



## Artigo Original

### AVALIAÇÃO DE LECTINAS CONJUGADAS A CRIPTATOS DE EURÓPIO (III) EM TECIDOS MAMÁRIOS HUMANOS EMPREGADAS EM HISTOQUÍMICA

### EVALUATION OF LECTINS CONJUGATED TO CRYPTATES OF EUROPIUM (III) IN HUMAN BREAST TISSUES IN HISTOCHEMISTRY

#### Resumo

Ana Rosa Galdino Bandeira<sup>1</sup>,  
Juliana Mendes Brandão<sup>1</sup>,  
Juliana Lúcia de Albuquerque,  
Vasconcelos<sup>1</sup>,  
Carmelita de Lima Bezerra  
Cavalcanti<sup>1</sup>,  
Severino Alves Júnior<sup>1</sup>,  
Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão<sup>1</sup>

Lectinas são (glico)proteínas que reconhecem açúcares de modo específico e reversível. Essas moléculas têm sido utilizadas como sondas auxiliares no diagnóstico de diversas doenças, inclusive neoplasias, conjugadas a diferentes marcadores, dentre eles, os criptatos de lantanídeos. Na histoquímica tradicional utilizam-se corantes para visualização da morfologia dos tecidos, porém esse método é subjetivo. Neste artigo foi proposta uma otimização da técnica histoquímica com lectinas utilizando as lectinas (Con A, UEA-I, PNA e WGA) conjugadas ao criptato de európio (III) como sondas histoquímicas luminescentes auxiliares. Foram utilizadas biópsias de fibroadenoma, um tumor benigno muito incidente em mulheres jovens. Os resultados obtidos indicaram que a glicerina pode ser utilizada como material de fixação para lamínulas sem interferir na emissão do íon európio (III), além disso, apresentou melhor preservação do tecido em análise. Dentre os quatro conjugados utilizados, apenas os conjugados Con A-criptato de  $\text{Eu}^{3+}$  e UEA-I-criptato de  $\text{Eu}^{3+}$  apresentaram marcação nos tecidos com fibroadenoma sem corantes, sugerindo que isso ocorra devido à expressão de carboidratos presentes nos tecidos usados para o experimento..

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco  
Recife – PE – Brasil

E-mail  
arosagb@yahoo.com.br

**Palavras-chave:** lectinas, európio, hematoxilina, eosina, fibroadenoma.

#### Abstract

Lectins are glycoproteins that bind sugars specifically and reversibly. These molecules have been used as probes to aid in the diagnosis of several diseases, including neoplasia. They are usually combined with different substances with luminescent properties, among them the lanthanide cryptates. In traditional histochemical stains are used to visualize the morphology of tissues, but this method is subjective. This paper proposed an optimization technique lectin histochemistry using lectins (Con A, UEA-I, PNA and WGA) conjugated with europium (III) cryptate in order obtain luminescent histochemical probes to allow the pathologist assistants safer diagnosis of pathologies. Histochemistry was used in biopsies of fibroadenoma, a benign tumor very incident in young women. The results indicate that glycerine can be used as material of attachment to coverslips without interfering with the emission of

Eu<sup>3+</sup> ions, furthermore showed better preservation of tissue analyzed. The conjugates Con A-Eu<sup>3+</sup> cryptate and UEA-I-Eu<sup>3+</sup> cryptate recognized glucose/mannose and L-fucose residues in fibroadenoma suggesting that this is due to the carbohydrates expression in tissues used for the experiment.

**Key words:** lectins, europium, hematoxylin, eosin, fibroadenoma.

## Introdução

Lectina denomina um grupo de (glico)proteínas com habilidade de se ligar reversível e especificamente a estruturas mono ou oligossacarídicas, encontrada em diferentes plantas, invertebrados e animais<sup>1</sup>. As lectinas podem ser empregadas como instrumento de estudos de glicoconjugados na superfície celular onde os carboidratos tem papel importante durante o crescimento e a diferenciação celular, interação entre células e com o meio ao redor, além de processos patológicos.<sup>2</sup>

Estudos demonstram que carboidratos da superfície celular podem funcionar como carreadores de informação biológica<sup>3</sup>, uma vez que o padrão de glicosilação de proteínas celulares é influenciado por várias alterações fisiológicas ou vice-versa. Um exemplo dessas evidências é a glicosilação anormal detectada no diagnóstico do câncer.<sup>4</sup> Devido ao fato da interação lectina-carboidrato ocorrer no citoplasma e/ou na superfície das células, ou mesmo em fluidos fisiológicos<sup>2</sup>, o uso de lectinas para identificação de modificações nos padrões de expressão de carboidratos de glicoproteínas de superfície celular pode contribuir no diagnóstico e prognóstico de processos neoplásicos.<sup>5</sup> Um grande número de lectinas tem sido empregado como ferramenta histoquímica no diagnóstico histopatológico em tecidos humanos da cavidade oral<sup>6</sup>, do cérebro<sup>7</sup>, da mama<sup>8,9,10,11</sup>, de próstata<sup>12</sup>, dentre outros.

Essas lectinas na maioria das vezes são utilizadas conjugadas a moléculas com propriedades enzimáticas, luminescentes ou quimioluminescentes como, por exemplo, peroxidase, isotiocianato de fluoresceína, ésteres de acridinas, entre outros<sup>6,10,12,13</sup>.

Os criptatos de lantanídeos são complexos que apresentam elevada estabilidade cinética e termodinâmica além de luminescência em meio aquoso. A luminescência dos íons lantanídeos decorre de transições 4f-4f que são proibidas pela regra de Laporte, porém relaxada em complexos sem centro de inversão<sup>14</sup>.

Devido a essas propriedades, complexos com íons lantanídeos vêm sendo utilizados como sondas espectroscópicas no estudo de biomoléculas e de suas funções<sup>14</sup>. Recentemente nosso grupo de pesquisa vem utilizado como marcadores luminescentes criptato de európio (III) (criptato de Eu<sup>3+</sup>) conjugados a lectinas para aplicação em ensaios histoquímicos<sup>13</sup>.

A técnica de histoquímica convencional utiliza como ferramenta de avaliação a morfologia das células e dos tecidos, auxiliada por corantes. Os corantes mais utilizados nos procedimentos histológicos são a hematoxilina e a

eosina (HE)<sup>15</sup>. No entanto, diagnósticos morfológicos são subjetivos, uma vez que aspectos morfológicos de um tumor podem mascarar o seu verdadeiro comportamento biológico<sup>16</sup>.

Doenças benignas da mama representam um grupo heterogêneo de lesões que incluem desenvolvimento anormal, lesões inflamatórias, proliferação epitelial e neoplasma, sendo o fibroadenoma a lesão mais comum da mama<sup>17</sup>.

Este trabalho objetivou otimizar o protocolo de histoquímica com lectinas, já descrito por Beltrão e colaboradores (2001), para utilização de um novo marcador, o criptato de  $\text{Eu}^{3+}$ , conjugado a diferentes lectinas, a fim de fornecer uma nova ferramenta auxiliar no diagnóstico de patologias.

## Materiais e Métodos

**Materiais.** As lectinas *Canavalia ensiformis* (Con A), *Ulex europaeus I* agglutinin (UEA-I), *Triticum vulgare* agglutinin (WGA) e *Arachis hypogea* agglutinin (PNA), específicas para D-glicose/D-manose, L-fucose, N-acetil-glicosamina (GlcNAc) e D-galactose/N-acetil-galactosamina (GalNAc)<sup>18,19</sup>, respectivamente, foram adquiridas comercialmente (Sigma, USA). Os criptatos de  $\text{Eu}^{3+}$  foram sintetizados no Laboratório de Terras Raras (BSTR) do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Biópsias (n=15) de fibroadenoma, fixadas em formalina e embebidas em parafina, foram obtidas do Setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas – UFPE.

**Conjugação lectinas-criptatos.** A conjugação das lectinas com os criptatos de  $\text{Eu}^{3+}$  foi realizada utilizando-se os grupamentos carboxílicos dos resíduos de aminoácidos disponíveis na estrutura das lectinas e o grupamento etilenodiamina disponível na estrutura dos criptatos de  $\text{Eu}^{3+}$ . Cada solução de lectina (200µg/mL) foi incubada com uma solução de criptato de  $\text{Eu}^{3+}$  (0,13 – 0,88mg) em tampão fosfato de sódio 10mM (PBS), contendo 0,15M de NaCl, pH 7,2, por 2h a 25°C. Posteriormente a solução de conjugados foi submetida à diálise por 16h, sob agitação, a 4°C.

**Atividade Hemaglutinante (AH).** A atividade biológica das lectinas (reconhecimento a carboidratos) foi analisada com ensaios de hemaglutinação em placas de microtitulação. Em cada poço da placa foi adicionado 50µL da solução de NaCl 0,15 M. A partir do segundo poço foi adicionado 50µL da amostra (lectina e/ou lectinas conjugadas ao criptato) realizando uma diluição seriada. Por fim, foi adicionado 50µL de eritrócitos de coelho e/ou eritrócitos humanos glutarizados em todos os poços da placa. Após 45 minutos a 25°C foi realizada a determinação do título da AH<sup>20</sup>.

**Histoquímica com Lectinas (HqL) e com Hematoxilina e Eosina (H.E.)**

Cortes de 4µm de fibroadenoma foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100-70%), sendo tratados com uma solução de tripsina 0,1% (p/v) a 37°C por 2 minutos e depois incubados com os conjugados lectinas-criptatos (Con A, UEA-I, PNA e WGA -200 µg/mL) por 2 horas a 4°C. Todas as soluções foram preparadas em PBS e após cada etapa do protocolo os cortes foram lavados por imersão em PBS (2 x 5 minutos cada). PBS e glicerina foram avaliados como material para preservação dos

tecidos e influência na visualização do tecido após a HqL. As mesmas amostras de tecidos utilizadas na HqL foram utilizadas para H.E.

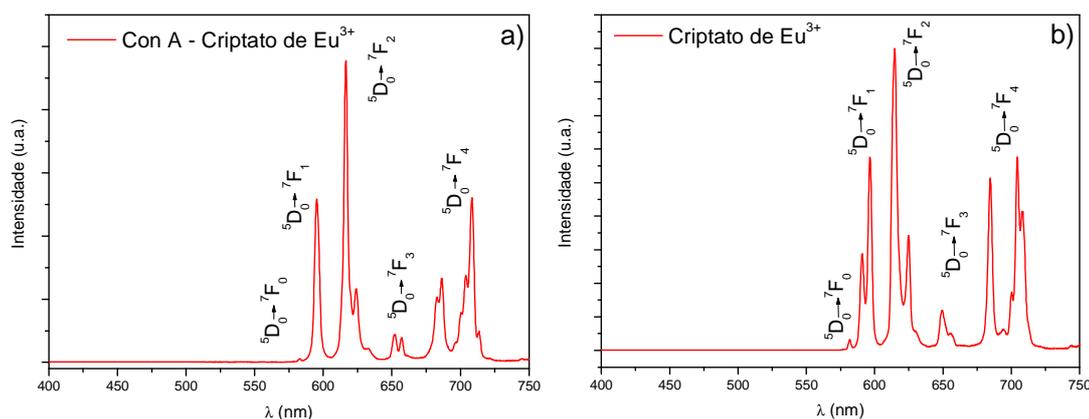
*Análise Espectroscópica.* As análises de marcação dos tecidos foram realizadas num protótipo fluorimétrico desenvolvido no Laboratório de Laser e Aplicações, no Instituto de Física da Universidade de São Paulo em São Carlos-SP, composto por uma fonte de excitação e um sistema de filtros ópticos capazes de selecionar a energia requerida para a excitação. O sistema de detecção é composto por uma fotomultiplicadora acoplada a um sistema de contagem de fótons e outro sistema de filtros intercambiáveis, cuja seleção depende do íon lantanídeo utilizado na conjugação a lectina.

## Resultados e Discussão

A atividade hemaglutinante para todos os conjugados foi mantida indicando que o método de conjugação não impediu a capacidade de reconhecimento de carboidratos específicos pelas lectinas utilizadas. O aparecimento das linhas espectrais características do íon európio (III) em todos os conjugados avaliados indica a possível conjugação das lectinas ao criptato de  $\text{Eu}^{3+}$ .

Os espectros de emissão dos conjugados lectinas-criptato de  $\text{Eu}^{3+}$  quando comparados com o criptato  $\text{Eu}^{3+}$  não conjugado, conforme Figura 1, corroboram para a não interferência do material fixador das lamínulas com PBS e ou glicerina. Vale salientar que os tecidos mantem-se preservado de forma satisfatória quando a glicerina é o material de escolha.

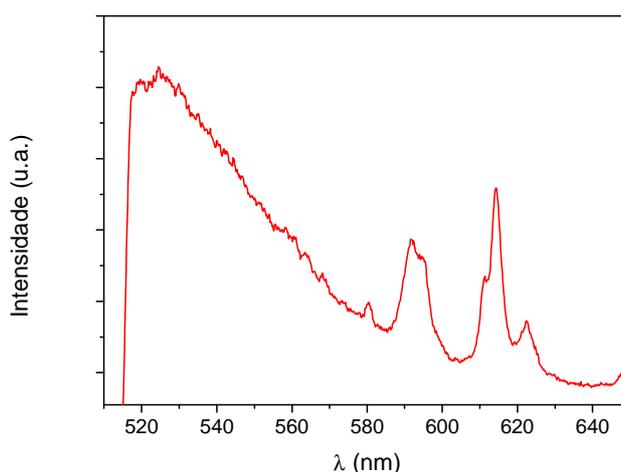
**Figura 1** - a) Espectro de emissão do conjugado Con A-criptato de  $\text{Eu}^{3+}$ . b) Espectro de emissão do criptato de  $\text{Eu}^{3+}$  não conjugado.



Em todos os tecidos marcados com os conjugados lectina-criptato avaliados e corados com hematoxilina e eosina (H.E.), a emissão do íon európio (III) não foi observada. Além disso, observou-se uma banda em aproximadamente 547 nm, sugerindo a emissão dos corantes H.E, uma vez que a fluoresceína faz parte da sua composição<sup>21</sup>. O isotiocianato de fluoresceína (FITC), um dos primeiros reveladores fluorescentes utilizados,

apresenta emissão de fluorescência verde quando excitado por comprimento de onda na região de 490 nm<sup>22</sup>. O íon  $\text{Eu}^{3+}$  também apresenta sua luminescência na região do visível, vermelho, quando excitado no comprimento de onda na região de 320 nm, sendo considerado um emissor forte<sup>23</sup>.

Na análise dos tecidos sem H.E., marcados com os conjugados Con A-criptato de  $\text{Eu}^{3+}$  e UEA-I-criptato de  $\text{Eu}^{3+}$ , conforme Figura 2 e Figura 3, respectivamente, observou-se a emissão na região entre 580 nm e 640 nm. Essa faixa espectral foi utilizada devido à limitação do nosso protótipo o qual visa auxiliar de forma rápida o patologista em seu diagnóstico. Nestes espectros evidenciamos a presença das transições  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_j$  ( $J = 0,1,2,3,4$ ) do íon  $\text{Eu}^{3+}$  encapsulado no criptato, com o máximo de emissão em 612 nm, referente a transição hipersensível,  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ . Na figura 2 a banda larga em 528 nm é referente à emissão do ligante, enquanto na figura 3 a baixa intensidade nesta região pode está relacionada a pouca concentração de criptato de  $\text{Eu}^{3+}$ , uma vez que a quantidade do ligante varia de acordo com a lectina utilizada na conjugação. Entretanto, quando analisamos os tecidos marcados com os conjugados PNA-criptato de  $\text{Eu}^{3+}$  e WGA-criptato de  $\text{Eu}^{3+}$  observa-se uma supressão de luminescência, o que pode ter ocorrido devido a não marcação do tecido.

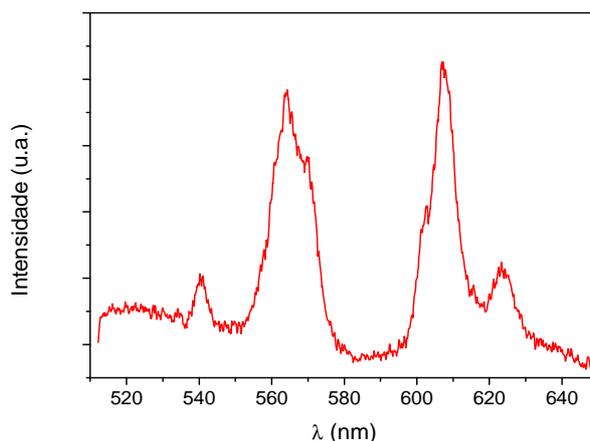


**Figura 2** - Emissão do conjugado Con A-criptato de  $\text{Eu}^{3+}$  em tecidos de fibroadenoma sem coloração H.E.

No caso dos tecidos sem H.E., Con A-criptato de  $\text{Eu}^{3+}$  o processo de glicosilação leva a arranjos de oligossacarídeos ligados a glicoproteínas ou glicolipídeos o qual tem importância em funções fisiológicas e sua alteração leva a processos patológicos<sup>24</sup>. Os resultados mostraram que tecidos mamários diagnosticados com fibroadenoma apresentaram uma maior expressão dos glicosídeos manose, glicose e fucose e uma ausente e/ou não acessível expressão de galactose e GlcNAc.

Neste processo de glicosilação glicanos *N*-ligados são importantes por serem utilizados em âncoras para a síntese seqüencial de estruturas precursoras as quais, quando na forma finalizada, são transferidas para uma proteína na face externa das membranas celulares. O processo de glicosilação

tem a participação de uma família de enzimas, denominadas glicosiltransferases, responsáveis pela construção da estrutura sacarídica de glicoconjugados<sup>25</sup>. Potapenko e colaboradores (2010) indicaram que níveis elevados de transcrição encontrados nesses genes (perfil genotípico) em carcinoma de mama, quando comparados ao tecido normal, resultam no surgimento ou exacerbação desses açúcares (perfil fenotípico) na superfície de células neoplásicas<sup>25</sup>. Nossos resultados indicam que no fibroadenoma, para glicose, manose e L-fucose, seu perfil fenotípico sacarídico, em glicoconjugados de superfície celular, estão modificados.



**Figura 3** - Emissão do conjugado UEA-I-criptato de Eu<sup>3+</sup> em tecidos de fibroadenoma sem coloração H.E.

De acordo com Yuan e colaboradores (2008), a  $\alpha$ -L-fucose, um componente monossacarídico de glicosilação, tem sido encontrada com expressão aumentada durante a tumorigênese e a progressão de neoplasias, tais como em carcinoma ovariano, carcinoma de tireóide, adenocarcinoma coloretal, dentre outros. Também foi observado um aumento de  $\alpha$ -L-fucose em glicoproteínas do soro de pacientes com câncer de mama<sup>24</sup>. Algumas moléculas de adesão da superfície celular contendo  $\alpha$ -L-fucose apresentam sua expressão elevada em células cancerígenas. CD44, uma família de moléculas deste tipo, pode sofrer diversas modificações pós-translacionais como adição de glicosaminoglicanos e glicosilação, o que resulta em células tumorais ricas em  $\alpha$ -L-fucose nas suas superfícies. Outra molécula rica em  $\alpha$ -L-fucose é CD15, a qual desempenha papel importante na adesão da célula tumoral ao endotélio vascular e apresenta um aumento na sua expressão em células cancerígenas da mama<sup>24</sup>. Portanto, várias alterações ocorrem em células transformadas e algumas dessas favorecem o aumento ou o surgimento de carboidratos, como  $\alpha$ -L-fucose, em tumores de mama. Nosso estudo indica que variações no conteúdo e/ou disponibilidade/acessibilidade de L-fucose são observadas no fibroadenoma, uma transformação benigna da mama. Desta forma corroborando com a elevada luminescência dos tecidos sem H.E. marcados com UEA-I-criptato de Eu<sup>3+</sup>.

O ácido siálico tem papel fundamental na finalização da síntese de glicanos por bloquear a adição de outros açúcares. Sabe-se que tecidos de câncer de mama contêm mais ácido siálico e maior atividade da sialiltransferases quando comparados com tecidos normais<sup>26</sup>. Na histoquímica com lectinas uma forma de acessar os carboidratos truncados pela sialização é a utilização da enzima neuraminidase, que remove os ácidos neuramínicos (ou siálicos). Estudo utilizando a enzima neuraminidase mostrou que a lectina PNA reconheceu resíduos de GalNAc somente após o tratamento com esta enzima<sup>27</sup>.

A supressão da luminescência nos tecidos sem H.E., marcados com os conjugados PNA-criptato de  $\text{Eu}^{3+}$  e WGA-criptato  $\text{Eu}^{3+}$  sugere que este carboidrato tem uma baixa expressão ou acessibilidade quando na metodologia utilizada o tratamento enzimático é feito com tripsina<sup>28,29</sup>. Resultados diferentes podem ser observados se a enzima for neuroaminidase. Estudos no nosso grupo estão sendo realizados com este intuito.

Nossos resultados indicam que a marcação do tecido com o conjugado Con A-criptato de  $\text{Eu}^{3+}$  e UEA-I-criptato de  $\text{Eu}^{3+}$  ocorra com maior intensidade que os tecidos marcados com os conjugados PNA-criptato de  $\text{Eu}^{3+}$  e WGA-criptato de  $\text{Eu}^{3+}$ . Este fato pode auxiliar no diagnóstico precoce uma vez que modificações no padrão de glicosilação de glicoproteínas da superfície antecedem alterações na morfologia da célula, utilizada como parâmetro para o diagnóstico.

Os complexos de lantanídeos do tipo criptatos de európio (III), vem sendo empregados em fluoroimunoensaios, como marcadores luminescentes de ensaios homogêneos, método TRACE<sup>®</sup>, ligados a ácidos nucléicos<sup>30</sup>. Na histoquímica é comum encontrarmos marcadores de lectinas conjugadas a FITC. Neste trabalho propomos a utilização de um novo marcador luminescente, onde teremos um criptato de  $\text{Eu}^{3+}$  conjugado a diferentes lectinas. Esse tipo de marcação tem a vantagem de ser quantitativa, visto que a emissão do  $\text{Eu}^{3+}$  pode ser medida e comparada entre os vários diagnósticos, o que pode desta forma, ser utilizada como uma ferramenta auxiliar ao médico patologista no diagnóstico de patologias mamárias.

## Conclusões

Os resultados iniciais mostraram que o uso da histoquímica com lectinas conjugadas a criptato de európio (III) pode ser utilizado como método auxiliar no diagnóstico de patologias.

## Referências

1. Iskratsch T, Braun A, Paschinger K, Wilson IBH. Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. *Anal Biochem*. 2009; 386(2): 133-46.
2. Sharon N. Lectins: carbohydrates-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol Chem*. 2007; 282(5): 2753-64.

3. Guimarães MT, Melo-Júnior MR, Costa Silva RB, Cavalcante CBL, Beltrão EIC. Estudo comparativo da expressão de carboidratos no sistema ovo-granuloma hepático na esquistossomose humana e experimental. *Rev I Adolfo Lutz*. 2008; 67(1): 59-63.
4. Ambrosi M, Cameron NR, Davis BG. Lectins: Tools for molecular understanding of the glycode. *Org Biomol Chem*. 2005; 3(9): 1593-698.
5. Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 2004; 14(11): 53-62.
6. Sobral APV, Rêgo MJB, Cavalcanti CLB, Carvalho Júnior LB, Beltrão EIC. ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. *J Oral Science*. 2010; 52(1): 49-54.
7. Beltrão EIC, Medeiros PL, Figueredo-Silva J, Valença MM, Coelho LCBB, Carvalho Júnior LB. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. *Eur J Histochem*. 2003; 47(2): 139-42.
8. Beltrão EIC, Correia MTS, Figueredo-Silva J, Coelho LCBB. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Appl Biochem Biotech*. 1998; 74(3): 125-34.
9. Beltrão EIC, Cabral TA, Figueredo-Silva J, Coelho LCBB, Carvalho Júnior LB. Infiltrating ductal mammary carcinoma: a lectin histochemistry study. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*. 2001; 46(1): p. 32-5.
10. Campos LM, Cavalcanti CLB, Lima-Filho JL, Carvalho LB, Beltrão EIC. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers*. 2006; 11(5): 480-4.
11. Santos BS, Farias PMA, Menezes FD, Ferreira RC, Júnior AS, Figueiredo RCBQ, et al. CdS-Cd(OH)<sub>2</sub> core shell quantum dots functionalized with concanavalin A lectin for recognition of mammary tumor. *Phys Status Solidi C*. 2006; 3(11): 4017-22.
12. Lima ALR, Cavalcanti CCB, Silva MCC, Paiva PVG, Coelho LCBB, Beltrão EIC, et al. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. *J Biomed Biotechnol*. 2010; Article ID 179817: 6 pages.
13. Vila Nova SP, Pereira GA, Sá GF, Júnior AS, Bazin H, Autiero H, et al. Síntese, caracterização e propriedades espectroscópicas de criptatos de lantanídeos do tipo [Ln c (bipy)<sub>2</sub>py(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub><sup>3+</sup>]. *Quim Nova*. 2004; 27(5): 709-14.
14. Martins TS, Isolani PC. Terras raras: aplicações industriais e biológicas. *Quim Nova*. 2005; 28(1): 111-7.
15. Timm LL. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológica. *Caderno La Salle XI*. 2005; 2(1): 231-9.
16. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. *Patologia estrutural e funcional – Robbins*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 1996.
17. Guray M, Sahin A. Benign breast disease: classification, diagnosis and management. *Oncologist*. 2006; 11(5): 435-9.
18. Pastor LM, Morales E, Polo LA, Calvo A, Pallarés J, De La Viesca S. Histochemical study of glycoconjugates in active and photoperiodically-regressed testis of hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta histochem*. 2003; 105(2): 165-73.
19. Nishi K, Tanegashima A, Yamamoto Y, Ushiyama I, Ikemoto K, Yamasaki S, et al. Utilization of lectin-histochemistry in forensic neuropathology: lectin staining provides useful information for postmortem diagnosis in forensic neuropathology. *Legal Med*. 2003; 5(3): 117-31.
20. Beltrão EIC, Correia MTS, Figueredo-Silva J, Coelho LCBB, Lectina conjugada a Éster de acridina como marcador histoquímica quimioluminescente. *Appl Biochem Biotech*. 1998; 74: 125-34.

21. Blum HF, Spealman CR. Photochemistry of fluorescein dyes. *J Phys Chem.* 1933; 37(9): 1123-33.
22. Mendonça JC, Dolci JEL. Imunofluorescência para neuropeptídeos na mucosa nasal humana: avaliação de técnica para peptídeo intestinal vasoativo (VIP). *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2005; 71(2): 123-31.
23. Brunet E, Juanes O, Rodriguez-Ubis JC. Supramolecularly Organized Lanthanide Complexes for Efficient Metal Excitation and Luminescence as Sensors in Organic and Biological Applications. *Curr Chem Biol.* 2007; 1: 11-39.
24. Yuan K, Listinsky CM, Singh RK, Listinsky JJ, Siegal GP. Cell Surface associated alpha-L-fucose moieties modulate human breast cancer neoplastic progression. *Pathol Oncol Res.* 2008; 14(2): 145-56.
25. Potapenko IO, Haakensen VD, Lüders T, Helland A, Bukholm I, Sørli T, et al. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Mol. Oncol.* 2010; 4(2): 98-118.
26. Cazet A, Julien S, Bobowski M, Burchell J, Delannoy P. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010; 12(3): 204.
27. Chacko BK, Appukuttan PS. Peanut (*Arachis hypogaea*) lectin recognizes  $\alpha$ -linked galactose, but not *N*-acetyl lactosamine in *N*-linked oligosaccharide terminals. *Int J Biol Macromol.* 2001; 28(5): 365-71.
28. Marcuschi M, Espósito TS, Machado MFM, Hirata IY, Machado MFM, Silva MV, et al. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Biochem Bioph Res Co.* 2010; 396: 667-73.
29. Wang Y, Ao X, Vuong H, Konanur M, Miller FR, Goodison S, et al. Membrane glycoproteins associated with breast tumor cell progression identified by a lectin affinity approach. *J Proteome Res.* 2008; 7(10): 4313-25.
30. Bazin H, Trinquet E, Mathis G. Time resolved amplification of cryptate emission: a versatile technology to trace biomolecular interactions. *Rev Molec Biotech.* 2002; 82: 233-50.

## Agradecimentos

Os autores agradecem as agências de fomento à pesquisa CNPq e FACEPE, e ao Instituto de Ciência e Tecnologia INCT-INAMI.

Recebido em 02/02/2011

Aprovado em 01/07/2011

### Endereço para correspondência

Universidade Federal de Pernambuco  
 Departamento de Química Fundamental, Avenida  
 Jornalista Aníbal Fernandes, S/N, Cidade Universitária.  
 Recife – Pernambuco – Brasil.  
 CEP: 50740-560.