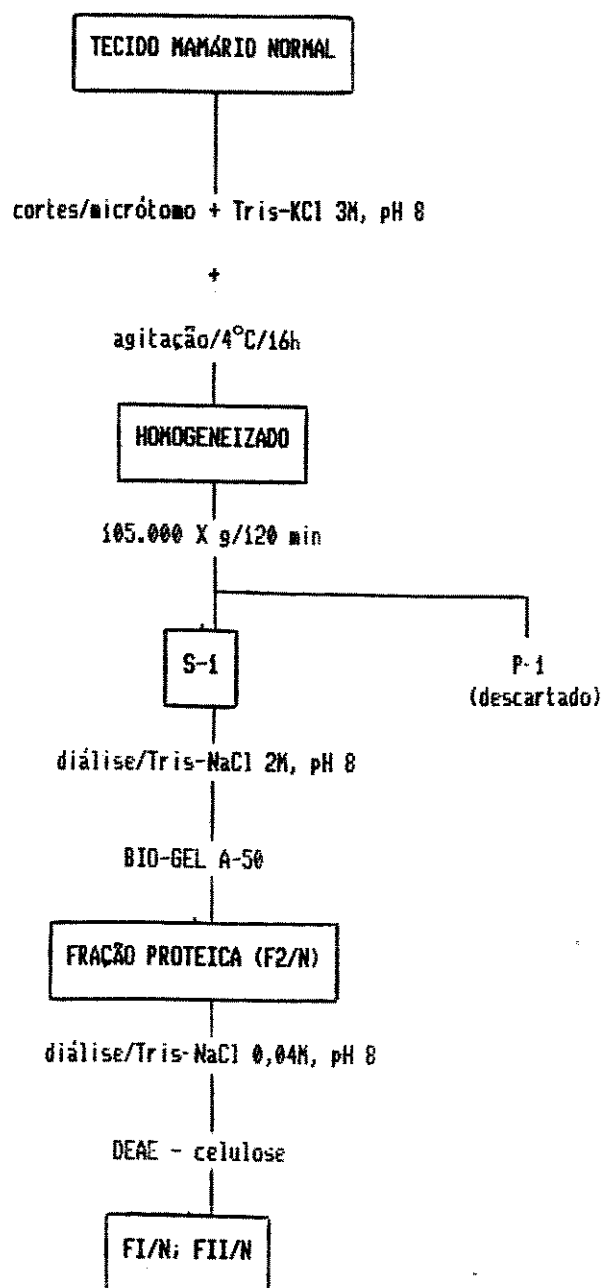


Figura II - Representação esquemática do processo de purificação de proteínas associadas ao tecido mamário normal.

um dos produtos foi submetida à dosagem de proteínas pelo método de LOWRY et alii (1951), modificado por GARVEY et alii (1977).

4.2. Análise Eletroforética em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS

As frações resultantes dos diferentes processos de fracionamento foram submetidas à análise eletroforética em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, segundo metodologia descrita por TAKÁCS (1979).

As análises foram realizadas em gel de separação a 7,5%. As amostras foram diluídas em tampão apropriado e aplicadas no volume de 50 µl, nas seguintes concentrações proteicas: FI/T; FIII/T; FI/N; FII/N; F-NAG/E = 1,6 mg/ml; FII/T; FIV/T = 1,55 mg/ml; F-NAG = 0,4 mg/ml. Como marcadores de peso molecular, utilizou-se BSA (67 kd) e IgG (150 kd). As corridas eletroforéticas foram efetuadas sob voltagem constante: 60 V até que as amostras atingissem o gel de separação, passando-se então para 100 V. O tempo médio das corridas foi de 2 horas e 30 minutos. A coloração de proteínas foi realizada com "Coomassie blue" a 0,25%, segundo o método de SEGREST & JACKSON (1972). Para a reação de PAS utilizou-se a metodologia de ZACHARIUS et alii (1969), sendo

que o reativo de Schiff foi preparado segundo Mc GUCKIN & Mc KENZIE (1958).

4.3. Análise por Imunodifusão e Análise Imunoeletroforética

4.3.1. Produção de Soro Hiperimune anti-fração F-NAG

O soro hiperimune anti-fração F-NAG (α -F-NAG) foi obtido de um coelho albino. A preparação antigênica, fração F-NAG, foi injetada com adjuvante completo de Freund (v/v), por via subcutânea, no dorso do animal, na concentração proteica final de 0,4 mg/ml. Após trinta dias o animal recebeu a segunda dose e, em intervalos aproximados de vinte dias, duas doses adicionais. As doses de reforço foram inoculadas por via intradérmica. A sangria total do animal foi realizada após três meses da primeira dose. Após separação do soro, este foi aliquotado e armazenado a -80° C. O título dos anticorpos anti-fração F-NAG foi determinado através de imunodifusão dupla.

4.3.2. Absorções do Soro Hiperimune α -F-NAG

O soro α -F-NAG foi absorvido com proteínas de tecido mamário normal ou com linfócitos da paciente, de cujo tumor resultou a fração F-NAG.

A absorção com proteínas de tecido mamário normal foi realizada através de cromatografia de afinidade, com base na metodologia descrita por GARVEY et alii (1977), adaptada para proteínas de tecido mamário normal. Para obtenção de proteínas na forma solúvel, uma amostra de tecido mamário normal foi seccionada em micrótomo-criostato e os cortes (16 μ m de espessura), homogeneizados mecanicamente e incubados com solução de bicarbonato de sódio 0,1M, em NaCl 0,5M, por 1 hora, a 4°C. A seguir a preparação homogênea foi centrifugada a $1.300 \times g$ durante 10 minutos, e o sobrenadante obtido, foi misturado à Sepharose hidratada (Sepharose 4B ativada com Brometo de Cianogênio - Sigma), sob agitação lenta, durante duas horas à temperatura ambiente. Findo o processo de conjugação, a matriz foi transferida para uma seringa descartável e incubada com o soro anti-fração F-NAG por 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente, com agitação ocasional. Em seguida a coluna foi lavada com PBS para remoção das proteínas não ligadas à matriz, correspondentes ao soro absorvido (α -F-NAG abs.I). Após concentração ao volume original, o soro foi aliquotado e estocado a - 80° C.

Para absorção do soro a-F-NAG com linfócitos do sangue periférico da paciente D.B.M., estes foram obtidos com base na metodologia descrita por BOYUM (1976). Após o processo de separação, os linfócitos foram centrifugados e o sedimento ressuspendido em 1 ml de soro a-F-NAG, na concentração final de $1,4 \times 10^7$ células/ml de soro. A suspensão foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente e 1 hora a 4° C, com agitação a cada 15 minutos. Após centrifugação a $500 \times g$ por 10 minutos, obteve-se o soro absorvido (a-F-NAG abs.II).

4.3.3. Imunodifusão e Imunoelektroforese

As reações de imunodifusão foram realizadas segundo o método de OUCHTERLONY (1949), adaptado por GARVEY et alii (1977), utilizando-se como suporte agarose a 1%, preparada em solução salina 0,15 M. Após preparação das lâminas, estas foram perfuradas de forma a apresentar um poço central, circundado por quatro ou seis poços a 0,5 cm de distância. No poço central aplicou-se o soro hiperímune a ser testado e nos poços periféricos, as diferentes frações sob análise.

As análises imunoelektroforéticas foram efetuadas com base na metodologia adaptada por GARVEY et alii (1977), utilizando-se como suporte, agarose a 1%, preparada

em tampão barbital 0,025M, pH 8,6. Nos poços, aplicou-se as frações em estudo e nas canaletas, os soros hiperimunes. As corridas eletroforéticas foram realizadas com tampão barbital 0,025 M, pH 8,6 e sob voltagem constante (150 V).

Em ambos os tipos de análise, após o processo de imunodifusão, lavagem e secagem das lâminas, estas foram coradas com solução de Negro de Amido a 0,2% em metanol: ácido acético: água destilada (25:5:20) durante 30 minutos e descoradas através de incubações sucessivas com a solução descorante: metanol:ácido acético:água destilada (25:5:20).

4.4. Ensaio Qualitativo de Ligação à Lectina WGA. ¹²⁵I

4.4.1. Purificação da Lectina "Wheat Germ Agglutinin" (WGA)

A lectina WGA, extraída de germe de trigo bruto, foi purificada de acordo com o método descrito por NAGATA et alii (1974). Sua atividade aglutinante foi testada durante e após o processo de purificação, através de técnica de aglutinação direta, descrita por BURGER & GOLDBERG (1967) e adaptada quanto ao sistema de células-teste utilizado que, no presente trabalho, foi representado por hemácias humanas "A" ou hemácias de carneiro.

Algumas alíquotas da lectina purificada foram marcadas com ^{125}I , pelo método de Cloramina T, no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

4.4.2. Ensaio Qualitativo

A investigação da presença de componentes com afinidade de ligação à lectina WGA- ^{125}I nas diferentes frações obtidas no presente trabalho, foi realizada através de ensaios qualitativos. Estes foram realizados em triplicatas de tubos de poliestireno, sendo que as frações analisadas encontravam-se com as seguintes concentrações proteicas: FI/T; FIII/T; FI/N; FII/N = 1,6 mg/ml; FII/T; FIV/T; = 1,55 mg/ml; F-NAG = 0,4 mg/ml.

As frações sob análise (50 μl) e uma alíquota de PBS (50 μl) foram depositadas respectivamente nos tubos-teste e no tubo controle, os quais foram incubados a 4° C por uma hora. A seguir, os tubos receberam 25 μl da solução de BSA a 2% e foram incubados a 4° C, durante 18 horas. Findo o período de incubação e após três lavagens com PBS contendo BSA a 0,2%, todos os tubos receberam 50 μl de WGA- ^{125}I diluída em PBS-BSA a 0,2% . Após incubação a 4° C durante 2 horas, todos os tubos foram lavados com PBS-BSA a 0,2%, procedendo-se em seguida a leitura em contador gama (Gammacord-Ames).

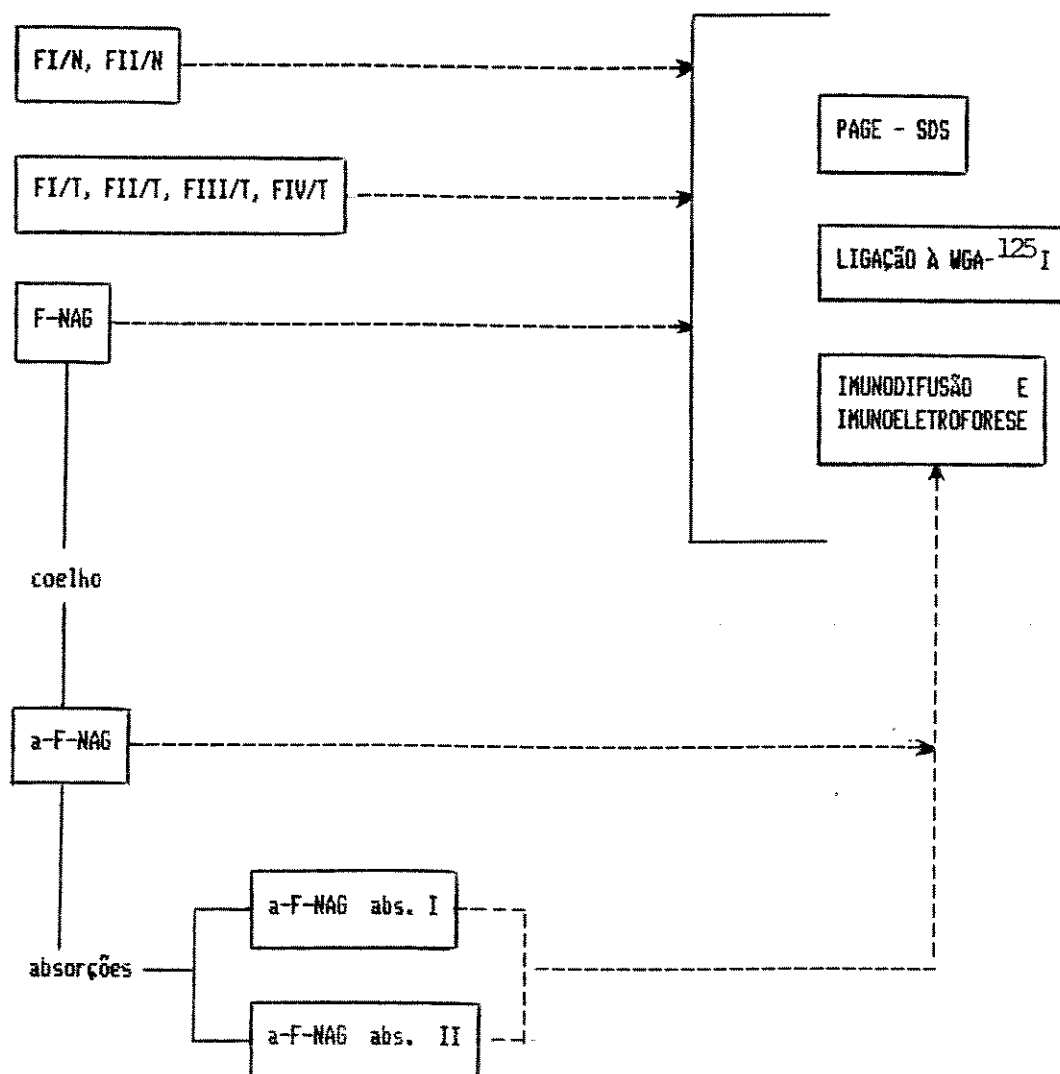


Figura III - Representação esquemática da sequência metodológica.

5. RESULTADOS

5.1. Purificação de Proteínas Associadas ao Tecido Mamário Normal e ao Carcinoma Mamário

Os fragmentos provenientes da massa tumoral da paciente D.B.M. foram submetidos a dois processos de fracionamento distintos: o primeiro, baseado na metodologia proposta por KAMIYAMA et alii (1980), e o segundo, na metodologia de ASHALL et alii (1982).

As cromatografias realizadas para o fragmento tumoral e tecido mamário normal, submetidos ao primeiro processo de fracionamento, encontram-se representadas nas figuras de IV a VII. Os extratos mamários tumoral e normal, quando submetidos à cromatografia de exclusão por peso molecular (Bio-Gel A-50), revelaram a presença de duas frações principais: a primeira, F1, sugestiva de conter principalmente material nuclear, do tipo DNA, e a segunda, F2, proteínas (figuras IV e V). As frações foram denominadas segun-

do seu extrato de origem F1/T e F2/T resultantes do extrato mamário tumoral e F1/N e F2/N resultantes do extrato mamário normal. A centrifugação adicional a $105.000 \times g$ do extrato bruto de tumor, reduziu de forma significativa a sua viscosidade, melhorando a capacidade analítica de resolução da cromatografia em Bio-Gel A-50 que, por sua vez, demonstrou-se bastante eficaz na exclusão de componentes sugestivamente nucleares, responsáveis pela viscosidade remanescente no extrato tumoral. Esta dedução foi estabelecida com base nas leituras espectrofotométricas realizadas a 260 nm antes e após a centrifugação adicional a que foi submetido o extrato mamário tumoral, com nítida diminuição da D.O. na segunda leitura.

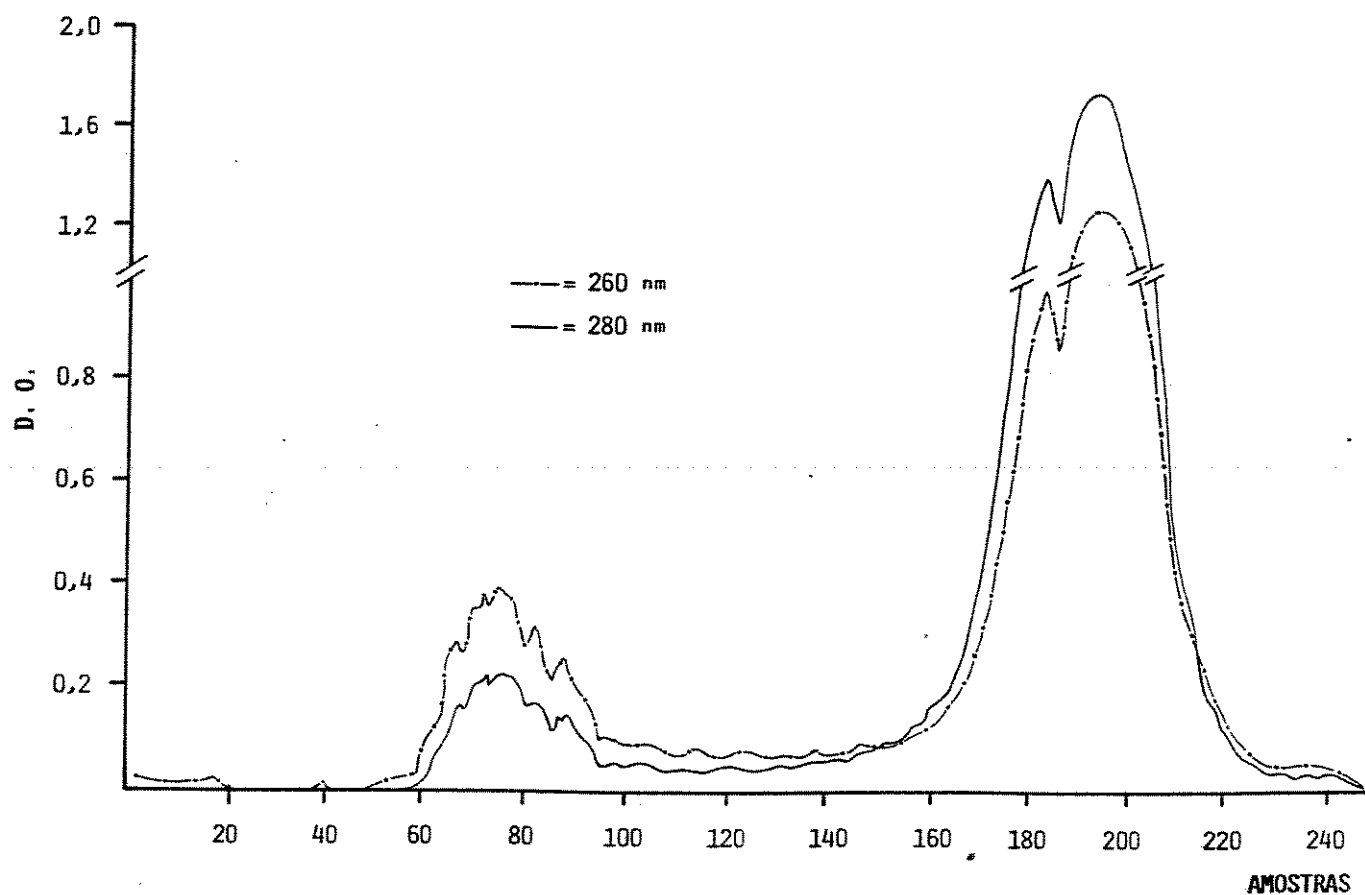


Figura IV - Cromatografia em Bio-Gel A-50 do extrato tumoral, relativo ao fragmento I da paciente D.B.M. Volume da amostra aplicada: 1,4 ml (154 mg de proteínas). Dimensões da coluna: 62 x 2,5 cm. Tampão de eluição: Tris-HCl 0,05M, contendo NaCl 2M, pH 8,0. Velocidade de fluxo: 6 ml/h. Amostras coletadas: 2 ml/tubo. Tempo requerido: 82 horas. Reunião das amostras: F1: do 64º ao 90º tubo; F2: do 170º ao 210º tubo.

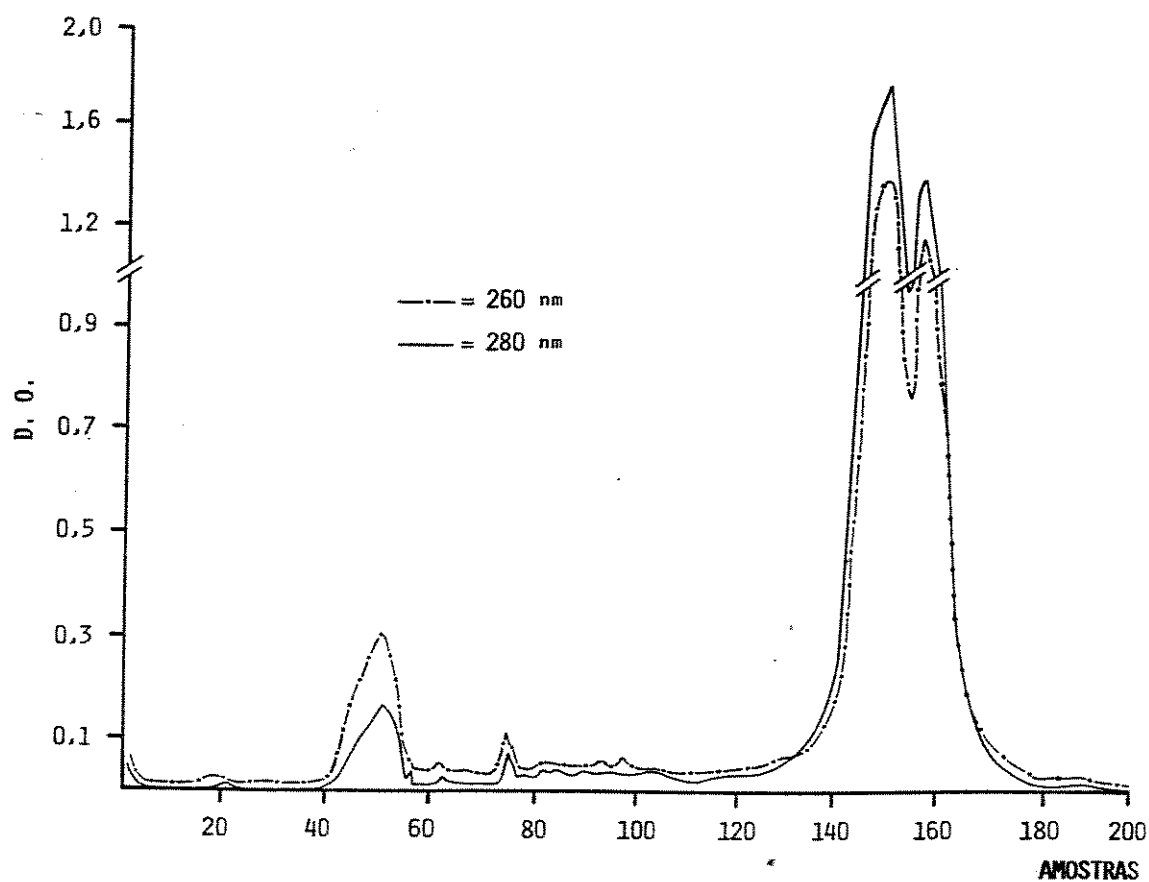


Figura V - Cromatografia em Bio-Gel A-50 do extrato mamário normal. Volume da amostra aplicada: 2,5 ml (172 mg de proteínas). Dimensões da coluna: 66 x 2,5 cm. Tampão de eluição: Tris-HCl 0,05M, contendo NaCl 2M, pH 8,0. Velocidade de fluxo: 6 ml/h. Amostras coletadas: 2 ml/tubo. Tempo requerido: 68 horas. Reunião das amostras: F1: do 45º ao 56º tubo; F2: do 138º ao 170º tubo.

As figuras VI e VII representam respectivamente, os perfis cromatográficos das frações predominantemente proteicas tumoral e normal, F2/T e F2/N quando submetidas à cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose, com eluição através de gradiente linear com molaridade crescente de NaCl (0,04 a 0,4 M), podendo se observar um perfil mais heterogêneo, para a amostra resultante de tecido mamário tumoral, que na zona do gradiente deu origem a duas outras frações (FII e FIV), além daquela (FIII) aparentemente correspondente à fração FII da preparação relativa ao tecido mamário normal.

Na realidade, considerando-se que a fração II resultante do produto de tecido mamário normal, eluiu na faixa estimada de NaCl, entre 0,11 e 0,20M e que as frações FII e FIII resultantes do tecido tumoral eluíram respectivamente entre 0,11 e 0,16M e 0,16 e 0,20M, poder-se-ia considerar que a fração relativa ao tecido normal corresponderia à somatória das frações II e III, resultantes do tecido tumoral.

As frações resultantes foram também denominadas segundo o tecido de origem: FI/T; FII/T; FIII/T e FIV/T, as obtidas a partir do tecido tumoral e, FI/N e FII/N do tecido mamário normal.

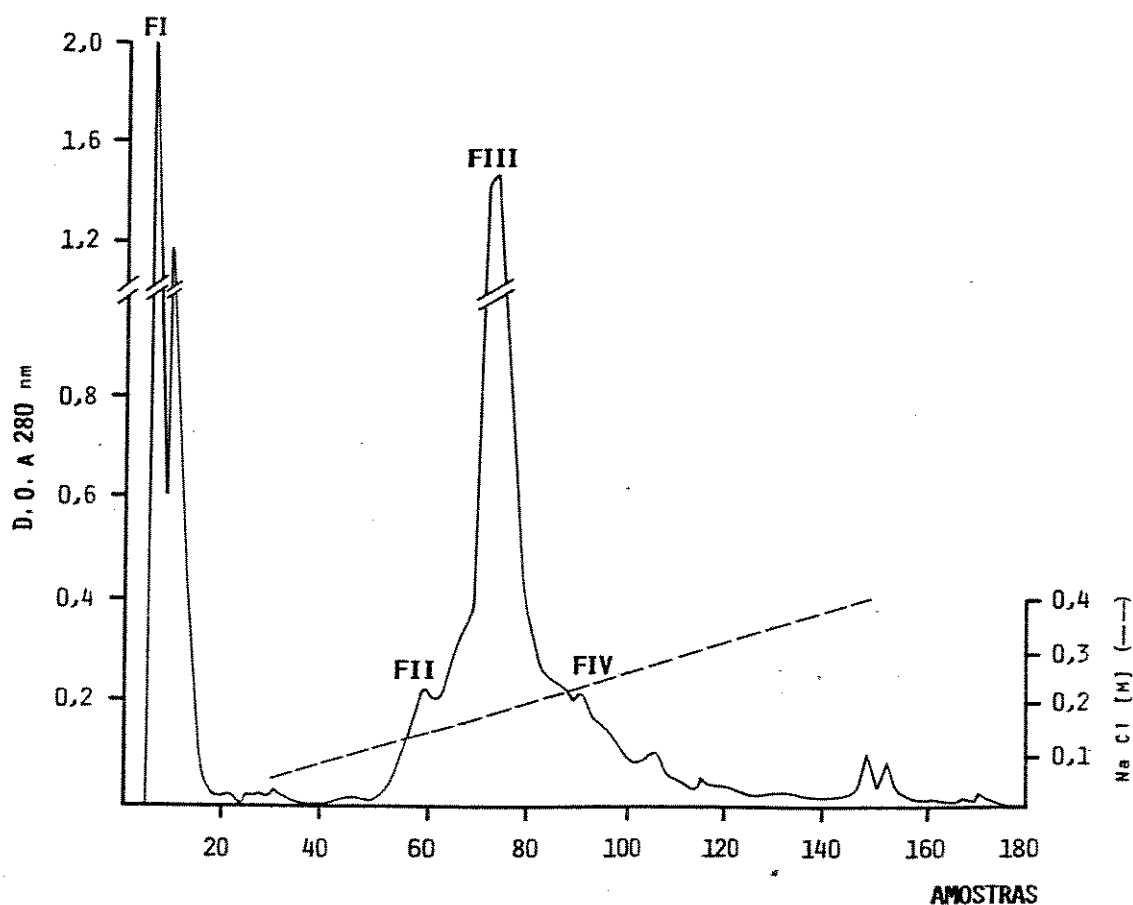


Figura VI - Cromatografia em DEAE-celulose, da fração predominantemente proteica resultante do extrato tumoral (F2/T). Volume da amostra aplicada: 2,5 ml (100,7 mg de proteínas). Dimensões da coluna: 17,5 x 1,5 cm. Tampão inicial de eluição: Tris-HCl 0,05M, contendo NaCl 0,04M, pH 8,0. Aplicação do gradiente linear (0,04 a 0,4M de NaCl): 30º tubo. Tampão terminal de eluição: Tris-HCl 0,05M, contendo NaCl 0,4M, pH 8,0. Velocidade de fluxo: 10 ml/h. Amostras coletadas: 2 ml/tubo. Tempo requerido: 38 horas. Reunião das amostras: FI: do 6º ao 15º tubo; FII: do 54º ao 69º tubo; FIII: do 70º ao 80º tubo; FIV: do 81º ao 110º tubo.

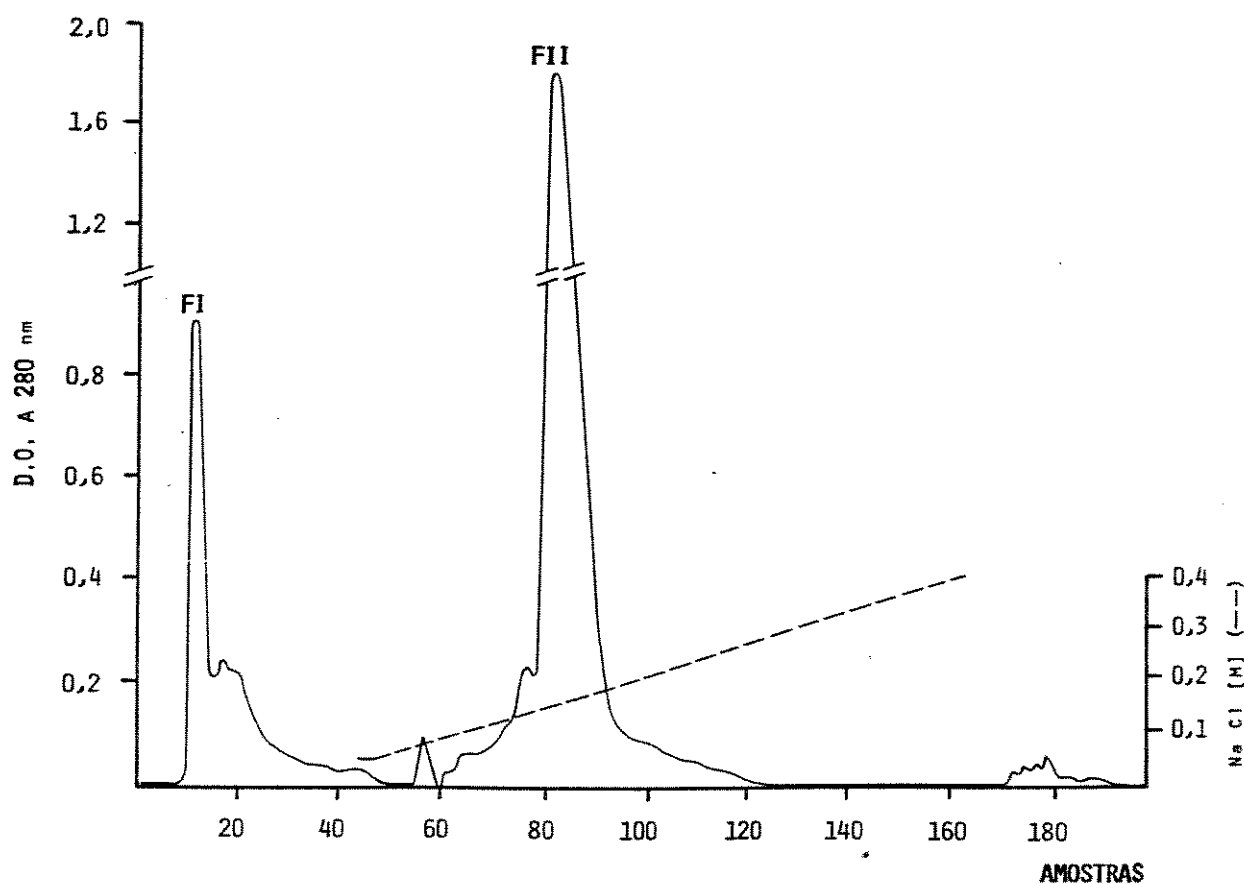


Figura VII - Cromatografia em DEAE-celulose, da fração predominantemente proteica resultante do extrato de tecido mamário normal (F2/N). Volume da amostra aplicada: 3,4 ml (98,6 mg de proteínas). Dimensões da coluna: 17,5 x 1,5 cm. Tampão inicial de eluição: Tris-HCl 0,05M, contendo NaCl 0,04M, pH 8,0. Aplicação do gradiente linear (0,04 a 0,4M de NaCl): 44º tubo. Tampão terminal de eluição: Tris-HCl 0,05M, contendo NaCl 0,4M, pH 8,0. Velocidade de fluxo: 10 ml/h. Amostras coletadas: 2 ml/tubo. Tempo requerido: 42 horas. Reunião das amostras: FI: do 10º ao 30º tubo; FII: do 71º ao 99º tubo.

A recuperação proteica obtida através dos diferentes processos de fracionamento, encontra-se registrada na tabela I. A cromatografia de troca iônica permitiu a recuperação de 54,9% (soma dos IR relativos às frações FI, FII, FIII e FIV) do extrato inicial de tumor, enquanto que apenas 13,4% foi recuperado da coluna de afinidade, utilizando WGA.

Tabela I - Dosagem de proteínas realizada a cada etapa dos diferentes processos de fracionamento, através do Método de LOWRY et alii (1951), modificado.

	TECIDO MAMÁRIO NORMAL		FRAGMENTO TUMORAL			
	MASSA INICIAL (g)					
	8,15		9,17		9,15	
	TOTAL DE PROTEÍNAS	IR	TOTAL DE PROTEÍNAS	IR	TOTAL DE PROTEÍNAS	IR
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)
Extrato	172,0	-	176,0	-	386,6	-
FII/Bio-Gel	117,6	68,3	121,8	169,21	-	-
FI/DEAE-celulose	9,2	5,3	23,7	113,41	-	-
FII/DEAE-celulose	65,6	38,1	14,5	8,21	-	-
FIII/DEAE-celulose	-	-	37,1	121,01	-	-
FIV/DEAE-celulose	-	-	21,7	112,31	-	-
F/WAG	-	-	-	-	51,8	13,41

FI - Fração I

FII - Fração II

FIII - Fração III

FIV - Fração IV

F/WAG - Fração eluída com N-acetil-D-glicosamina

IR = Índice de Recuperação = $\frac{\text{massa de proteína eluída} \times 100}{\text{massa de proteína inicial}}$

5.2. Análise Eletroforética em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, permitiu a detecção de várias diferenças entre tecido mamário tumoral e normal (figuras VIII e IX), diferenças essas, representadas principalmente pelos componentes de migração mais lenta, presentes na fração FII do tumor (FII/T), resultante da cromatografia de troca iônica. Esses componentes aparentam peso molecular superior a 150 kd, conforme foi verificado em análise eletroforética, na qual IgG e BSA, correram paralelamente às frações tumorais, resultantes da cromatografia de troca iônica e da cromatografia de afinidade (figura X). Conforme o esperado, a cromatografia de afinidade mostrou-se mais seletiva do que a de troca iônica. Pela coloração usual foi possível observar que alguns dos componentes presentes na fração FII/T encontraram correspondência na fração F-NAG (figuras VIII, IX e X).

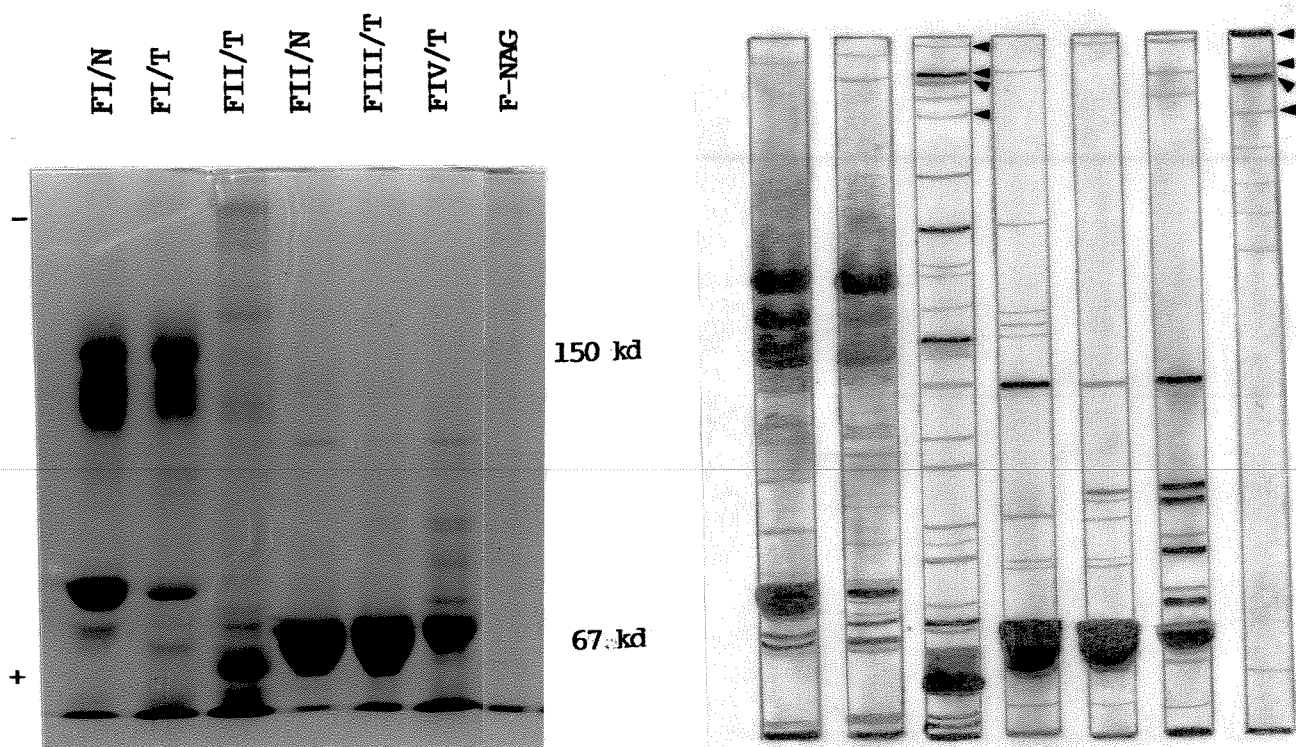


Figura VIII - Análise eletroforética em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, realizada para as frações: FI/N (1,6 mg/ml), FII/N (1,6 mg/ml), FI/T (1,6 mg/ml), FII/T (1,55 mg/ml), FIII/T (1,6 mg/ml), FIV/T (1,55 mg/ml) e F-NAG (0,4 mg/ml). Concentração do gel de separação: 7,5%. Volume das amostras: 50 µl. Tampão de corrida: Tris(0,025M) - Glicina (0,192M), pH 8,4. Voltagem empregada: 100 V. Tempo de corrida: 2 horas e 15 minutos. Coloração: "Coomassie blue" a 0,25%.

Obs.: O esquema foi obtido a partir de observação da placa.

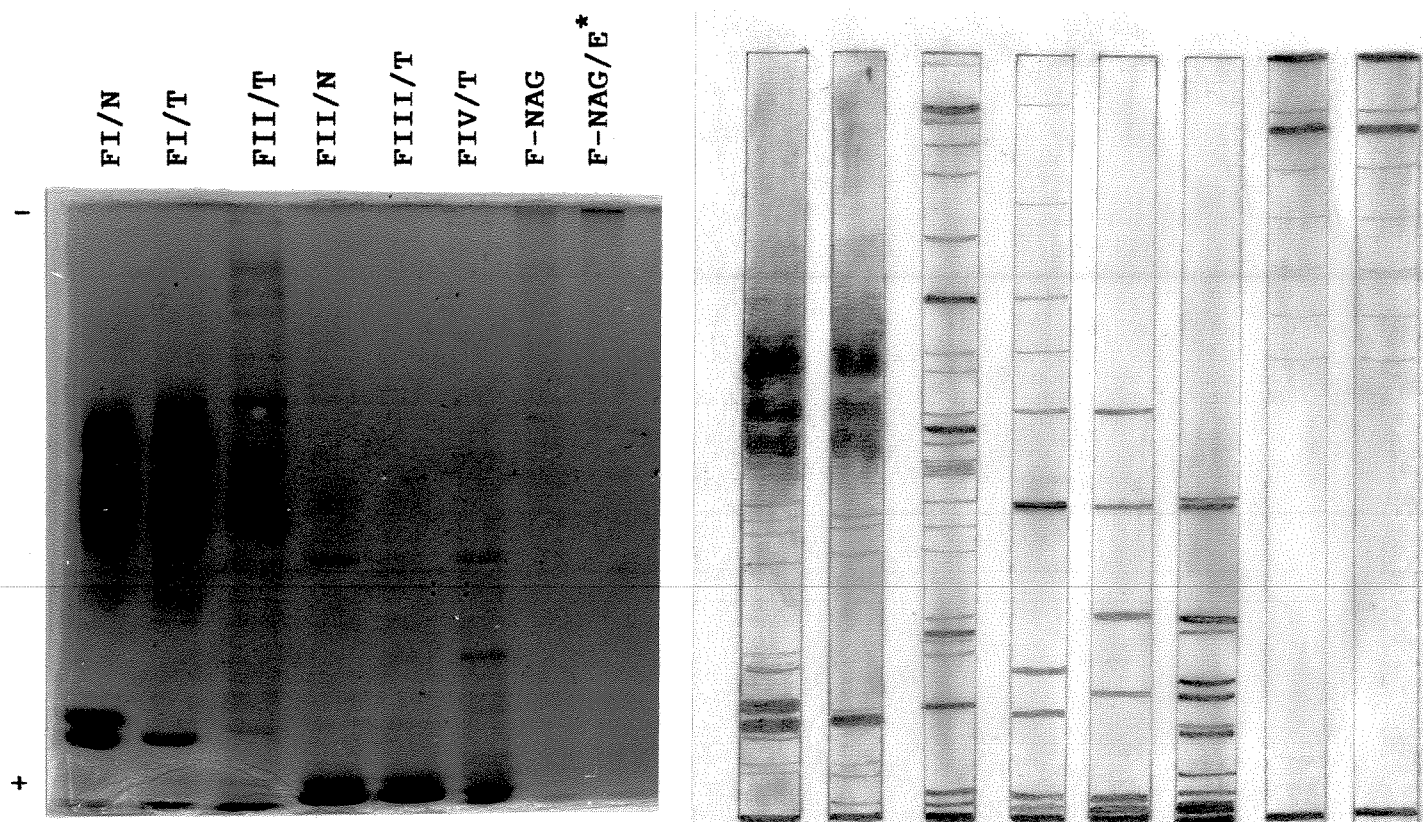


Figura IX - Análise eletroforética em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, realizada para as mesmas frações e nas mesmas condições descritas na figura VIII, exceto pelo tempo de corrida que foi de 2 h e 45 min.

* A amostra F-NAG/E corresponde à fração F-NAG tratada com etanol, na concentração proteica final de 1,6 mg/ml.

Obs.: O esquema foi obtido a partir de observação da placa.

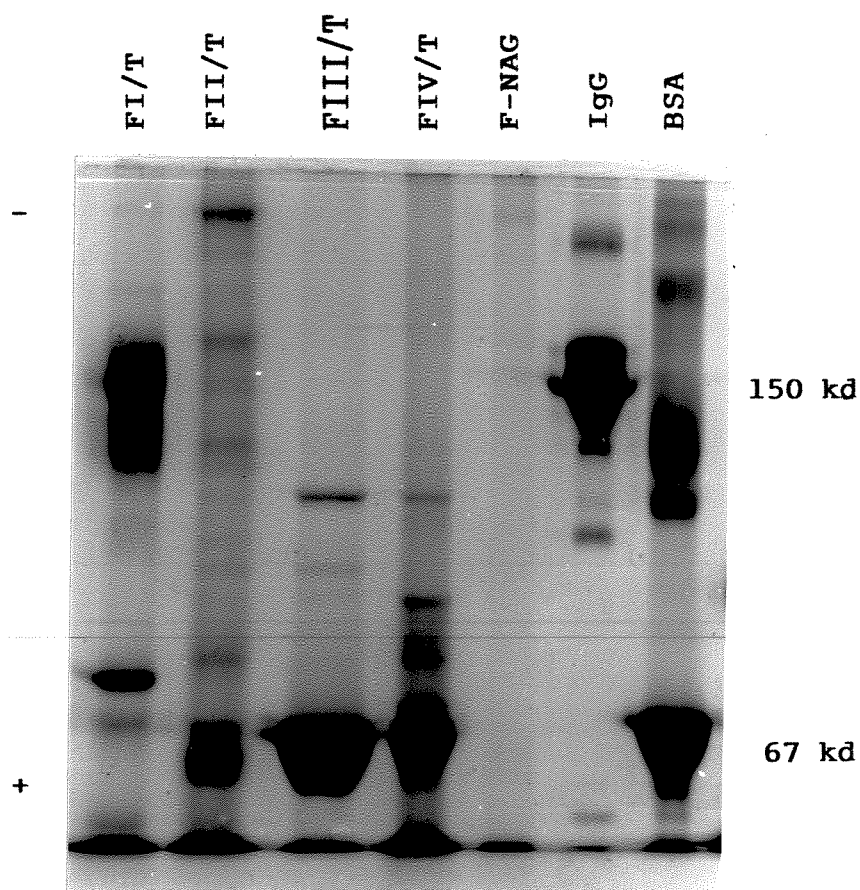


Figura X - Análise eletroforética em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, realizada para as frações: FI/T (1,6 mg/ml); FII/T (1,55 mg/ml); FIII/T (1,6 mg/ml); FIV/T (1,55 mg/ml) e F-NAG (0,4 mg/ml). Paralelamente às frações, correram os marcadores de peso molecular, Ig G (150 kd) e BSA (67 kd). Esta análise foi realizada nas mesmas condições descritas na figura VIII, exceto pelo tempo de corrida que foi de 2 h e 30 min.

Os géis de poliacrilamida, além de terem sido corados por "Coomassie blue", foram submetidos à reação de PAS, sendo que nenhuma das frações analisadas, demonstrou a presença de componente com reação PAS positiva.

5.3. Análise por Imunodifusão e Análise Imunoeletroforética

5.3.1. Análise por Imunodifusão

A análise prévia por imunodifusão, método de OUCHTERLONY (1949), demonstrou que o soro hiperimune produzido em coelho contra a fração F-NAG, soro a-F-NAG, reagiu com todas as frações sob análise. A utilização simultânea deste soro, antes e após absorção com proteínas de tecido mamário normal, permitiu a detecção de componente(s) aparentemente associado(s) de forma restrita ao tumor, nas frações F-NAG, FI/T, FII/T e FIV/T. Tendo-se em vista, que na análise eletroforética em gel de poliacrilamida, observou-se a correspondência de alguns componentes entre as frações FII/T e F-NAG (figuras VIII, IX e X), foi de interesse investigar, na análise por imunodifusão, o tipo de relação existente entre os componentes reconhecidos pelo soro anti-F-NAG, nestas mesmas frações. Após absorção do soro, observou-se o desapare-

recimento do arco precipitante de identidade total, resultante do reconhecimento, pelo soro anti-F-NAG, de componente(s) compartilhado(s) pelo tecido mamário normal. Todavia não foi possível estabelecer relação de identidade entre o(s) componente(s) associado(s) ao tumor, reconhecido(s) nas frações F-NAG e FII/T. Desta forma, com o objetivo de se explorar os resultados obtidos na imunodifusão, recorreu-se à imunoeletroforese.

5.3.2. Análise Imunoeletroforética

As diferentes frações analisadas frente ao soro a-F-NAG, demonstraram componentes com diferentes mobilidades eletroforéticas (figuras XI e XII). A julgar pelo padrão imunoeletroforético exibido pelas diferentes frações, pode-se atribuir relação de correspondência entre as frações FI/T e FI/N (figura XI, A e B), assim como entre as frações FIII/T e FII/N (figura XI, E e F). Enquanto a fração FIV/T parece compartilhar componentes presentes na fração FIII/T (figura XI, G e E), pode-se verificar que a maioria dos componentes reconhecidos na fração FII/T (figura XI, C), não encontra correspondência em nenhuma das frações provenientes de tecido mamário normal (figura XI, B e F).

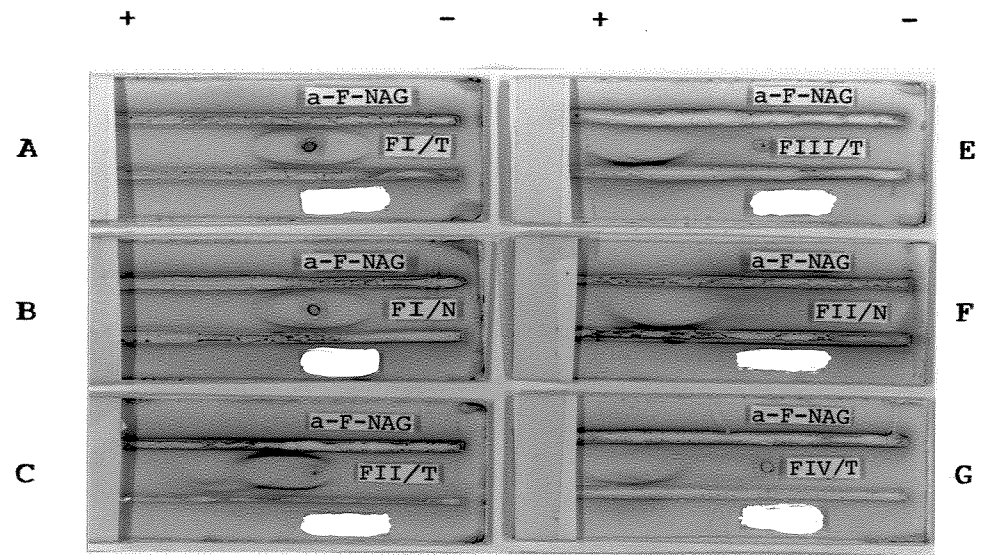


Figura XI - Análise imunoelctroforética realizada em agarose a 1%. Tampão de corrida: Tampão Barbital 0,025M, pH 8,6.

Coloração: Negro de Amido a 0,2%. Canaleta Superior: a-F-NAG - soro de coelho anti-fração F-NAG. Poços de aplicação: frações FI/T, FII/T, FIII/T, FIV/T, FI/N e FII/N.

Através da utilização de soro a-F-NAG absorvido com proteínas de tecido mamário normal (figuras XII, XIII e XIV), foi possível demonstrar que o componente associado ao tumor, presente na fração F-NAG diferiu do componente aparentemente comum, encontrado nas frações FI/T, FII/T e FIV/T, tanto a nível de mobilidade eletroforética, como em termos de concentração relativa, visivelmente mais elevada na fração F-NAG. Ainda em relação a esta fração o mesmo soro, porém absorvido com linfócitos da paciente D.B.M., mostrou padrão de precipitação idêntico ao exibido anteriormente, quando da utilização do soro não-absorvido (figura XV).

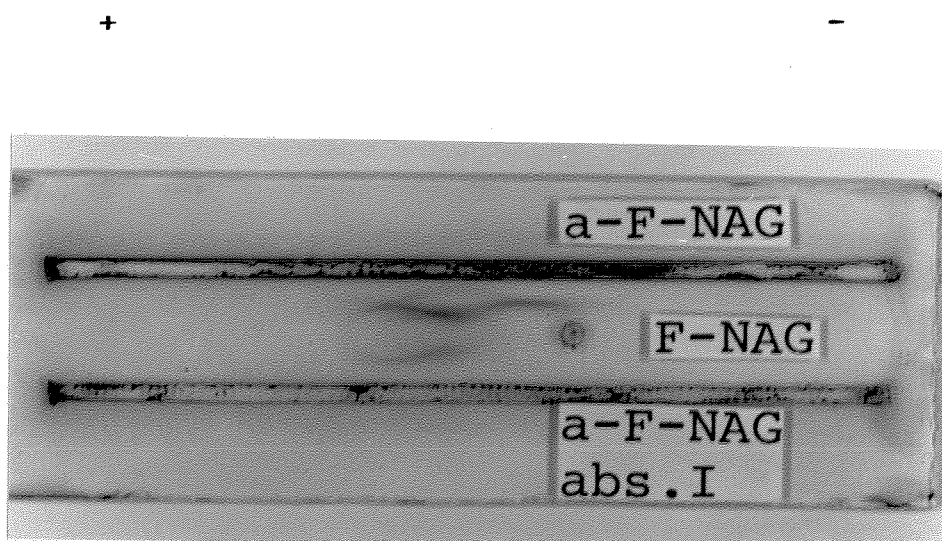


Figura XII - Análise imunoelctroforética realizada nas mesmas condições descritas na figura XI. Poço de aplicação: F-NAG. Canaletas: a-F-NAG - soro de coelho anti-fração F-NAG; a-F-NAG abs. I - soro a-F-NAG, absorvido com proteínas de tecido mamário normal.

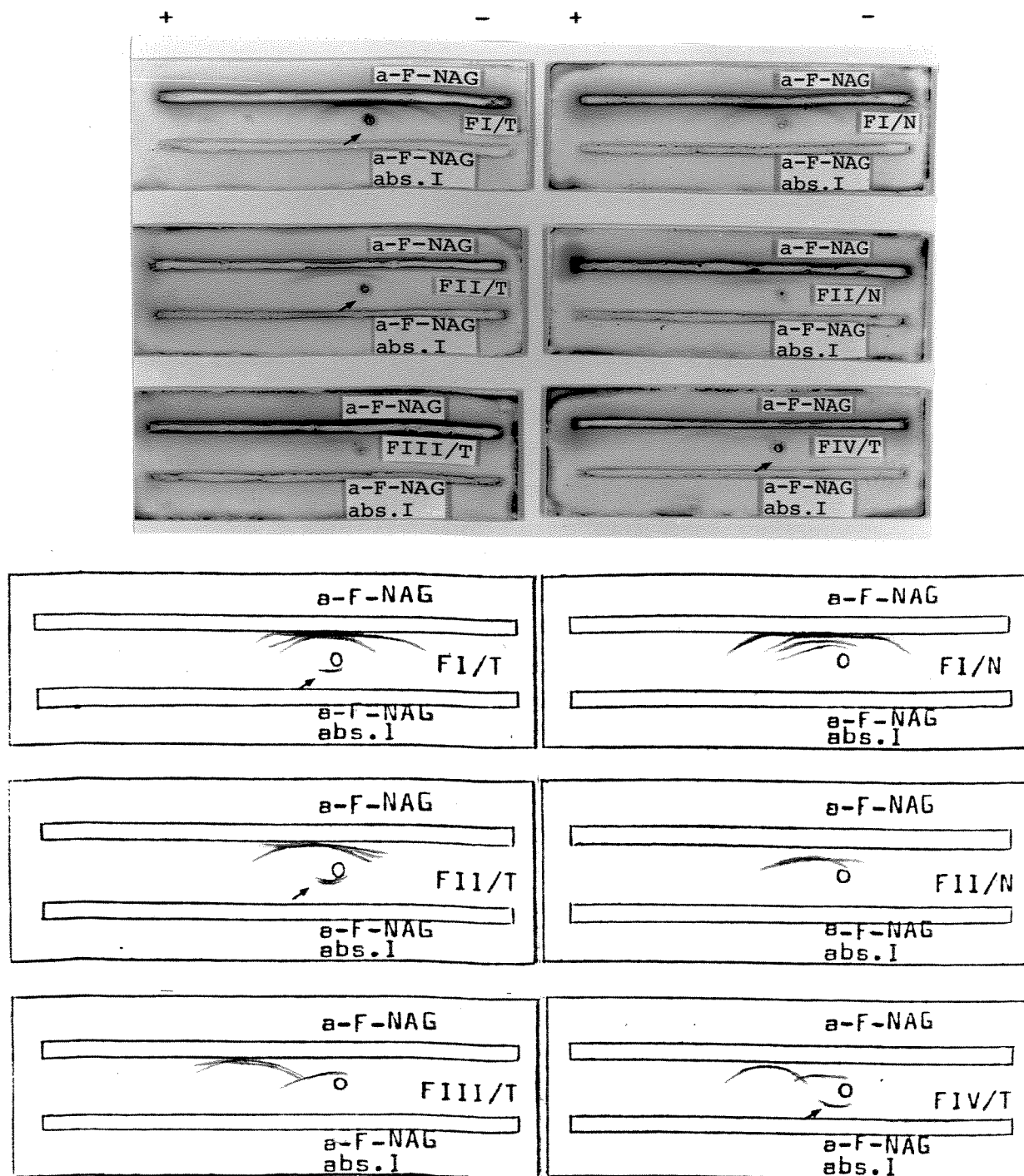


Figura XIII - Análise imunoeletroforética realizada nas mesmas condições descritas na figura XI. Canaletas: a-F-NAG: - soro de coelho anti-fração F-NAG; a-F-NAG abs. I - soro a-F-NAG, absorvido com proteínas de tecido mamário normal. Poços de aplicação: FI/T, FII/T, FIII/T, FIV/T, FI/N e FII/N.

Obs.: Esquema obtido a partir de observação das lâminas.

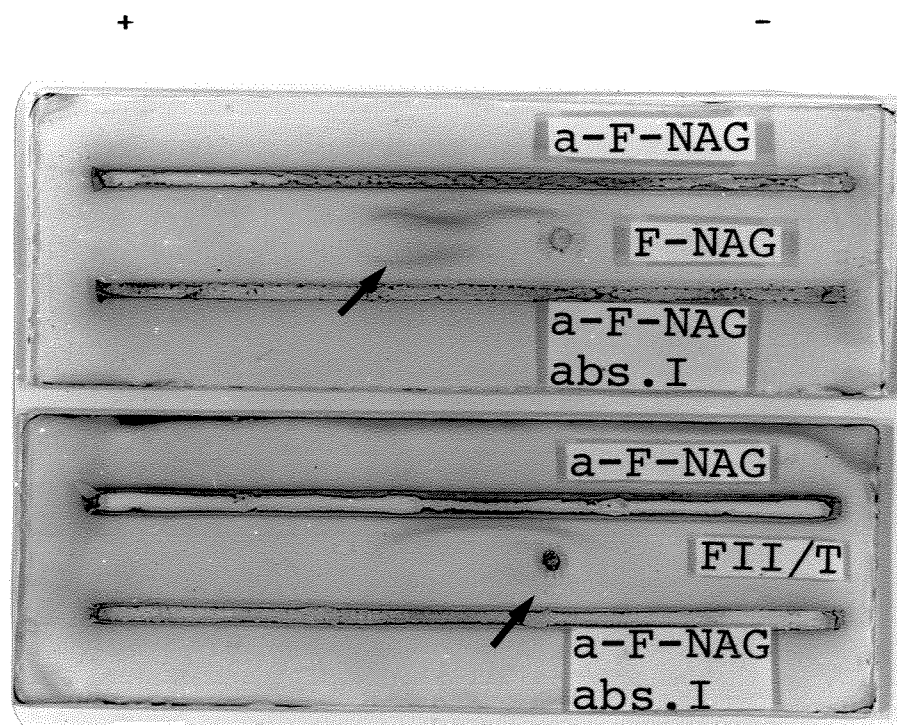


Figura XIV - Análise imunoeletroforética realizada nas mesmas condições descritas na figura XI. Canaletas: a-F-NAG - soro de coelho anti-fração F-NAG ; a-F-NAG abs. I- soro a-F-NAG, absorvido com proteínas de tecido mamário normal. Poços de aplicação: F-NAG e FII/T.

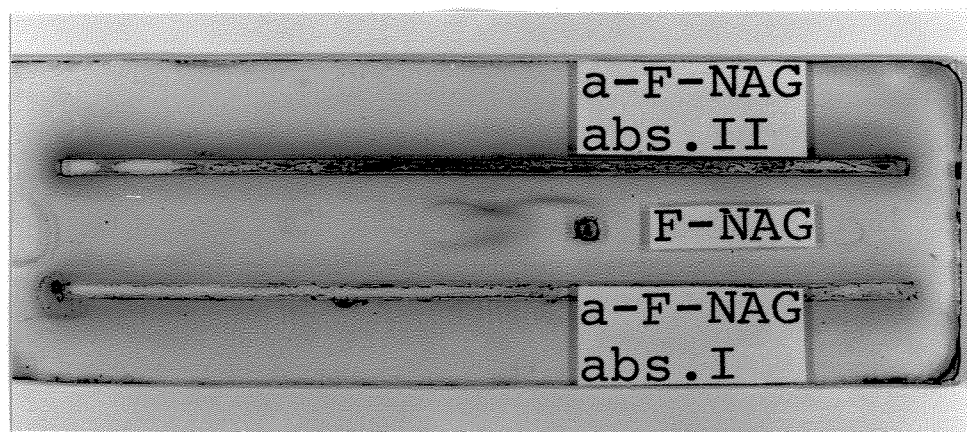


Figura XV - Análise imunoeletroforética realizada nas mesmas condições descritas na figura XI. Canaletas: a-F-NAG abs.I - soro a-F-NAG, absorvido com proteínas de tecido mamário normal; a-F-NAG abs.II-soro a-F-NAG, absorvido com linfócitos da paciente D.B.M. Poço de aplicação: F-NAG.

5.4. Ensaio Qualitativo de Ligação à Lectina WGA- 125 I.

A tabela II apresenta os resultados do ensaio realizado. Conforme se esperava a fração F-NAG demonstrou a presença de sítios de ligação para a lectina WGA - 125 I, servindo desta forma como um controle positivo junto às demais frações analisadas, que não demonstraram conter componentes com afinidade de ligação à lectina WGA.

Em vista da análise eletroforética em gel de poliacrilamida e da análise imuno eletroforética terem revelado que alguns dos eluatos cromatográficos de troca iônica, provenientes do tecido tumoral, compartilhavam alguns componentes com a fração F-NAG, esperava-se alguma ligação à WGA - 125 I. Entretanto, tal fenômeno não ocorreu, muito provavelmente devido à baixa concentração dos componentes potencialmente capazes de realizá-la.

Tabela II - Análise do potencial de ligação à lectina WGA-¹²⁵I.

REAGENTES	BSA + WGA- ¹²⁵ I **
IF-NAG (cpm)*	9.243 (± 145)
IFI/T (cpm)	0
FII/T (cpm)	0
FIII/T (cpm)	0
FIV/T (cpm)	0
FI/N (cpm)	0
FII/N (cpm)	0
PBS (cpm)	400 (±57)

F-NAG-fração resultante da cromatografia de afinidade

FI/T; FII/T; FIII/T; FIV/T; FI/N; FII/N - frações resultantes da cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose

* Ensaio realizado em triplicata; os resultados registrados em cpm correspondem à média de cada triplicata

** A lectina WGA foi diluída 1:10 em PBS contendo 0,2% de BSA

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O produto do extrato tumoral resultante da cromatografia em Bio-Gel A-50, F2/T, confirmando observações anteriores, quando da realização de análises prévias à presente investigação, exibe um padrão cromatográfico com características bem definidas, quando submetido à cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose, com eluição de três frações passíveis de distinção, na zona de gradiente contínuo (figura VI). O produto resultante do extrato de tecido mamário normal apresentou um perfil de dispersão mais homogêneo, permitindo a distinção de apenas uma fração na zona correspondente (figura VII).

Conforme se verifica na análise eletroforética em gel de poliacrilamida, muitas são as diferenças quantitativas e qualitativas encontradas entre as frações tumorais e normais, resultantes da cromatografia de troca iônica. Este processo cromatográfico permitiu uma distribuição diferenciada de bandas nas quatro frações tumorais, com eluição de componentes possivelmente associados ao tumor, principalmen-

te na fração FII/T, que exibe o maior número de bandas não detectadas nas frações resultantes de tecido mamário normal (figura VIII). Estes componentes encontram-se distribuídos predominantemente na zona de migração lenta, possuindo pesos moleculares acima de 150 kd (figura X).

Confrontando-se os resultados da cromatografia de troca iônica realizada no presente trabalho, com os resultados obtidos por KAMIYAMA et alii (1980), verifica-se que os mesmos não são comparáveis. As condições de trabalho estabelecidas pelos autores acima foram reproduzidas, exceto pela omissão da precipitação do produto resultante da coluna de Bio-Gel A-50, F2/T, com sulfato de amônio. Todavia, a ausência de tal procedimento não poderia ser responsável pela grande diferença observada entre o perfil cromatográfico demonstrado na literatura, representado pela eluição de picos de amplitudes crescentes na zona do gradiente, e o obtido neste trabalho.

Além disso, segundo os mesmos autores, o antígeno BTA, glicoproteína de migração lenta, que se cora pelo "Coomassie blue" e apresenta reação PAS positiva estava presente na fração IV da cromatografia de troca iônica, que eluiu na faixa de concentração de NaCl entre 0,20 e 0,35M. Embora neste trabalho a fração FIV/T tenha sido eluída em uma faixa de concentração de NaCl aproximada (figura VI), esta não demonstrou a presença de um componente exclusivo, sugestivo de corresponder ao antígeno BTA.

Conforme já mencionado, as diferenças aparentemente mais significativas, em relação ao padrão eletroforético, observadas entre tecido tumoral e normal encontram-se concentradas na fração FII/T, que eluiu na faixa estimada de concentração de NaCl, entre 0,11 e 0,16M, fato este não mencionado na literatura consultada.

Nas cromatografias de troca iônica (figuras VI e VII), levando-se em conta a zona cromatográfica de eluição, a julgar pela concentração estimada de NaCl no gradiente, poder-se-ia interpretar que a fração FII/N, que eluiu na faixa de concentração entre 0,11 e 0,20M, possivelmente corresponderia à somatória das frações FII/T e FIII/T, que eluíram, respectivamente, nas faixas estimadas entre 0,11 e 0,16M e 0,16 e 0,20M. Todavia, através da análise eletroforética em gel de poliacrilamida, verificou-se que a fração FII/N, muito embora compartilhe alguns componentes com as frações FII/T e FIV/T, estabelece maior grau de analogia com a fração FIII/T.

O perfil eletroforético menos heterogêneo exibido pela fração resultante da cromatografia de afinidade, fração F-NAG, parece não deixar dúvidas de que essa metodologia mostrou-se muito mais seletiva do que a anterior, apesar de sua análise ser mais limitada, em decorrência de sua concentração proteica encontrar-se abaixo das concentrações proteicas exibidas pelas demais frações em estudo. Entretanto, esta mesma fração, precipitada com etanol e concentrada dentro de limites comparativos, em termos qualitativos, re-

velou padrão eletroforético idêntico ao da fração F-NAG total (figura IX), mostrando que o tratamento com etanol não alterou qualitativamente o seu padrão eletroforético. Este fato não foi surpreendente, uma vez que quando da precipitação com etanol, a dosagem de proteínas do sobrenadante revelou-se praticamente nula.

Ao se comparar a fração F-NAG com as frações resultantes da cromatografia de troca iônica, observa-se que esta também concentra componentes com pesos moleculares acima de 150 kd. Embora ela seja uma fração constituída de várias bandas, é consideravelmente menos heterogênea que as demais frações. A fração F-NAG apresenta quatro bandas em comum com a fração FII/T, sendo que duas delas estão ausentes das frações resultantes de tecido mamário normal e as outras duas, apenas discretamente representadas na fração FII/N. Além disso, as duas bandas de altos pesos moleculares reveladas na fração F-NAG e compartilhadas pela fração FII/T, encontram-se em concentração muito mais baixa nesta última (figura VIII).

Até este ponto pode-se concluir que o fracionamento através de cromatografia de afinidade, que se baseia em princípios muito diferentes daqueles em que se apoiam as cromatografias de exclusão por peso molecular e troca iônica é capaz de separar componentes aparentemente compartilhados pela fração FII/T, resultante deste último processo.

Do ponto de vista metodológico, a cromatografia de afinidade em coluna de WGA, que seleciona componentes

do extrato pela ligação a resíduos glicídicos, permite definir analogias quanto à distribuição de bandas, na análise eletroforética em gel de poliacrilamida, frente ao espectro de componentes exibidos pelas frações resultantes da cromatografia de troca iônica.

Assim sendo, a cromatografia de afinidade, muito embora tenha fornecido um IR menor do que a cromatografia de troca iônica (tabela I), parece ser mais indicada, como processo mais seletivo de separação, resultando em um menor número de bandas eluídas, com exclusão simultânea de numerosos componentes comuns ao tecido mamário normal.

A combinação de métodos cromatográficos à eletroforese em gel de poliacrilamida foi muito eficaz na detecção de diferenças entre tecido mamário tumoral e normal, assim como, entre frações provenientes do mesmo tecido tumoral, porém resultantes de diferentes métodos de fracionamento.

As metodologias desta ordem, ainda que muito úteis como técnicas analíticas, quando existe o interesse em se conhecer a composição proteica de um determinado tipo de tumor, raramente têm sido empregadas com esta finalidade. No caso particular dos tumores mamários humanos, tanto quanto se sabe, não existem estudos desta natureza. Todavia, a importância desse tipo de análise continua inquestionável (NARAYAN et alii, 1986).

Se de um lado este tipo de análise não permite observação conclusiva quanto à identificação final do anti-

geno associado ao tumor, pode, entretanto, contribuir para discriminar o repertório proteico de um determinado tipo de tumor, que poderia ter seu padrão estabelecido, após avaliação de um certo número de amostras.

A análise por imunodifusão das diferentes frações, frente ao soro produzido contra a fração F-NAG, mostrou relação de identidade total entre alguns componentes presentes em todas as frações, sendo que a utilização deste soro, após absorção com proteínas de tecido mamário normal, permitiu a revelação de componentes sugestivos de associação ao tumor mamário, nas frações FI/T, FII/T, FIV/T e F-NAG.

Através da análise imunoeletroforética (figuras XI a XIV), verificou-se que os anticorpos anti-F-NAG reconhecem componentes com diferentes mobilidades eletroforéticas, nas diferentes frações. As frações FI/T e FI/N compartilham um componente com mobilidade $\beta_2 \gamma$, enquanto a fração FII/T apresenta um outro componente com mobilidade $\alpha_2 \beta_1$, que é reconhecido parcialmente nas frações F-NAG (figura XIV), FII/N, FIII/T e FIV/T, sendo que, nestas últimas três frações, o arco de precipitação é muito tênue (figuras XI e XIII). Ainda que debilmente, um outro componente é detectado nas frações FIII/T e FIV/T, na zona em que habitualmente se demonstra albumina e α_1 (figura XI).

O soro anti-F-NAG absorvido com proteínas de tecido mamário normal reconhece um único componente com mobilidade α_2 na fração resultante da cromatografia de afinidade, fração F-NAG, e um componente comum com mobilidade

β_2 , muito discretamente representado nas frações FI/T, FII/T e FIV/T (figuras XII e XIII).

A análise imunoeletroforética foi útil como um critério adicional de análise, por permitir a evidência de que os componentes detectados com o soro anti-F-NAG, absorvido com proteínas de tecido mamário normal, dentro dos limites da técnica utilizada, podem ser considerados como associados ao tumor mamário.

Não foi demonstrada ligação à lectina WGA-¹²⁵I em nenhuma das frações cromatográficas da coluna de troca iônica (tabela II). Apesar da concentração proteica da fração F-NAG encontrar-se abaixo das concentrações das demais frações sob análise, não houve impedimento para a análise comparativa, em virtude da fração F-NAG ter sido eluída de coluna de afinidade, cuja matriz era WGA, servindo, desta forma, como um controle positivo de ligação à lectina marcada.

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida demonstrou a presença de componentes compartilhados pelas frações resultantes dos dois diferentes processos de fracionamento. Pela análise antigênica destes componentes, demonstrou-se que o soro anti-F-NAG absorvido com proteínas de tecido mamário normal, tendo reagido mais intensamente, como era de se esperar, com a fração F-NAG, reconheceu, entretanto, determinantes antigênicos com mobilidades eletroforéticas distintas, sugestivos de associação ao tumor, nas frações resultantes de ambos os processos de fracionamento.

Todavia, o terceiro critério analítico, representado pela ligação seletiva à lectina WGA- ^{125}I não mostrou correspondência entre os componentes presentes na fração F-NAG e aqueles presentes nas demais frações. Uma justificativa aceitável para este fato, seria a possibilidade dos componentes compartilhados entre a fração F-NAG e as demais frações tumorais resultantes da coluna de troca iônica, encontrarem-se muito diluídos em meio ao grande repertório proteico destas últimas frações, não sendo detectáveis através deste ensaio qualitativo.

Sem dúvida alguma, a metodologia que utiliza cromatografia de afinidade através da lectina WGA, foi superior à combinação dos métodos convencionais, por permitir a recuperação de uma fração muito menos heterogênea. Desta forma, a partir de seus constituintes foram produzidos anticorpos policlonais, que após absorção com proteínas de tecido mamário normal, reconheceram um componente possivelmente associado ao carcinoma mamário, nesta mesma fração. A detecção de tal componente em uma fração desta natureza, ou seja, com afinidade pela lectina WGA, confirma a eficácia desta metodologia para a seleção de componentes com resíduos glicídicos, presentes na célula tumoral e possivelmente associados ao tumor.

Nos últimos anos vários autores têm confirmado que a transformação neoplásica encontra-se associada com alterações no tamanho e na estrutura das cadeias laterais dos oligossacárides das glicoproteínas de superfície da célula

tumoral (COLLARD et alii, 1985; DENNIS et alii, 1987; HAKOMORI, 1984; HUMPHRIES et alii, 1986; ROSS, 1984, SMETS & VAN BEEK, 1984), sendo que a mudança no tamanho dos oligosacárides tem sido atribuída a um aumento no conteúdo de resíduos de ácido siálico (COLLARD et alii, 1985; DENNIS, 1986; DENNIS et alii, 1984; DENNIS & LAFERTE, 1986; DENNIS et alii, 1987; LLOYD et alii, 1979).

Em seu trabalho de revisão sobre antígenos glicídicos associados a tumores, HAKOMORI (1984) observa que as mudanças na composição e estrutura dos carboidratos de membrana das células neoplásicas são mais quantitativas do que qualitativas, sendo que o conjunto dos resíduos glicídicos situados em um domínio específico do polipeptídeo, pode ser reconhecido através de métodos imunológicos, sendo desta forma identificado, como um antígeno associado ao tumor.

Dentro deste contexto, a presença de um conteúdo mais elevado de ácido siálico nas células tumorais (COLLARD et alii, 1985; DENNIS, 1986; DENNIS et alii, 1984; DENNIS & LAFERTE, 1986; DENNIS et alii, 1987; LLOYD et alii, 1979) poderia ser interpretada como representativa de estrutura antigênica associada ao tumor.

Desta forma, considerando-se que a lectina WGA possui capacidade de interagir com células de diferentes tumores (BURGER & GOLDBERG, 1967; CHANDRASEKARAN, 1979; GOLDSSTEIN & HAYES, 1978) via glicoproteínas de superfície celular e que sua interação é complexa, envolvendo resíduos de NAc-Glc e também resíduos de ácido siálico (BHAVANANDAN et alii,

1977; BHAVANANDAN & KATLIC, 1979; BURGER & GOLDBERG, 1967; DENNIS, 1986; IRIMURA & NICOLSON 1984; KRONIS & CARVER, 1982; WRIGHT, 1980 a e b), muitos dos componentes constituintes da célula tumoral, que demonstram afinidade por esta lectina, poderiam corresponder a estruturas antigênicas com alto conteúdo de ácido siálico.

Por outro lado, evidências experimentais têm demonstrado a existência de associação entre o conteúdo aumentado de ácido siálico na superfície das células tumorais e o processo de formação de metástase, pelo fato de linhagens tumorais celulares, com capacidade de colonizar outros órgãos, apresentarem elevação da quantidade destes resíduos nas suas glicoproteínas de superfície (IRIMURA & NICOLSON, 1984, LLOYD et alii, 1979).

Determinadas linhagens celulares de tumores murinos, expressando caráter altamente metastático, podem ser discriminadas de suas variantes não-metastáticas, através de seleção pela afinidade à lectina WGA. As linhagens cultivadas in vitro, são submetidas a concentrações tóxicas da lectina WGA, sendo que as células com o fenótipo WGA-sensível são altamente metastáticas, ao passo que as suas variantes WGA-resistentes, apresentam perda do potencial metastático, sendo que, ao readquirirem a sensibilidade à lectina, readquirem também seu potencial metastático (COLLARD et alii, 1985; DENNIS et alii, 1984; DENNIS & KERBEL, 1981; DENNIS & LAFERTE, 1986; HUMPHRIES et alii, 1986). A análise da estrutura das glicoproteínas de superfície, pre-

sentos nas diferentes linhagens celulares, demonstrou que a perda do potencial metastático pelas linhagens WGA-resistentes ocorre como consequência de alteração na porção glicídica das glicoproteínas, representada ou pela diminuição de resíduos de ácido siálico (DENNIS, 1986; DENNIS et alii, 1984; DENNIS & LAFERTE, 1986; KRONIS & CARVER, 1982), ou por mudanças qualitativas sutis no posicionamento destes resíduos, na superfície celular (FOGEL et alii, 1983), impedindo uma configuração mais adequada para interação com a lectina. Da mesma forma, em qualquer das duas situações, não haveria mais possibilidade de interação dessas moléculas com outras moléculas envolvidas nos mecanismos de espalhamento, migração e formação de metástase.

Considerando-se as informações acima e tendo-se em vista que sialoglicopeptídeos do tipo mucina, com afinidade pela WGA parecem ser produzidos por muitas linhagens celulares malignas (BHAVANANDAN et alii, 1977) e, inclusive células de carcinoma mamário humano (ABE & KUFE, 1987; BHAVANANDAN et alii, 1977; BRAMWELL et alii, 1983; BOLMER & DAVIDSON, 1981; CHANDRASEKARAN & DAVIDSON, 1979) poder-se-ia supor a possibilidade da fração F-NAG conter um componente com "sialilação" aumentada, positivamente associado ao processo de formação de metástase e, conseqüentemente, com o caráter maligno. A hipótese acima é cogitada, em virtude do componente aparentemente associado ao tumor, contido na fração F-NAG, provavelmente possuir afinidade pela lectina WGA.

Todavia, a confirmação desta hipótese depende de resultados futuros, envolvendo análises mais detalhadas do componente detectado, uma vez que, em vista das limitações do presente trabalho, não se pode assegurar ainda a sua associação restrita ao carcinoma mamário, exigindo-se a pesquisa de sua presença em um número mais significativo de amostras de tecidos mamários tumorais e normais.

A continuidade do presente trabalho exige obrigatoriamente o isolamento de tal componente. Tendo-se em vista que sua detecção foi realizada através do soro anti-F-NAG absorvido com proteínas de tecido mamário normal, a disponibilidade deste soro favorece o processo de isolamento, que poderia ser realizado através de cromatografia de afinidade, cuja matriz seria representada pelos anticorpos remanescentes no soro absorvido, acoplados à Sepharose.

Uma vez isolado, o componente poderia ser utilizado para imunização de animais para produção de anticorpos policlonais ou monoclonais. Posteriormente estes anticorpos poderiam ser empregados para a análise das amostras de tecidos mamários tumorais e normais.

Vários autores têm utilizado determinadas lectinas, e inclusive a lectina WGA, para fins diagnósticos, através de técnicas histoquímicas, com base nas suas propriedades altamente específicas de reconhecerem certas estruturas glicídicas presentes nas células tumorais (FRANKLIN, 1983; LEATHEM & BROOKS, 1987; LOUIS et alii., 1981; LOUIS et alii., 1983; WALKER, 1984).

Diante desta constatação e considerando-se o importante papel da lectina WGA no sentido de seleccionar linhagens celulares metastáticas de suas variantes não-metastáticas, o ensaio de ligação à WGA- ^{125}I realizado em suporte sólido, representado pela aderência de material proteico a tubos de poliestireno, poderia introduzir novas perspectivas para a investigação de glicoproteínas associadas ao tumor, surgindo, eventualmente, como metodologia alternativa para fins diagnósticos.

O presente trabalho, no contexto de seus objetivos, permitiu que se analisassem os produtos proteicos resultantes de dois diferentes métodos de fracionamento, sob diferentes fundamentos metodológicos.

A segunda contribuição, e talvez a mais importante, foi a detecção dos componentes aparentemente associados ao tumor nas frações resultantes dos dois métodos, devendo-se destacar aquele presente na fração F-NAG, pela demonstração de maior reatividade, maior concentração proteica e provável afinidade pela lectina WGA.

7. RESUMO

A partir de uma amostra de tecido mamário tumoral obteve-se dois fragmentos, denominados respectivamente fragmento 1 e fragmento 2, os quais foram submetidos independentemente a dois diferentes processos de fracionamento proteico, com o objetivo de se comparar seus produtos resultantes. O primeiro processo de fracionamento, que foi aplicado ao fragmento 1, constituiu-se de cromatografia de exclusão (Bio-Gel A-50), seguida de cromatografia de troca iônica (DEAE - celulose) e resultou na eluição de quatro frações, denominadas respectivamente: FI/T; FII/T; FIII/T e FIV/T. Uma amostra de tecido mamário normal também foi submetida a este processo, tendo como resultantes as frações: FI/N e FII/N. O fragmento 2 foi submetido ao segundo processo de fracionamento, representado pelo emprego de cromatografia de afinidade (WGA - Sepharose 6 MB), que permitiu a obtenção da fração única, denominada F - NAG. Para efeito de análise comparativa, as diferentes frações proteicas foram submetidas: 1) à análise eletroforética em gel de poliacrí-

lamida, na presença de SDS; 2) à análise imunoquímica, através de imunodifusão dupla e imunoeletroforese; 3) à análise do potencial de ligação à lectina WGA-¹²⁵I. A análise eletroforética demonstrou a presença de vários componentes na fração FII/T, não detectados nas frações resultantes de tecido mamário normal, FI/N e FII/N. Alguns desses componentes encontraram correspondência na fração F-NAG, resultante da cromatografia de afinidade. Através da análise por imunodifusão foi possível detectar a presença de componentes possivelmente associados ao tumor mamário, nas frações FI/T, FII/T, FIV/T e F-NAG. A análise imunoeletroforética destas frações permitiu esclarecer que o componente presente na fração F-NAG, com mobilidade $\alpha 2$ era distinto do componente aparentemente comum presente nas demais frações, cuja mobilidade era $\beta 2$. A análise do potencial de ligação à WGA-¹²⁵I revelou que somente a fração F-NAG continha componentes acessíveis à ligação com a lectina.

8. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ABE, M. & KUFEL, D.W. Identification of a Family of High Molecular Weight Tumor-Associated Glycoproteins. *J. Immunol.*, 132 : 257-61, 1987.

ALFORD, C.; HOLLINSHEAD, A. C. & HERBERMAN, R. Delayed Cutaneous Hypersensitivity Reactions to Extracts of Malignant and Normal Human Breast Cells. *Ann. Surg.*, 178: 20-4, 1973.

ASHALL, F.; BRAMWELL, M. E. & HARRIS, H. A New Marker for Human Cancer Cells. 1. The Ca Antigen and the Ca1 Antibody. *Lancet*, July 3 : 1-6, 1982.

ASHORN, P. & KROHN, K. Characterization and Partial Purification of Human Milk Fat Globule Membrane Antigens by Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Immunoblotting Using Monoclonal Antibodies. *Int. J. Cancer*, 35 : 179-84, 1985.

BHAVANANDAN, V. P.; UMEMOTO, J.; BANKS, J. R. & DAVIDSON, E. A. Isolation and Partial Characterization of Sialoglycopeptides Produced by a Murine Melanoma. *Biochemistry*, 16 (20) : 4427-37, 1977.

BHAVANANDAN, V. P. & KATLIC, A. W. The Interaction of Wheat Germ Agglutinin with Sialoglycoproteins. The Role of Sialic Acid. *J. Biol. Chem.*, 254 (10) : 4000-8, 1979.

BOLMER, S. D. & DAVIDSON, E. A. Preparation and Properties of a Glycoprotein Associated with Malignancy. *Biochemistry*, 20 (5):1047-54, 1981.

BOYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol.* 5(5) : 9-15, 1976.

BRAATZ, J. A.; McINTIRE, K. R.; PRINCLER, G. L.; KORTRIGHT, K. H. & HERBERMAN, R. B. Purification and Characterization of a Human Lung Tumor-Associated Antigen. *J. Natl. Cancer Inst.*, 61(4) : 1035-46, 1978.

BRAMWELL, M. E. & HARRIS, H. An Abnormal Membrane Glycoprotein Associated with Malignancy in a Wide Range

- of Different Tumours. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 201 : 87-106, 1978, a.
- BRAMWELL, M. E. & HARRIS, H. Some Further Information about the Abnormal Membrane Glycoprotein Associated with Malignancy. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 202 : 93-9, 1978, b.
- BRAMWELL, M. E.; BHAVANANDAN, V. P.; WISEMAN, G. & HARRIS, H. Structure and Function of the Ca Antigen. *Br. J. Cancer*, 48 : 177-83, 1983.
- BRODT, P. Tumor Immunology - Three Decades in Review. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37 : 447-76, 1983.
- BURGER, M. M. & GOLDBERG, A. R. Identification of a Tumor-Specific Determinant on Neoplastic Cell Surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 54 : 359-66, 1967.
- BURNET, F.M. Immunological Surveillance in Neoplasia. *Immunol. Rev.*, 2 : 3-25, 1971. In: BRODT, P. Tumor Immunology - Three Decades in Review. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37 : 447-76, 1983.
- CAREY, T. E.; TAKAHASHI, T.; RESNICK, L. A.; OETTGEN, H. F. & OLD, L. J. Cell Surface Antigens of Human Malignant Melanoma: I. Mixed Hemadsorption Assays for Humoral Immunity to Cultured Autologous Melanoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73 : 3278 - 82, 1976.

CERIANI, R. L.; SASAKI, M.; SUSSMAN, H.; WARA, W. M. & BLANK, E. W. Circulating Human Mammary Epithelial Antigens in Breast Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79 : 5420-4, 1982.

CERIANI, R. L.; PETERSON, J. A. & BLANK, E. W. Variability in Surface Antigen Expression of Human Breast Epithelial Cells Cultured from Normal Breast, Normal Tissue Peripheral to Breast Carcinomas, and Breast Carcinomas. *Cancer Res.*, 44 : 3033-9, 1984.

CHANDRASEKARAN, E. V. & DAVIDSON, E. A. Sialoglycoproteins of Human Mammary Cells: Partial Characterization of Sialoglycopeptides. *Biochemistry*, 18 (25) : 5615-20, 1979.

CHU, T. M.; HOLYOKE, E. D. & DOUGLASS, H. O. Isolation of a Glycoprotein Antigen from Ascites Fluid of Pancreatic Carcinoma. *Cancer Res.*, 37 : 1525-9, 1977.

COLLARD, J. G.; VAN BEEK, W. P.; JANSSEN, J. W. G. & SCHIJVEN, J. F. Transfection by Human Oncogenes: Concomitant Induction of Tumorigenicity and Tumor-Associated Membrane Alterations. *Int. J. Cancer*, 35 : 207-14, 1985.

COOPER, A. G.; CODINGTON, J. F. & BROWN, M. C. In Vivo Release of Glycoprotein I from the Ha Subline of TA3 Murine Tumor into Ascites Fluid and Serum. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71 (4) : 1224-8, 1974.

DE CARVALHO, S. Preparation of Antigens Specific of Human Breast Carcinoma by an Immunochromatographic Method. *Nature* (London), 203 : 1186-8, 1964.

DENNIS, J.; DONAGHUE, T.; FLORIAN, M. & KERBEL, R.S. Apparent Reversion of Stable in vitro Genetic Markers Detected in Tumour Cells from Spontaneous Metastases. *Nature*, 292 : 242-5, 1981.

DENNIS, J.W.; CARVER, J.P. & SCHACHTER, H. Asparagine-linked Oligosaccharides in Murine Tumor Cells: Comparison of a WGA-resistant (WGA^r) Nonmetastatic Mutant and a Related WGA-sensitive (WGA^s) Metastatic Line. *J. Cell Biol.*, 92 : 1034-44, 1984.

DENNIS, J.W. Different Metastatic Phenotypes in Two Genetic Classes of Wheat Germ Agglutinin-resistant Tumor Cell Mutants. *Cancer Res.*, 46 : 4594-600, 1986.

DENNIS, J.W. & LAFERTE, S. Co-Reversion of a Lectin-Resistant Mutation and Non-Metastatic Phenotype in Murine Tumor Cells. *Int. J. Cancer*, 38 : 445-50, 1986.

DENNIS, J.W.; LAFERTE, S.; WAGHORNE, C.; BREITMAN, M.L. & KERBEL, R.S. β 1-6 Branching of Asn-Linked Oligosaccharides Is Directly Associated with Metastasis. *Science*, 236 : 582-5, 1987.

EDWARDS, P. A. W. & BROOKS, I. M. Antigenic Subsets of Human Breast Epithelial Cells Distinguished by Monoclonal Antibodies. *J. Histochem. Cytochem.*, 32 (5) : 531-7, 1984.

EGAN, M. L. & HENSON, D. E. Monoclonal Antibodies and Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 68 (2) : 338-40, 1982.

EHRlich, P. The Collected Papers of Paul Ehrlich, 2 : 550. London : Pergamon, 1957. In : BRODT, P. Tumor Immunology - Three Decades in Review. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37 : 447-76, 1983.

FOGEL, M.; ALTEVOGT, P. & SCHIRRMACHER, V. Metastatic Potential Severely Altered by Changes in Tumor Cell Adhesiveness and Cell-Surface Sialylation. *J. Exp. Med.*, 157 : 371-6, 1983.

- FOLEY, E. J. Antigenic Properties of Methylcholanthrene-Induced Tumors in Mice of the Strain of Origin. *Cancer Res.*, 13 : 835-7, 1953. In : OLD, L. J. *Cancer Immunology : The Search for Specificity - G.H.A. Clowes Memorial Lecture. Cancer Res.*, 41 : 361-75, 1981.
- FRANKLIN, W. A. Tissue Binding of Lectins in Disorders of the Breast. *Cancer*, 51 : 295-300, 1983.
- GARVEY, J. S.; CREMER, N. E. & SUSSDORF, D. H. Dissociation from Insoluble Antigen Adsorbents (Affinity Chromatography). In: _____. *Methods in Immunology*. 3rd ed. Massachusetts, W. A. Benjamin, Inc., 1977. part 4, cap. 30, p. 245-55.
- GARVEY, J. S.; CREMER, N. E. & SUSSDORF, D. H. Gel Electrophoresis. In: _____. *Methods in Immunology*. 3rd ed. Massachusetts, W. A. Benjamin, Inc., 1977. part 5, cap. 37, p. 328-46.
- GINGRICH, R. D.; WOUTERS, M.; BRAMWELL, M. E. & HARRIS, H. Immunological Delineation in Normal and Malignant Cells of a Membrane Protein Involved in Glucose Transport. I. Preparation and Properties of the Antibody. *J. Cell Sci.*; 52 : 99-120, 1981.

GOLDSTEIN, I.J. & HAYES, C.E. The Lectins: Carbohydrate - Binding Proteins of Plants and Animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 35 : 127-340, 1978.

GROSS, L. Intradermal Immunization of C3H Mice Against a Sarcoma that Originated in an Animal of the Same Line. *Cancer Res.*, 3 : 326-33, 1943. In : OLD, L. J. Cancer Immunology: The Search for Specificity - G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.*, 41 : 361-75, 1981.

HAKOMORI, S. Tumor-Associated Carbohydrate Antigens. *Ann. Rev. Immunol.*, 2 : 103-26, 1984.

HAND, P. H.; NUTI, M.; COLCHER, D. & SCHLOM, J. Definition of Antigenic Heterogeneity and Modulation Among Human Mammary Carcinoma Cell Population Using Monoclonal Antibodies to Tumor-Associated Antigens. *Cancer Res.*, 43 : 728-35, 1983.

HELLE, M. & KROHN, K. Immunohistochemical Reactivity of Monoclonal Antibodies to Human Milk Fat Globule with Breast Carcinoma and with Other Normal and Neoplastic Tissues. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. A*, 94 : 43-51, 1986.

HEYDERMAN, E.; STEELE, K. & ORMEROD, M. G. A New Antigen on the Epithelial Membrane: Its Immunoperoxidase Localisation in Normal and Neoplastic Tissue. *J. Clin. Pathol.*, 32 : 35-9, 1979.

HOLLINSHEAD, A. C.; JAFFURS, W. T.; ALPERT, L. K.; HARRIS, J. E. & HERBERMAN, R. B. Isolation and Identification of Soluble Skin-Reactive Membrane Antigens of Malignant and Normal Human Breast Cells. *Cancer Res.*, 34 : 2961-8, 1974.

HOLTON, D. D.; LOVINS, R. E. & FUDENBERG, H. H. Isolation and Characterization of Tumor Specific Antibody and Antigen in Human Breast Cancer. *Exp. Proc.*, 38 : 1218, 1979.

HUMPHRIES, M.J.; MATSUMOTO, K.; WHITE, S.L. & OLDEN, K. Inhibition of Experimental Metastasis by Castanospermine in Mice : Blockage of two Distinct Stages of Tumor Colonization by Oligosaccharide Processing Inhibitors. *Cancer Res.*, 46 : 5215-22, 1986.

IMAM, A.; DRUSHELLA, M. M.; TAYLOR, C. R. & TÖKÉS, Z. A. Generation and Immunohistological Characterization of Human Monoclonal Antibodies to Mammary Carcinoma Cells. *Cancer Res.*, 45 : 263-71, 1985.

IRIMURA, T. & NICOLSON, G. L. Carbohydrate Chain Analysis by Lectin Binding to Electrophoretically Separated Glycoproteins from Murine B16 Melanoma Sublines of Various Metastatic Properties. *Cancer Res.*, 44 : 791-8, 1984.

KAMIYAMA, M.; HASHIM, G. A.; KYRIAKIDIS, G. & FITZPATRICK, H. F. A Tumor-Associated Antigen Isolated from Human Breast Adenocarcinoma. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 16 (2) : 151-65, 1980.

KAMIYAMA, M.; HASHIM, G. A.; FUDENBERG, H. H.; HOLTON, O. D. & LOVINS, R. E. Tumor-Associated Antigen from a Human Breast Tumor Cell Line. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 24 : 396-408, 1982.

KLEIN, G. Immune and Non-Immune Control of Neoplastic Development: Contrasting Effects of Host and Tumor Evolution. *Cancer*, 45 : 2486-99, 1980.

KRONIS, K. A. & CARVER, J. P. Specificity of Isolectins of Wheat Germ Agglutinin for Sialyloligosaccharides: A 360-MHz Proton Nuclear Magnetic Resonance Binding Study. *Biochemistry*, 21 : 3050-7, 1982.

KUFE, D. W.; NADLER, L.; SARGENT, L.; SHAPIRO, H.; HAND, P. H.; AUSTIN, F.; COLCHER, D. & SCHLOM, J. Biological Behaviour of Human Breast Carcinoma-Associated Antigens Ex-

- pressed During Cellular Proliferation. *Cancer_Res.*, 43 : 851-7, 1983.
- LEATHEM, A. J. & BROOKS, S. A. Predictive Value of Lectin Binding on Breast-Cancer Recurrence and Survival. *Lancet*, May 9 : 1054-6, 1987.
- LEWINSOHN, R. A Safe Homogenizing Procedure for the Study of Tissue Benzylamine Oxidase and Monoamine Oxidase. *J._Pharmacol._Meth.*, 6 : 121-7, 1981.
- LINSLEY, P.S.; OCHS, V.; LASKA, S.; HORN, D.; RING, D. B. & FRANKEL, A. E. Elevated Levels of a High Molecular Weight Antigen Detected by Antibody W1 in Sera from Breast Cancer Patients. *Cancer_Res.*, 46 : 5444-50, 1986.
- LLOYD, K. O.; TRAVASSOS, L. R.; TAKAHASHI, T. & OLD, L. J. Cell Surface Glycoproteins of Human Tumor Cell Lines: Unusual Characteristics of Malignant Melanoma. *J._Natl._Cancer_Inst.*, 63 (3) : 623-34, 1979.
- LOUIS, C. J.; WYLLIE, R. G.; CHOU, S. T. & SZTYNDA, T. Lectin-Binding Affinities of Human Epidermal Tumors and Related Conditions. *Am._J._Clin._Pathol.*, 75 : 642-7, 1981.

- LOUIS, C. J.; SZTYNDA, T.; CHENG, Z. & WYLLIE, R. G. Lectin-Binding Affinities of Human Breast Tumors. *Cancer*, 52 : 1244-50, 1983.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-75, 1951. In: GARVEY, J. S., CREMER, N. E. & SUSSDORF, D. H. Lowry (Folin-Ciocalteu) Method. In: _____. *Methods in Immunology*. 3rd ed. Massachusetts, W. A. Benjamin, Inc., 1977. part 1, cap 12, p. 87-9.
- MCGEE, J. O.; WOODS, J. C.; ASHALL, F.; BRAMWELL, M. E. & HARRIS, H. A New Marker for Human Cancer Cells. 2. Immunohistochemical Detection of the Ca Antigen in Human Tissues with the Ca1 Antibody. *Lancet*, July 3 : 7-10, 1982.
- MCGUCKIN, W. F. & MCKENZIE, B. F. An Improved Periodic Acid Fuchsin Sulfite Staining Method for Evaluation of Glycoproteins. *Clin. Chem.*, 4 (6) : 476-83, 1958.
- NAGATA, Y.; GOLDBERG, A. R. & BURGER, M. M. The Isolation and Purification of Wheat Germ and Other Agglutinins. *Methods Enzymol.*, 32 : 611-5, 1974.
- NARAYAN, R. K.; HEYDORN, W. E.; CREED, G. J. & JACOBOWITZ, D. M. Protein Patterns in Various Malignant Human Brain

Tumors by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Cancer Res.*, 46 : 4685-94, 1986.

NATALI, P. G.; GIACOMINI, P.; BIGOTTI, A.; IMAI, K.; NICOTRA, M.R.; NG, A.K. & FERRONE, S. Heterogeneity in the Expression of HLA and Tumor-Associated Antigens by Surgically Removed and Cultured Breast Carcinoma Cells. *Cancer Res.*, 43 : 660-8, 1983.

NORTH, S. M.; STECK, P. A. & NICOLSON, G. L. Monoclonal Antibodies against Cell-Surface Antigens of the Metastatic Rat 13762 NF Mammary Adenocarcinoma and Their Cross-Reactivity with Human Breast Carcinomas. *Cancer Res.*, 46 : 6393-9, 1986.

OLD, L. J. Cancer Immunology: The Search for Specificity - G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.*, 41 : 361-75, 1981.

OUCHTERLONY, O. Antigen-Antibody Reactions in Gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 26 : 507, 1949. In: GARVEY, J. S.; CREMER, N. E. & SUSSDORF, D. H. Ouchterlony Method. In: _____. *Methods in Immunology*. 3rd ed. Massachusetts, W. A. Benjamin, Inc., 1977. part 5, cap. 36, p. 313-21.

- PAPSIDERO, L. D.; NEMOTO, T.; CROGHAN, G. A. & CHU, T. M.
Expression of Ductal Carcinoma Antigen in Breast Cancer
Sera as Defined Using Monoclonal Antibody F36/22. *Cancer
Res.*, 44 : 4653-7, 1984.
- PETERSON, J. A.; CERIANI, R. L.; BLANK, E. W. & OSVALDO, L.
Comparison of Rates of Phenotypic Variability in Surface
Antigen Expression in Normal and Cancerous Human Breast
Epithelial Cells. *Cancer Res.*, 43 : 4291-6, 1983.
- PINTO, V. B.; GELDER, F. B. & MORRIS, D. M. Purification,
Partial Characterization, and Clinical Evaluation of an
Adenocarcinoma-associated Antigen. *Cancer Res.*, 46 :
6520-4, 1986.
- PREHN, R. T. & MAIN, J. M. Immunity to methylcholanthrene -
Induced Sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, 18 : 769-78,
1957. In : OLD, L. J. Cancer Immunology : The Search for
Specificity - G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer
Res.*, 41 : 361-75, 1981.
- PUKEL, C. S.; LLOYD, K. O.; TRAVASSOS, L. R.; DIPPOLD, W.
G.; OETTGEN, H. F. & OLD, L. J. GD3, A Prominent Gan-
glioside of Human Melanoma. Detection and Characteriza-
tion by Mouse Monoclonal Antibody. *J. Exp. Med.*, 155 :
1133-47, 1982.

- REAL, F.X.; MATTES, M. J.; HOUGHTON, A. N.; DETTGEN, H. F.; LLOYD, K. O. & OLD, L. J. Class 1 (Unique) Tumor Antigens of Human Melanoma. Identification of a 90,000 Dalton Cell Surface Glycoprotein by Autologous Antibody. *J. Exp. Med.*, 160 : 1219-33, 1984.
- RONAI, Z. & SULITZEANU, D. (Auto)antibodies in Human Breast Cancer Sera Against Antigens Associated with Breast Cancer Cells, Detected by Immunoblotting. *JNCI*, 72 (6) : 1203-9, 1984.
- ROSS, E. Cellular Adhesion, Invasion and Metastasis. *Biochim. Biophys. Acta*, 738 (2) : 263-84, 1984.
- SCHLOM, J.; GREINER, J.; HAND, P. H.; COLCHER, D.; INGHIRAMI, G.; WEEKS, M.; PESTKA, S.; FISHER, P. B.; NOGUCHI, P. & KUFER, D. Monoclonal Antibodies to Breast Cancer-Associated Antigens as Potential Reagents in the Management of Breast Cancer. *Cancer*, 54 : 2777-94, 1984.
- SEGREST, J. P. & JACKSON, R. L. Molecular Weight Determination of Glycoproteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulfate. *Methods Enzymol.*, 28 : 54-63, 1972.

- SHIKU, H.; TAKAHASHI, T.; OETTGEN, H. F. & OLD, L. J. Cell Surface Antigens of Human Malignant Melanoma. II. Serological Typing with Immune Adherence Assays and Definition of Two New Surface Antigens. *J. Exp. Med.*, 144 : 873-81, 1976.
- SHIKU, H.; TAKAHASHI, T.; RESNICK, L. A.; OETTGEN, H. F. & OLD, L. J. Cell Surface Antigens of Human Malignant Melanoma. III. Recognition of Autoantibodies with Unusual Characteristics. *J. Exp. Med.*, 145 : 784-9, 1977.
- SMETS, L. A. & VAN BEEK, W. P. Carbohydrates of the Tumor Cell Surface. *Biochim. Biophys. Acta*, 238 : 237-49, 1984.
- TAKÁCS, B. Electrophoresis of Proteins in Polyacrylamide Slab Gels. *Immunol. Methods*, 81-105, 1979.
- TAYLOR, G. & ODILI, J. L. Tumour Specific T-like Antigen of Human Breast Carcinoma. *Brit. J. Cancer*, 24 : 447-53, 1970.
- THOMAS, L. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitivity State, ed. H. S. Lawrence, pp 529-32. New York : Hoeber. In : BRODT, P. Tumor Immunology-Three Decades in Review. *Ann. Rev. Microbiol.* 32 : 447-76, 1983.

- THOR, A.; WEEKS, M. D. & SCHLOM, J. Monoclonal Antibodies and Breast Cancer. *Semin. Oncol.*, 13(4) : 393-401, 1986.
- VELTRI, R. W.; MENGOLI, H. F.; MAXIM, P. E.; WESTFALL, S.; GOPO, J. M.; HUANG, C. W. & SPRINKLE, P. M. Isolation and Identification of Human Lung Tumor-Associated Antigens. *Cancer Res.*, 37 : 1313-22, 1977.
- WALKER, R. A. The Binding of Peroxidase-Labeled Lectins to Human Breast Epithelium. II - The Reactivity of Breast Carcinomas to Wheat Germ Agglutinin. *J. Pathol.*, 144 : 101-108, 1984.
- WATANABE, T.; PUKEL, C. S.; TAKEYAMA, H.; LLOYD, K. D.; SHIKU, H.; LI, L. T. C.; TRAVASSOS, L. R.; OETTGEN, H. F. & OLD, L. J. Human Melanoma Antigen AH Is an Autoantigenic Ganglioside Related to GD2. *J. Exp. Med.*, 156 : 1884-9, 1982.
- WRIGHT, C. S. Location of the N-acetyl-D-neuraminic Acid Binding Site in Wheat Germ Agglutinin. *J. Mol. Biol.*, 132 : 53-60, 1980,a.
- WRIGHT, C. S. Crystallographic Elucidation of the Saccharide Binding Mode in Wheat Germ Agglutinin and its Biological Significance. *J. Mol. Biol.*, 141 : 267-91, 1980,b.

YU, G. S. M.; KADISH, A. S.; JOHNSON, A. B. & MARCUS, D. M.
Breast Carcinoma-Associated Antigen. An Immunocytochemical Study. *Am. J. Clin. Pathol.*, 74 : 453-7, 1980.

ZACHARIUS, R. M.; ZELL, T. E.; MORRISON, J. H. & WOODLOCK, J. J.
Glycoprotein Staining Following Electrophoresis on Acrylamide Gels. *Anal. Biochem.*, 30 : 148-52, 1969.