



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**INVESTIGAÇÃO HISTOQUIMILUMINESCENTE DE NEOPLASIAS PROSTÁTICAS  
MEDIANTE EMPREGO DE LECTINAS CONJUGADAS A ÉSTER DE ACRIDINA**

LÚCIA PATRÍCIA BEZERRA GOMES DA SILVA

ORIENTADORA: PROF. Dr<sup>a</sup>. MARIA DA PAZ CARVALHO DA SILVA  
CO-ORIENTADOR: PROF. DR EDUARDO ISIDORO CARNEIRO BELTRÃO

RECIFE-PE  
2012

LÚCIA PATRÍCIA BEZERRA GOMES DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO HISTOQUIMILUMINESCENTE DE NEOPLASIAS PROSTÁTICAS  
MEDIANTE EMPREGO DE LECTINAS CONJUGADAS A ÉSTER DE ACRIDINA**

Dissertação apresentada como exigência parcial das exigências para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

RECIFE-PE  
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**LÚCIA PATRÍCIA BEZERRA GOMES DA SILVA**

**INVESTIGAÇÃO HISTOQUIMILUMINESCENTE DE NEOPLASIAS PROSTÁTICAS  
MEDIANTE EMPREGO DE LECTINAS CONJUGADAS A ÉSTER DE ACRIDINA**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do último, considera a candidata **LÚCIA PATRÍCIA BEZERRA GOMES DA SILVA** como:

---

Recife, 28 de fevereiro de 2011

---

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior  
Membro Interno

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Tereza dos Santos Correia  
Membro Interno

---

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo  
Membro Externo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da Paz Carvalho da Silva  
Orientadora -Presidente

RECIFE-PE  
2012

**Silva, Lúcia Patrícia Bezerra Gomes da**

**Investigação histoquimiluminescente de neoplasias prostáticas mediante emprego de lectinas conjugadas a éster de acridina/ Lúcia Patrícia Bezerra Gomes da Silva. – Recife: O Autor, 2012.**

**72 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Maria da Paz Carvalho da Silva**

**Coorientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2012.**

**Inclui bibliografia**

- 1. Próstata- Câncer 2. Carboidratos 3. Lectinas I. Silva, Maria da Paz Carvalho da II. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro III. Título**

**571.978**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2012-128**

*A todos os meus familiares, em especial à meus pais Severino Gomes e Lúcia Bezerra e ao  
esposo Iranilton, que sempre me estimularam a buscar meus sonhos a cada dia, DEUS*

*Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tivesse amor, serei como o  
bronze que soa ou como o címbalo que retine;  
E ainda que tivesse o dom de profetizar, e conheça todos os mistérios e toda a ciência, ainda  
que tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tivesse amor, nada serei;  
E ainda que distribua todos meus bens entres os pobres, e ainda que entregue o meu corpo  
para ser queimado, se não tiver amor, nada disso me aproveitaria;  
O amor é paciente, é benigno; o amor não arde em ciúmes, não se ufana, não se  
ensoberbece;  
Não se conduz inconveniente, não procura os seus interesses, não se axaspera, não se  
ressente mal;  
Não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade;  
Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta...*

(I Coríntios 13, 1-7)

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, o nosso mestre, fonte infinita da mais importante sabedoria, pela força e presença constante, necessária a vida.

Aos meus pais, Severino Gomes da Silva e Maria Lúcia Bezerra da Silva, cada um com suas características próprias que juntas resultaram no nosso alicerce e fonte de inspiração que devemos levar por toda vida, ambos lutaram com muita humildade e perseverança para que fôssemos educados e respeitados.

Aos meus irmãos e irmãs pelo amor que nos mantêm unidos em busca de objetivos comuns, saibam que aqui existe muito de vocês, serei sempre muito grata pelo apoio e paciência nos meus dias de aperreio, vejo em cada um de vocês a felicidade por me verem dando novos passos.

À Iranilton, meu esposo e companheiro, pela oportunidade de conviver com uma pessoa que direciona sempre o meu olhar para um horizonte de paz, amor, união e principalmente para um alvo maior, Jesus Cristo.

Ao Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, pela confiança depositada, pelo apoio e principalmente pelos preciosos momentos de aprendizagem, além da total disponibilidade para a execução deste projeto.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Paz Carvalho da Silva, pela paciência, dedicação e companheirismo, fatores que foram essenciais para essa caminhada.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, pelo apoio, pelos ensinamentos e principalmente pela capacidade de lidar de forma singular com cada um de seus alunos, respeitando e compreendendo seus limites, característica típica de um líder.

Ao Prof. Dr. Agenor Jácome, pela confiança e pelos ensinamentos adquiridos ao longo da iniciação científica e por me inserir no mundo da pesquisa.

Aos meus amigos do laboratório de Bioquímica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) que fazem parte do grupo Imobilização de Biomoléculas (IMOBIO): Sinara, Luiza, Mariana Cabrera, Ricardo, Amanda, Larissa, Camila e Matheus pelo apoio, amizade e incentivo.

Aos meus amigos do Laboratório de Patologia do LIKA do grupo de pesquisa Biomarcadores no Câncer (BmC): João Luiz, Juliana Vasconcelos, Moacyr Barreto, Juliana Brandão, Carmelita Cavalcanti, Marina Cartaxo, Steffany Ferreira, Ana Rosa, Renato Silva, Eduardo Ramalho, Juliana Nunes, Bruno Trajano, Marina Ferraz e Renato Ferreira pela recepção e amizade.

Ao Dr. Roosevelt Gonçalves, pelo incentivo e apoio financeiro durante a graduação, etapa essencial para que esse momento acontecesse.

Aos Professores do Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia (PPGBF), pela oportunidade de convívio e aprendizagem.

Aos funcionários do PPGBF e LIKA Djalma, Miron, Eliete, Sr. Otaviano, Vera, Ilma, Conceição, Moisés e Edson, pelo apoio e assistência oferecida em todos os momentos.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.



## LISTA DE FIGURAS (REVISÃO DA LITERATURA)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Apresentação da localização anatômica da glândula prostática.                                                                                                                                                                                                                                               | 17 |
| Figura 2 - Demonstração das quatro zonas ou regiões que compõem o parênquima prostático.                                                                                                                                                                                                                               | 18 |
| Figura 3 - Tecido prostático normal demonstrando as células basais e colunares e o estroma no qual as glândulas próstaticas estão emergidos.                                                                                                                                                                           | 19 |
| Figura 4 - A- Imagem macroscópica de um corte longitudinal da glândula prostática, demonstrando os nódulos hiperplásicos, comuns a hiperplasia prostática benigna.<br>B- Imagem histológica da hiperplasia prostática benigna. Presença de glândulas pequenas e grandes, cisticamente dilatadas em forma de agregados. | 21 |
| Figura 5 - Apresentação das setes características comuns as célula malignas.                                                                                                                                                                                                                                           | 25 |
| Figura 6 - Imagem histológica de um adenocarcinoma prostático mostrando pequenas glândulas malignas, cuja células apresentam núcleos aumentados, nucléolos proeminentes , desorganização celular e citoplasma escuro. Ausência das célula basais                                                                       | 27 |
| Figura 7 - Representação esquemática das classes de glicoconjugados expresso em células humanas.                                                                                                                                                                                                                       | 32 |
| Figura 8 - Participação dos glicanos na maior parte dos eventos durante a progressão tumoral.                                                                                                                                                                                                                          | 34 |
| Figura 9 - Interações entre diversos tipos celulares através do reconhecimento entre lectinas e carboidratos.)                                                                                                                                                                                                         | 37 |
| Figura 10 - Representação esquemática da estrutura terciária das lectinas Con A, PNA e UEA-I                                                                                                                                                                                                                           | 39 |
| Figura 11 - Mecanismo quimiluminescente do éster de acridina.                                                                                                                                                                                                                                                          | 43 |
| Figura 12 - Reação de conjugação da proteína (NH <sub>2</sub> – R) ao éster de acridina.                                                                                                                                                                                                                               | 44 |
| Figura 13 - Modificação no éster de acridina (A) pela inserção de dois grupos metil no fenol conferindo estabilidade hidrolítica (B).                                                                                                                                                                                  | 45 |

## LISTA DE FIGURAS (ARTIGO)

- Figura 1 - Chemiluminescence in normal prostate tissues (n=5), benign prostatic hyperplasia (n=49) and prostate adenocarcinoma (n=50), using the conjugate Con A-AE, PNA-AE and UEA-AE. All measurements are mean of triplicate. 63
- Figura 2 – Lectin binding inhibition assay in prostate tissues diagnostic as benign Prostatic hyperplasia (n=5) and prostate adenocarcinoma (n=5), using the conjugate Con A-AE, PNA-AE and UEA-AE inhibited using the sugars (methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, D-galactose and D-fucose) respectively. All measurements are mean of triplicate. 63
- Figura 3 – Relationship between RLU and area (0.125 to 1.0 cm<sup>2</sup>) of prostate tissue diagnosed as benign hyperplasia prostatic and adenocarcinoma prostate by using Con A-AE (A), PNA-AE (B) and UEA-AE (C). All measurements are mean of triplicate. 64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*AIDS*- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AcP – Adenocarcinoma prostático

Con A- *Concanavalina A*

Con A-AE – Concanavalina A conjugada ao Dimetil Éster de Acridina

DHT - Diidrotestosterona

DMAE-NHS – Dimetil Éster de Acridina – Éster N-Hidroxisuccinamida

DMF - N, N - Dimetilformamida

ERAs – Elementos Responsivos a Andrógenos

HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida

HPB – Hiperplasia Prostática Benigna

INCA – Instituto Nacional do Câncer

PSA – Antígeno prostático específico

PNA – *Peanut agglutinin*

PNA-AE – *Peanut agglutinin* conjugada ao Dimetil Éster de Acridina

QL - Quimiluminescência

STUI – Sintomas do Trato Urinário Baixo

UEA- *Ulex europaeus agglutinin*

UEA-AE – *Ulex europaeus agglutinin* conjugada ao Dimetil Éster de Acridina

RLU - Unidades Relativa de Luz

## RESUMO

A inespecificidade dos métodos atualmente adotados para diagnosticar e monitorar o câncer de próstata torna-os incapazes de fornecer um prognóstico preciso para direcionar com eficiência a conduta terapêutica. Por isso, faz-se necessário desenvolver metodologias que forneçam diagnósticos mais precisos e eficientes. Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um método quantitativo, empregando as lectinas *Concanavalin A* (Con A), *Ulex europaeus agglutinin* (UEA-I) e *Peanut agglutinin* (PNA) conjugadas a éster de acridina (Lectinas-EA) para avaliar a expressão de carboidratos em tecidos prostáticos: normal, hiperplasia prostática benigna (HPB) e adenocarcinoma prostático (AcP). Os conjugados lectinas-EA foram avaliados quanto a atividade hemaglutinante, conteúdo de proteínas e quimiluminescência expressado em unidades relativa de luz (RLU). Tecidos transformados apresentaram uma menor expressão de resíduos de  $\alpha$ -D-glicose/ $\alpha$ -D-manose (BPH:  $226.931 \pm 17.436$ ; AcP:  $239.520 \pm 12.398$ ) e Gal- $\beta$ (1-3)-GalNAc, (BPH:  $28.754 \pm 2.157$ ; AcP:  $16.728 \pm 1.204$ ) quando correlacionados as condições normais ( $367.566 \pm 48.550$  e  $409.289 \pm 22.336$ , respectivamente). No entanto, a maior expressão de  $\alpha$ -L-fucose foi observado em AcP ( $251.118 \pm 14.193$ ) em relação ao tecido normal ( $200.979 \pm 21.318$ ) e HPB ( $169.758 \pm 10.264$ ), que exibem valores menores. A RLU diminuiu significativamente pela inibição da interação entre tecidos e lectinas usando seus açúcares específicos. Esses resultados indicam que o método usado é uma eficiente ferramenta para diferenciação quantitativa entre os tecidos prostáticos analisados.

Palavras-Chave: quimiluminescência, lectinas, carboidratos, adenocarcinoma prostático.

## ABSTRACT

The nonspecific methods that are currently used for both diagnosis and monitoring the prostatic cancer makes them unable to provide accurate prognosis and help the choice of an efficient therapeutic. For this reason, it is necessary to develop methodologies more accurate and efficient diagnosis. This work aimed to develop a quantitative method through the employment of *Concanavalin A* (Con A), *Ulex europaeus agglutinin* (UEA-I) and *Peanut agglutinin* (PNA) lectins conjugated to acridinium ester (Lectin-AE) for evaluation of the carbohydrate expression in prostatic tissues: normal, benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostatic adenocarcinoma (PAC). The lectin-AE conjugates were assayed for hemagglutination activity, protein content and chemiluminescence expressed in relative light units (RLU). Transformed tissues showed a lower content of  $\alpha$ -D-glucose/ $\alpha$ -D-mannose residues (BPH:  $226.931 \pm 17.436$ ; PAC:  $239.520 \pm 12.398$ ) and Gal- $\beta$ (1-3)-GalNAc residues (BPH:  $28.754 \pm 2.157$ ; PAC:  $16.728 \pm 1.204$ ) than normal tissues ( $367.566 \pm 48.550$  and  $409.289 \pm 22.336$ , respectively). However, the highest  $\alpha$ -L-fucose expression was observed in PAC ( $251.118 \pm 14.193$ ) in relation normal ( $200.979 \pm 21.318$ ) and BHP ( $169.758 \pm 10.264$ ), that exhibited lower values. RLU was abolished by inhibiting the interaction between tissues and lectins using their specific carbohydrates. These results indicate that the used method is an efficient tool for quantitative differentiation among the analyzed prostatic tissues.

Keywords: chemiluminescence, lectins, carbohydrates, prostatic adenocarcinoma.

## INDICE

|                                                 |             |
|-------------------------------------------------|-------------|
| <b>AGRADECIMENTOS</b>                           | <b>vi</b>   |
| <b>LISTA DE FIGURAS (REVISÃO DE LITERATURA)</b> | <b>viii</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS (ARTIGO)</b>                | <b>ix</b>   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>                    | <b>x</b>    |
| <b>RESUMO</b>                                   | <b>xi</b>   |
| <b>ABSTRACT</b>                                 | <b>xii</b>  |
| <br>                                            |             |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                            | <b>14</b>   |
| <br>                                            |             |
| <b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b>                   | <b>17</b>   |
| 2.1 Anatomia e Histologia da Próstata           | 17          |
| 2.2 Hiperplasia Prostática Benigna              | 19          |
| 2.2.1 Histopatologia                            | 20          |
| 2.2.2 Manifestações Clínicas                    | 21          |
| 2.2.3 Etiologia                                 | 22          |
| 2.2.4 Diagnóstico                               | 23          |
| 2.3 Câncer- Aspectos Gerais                     | 23          |
| 2.4 Adenocarcinoma Prostático                   | 25          |
| 2.2.1 Histopatologia                            | 26          |
| 2.2.2 Manifestações Clínicas                    | 27          |
| 2.2.3 Etiologia                                 | 28          |
| 2.2.4 Diagnóstico                               | 30          |
| 2.5 Glicosilação Alterada e Câncer              | 30          |
| 2.6 Lectinas                                    | 35          |
| 2.6.1 Aplicações                                | 39          |
| 2.7 Quimiluminescência                          | 41          |
| <br>                                            |             |
| <b>3 REFERÊNCIAS</b>                            | <b>46</b>   |
| <br>                                            |             |
| <b>4 OBJETIVOS</b>                              | <b>55</b>   |
| 3.1 Geral                                       | 55          |
| 3.2 Objetivos específicos                       | 55          |
| <br>                                            |             |
| <b>5 ARTIGO</b>                                 | <b>56</b>   |
| <br>                                            |             |
| <b>6 CONCLUSÃO</b>                              | <b>72</b>   |

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer, que segundo a Sociedade Americana do Câncer (2011) define-se por um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e disseminação de células anormais, e que essas células também podem invadir e se proliferar em tecidos diferentes da sua origem (metástase), são uma das principais causas de morte mundial, geralmente excedido apenas por doenças cardiovasculares.

No Brasil, estimativas para o ano de 2012 que serão válidas para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer. Especificamente, para o câncer de próstata, aponta-se uma incidência de 60.180 novos casos, sendo, portanto, considerado o tipo de câncer mais incidente entre indivíduos do sexo masculino, atrás apenas dos casos de câncer de pele não-melanoma, revelando assim, a magnitude do problema relacionado a esse tipo de câncer no país. A região Nordeste apresenta-se como a segunda região mais incidente, e o estado de Pernambuco caracteriza-se por apresentar a maior incidência (2.310 novos casos por ano) desse tipo de câncer na região (INCA, 2012).

Atualmente, o diagnóstico de câncer prostático se baseia no exame clínico (toque retal), níveis sanguíneos do Antígeno Prostático Específico (PSA), associado à ultrassonografia transretal e quando necessário à análise histopatológica (biópsia) a qual varia de acordo com os parâmetros adotados pelo patologista. No entanto, nenhum deles é suficientemente capaz de fornecer prognóstico preciso para direcionar com eficiência a conduta terapêutica mais adequada para cada paciente (KULIGOWSKA, 2001).

Por isso, o interesse na busca de novos biomarcadores a fim de definir uma doença a nível molecular, monitorar uma resposta terapêutica ou predizer o prognóstico ou resposta terapêutica para uma determinada doença (STOSS e HENKEEL, 2004).

Os glicoconjugados presentes em proteínas e lipídios na superfície celular são variavelmente expressos durante desenvolvimento e oncogênese. A glicosilação é um fenômeno comumente associado com desordens hereditárias, imunodeficiência e também com transformação maligna, invasão e metástase de células do câncer, de modo que, quase todos os tipos de células malignas demonstram alterações em seus padrões de glicosilação quando comparadas as suas contrapartes normais (CHAN; CHOI; HO, 2001; GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que possuem a capacidade de se ligar especificamente a mono ou oligossacarídeos de forma reversível na qual a principal força de interação é a hidrofobicidade (KENNEDY *et.al*, 1995). Em virtude da interação lectina-carboidrato ser reversível e altamente específica, elas têm sido amplamente estudadas em diferentes áreas biológicas e biomédicas como ferramentas para análise de carboidratos, estejam eles na forma livre ou complexados (NILLSSON, 2007; GERMEINER *et al* ,2009)

A quimiluminescência (QL) é a emissão de radiação eletromagnética geralmente na faixa do visível ou infravermelho próximo, resultante de uma reação química exergônica, quando o produto excitado retorna ao seu estado basal (CAMPBELL *et al.*, 1985). Entre os vários marcadores quimiluminescentes, os ésteres de acridina são particularmente atraentes porque possuem altos rendimentos quânticos, por esta razão estes compostos foram capazes de substituir os radioisótopos amplamente aplicados em imunoensaios, os quais apresentavam uma curta meia vida, perigo potencial à saúde e problemas quanto aos dejetos gerados (WEEKS *et al.*, 1986).

Considerando-se a alta prevalência do câncer prostático, a relação das transformações malignas com a mudança no perfil dos glicídios presentes na superfície da célula e a grande afinidade das lectinas por carboidratos, o desenvolvimento de métodos baseados no padrão de

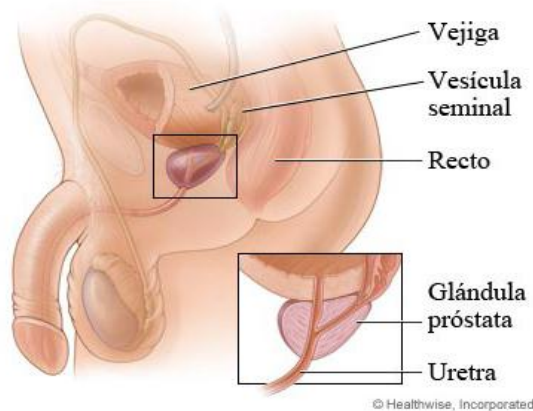


ligação das lectinas ao tecido modificado e a sua revelação através de quimiluminescência, pode ser se uma importante ferramenta auxiliar na histoquímica das neoplasias prostáticas.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Anatomia e Histologia da Próstata

A próstata é um órgão constituído parcialmente por tecidos glandular e muscular, apresenta localização retroperitoneal, circundando o colo vesical e a uretra (Figura 1), possui formato de castanha, com a base voltada para o alto e a ponta voltada para baixo, medindo cerca de 2 cm no eixo anteroposterior, 3 cm no eixo vertical e 4 cm no eixo transversal ao nível da base. Em um homem adulto normal, a próstata pesa cerca de 20 gramas, apresentando uma consistência firme e elástica, com superfície lisa e desprovida de uma cápsula distinta (CALVETE *et al*, 2003). Juntamente com a vesícula seminal e glândulas bulbouretrais, constituem as glândulas acessórias da reprodução (REUBER; CADY, 2009).



**Figura 1:** Localização anatômica da próstata.

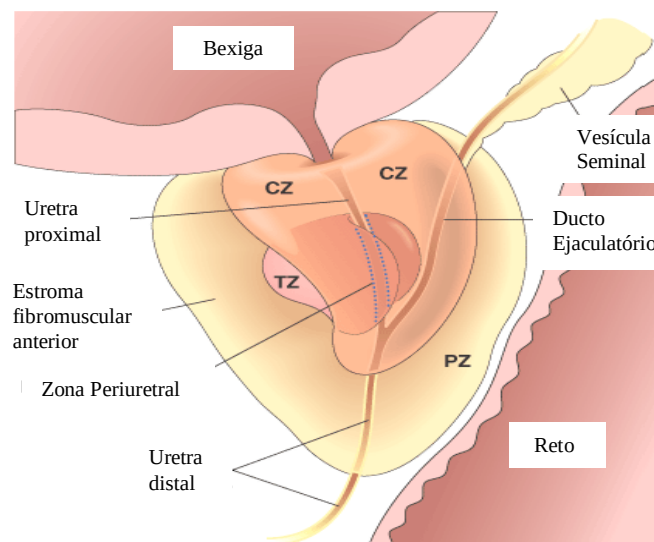
**Fonte:** <http://www.effectivehealthcare.ahrq.gov>

A principal função da próstata é a produção do líquido prostático, este fluido, como parte do sêmen, facilita o transporte, ajuda a nutrir e proteger os espermatozóides durante a ejaculação e contém várias substâncias biológicas importantes como: frutose, ácido cítrico, espermina, prostaglandinas, zinco, proteínas e enzimas específicas, como as imunoglobulinas, proteases, esterases e fosfatases. Além disso, a secreção da próstata contém em especial

lisozima, que junto às secreções das outras glândulas sexuais protege o trato urinário superior e o sistema reprodutor masculino de microorganismos que penetram pela uretra (CHALABI *et al.*, 2002).

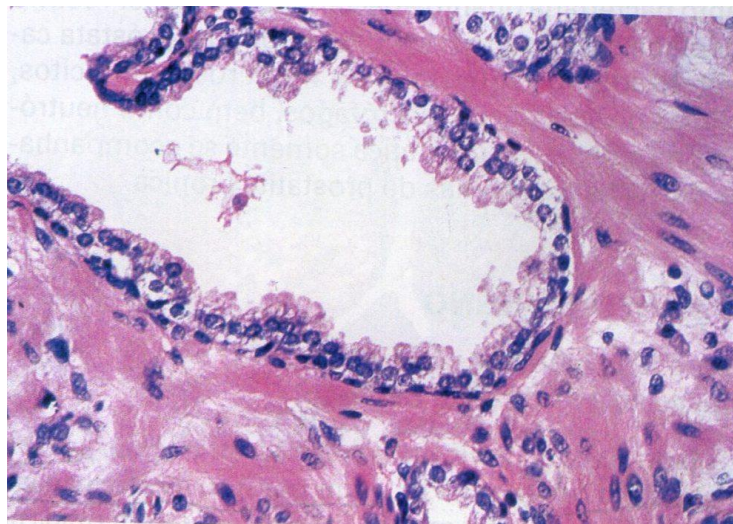
De acordo com Lowsley e colaboradores (1912), a próstata pode ser dividida em lobos laterais, anterior, posterior e mediano, que são nítidos durante o período embrionário. Em homens adultos, essa divisão lobular é quase imperceptível, exceto o lobo posterior que corresponde ao parênquima situado posteriormente a um plano indicado pela trajetória dos ductos ejaculadores.

Em homens adultos, o parênquima prostático, pode ser dividido em quatro zonas ou regiões biológicas e anatomicamente distintas (Figura 2): A zona periférica – 70% da glândula, à porção que envolve a uretra distal correspondendo à região apical da próstata; a zona central - 20% da glândula, acompanha os ductos ejaculadores; A zona de transição - 2% da glândula, corresponde à porção que envolve a uretra proximal e a região do estroma fibromuscular anterior - 8 a 30% da glândula (McNEAL, 1983; ROBBINS e COTRAN, 2005). A hiperplasia prostática benigna usualmente se desenvolve na zona de transição, enquanto que 75% dos cânceres de próstata ocorrem na zona periférica (APPELWHITE *et al.*, 2001).



**Figura 2:** Divisão histológica do parênquima prostático.  
**Fonte:** ROBBINS; COTRAN, 2007.

Histologicamente, as glândulas prostáticas são constituídas de ácinos e ductos secretores do fluido prostático, revestidas por uma fina camada de células basais que apresentam núcleos com cromatina condensada e citoplasma claro e uma camada de células epiteliais colunares altas ou cúbicas, com núcleos mais claros (Figura 3). O estroma prostático é constituído por fibroblastos, colágeno e músculo liso com variável quantidade de fibras elásticas, no interior desse estroma estão imersos as glândulas formando pregas complexas (STEVENS e LOWE, 2002).



**Figura 3:** Tecido prostático normal demonstrando as células basais e colunares e o estroma no qual as glândulas próstáticas estão emergidos.  
**Fonte:** ROBBINS; COTRAN, 2005.

## 2.2 Hiperplasia Prostática Benigna

O termo Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) descreve a alteração proliferativa benigna dos elementos celulares da próstata, sendo caracterizada pela hiperplasia do estroma fibromuscular e dos elementos epiteliais glandulares. A HPB resulta na formação de nódulos, relativamente nítidos, nas zonas periuretral e de transição prostática, promovendo consequentemente um aumento glandular e quando esses nódulos são suficientemente

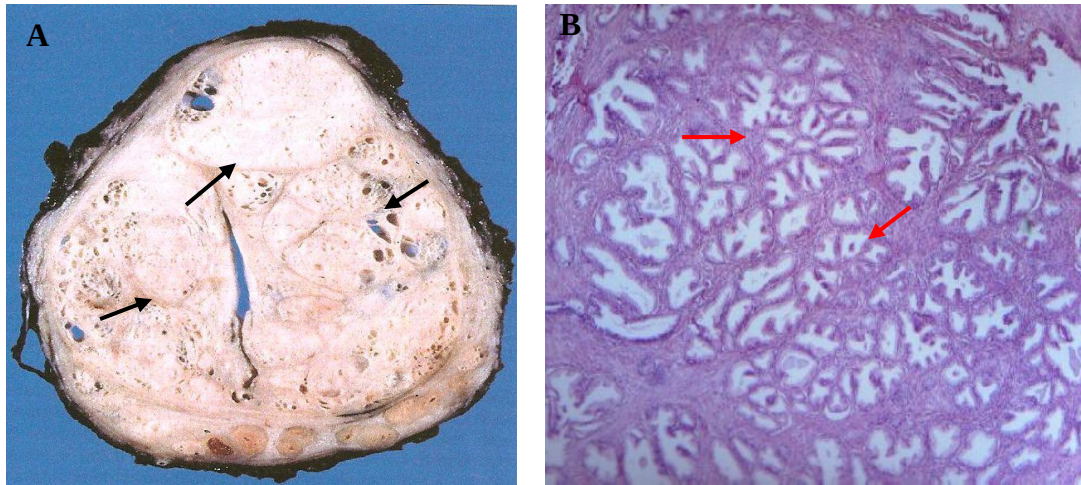
grandes, comprimem e estreitam o canal uretral causando obstrução parcial ou, às vezes, total da uretra, promovendo assim uma disfunção miccional (MCNEAL, 1983; LEPOR, 2004).

É amplamente reconhecido que a HPB é uma das condições clínicas benignas mais frequentes que acometem o homem, além disso, essa afecção apresenta uma íntima relação com o envelhecimento, sendo geralmente incomum a presença de HPB em homens até aos 40 anos de idade. No entanto, evidências histológicas e sintomatológicas dessa doença acometem cerca de 50% dos homens aos 50 anos de idade e essa incidência aumenta com a avançar da idade, de modo que aos 80 anos, cerca de 90% dos indivíduos apresentaram aspectos histológicos da HPB (WROCLAWSKI, 2003). Cabe ressaltar que, tendo em vista o aumento da longevidade do homem observado em análises demográficas, incluindo a população brasileira, aspectos relacionados à HBP serão cada vez mais relevantes do ponto de vista epidemiológico.

### **2.2.1 Histopatologia**

De acordo com os aspectos macroscópicos (Figura 4A), os nódulos hiperplásicos são facilmente identificados, apresentando variação de cor e consistência de acordo com a predominância dos elementos celulares envolvidos, de modo que, os nódulos fibroepiteliais, com predominância glandular apresentam uma coloração rosa-amarelado com uma consistência macia, e um líquido prostático branco leitoso escoa dessas áreas. Enquanto que, os nódulos fibromusculares apresentam uma coloração cinza pálido e ausência de secreção de exsudato. Microscopicamente, os aspectos morfológicos dos nódulos observados são provenientes, ou da proliferação ou dilatação glandular (Figura 4B), que é caracterizada pelos agregados de glândulas cisticamente dilatadas pequenas ou grandes, revestidas por uma camada interna colunar e outra camada externa de epitélio cuboide ou planificado, repousando

sobre uma membrana basal intacta, ou proveniente da proliferação fibrosa ou muscular do estroma (ROBBINS e COTRAN, 2005).



**Figura 4. (A)** Aspectos macroscópicos da HPB, apresentando os nódulos hiperplásicos na região periuretral (setas pretas). **(B)** Características histológicas da HPB, sendo observadas glândulas pequenas e cisticamente dilatadas em forma de agregados (setas vermelhas).

**Fonte:** ROBBINS; COTRAN, 2005.

Os elementos celulares que compõem os nódulos hiperplásicos epiteliais e/ou estromais são expressos em proporções diferentes, de modo que, a composição celular individual varia em tecido conjuntivo de 16.1% para 56.1%, em músculo liso de 20.2% para 59.3%, em epitélio de 24% para 3%, respectivamente (LEPOR, 2005).

### 2.2.2 Manifestações clínicas

Os frequentes sintomas clinicamente relacionados à HPB são denominados coletivamente de STUI, que correspondem aos sintomas do trato urinário inferior, anteriormente denominado prostatismo. Esses sintomas compreendem aos sintomas irritativos (disúria, noctúria, polaciúria, hematúria) e os sintomas obstrutivos (hesitação, jato urinário fraco, esforços para iniciar a urina, esvaziamento incompleto da bexiga, interrupção do jato urinário) (MILLER, 2009). Tais sintomas podem causar prejuízo significativo à qualidade de

vida dos pacientes, além de poder causar morbidade não desprezível, especialmente em casos não adequadamente conduzidos do ponto de vista de diagnóstico e terapêutico.

### 2.2.3 Etiologia

Diversos estudos têm sido realizados com o intuito de se compreender a etiologia da Hiperplasia Prostática Benigna, mas seu real mecanismo de formação ainda não é totalmente compreendido. No entanto, há poucas dúvidas de que dois fatores de risco estejam intimamente relacionados ao desenvolvimento dessa neoplasia: ação de andrógenos e envelhecimento.

Os andrógenos, diidrotestosterona (DHT) e testosterona, semelhante aos demais hormônios esteróides, exercem seus efeitos ligando-se a uma superfamília de receptores nucleares. O complexo hormônio-receptor consiste num fator transcricional ativo, proveniente da mudança conformacional desse receptor, o qual interage com regiões específicas na região promotora do DNA, denominadas elementos responsivos a andrógenos (ERAs) em vários genes alvos (LEE, 2003).

Tanto nas células estromais quanto epiteliais, a DHT, que é produto da conversão da testosterona através da enzima 5  $\alpha$ -redutase, liga-se aos receptores androgênicos nucleares e sinalizam a transcrição de fatores de crescimento. A testosterona pode ligar-se a estes receptores e estimular o crescimento celular, no entanto, a DHT é dez vezes mais potente por dissociar-se mais lentamente dos receptores (KLAUSNER *et al.*, 1994).

Com o avançar da idade os níveis plasmáticos de andrógenos declinam gradualmente no homem, enquanto os níveis séricos de estrógenos permanecem constantes ou ligeiramente aumentados, resultando num aumento da taxa de estrógeno em relação aos níveis de andrógenos, modificando assim o equilíbrio normal desses hormônios (HO, 2008). Assim,

torna-se permissível considerar que esse desequilíbrio hormonal possa estar diretamente atrelada à patogênese dessa afecção.

#### **2.2.4 Diagnóstico**

A HPB é inicialmente diagnosticada através do exame clínico, onde se avalia a sintomatologia apresentada pelo paciente, especificamente os sintomas urinários típicos. Associado a esta primeira etapa, realiza-se a análise digital (toque retal), com o intuito de avaliar o peso prostático e realizar um diagnóstico diferencial, eliminando a possibilidade de adenocarcinoma prostático. Além disso, é avaliado o nível de PSA (*prostatic specific antigen*), onde é observado um aumento do PSA total associado a um aumento de PSA livre em relação ao conjugado, pode-se também utilizar exames de imagem (ultrassonografia) e como diagnóstico complementar realizar a análise histopatológica convencional através de biópsia (AVERBECK *et al.*, 2010).

### **2.3 Câncer – Aspectos Gerais**

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2012), câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças, nas quais as células em uma determinada parte do organismo passam a apresentar crescimento desordenado, com uma característica em comum: a capacidade de invadir tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo promovendo a metástase.

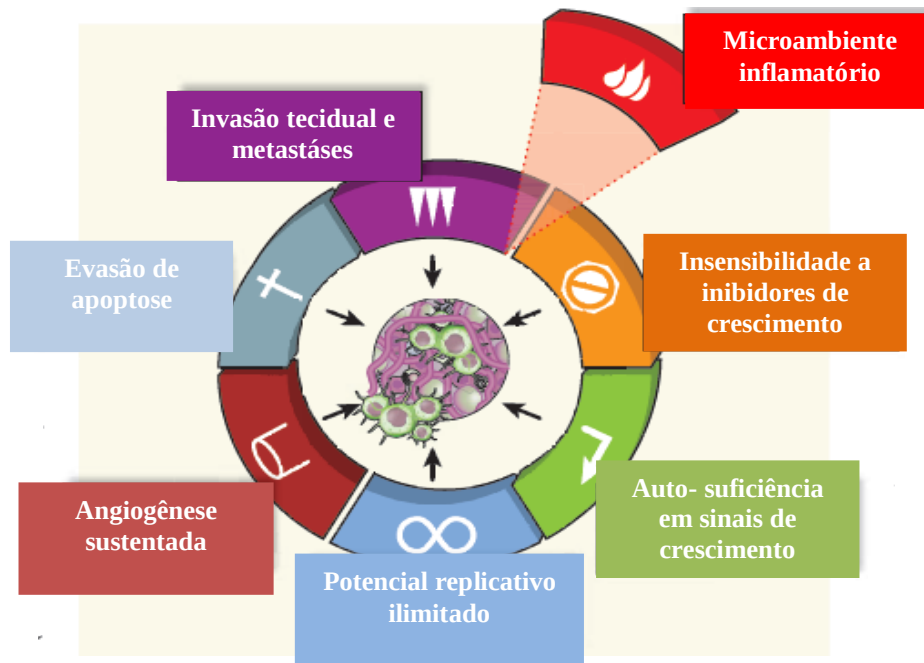
Breivik (2005) relata que a carcinogênese é um modelo tempo-dependente, de modo que, a incidência de câncer aumenta com a idade e em países com alta expectativa de vida,



onde cerca de 40% da população sofreu algum tipo de câncer. Dados epidemiológicos demonstram uma clara associação entre os fatores ambientais (fumo, dieta e radiação, por exemplo) e o desenvolvimento de câncer. Além disso, muitos aspectos do desenvolvimento do câncer foram explicados pelas alterações no código genético, envolvendo a herança entre as gerações. Sendo assim os três fatores tempo, meio ambiente e herança genética, são os principais aspectos que devem ser unidos por um modelo de carcinogênese.

A proliferação, diferenciação e a sobrevivência das células individuais em organismos multicelulares são cuidadosamente reguladas visando à necessidade do organismo como o todo. O câncer é o resultado da quebra dos mecanismos reguladores que governam o comportamento normal das células. Dessa forma, essa patologia se apresenta como uma doença social celular, resultado da perda dessa regulação, fazendo com que as células passem a se dividir de maneira descontrolada e invadam outros tecidos e órgãos interferindo em suas funções (COOPER, 2001).

Hanahan e Weinberg (2000) propuseram um modelo objetivando definir as características que as células tumorais apresentam onde foi observado que todas as células malignas possuem a capacidade para desenvolver vasos sanguíneos (angiogênese), um potencial ilimitado de replicação, evasão de morte celular programada (apoptose), auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento e invasão de tecidos e metástase. No entanto, Mantovani (2009) relatou que além dessas seis características acima citadas, as células malignas possuem a capacidade de secretar moléculas (citocinas) capazes de recrutar macrófagos tornando o micro-ambiente tumoral um meio inflamatório, de modo que, as células inflamatórias influenciam em quase todos os aspectos da progressão do câncer, incluindo a capacidade das células tumorais para metastatizar (Figura 5).



**Figura 5:** As sete características apresentadas pela célula maligna.

**Fonte:** Mantovani, 2009.

## 2.4 Adenocarcinoma Prostático

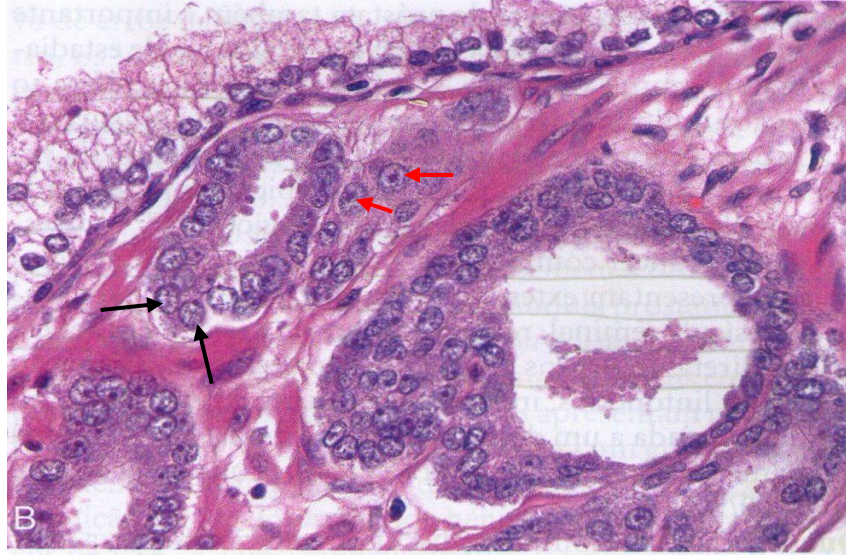
O aumento da expectativa de vida da população está associado com o desenvolvimento de doenças, como o câncer de próstata (CP), que surgem com o envelhecimento e que vem assumindo dimensões cada vez maiores, não apenas como um problema de saúde pública, mas também pelo impacto sócio-econômico sobre a população (DINI, 2006).

Segundo o INCA, o câncer de próstata é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais prevalente entre os homens, representando cerca de 10% do total de câncer. No Brasil, o câncer de próstata é o segundo mais comum entre os homens (após o câncer de pele não-melanoma) e é considerado a segunda maior causa de morte por câncer, atrás apenas do câncer de pulmão. Mais do que qualquer outro tipo, é considerado um câncer da terceira idade, já que cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos. Além

disso, estimativas para o ano de 2012, válidas para o ano de 2013 apontam uma incidência de cerca de 60.180 novos casos para o Brasil e 2.310 novos casos para estado de Pernambuco, sendo desta forma, considerado o estado de maior incidência na região nordeste (INCA, 2012).

#### **2.4.1 Histopatologia**

Observando macroscopicamente, o tecido neoplásico é áspero e firme, mas quando encrustado na substância prostática pode ser extremamente difícil de visualizar e ser mais aparente a palpação. À análise microscópica (Figura 6), as glândulas neoplásicas são comumente menores que as glândulas benignas e são revestidas por uma camada única uniforme de epitélio cuboide ou colunar baixo, não apresentando a membrana basal externa das células, típicas das glândulas normais ou hiperplásicas. Em contraste com as glândulas benignas, as glândulas do câncer de próstata são mais amontoadas, caracteristicamente com ausência de ramificação e invaginação papilar. Além disso, o citoplasma das células tumorais varia de pálido a claro, os núcleos são grandes e frequentemente contêm um ou mais nucléolos (ROBBINS e COTRAN, 2005).



**Figura 6.** Imagem histológica de um adenocarcinoma prostático mostrando pequenas glândulas malignas, cuja células apresentam núcleos aumentados (setas pretas), nucléolos proeminentes (setas vermelhas), desorganização celular e citoplasma escuro. Ausência de células basais.  
**Fonte:** ROBBINS; COTRAN, 2005.

#### 2.4.2 Manifestações Clínicas

Indivíduos acometidos por câncer de próstata são na grande maioria das vezes assintomáticos, nesses pacientes com doenças clinicamente localizadas, a lesão é descoberta pelo achado de nódulo suspeito ao exame retal, por biópsia de hiperplasia ou por nível de PSA elevado. Como esses nódulos geralmente ocorrem na região periférica, que é anatomicamente distante da uretra prostática, os sintomas urinários só aparecem tardiamente em pacientes com câncer de próstata avançado, e os sintomas mais frequentes nessa neoplasia (dificuldade de iniciar ou interromper o fluxo urinário, disúria, frequência urinária ou hematúria) geralmente estão associados à dor lombar devido às metástases vertebrais (JAHANSSON *et al.*, 2004; SROUG *et al.*, 2008).

### 2.4.3 Etiologia

Semelhantemente a HPB, a etiologia precisa do câncer de próstata ainda continua desconhecida. Porém, a grande variação da incidência do câncer de próstata nas diferentes áreas geográficas sugere o envolvimento de múltiplos fatores, constitucionais e ambientais em sua etiologia (TONON; SCHOFFEN, 2009).

Dentre os fatores constitucionais, que em geral são considerados como aqueles fatores não modificáveis que estão relacionados ao desenvolvimento do câncer de próstata, são considerados os seguintes: a idade, que é um fator de risco principalmente devido às mutações genéticas provenientes da exposição acumulada a fatores mutagênicos ao longo da vida, sendo esse tipo de câncer considerado um câncer da terceira idade. Além disso, o envelhecimento está diretamente associado ao desequilíbrio hormonal, onde a produção de andrógeno é comprometida devido à disfunção testicular, resultando num aumento na taxa de estrógeno em relação a andrógeno (JACOB; BURRI, 1996; HO *et al.*, 2011).

Além disso, estudos têm demonstrado que a expressão de receptores de estrógenos no epitélio prostático aumenta com a progressão tumoral enquanto a expressão de receptores de andrógenos diminui, justificando que nessa neoplasia a próstata está mais exposta à estrógenos e que possivelmente esse hormônio esteja atrelado a patogênese dessa afecção (HO *et al.*, 2011).

A etnia também tem se demonstrado como um fator de risco, visto que a incidência do câncer de próstata difere substancialmente entre os grupos étnicos, de modo que, as maiores taxas de incidência encontram-se entre os afro-americanos e a menor taxa entre homens de países do Mediterrâneo e chineses. Além disso, a incidência dessa doença é 60% maior em afro-americanos que em americanos brancos (KHAN; ADHAMI; MUKTAR, 2010).

Outro fator de risco associado ao câncer de próstata corresponde à herança genética do indivíduo, uma história familiar de câncer de próstata é um importante indício, visto que o risco de desenvolver essa patologia duplica em homens com história de pais e irmãos afetados, e o risco vai aumentando quando aumenta o número de parentes de primeiro grau afetados (CRAWFORD, 2003).

Associado a esses fatores intrínsecos comuns a cada indivíduo, que o predispõe aos processos carcinogênicos, outros fatores extrínsecos ou ambientais também estão diretamente atrelados ao desenvolvimento do câncer de próstata, podendo considerar a dieta rica em gorduras, o estilo de vida, não prática de exercícios físicos, o tabagismo e o etilismo.

#### **2.4.4 Diagnóstico**

Diferentemente do diagnóstico da HPB, onde o paciente procura o serviço de saúde em virtude dos sintomas urinários frequentes nessa afecção, pacientes assintomáticos são diagnósticos com câncer de próstata através de método de triagem, como a dosagem de PSA, ou de forma indireta, através da análise de biópsias de HPB. Os métodos utilizados para o diagnóstico do câncer de próstata são semelhantes aos utilizados para o diagnóstico de HPB (exame clínico, análise digital (toque retal), dosagens de PSA, ultrassonografia e análise histopatológica) (KULIGOWSKA, 2001).

A análise histopatológica, realizada a partir dos espécimes obtidos através de biópsias ou produto de prostatectomia, é essencial no diagnóstico preciso do câncer e para classificação do tumor quando ao grau de diferenciação das células tumorais utilizando o sistema de Gleason. A confirmação da prova anatomopatológica é necessária para o planejamento de tratamento e também para um prognóstico adequado (AKIMOTO *et al.*, 2006). O questionamento quanto esse método é que essa técnica depende diretamente da

experiência e da padronização utilizada pelo anatomopatologista, o que a torna subjetiva, visto que a análise pode diferenciar entre profissionais.

## **2.5 Glicosilação alterada e câncer**

Os carboidratos são as moléculas orgânicas mais abundantes encontradas na natureza, e quase todos os organismos podem sintetizar e metabolizá-los. A complexa heterogeneidade dos hidratos de carbono em sistemas vivos é o resultado direto de várias características, como a capacidade de formar ligações glicosídicas entre os resíduos de açúcar, característica estrutural dessa molécula, tipos de ligação anomérica, a posição e a ausência ou presença de ramificação (MODY; JOSHI; CHANEY, 1995).

Os glicanos são encontrados em vários tipos de biomoléculas (Figura 7), que podem ser classificadas em diferentes famílias de glicocojugados: glicoproteínas, glicoesfingolipídios, proteoglicanos e glicosilfosfatoinositol. A maioria dos carboidratos em glicoconjugados são oligo ou polissacarídeos consistindo de cadeias linear ou ramificadas de açúcar, frequentemente manose (Man), fucose (Fuc), galactose (Gal), glicose (Glc), N-acetilgalactosamina (GalNAC), N-cetilglicosamina (GlcNAc) e ácido siálico (NeuAc). Esses seis monossacarídeos estão presentes em diferentes combinações, dando origem a alta variabilidade dos glicoconjugados, e assim a um alto número de modificações possíveis de proteínas e lipídios com diferentes propriedades e funções (GABIUS, 2001).

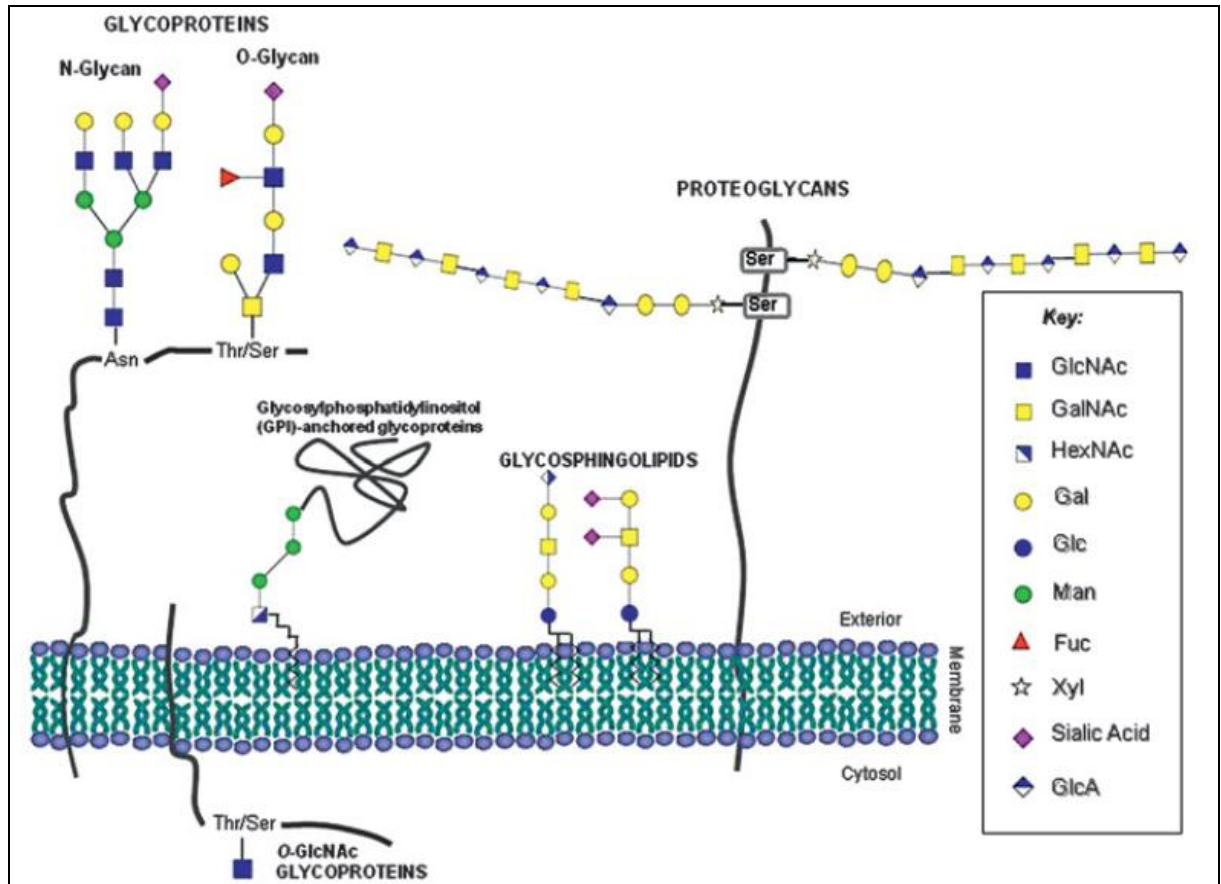
Devido à diversidade estrutural dos glicoconjugados, os glicanos atuam como moléculas de armazenamento de informação, sendo atribuído a eles significado funcional, de modo que muitas informações biológicas podem residir nas estruturas de glicanos complexos, devido ao enorme potencial de codificação que está muito além do potencial de codificação dos aminoácidos ou nucleotídeos. Este potencial é baseado não apenas na variação da

sequência de monossacarídeos nas cadeias oligossacarídicas, mas também sobre a possibilidade de modificação pós-transcricional dos açúcares (JANKOVIC; KOSANOVI; MILUTINOV, 2008).

A glicosilação é um processo que envolve um sistema fortemente regulamentado de enzimas e transportadores que utilizam células de mamíferos para ligar proteínas e lipídios a vários tipos de estruturas oligossacarídicas. É considerada uma das modificações co- ou pós-transcricionais mais comum, que atua modulando as propriedades físicas, químicas e biológicas de uma proteína devido a variação de oligossacarídeos que consequentemente diversifica as funções biológicas das proteínas (CAMPBELL; SAMPATHKUMAR; YAREMA, 2007).

Entre todas as variedades de moléculas de adesão, as estruturas de carboidratos na superfície celular têm sido foco de muitos esforços de investigação, isso se deve ao enorme potencial para codificação de informação biológica fornecida por essas biomoléculas, que atuam “pontilhando” a superfície externa de todas as células, servindo como marcador de identificação celular para o mundo circundante. Tipicamente, os carboidratos e as lectinas complementares estão localizados nas superfícies de células opostas, que podem ser do mesmo tipo ou de tipos diferentes, suas interações são necessárias para o desenvolvimento das células, diferenciação e estados patológicos (NANGIA-MAKKER *et al.*, 2002).





**Figura 7:** Representação esquemática das comuns classes de glicoconjugados expressados em células humanas.  
**Fonte:** Reis *et al.*, 2011.

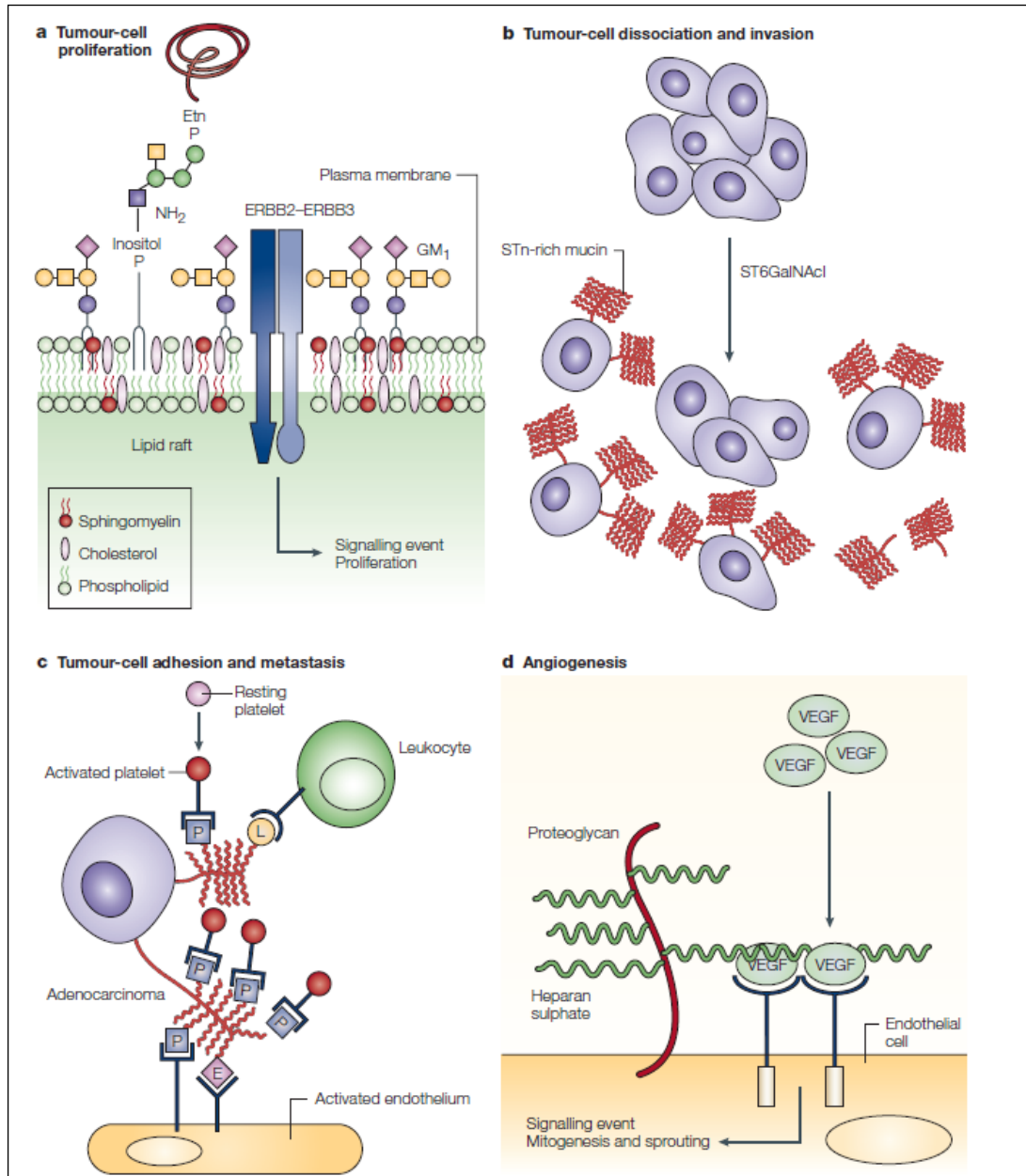
Em virtude de sua localização periférica, epítomos de oligossacarídeos em proteínas e lipídios exercem importantes funções fisiológicas tais como, desenvolvimento embrionário normal, diferenciação e crescimento celular, inibição por contato, reconhecimento célula-célula, interação patógeno-hospedeiro, reconhecimento imunológico, desenvolvimento de doenças, metástase, tráfico, localização e degradação intracelular de biomoléculas e rigidez da membrana (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Os glicoconjugados presentes em proteínas e lipídios na superfície celular são variavelmente expressos durante o desenvolvimento e oncogênese. A glicosilação é um fenômeno comumente associado com desordens hereditárias, imunodeficiência e também com transformação maligna, invasão e metástase de células do câncer, desse modo, quase todos os tipos de células malignas demonstram alterações em seus padrões de glicosilação quando

comparadas as suas contrapartes normais (CHAN; CHOI; HO, 2001; GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Embora muitos fatores contribuam para a glicosilação aberrante no câncer, tais como, a disponibilidade e localização de nucleotídeos doadores de açúcar, um dos mecanismos primários parece ser a expressão diferencial de glicosiltransferases e glicosidases envolvidas na síntese e catabolismo dos glicanos, respectivamente. Por esta razão, alterações na expressão dessas enzimas pode desencadear uma cascata de eventos envolvidos na transformação oncogênica das células (MEANY; CHAN, 2011; BLOME *et al.*, 2009).

Os carboidratos e oligossacarídeos modificados têm a capacidade de interferir na interação carboidratos-proteínas e, portanto, inibem o reconhecimento célula-célula e os processos de adesão, que desempenham papel importante no crescimento e progressão do câncer (Figura 8), incluindo eventos como: proliferação celular, dissociação da célula do tumor e invasão, disseminação de células tumorais pelo organismo (metástase), angiogênese e evasão do sistema imune, adesão a plaquetas, leucócitos ou a células endoteliais dos vasos sanguíneos ou linfático (FUSTER; ESKO, 2005).



**Figura 8:** Participação dos glicanos na maior parte dos eventos durante a progressão tumoral.  
**Fonte:** FUSTER; ESKO, 2005.

Embora glicosfingolípídios sejam imunógenos relativamente pobres, certos glicosfingolípídios são utilizados com o intuito de ativar a resposta imune do hospedeiro contra glicanos alvos comuns em alguns tipos de tumores, seja através da ativação da imunidade passiva (pela infusão de anticorpos contra glicanos), ou por meio da imunidade ativa (por provocar uma resposta hospedeiro ao glicano). Esta abordagem apresentou-se

promissora em testes clínicos em vários tipos de câncer, incluindo carcinoma prostático (SLOVIN, 1999).

Até agora, investigações glicobiológicas têm resultado em muitas informações medicinalmente relevantes, permitindo traçar novas rotas na pesquisa do câncer, relacionado a detecção da doença e manipulação clínica com a intenção de criar novas estratégias para prevenção e terapia. As lectinas têm sido amplamente utilizadas como ferramenta de detecção e análise do perfil de expressão de carboidratos no câncer devido a eficiente capacidade de reconhecimento de glicanos específicos (BROOKS, 2009).

## 2.6 Lectinas

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que reconhecem carboidratos específicos, por meio de ao menos, dois sítios de ligação ao carboidrato, através do domínio de reconhecimento de carboidratos (SHARON; LIS, 2004). Estas moléculas aglutinam células animais e vegetais, precipitam polissacarídeos e glicoconjugados. São amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em seres unicelulares, pluricelulares e plantas (WANG; HG, 2006).

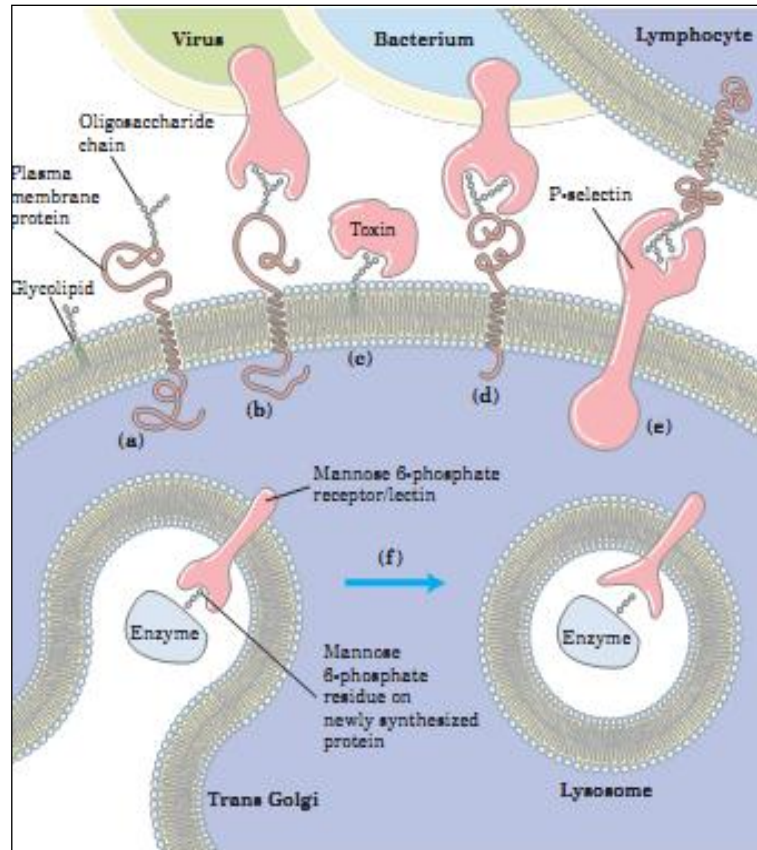
A pesquisa por lectinas iniciou-se em 1888 quando Herrmann Stilmark estudando a toxicidade de extratos da mamona (*Ricinus communis*) descobriu que uma proteína, a qual chamou de ricina, era capaz de aglutinar eritrócitos animais e humanos, porém o estudo sobre estas proteínas só começou a ganhar ímpeto em 1960 (Sharon e Lis, 1998); abrindo uma vasta área de aplicação para lectinas (GABOR *et al.*, 2001)

A ênfase que é dada quanto à origem não imune das lectinas serve para distingui-las de anticorpos anticarboidratos que aglutina células. Enquanto os anticorpos são estruturalmente similares, as lectinas diferem entre si quanto à composição aminoacídica,

requerimento de metais, peso molecular e estrutura tridimensional. Além disso, as lectinas estão presentes em organismos que não possuem sistema imune, como plantas e bactérias (GABIUS, 2001).

De acordo com a quantidade e especificidade dos domínios de ligação a carboidratos, as lectinas são subdivididas em: merolectina, hololectina, quimerolectina e superlectina. As lectinas de plantas geralmente pertencem a classe das hololectinas por possuírem pelo menos dois domínios idênticos ou mais domínios homólogos ligantes a açúcares, ou seja, são di ou multivalentes, aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados (VAN DAMME *et al.*, 1996).

Várias lectinas endógenas animais são importantes em diversos processos biológicos fundamentais, tais como controle de qualidade de proteínas secretadas, reconhecimento célula-célula, interações células-matriz extracelular, fertilização de gametas, desenvolvimento embrionário, crescimento celular, diferenciação celular, sinalização celular, apoptose, imunomodulação, inflamação, adesão e motilidade celular, e reconhecimento patógeno-hospedeiro (Figura 9). Muitas lectinas existem na superfície das células imunes e células endoteliais que revestem a vasculatura, como proteínas da matrix extracelular ou como moléculas de adesão solúveis tais como, proteínas ligadoras de manose ou lectinas ligadoras de galactose (galectinas), que podem se ligar aos glicanos presentes nas células do tumor (SHARON; LIS, 1998; FUSTER; ESKO, 2005).



**Figura 9.** Interações entre diversos tipos celulares através do reconhecimento entre lectinas-carboidratos.

**Fonte:** LEHNINGER, 2006.

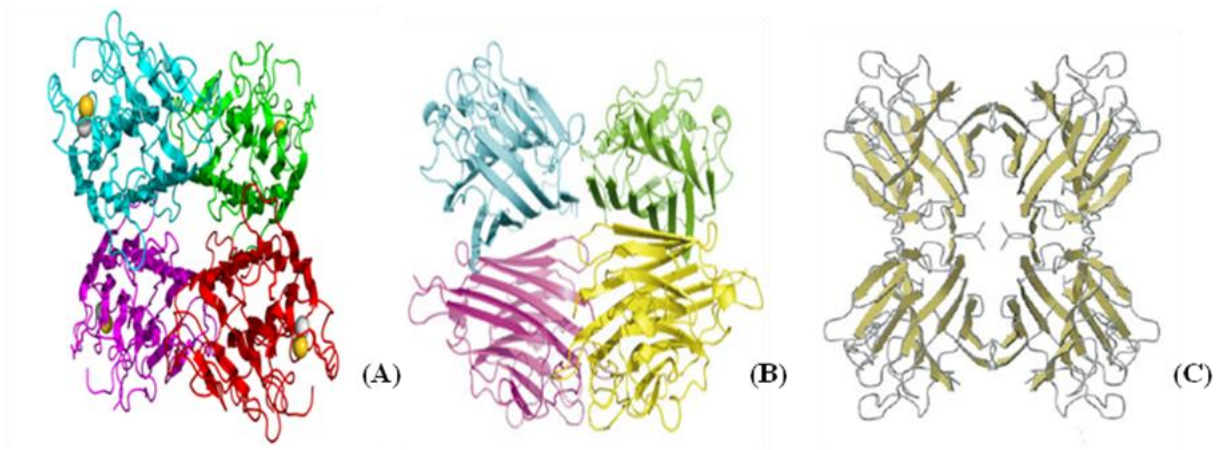
As lectinas de leguminosas existem como oligômeros, característica natural das proteínas que exercem tantas implicações funcionais importantes, tais como aglutinação de células, atividade mitogênica, entre outras. Todas as lectinas de leguminosas apresentam estrutura terciária similar, no entanto, elas diferem consideravelmente na especificidade ao ligante e estruturas quaternária (SRINIVAS *et al.*, 2001).

A Concanavalina A (Con A) é uma lectina vegetal obtida das sementes de *Canavalia ensiformes*, é o membro mais bem conhecido das lectinas de leguminosas devido as inúmeras aplicações biológicas. Ela reconhece e se liga especificamente à resíduos de  $\alpha$ -D-glicose/manose de carboidratos complexos, exibindo alta afinidade por oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolípídios de superfície celular. A estrutura molecular é apresentada como um tetrâmero acima de pH 7 e um dímero abaixo de pH 6, com cada monômero de Con A

apresentando peso molecular de 26 KDa e um sítio de ligação à carboidratos (CHATTERJEE; MANDAL, 2005).

A lectina *Peanut agglutinin* (PNA), isolada a partir do amendoim *Arachis hypogea*, é uma proteína não glicosilada, homotetramérica com monômeros de 27 KDa que possuem especificidade idêntica a sequência de carboidratos Gal- $\beta$ (1-3)-GalNAc. O tetrâmero possui um peso molecular em torno de 110 KDa e apresenta uma incomum estrutura quaternária aberta, que pode ser descrita como um dímero de um dímero. A PNA em pH neutro consiste em um tetrâmero, enquanto que em pH ácido ela se dissocia formando dímero. O termo “peanut agglutinin” foi originado a partir da sua habilidade em aglutinar linfócitos T e hemácias tratadas com a enzima neuraminidase (DEV; KHAN; SUROLIA, 2006).

A lectina *Ulex europaeus agglutinin-I* (UEA-I) é uma metalo-glicoproteína que reconhece especificamente resíduos de  $\alpha$ -L-fucose e oligossacarídeos que contêm fucose, como por exemplo,  $\alpha$ -L-fuc(1 $\rightarrow$ 2) $\beta$ -D-Gal(1 $\rightarrow$ 4) $\beta$ -D-GlcNAc. A organização estrutural quaternária dimérica da lectina UEA-I, bem como as estruturas terciárias das subunidades monoméricas são semelhantes as que ocorrem entre as lectinas de leguminosas. Todavia, algumas diferenças estruturais monoméricas são observadas, estas incluem substituição dos resíduos de alanina que atuam no sítio de ligação aos glicanos específicos comuns às demais lectinas, por treonina nos monômeros de UEA, cada um deles possuem dois íons metálicos, um de cálcio e outro de mangânes e, além disso, frações oligossacarídicas estão N-ligadas nos resíduos de aminoácido 23 e 111 na sequência proteica (AUDETTE; VANDONSELAAR; DELBAERE, 2000).



**Figura 10.** Representação da estrutura tridimensional da ConA (A), PNA (B) e UEA-I (C).

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

### 2.6.1 Aplicações das Lectinas

As lectinas vêm se mostrando como preciosa ferramenta nas pesquisas bioquímicas e biomédicas devido a sua estabilidade química, fácil utilização e sua alta especificidade no reconhecimento de carboidratos distintos, associada a grande disponibilidade na natureza, sendo otimizadas em diversas aplicações biológicas (SAMÉS *et al.*, 2001).

Estudos utilizando diferentes lectinas imobilizadas em microesferas de agarose frente linhagens celulares de cólon humano, nas condições normais e neoplásicas, mostraram que as lectinas reconheciam mais as células de linhagem tumoral e que essa ligação resultava em um maior efeito biológico promovendo assim inibição da proliferação da linhagem de células do câncer em relação à linhagem normal (PETROSSIAN; WELTY, 2007).

Essa característica das lectinas em reconhecer carboidratos de superfície de células tumorais, tem reforçado o uso dessas como moléculas carreadoras que podem ser conjugados com as drogas quimioterápicas e entregar os agentes anti-câncer diretamente no local da



doença, além disso, como algumas lectinas são mitogênicas, elas podem potencializar a eficácia da droga por sinergismo (OPPENHEIMER; ALVAREZ; NNOLI, 2008).

As dificuldades na produção de uma vacina contra o HIV / AIDS deve-se ao fato de que a superfície do vírus é revestida por carboidratos que mascaram os antígenos virais subjacentes, que podem ser bons alvos para a produção de vacinas. Grande parte dos carboidratos que revestem o vírus é rica em resíduos de manose (SCANLAN *et al.*, 2007). Lectinas, como a cianovirina, isolada a partir de bactérias, se ligam preferencialmente a resíduos de manose, essas lectinas estão sendo investigadas como possíveis ferramentas terapêuticas (TSAI *et al.*, 2004).

As lectinas também tem sido utilizadas em outras aplicações, como atividade antimicrobiana, inibindo a crescimento de fungos (FREIRE, 2002), identificação de microorganismo (COBO *et al.*, 2004) atividade inseticida (MACEDO, 2007), isolamento enzimático (LIMA, 1997).

A capacidade das lectinas em reconhecer e ligar-se a glicanos específicos, associado à mudança no perfil de expressão de carboidratos de superfície nas células tumorais, permite que as lectinas sejam utilizadas na caracterização e diferenciação de tecidos normais e transformados. Além disso, esta técnica é sensível, estável e de fácil manipulação, contribuindo com informações sobre o desenvolvimento, estágios de diferenciação, grau de malignidade e potencial do tecido em desenvolver metástase a partir do estabelecimento de perfil de carboidratos do tecido estudado (BELTRÃO, 1998; 2003; MELO-JÚNIOR *et al.*, 2006).

A revelação do reconhecimento do perfil de glicosilação tecidual através de lectinas têm sido realizada utilizando vários tipos de substâncias reveladoras, tais como os reveladores cromógenos cujas lectinas estão conjugadas a peroxidase ou biotina, as quais foram utilizadas na investigação de carcinoma ductal infiltrante (BELTRÃO *et al.*, 1998), meningioma

(BELTRÃO, 2003), câncer de pele (MELO-JÚNIOR, *et al.*, 2006), colite ulcerativa (MELO-JÚNIOR *et al.*, 2004), carcinoma mucoepidermóide de glândula parótida (SOBRAL *et al.*, 2010), estudo de lesões granulomatosas (MELO-JÚNIOR *et al.*, 2008), mucosa gástrica com e sem *H. pilory* (MELO-JÚNIOR *et al.*, 2008), alterações no sistema nervoso central (NISHIMURA *et al.*, 2000) e neoplasias prostáticas (ARENAS *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2010), reveladores fluorescentes como isotiocionato de fluoresceína utilizados em marcações em mucosa gástrica (MELO-JÚNIOR *et al.*, 2008) e *quantum dots* utilizados em fibroadenoma mamário (SANTOS *et al.*, 2006) e por fim, os reveladores quimiluminescentes, como éster de acridina, utilizados em tumores mamários como fibroadenoma e carcinoma ductal infiltrante (CAMPOS *et al.*, 2006; BRUSTEIN *et al.*, 2011).

## 2.7 Quimiluminescência

A luminescência foi definida depois da descoberta do elétron e da estrutura do átomo, como sendo um processo no qual, moléculas ou átomos excitados liberam o excesso de energia na forma de luz, proveniente de fonte biológica ou química (VAN DYKE, 1988). A denominação desses fenômenos luminescentes depende da fonte de energia responsável pela produção do estado excitado, de modo que, se a fonte de energia for proveniente de uma reação química, esse fenômeno luminescente será denominado quimiluminescência (CAMPBELL *et al.*, 1985).

Os primeiros relatos a cerca do fenômeno quimiluminescente foram descritos em 1877, quando Radziszewski sintetizou a lofina e observou que a mesma emitia luz verde ao reagir com o oxigênio na presença de uma base forte, e em 1887, quando Eder sintetizou o

pirogalol. No entanto, a definição do termo quimiluminescência foi descrito pela primeira vez por Eilhand Wiedeman no ano de 1888 (GARCIA-CAMPAÑA; BAEYENS, 2000).

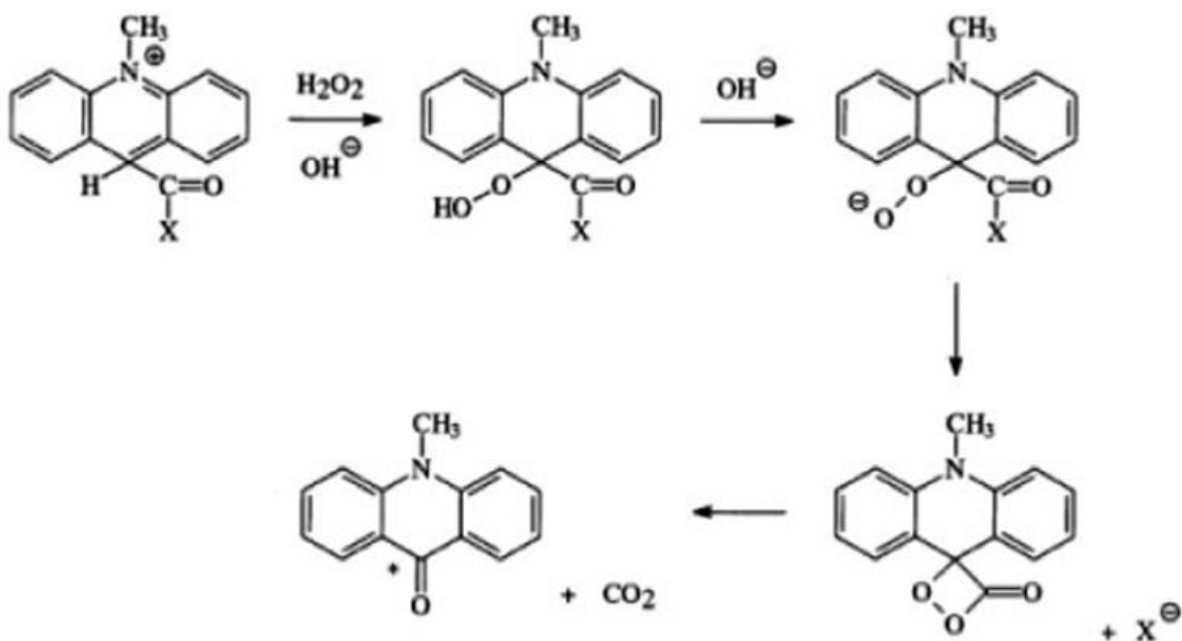
A quimiluminescência é a emissão de radiação eletromagnética que é observada quando o produto excitado vibronicamente a partir de uma reação química exergônica relaxa ao seu estado fundamental emitindo luz (WEEKS *et al.*, 1992). Essa reação química é capaz de produzir energia em quantidade suficiente para induzir a transição de um elétron de seu estado fundamental para um estado eletronicamente excitado, assim, o retorno desse elétron para o estado inicial resulta na emissão de um fóton (DODEIGNE; THUNUS; LEJEUNE, 2000).

Substâncias quimiluminescentes podem ser detectadas na faixa de fentomoles ou atomoles ( $10^{-15}$  a  $10^{-18}$ ) e abaixo de tipomoles ( $10^{-21}$  mol), com sensibilidade superior aos ensaios espectrofométricos ( $10^{-6}$  a  $10^{-12}$ ) e fluorimétricos ( $10^{-9}$  a  $10^{-12}$  mol) (CAMPBELL *et al.*, 1985). Vários compostos orgânicos exibem quimiluminescência em condições apropriadas, dentre os quais destacam-se o luminol, isoluminol e éster de acridina ou seus derivados como marcadores utilizados em imunoensaios quimiluminescentes (RODA *et al.*, 2000).

Embora o luminol tenha sido um dos primeiros compostos a serem descritos, juntamente com o isoluminol e seus derivados, como marcadores de proteínas, eles apresentam desvantagens a serem consideradas, como a diminuição do quantum de luz quando acoplado às proteínas e o requerimento de um catalisador na reação, o que aumenta o “background”, reduzindo a sensibilidade da técnica (STUART; WEEK, 1985).

Sais de acridina podem ser estimulados a produzir luz em presença de solução alcalina de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), na ausência de catalisador. Tais compostos incluem os derivados de acridina, que são moléculas que possuem um nitrogênio quaternário central e uma ramificação no carbono 9 onde está inserido um radical fenil instável (WEEKS *et al.*, 1983).

Diferentemente do luminol e isoluminol, os ésteres de acridina possuem o seu mecanismo de ação totalmente esclarecido em condição aquosa. A reação quimiluminescente do éster de acridina (Figura 11) é realizada em solução alcalina de peróxido de hidrogênio, onde este se dissocia para formar sua base conjugada, o ânion hidroxiperoxil ( $\text{HO}_2^-$ ), que ataca a estrutura do anel da acridina clivando múltiplas ligações, resultando em um rearranjo intermolecular formando o intermediário dioxetano. A decomposição deste intermediário resulta na síntese de uma molécula excitada, a N-metilacridona, que retorna a seu estado energético basal com emissão de luz por volta de 430 nm, a qual é registrada por detectores de fótons em aparelhos denominados luminômetros (DODEIGNE; THUNUS; LEJEUNE, 2000; GARCIA-CAMPAÑA *et al.*, 2003).



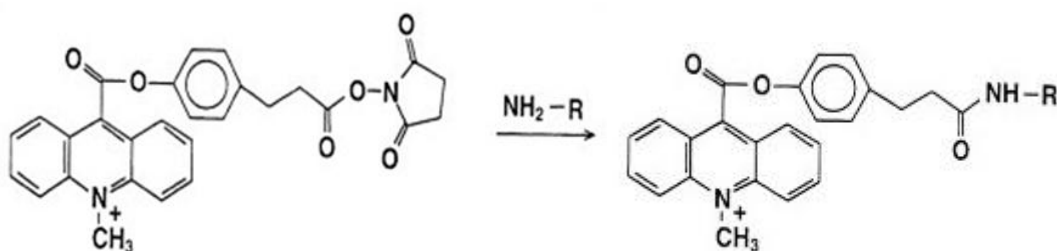
**Figura 11** - Mecanismo provável da quimiluminescência dos derivados de acridina.

**Fonte:** Dodeigne; Thunus; Lejeune, 2000.

O éster de acridina foi introduzido em imunoenaios a partir da necessidade de substituir os marcadores radioisótopos que estavam se tornando pouco populares devido à sua curta meia vida, ao perigo potencial à saúde e aos problemas quanto aos dejetos gerados

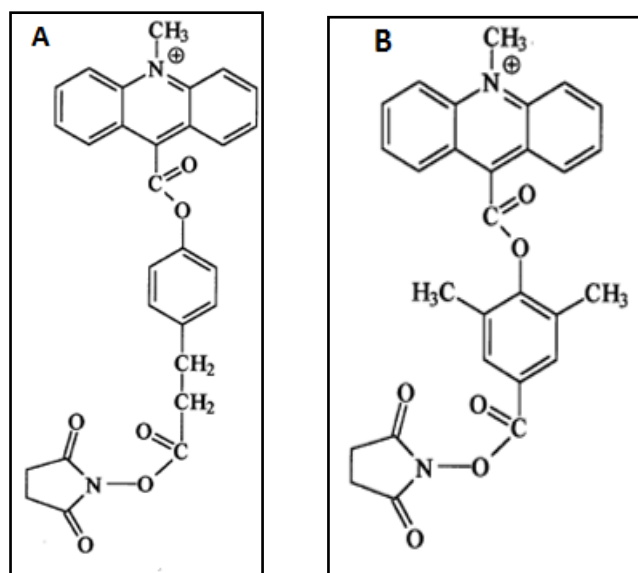
(WEEKS *et al.*, 1986). Esse composto foi considerado um eficaz marcador para biomacromoléculas e por esta razão recebeu um grande interesse como base para o desenvolvimento de ensaios quimiluminescentes de alto desempenho usando moléculas marcadas com essa substância (YANG *et al.*, 2002)

A aplicação dos ésteres de acridina 4-(2-succinimidiloxicarboniletil) fenil-10-metilacridina-9-carboxilato fluorosulfonado em imunoensaios quimiluminescentes foi realizada pela primeira vez por Weeks e colaboradores (1983), na preparação de anticorpos mono- ou policlonais marcados contra a  $\alpha$ -1-fetoproteína. Esse estudo inicial revelou que o marcador reagia sob condições brandas com aminas alifáticas primárias e secundárias, sendo, portanto capaz de marcar proteínas (Figura 12) e, além disso, foi demonstrado que este composto tinha alta sensibilidade de detecção, igual ou superior ao  $I^{125}$ .



**Figura 12.** Reação de conjugação da proteína ( $NH_2 - R$ ) ao Éster de Acridina N-hidroxisuccinimida, **Fonte:** GARCIA-CAMPAÑA *et al.*, 2003.

No entanto, foi observado que esse éster fenil de acridina apresentava a seguinte desvantagem: a ligação éster entre o anel acridina e o grupamento fenol era amplamente instável, sendo facilmente hidrolisada (SATO, 1996). Objetivando melhorar a estabilidade e as propriedades quimiluminescentes desse éster, que havia se apresentado como um eficiente marcador, Law e colaboradores (1989) e Yin e colaboradores (2008) descreveram o uso de um éster de acridina hidroliticamente estável (Figura 13) chamado dimetil éster de acridina (DMAE), o qual é comercialmente aplicado em equipamentos automatizados.



**Figura 13** - Modificação no éster de acridina (A) pela inserção de dois grupos metil no fenol conferindo estabilidade hidrolítica (B)  
**Fonte:** Smith *et al.*, 2009.

O uso da quimiluminescência tem sido extensivamente pesquisado por décadas, e uma ampla gama de métodos quimiluminescentes tem sido amplamente aplicada tanto na rotina clínica quanto na pesquisa clínica, isso se deve aos benefícios que incluem alta sensibilidade com limites de detecção ultrasensível (attomole-zeptomole), sendo capazes de detectar com precisão, em concentrações muito baixas, enzimas, espécies reativas, proteínas e ácidos nucleicos, entre outros compostos de interesse biológico, seletividade, desenvolvimento de ensaios rápidos e uma ampla gama de aplicações analítica (KRICKA, 2003).

Entre os vários marcadores quimiluminescentes, os esteres de acridina são particularmente atraentes porque têm altos rendimentos quânticos, com limites de detecção na faixa de attomoles, exibem emissão rápida de luz, possui um pequeno tamanho que permite protocolos de marcação simples para proteínas e ácidos nucleicos, são solúveis em água e estáveis contra hidrólise (NATRAJAN *et al.*, 2010). Baseado em tais propriedades, eles são usados em análise ambiental, testes bioquímicos e imunológicos, ensaios de atividade enzimática e marcação de fragmentos de oligossacarídeos para quantificar bactérias, vírus ou outros biomarcadores (XIAO-JING *et al.*, 2009).

### 3. REFERÊNCIAS

AUDETTE, G. F.; VANDONSELAAR, M.; DELBAERE, L. T. J. the 2.2 Å resolution structure of the O(H) blood-group-specific lectin I from *Ulex europaeus*. **J Mol Biol**, v. 304, p.423-433, 2000.

AKIMOTO, T. et al. Anatomy-based inverse optimization in high-dose-rate brachytherapy combined with hypofractionated external beam radiotherapy for localized prostate cancer: comparison of incidence of acute genitourinary toxicity between anatomy-based inverse optimization and geometric optimization. **Int.J. Radiation Oncology Biol. Phys**, v. 5, p. 1360-6, 2006.

American Cancer Society, Cancer statistic 2011, Available in <http://www.cancer.org/Cancer/ProstateCancer/DetailedGuide/prostate-cancer-key-statistics>.

APPLELWHITE, J. C. et al. Transrectal ultrasound and biopsy in the early diagnosis of prostate cancer. **Cancer Control**, v. 8, p. 141-150, 2001

ARENAS, et al. A lectin histochemistry comparative study in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma. **Glycoconj J**, v. 16, p. 375-382, 1999.

AVERBECK, M.A. et al. Diagnóstico e Tratamento da Hiperplasia Benigna da Próstata. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 54, p. 471-477, 2010.

BELTRÃO, E. I. C. et al. Binding evaluation of isoform *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, p. 125-134, 1998.

BELTRÃO, E. I. C. et al. Infiltrating ductal carcinoma: a lectin histochemistry study. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco, Recife*, n.46, p.32-35, 2001.

BELTRÃO, E. I. C. et al. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. **Eur J Histochem**, v.47, p. 139-42, 2003.

BLOME, B. et al. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. **J Hepatol**, v. 50, p. 592-603, 2009.

BREIVIK, J. The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. **Seminars in cancer biology**, v. 15, p. 51-60, 2005.

BROOKS, S. A. Strategies for analysis of the glycosylation of proteins: Current Status and future perspectives. **Mol Biotechnol**, v. 43, p. 76-88, 2009.

BRUSTEIN, V. P. et al. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. **Appl Biochem Biotechnol**, 2011.

CALVETE, A. C. et al. Avaliação da extensão da neoplasia em câncer da próstata: valor do PSA, da porcentagem de fragmentos positivos e da escala de Gleason. **Prev. Assoc. Med. Bras**, v. 49, p. 250-254, 2003.

CAMPBELL, A. K., HALLET, M. B. e WEEKS, I. Chemiluminescent as an analytical tool in cell biology and medicine. **Methods in Biochemical Analysis**, v. 31, p. 317-416, 1985.

CAMPBELL, C. T.; SAMPATHKUMAR, S. G.; YAREMA, K. J. Metallo-oligosaccharide engineering: perspectives, applications, and future directions. **Mol Biosyst**, v. 3, p. 187-194, 2007.

CAMPOS, L. M. et al. Acridinium Ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. **Biomarkers**, v. 11, p. 480 – 484, 2006.

CHALABI, S. et al. The expression of free oligosaccharides in human seminal plasma, **J Biol Chem**, v. 277, p. 32562-32570, 2002.

CHAN, F.L.; CHOI, H. L.; HO, S.M. Analysis of glycoconjugate patterns of normal and hormone-induced dysplastic noble rat prostates, and an androgen-independent noble rat prostate tumor, by lectin histochemistry and protein blotting. **The Prostate**. v. 46, p. 21-32, 2001.

CHATTERJEE, A.; MANDAL, D. K. Quaternary association and reactivation of dimeric concanavalin A. **Int Journal of Biol Macromol**, v. 35, p. 103-109, 2005.

COBO, E. R. et al. Lectin binding patterns and immunohistochemical antigen detection in the genitalia of *Tritrichomonas foetus*-infected heifers. **J. Comp. Path**, v. 131, p. 127–134, 2004.

CRAWFORD, E. D. Epidemiology of prostate cancer. **J. Urology**, v.62, p. 3-12, 2003.

DEV, S.; KHAN, R.H.; SUROLIA, A. 2,2,2-trifluoroethanol-induced structural change of Peanut agglutinin at different pH: A comparative account. **IUBMB Life**, v. 58, p. 473-479, 2006.



Dini L.I. Koff W.T. Perfil do câncer de próstata no hospital das clínicas de Porto Alegre. **Ver.Assoc. Méd.Bras.** v. 52, p. 28-32, 2006.

DODEIGNE, C.; THUNUS, L.; LEJEUNE, R. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. **Talanta**, v. 51, p. 415-439, 2000.

DWEK, M. V.; JENKS, A.; LEATHEM, A. J. C. A sensitive assay to measure biomarker glycosylation demonstrates increased fucosylation of prostate specific antigen (PSA) in patients with prostate cancer compared with benign prostatic hyperplasia. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, p. 1935–1939, 2010.

FREIRE, M. G. M. et al. Isolation and partial characterisation of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interfere with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

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

GABOR, F.; KLAUSEGGER, U. WITRTH, M. The Interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins With prostate cancer cells DU-145. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 221, p.35-47, 2001.

GABIUS, H. J. Glycohistochemistry: The why and how of detection and localization of endogenous lectins. **Anat Histol Embryol**, v. 30, p. 3-31, 2001.

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

GARCIA-CAMPAÑA, A. M. et al. Derivatization of biomolecules for chemiluminescent detection in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 793, p. 49-74, 2003.

GOO, Y. A.; GOODLETT, D. R. Advances in proteomic prostate cancer biomarker Discovery. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 1839 – 1850, 2010.

GERMEINER, P. et al., Lectinomics II. A highway to biomedical/ clinical diagnostics. **Biotechnology Advances**, v.27, p. 1-15, 2009.

GRAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S.B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, p. 236-246, 2011.

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 10, p. 57-70, 2000.

HO, C.K.M. et al. estrogen and benign prostatic hyperplasia: effects on stromal cell proliferation and local formation from androgen. **Journal of Endocrinology**, v. 197, p. 483–491, 2008.

HO, S.M. et al. Estrogens and Prostate Cancer: Etiology, Mediators, Prevention, and Management. **Endocrinol Metab Clin N Am**, v. 40, p. 591–614, 2011.

HUMPHREY, P.A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. **Modern Pathology**, v. 17, p. 292-306, 2004.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Câncer de Próstata / Epidemiologia. Instituto Nacional do Câncer, 2006. Disponível em : URL: [Http://www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)(em janeiro de 2012).

JACOB, R.A.; Burri, B.J. Oxidative damage and defensive. **Am J Clin Nutr**, v. 63, p. 9855-9905, 1996.

JAHNSSON, J. E. et al. Natural history of early localized prostate cancer. **JAMA**, V. 291, P. 2713-2719, 2004.

JANKOVIC, M.; KOSANONI, M.; MILUTINOVI, B. Glycans as a target in the detection of reproductive tract cancers. **JMB**, v. 27 p. 17-29, 2008.

KENNEDY J.F., PAIVA P.M.G., CORREIA M.T.S., CAVALCANTI M.S.M., Coelho L.C.B.B. Lectins, Versatile proteins of recognition: a Review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26 p. 219-30, 1995.

KHAN, N.; ADHAMI,; MUKHTAR, H. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 17, p. 39-52, 2010.

KLAUSNER, J.S. et al. Recent development in the diagnosis and treatment of HPB and prostatic carcinoma. **Proc. Am. Coll.Vett.Int.Med**, p. 547-548, 1994.

KRICKA, L. J. Clinical applications of chemiluminescence. **Anal Chim Acta**, v. 500, p. 279-286, 2003.

KULIGOWSKA E, BARISH M.A, FELON H.M., BLAKE M. Predictors of prostate carcinoma: accuracy of gray scale and color Doppler US and serum markers. **Radiology**, v. 220, p.757-764, 2001.

LAW, S.T.; MILLER, T.; PIRAN, U.; KLUKAS, C.; CHANG, S.; UNGER, J. Novel polysubstituted aryl acridinium esters and their use in immunoassay, **J. Biolumin. Chemilumin**, v. 4, p. 88–98, 1989.

LEE D.K. CHAWNSHANG C. Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. **Journal of Steroid Biochemistry e Molecular Biology**. v. 84 p. 41-49, 2003.

LEHNINGER, A. L. Princípios de bioquímica. 4ª edição, São Paulo, **Sarvier**, 2006.

LEPOR H. M. D. Pathophysiology of benign prostatic hyperplasia in the aging male population. **Rev.Urol**. v. 7 p. 3-12, 2005.

LEPOR, H. M. D. Pathophysiology, epidemiology and natural history of benign prostatic hyperplasia. **Rev.Urol**. v. 6, p. 3-10, 2004.

LIMA, A. L. R. et al. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, n. 2010, p. 1- 6, 2010.

LOWSLEY, O.S. et al. The development of the human prostate gland with reference to the development at other structures at the neck of the urinary bladder. **Am J Act**, v. 13, p. 299-346, 1912.

MACEDO, M. L. et al. Insecticidal action of Bauhinia monandra leaf lectin ( B mol) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera Pyralidae), *zabrotes subfasciatus* and *callosobruchus maculatus* ( coleóptera Bruchidae). **Comp Biochem Physiol A molIntegr Physiol**. v. 147, p. 486-498, 2007.

MANTOVANI, A. Inflaming metastasis. **Nature**, v. 457, 2009.

MEANY, D. L.; CHAN, D. W. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. **Clinical Proteomics**. v. 8 p. 7, 2011.

MCNEAL, J.G. The prostate gland: Morphology and pathobiology. **Monogr.Urol**. v. 4 p. 3-33,1983.

MELO-JÚNIOR, M. R. et al. Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, p. 123-125, 2004.

MELO-JÚNIOR, M. R. et al. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potencial marker to biochemical alterations and tumor differential diagnosis. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, p. 455-560, 2006.

MELO-JÚNIOR, M. R. et al. Carbohydrates detection in the hepatic egg-granuloma system using lectin histochemistry. **Int J Morphol**, v. 26, p. 967-972, 2008.

MELO-JÚNIOR, M. R. et al. Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to *Helicobacter pylori*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 238-240, 2008.

MILLER J. TARTER T.H. Combination therapy with dietasterida and tamsulosin for the treatment of symptomatic enlarged prostate. **Clinical Interventions in aging**. V. 4, p. 251-258, 2009.

MODY, R.; JOSHI, S.; CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for câncer. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 33, p. 1-10, 1995.

NANGIA-MAKKER, P. et al. Carboidrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, p. 187-192, 2002.

NATRAJAN, A. et al. Enhanced immunoassay sensitivity using chemiluminescent acridinium esters with increased light output. **Anal Biochem**, v. 406, p. 204- 213, 210.

NILLSSON, C.L. Lectins: Analytical tools from nature. **Tallahance, USA: Elsevier**, 2007.

OPPENHEIMER, S. B.; ALVAREZ, M.; NNOLI, J. Carbohydrate-based experimental therapeutics for câncer, HIV/AIDS and other disease. **Acta Histochemica**, v. 110, p. 6-13, 2008.

PETROSSIAN, K.; BANNER, L.R.; OPPENHEIMER, S. B. Lectins binding and effects in culture on human cancer and non-cancer cell lines: Examination of issues of interest in drug design strategies. **Acta Histochemica**, v. 109, p. 491-500, 2007.

REIS, C. A. Et al. Alterations in glycosylations as biomarkers for câncer detection. **J Clin Pathol**, v. 63, p. 322-329, 2010.

REUBER, L.; CADY, J. Overview. In : Hogle W, ed. Prostate cancer. Pittsbergh, P.A. **Oncology Niersing Society**, p. 2-3, 2009.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. Bases patológicas das doenças. 7<sup>a</sup> Edição. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro; p. 338, 2005.

RODA, A. et al. Bio- and Chemiluminescence in bioanalysis. **Fresenius J Analyt Chem**, v. 366, p. 752-759, 2000.

SAMES, K.H. et al. Proteoglycan and lectin histochemistry of neuroendocrine carcinomas of the ski. **FASEB Journal**, v. 15, p. 1072, 2001.

SANTOS, B. S. et al. Cds-Cd (OH)<sub>2</sub> core shell quantum dots functionalized with Concanavalin A for recognition of mammary tumors. **Phys Stat Sol**, v. 3, p. 4017-4022, 2006.

SANTOS, V.C.T., MILITO, M.A., MARCHIORI E. O papel atual da ultra-sonografia transretal da próstata na detecção precoce do câncer prostático. **Radiol. Bras.** v.39, n.3, 2006.

SATO, N. Synthesis and properties of new luminescent 10-carboxymethylacridinium derivatives. **Tetrahedron Letters**, vol. 37, p. 8519-8522, 1996.

SCANLAN, C. N. et al. Exploiting the defensive sugars of HIV-I for drug and vaccine design. **Nature**, v.446, p. 1038-1045, 2007.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: carbohydrate-specific protein that mediate cellular recognition. **Chem Rev**, v. 98, p. 637-674, 1998.

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

SLOVIN, S.F. et al. Carbohydrate vaccines in câncer: immunogenicity of a fully synthetic globo H hexasaccharide conjugate in man. **Proc Natl Acad Sci USA**, V. 96, p. 5710-5715, 1999.

SMITH, K.; YANG, J-J.; LI, Z.; WEEKS, I.; WOODHEAD, S. Synthesis and properties of novel chemiluminescent biological probes: 2- and 3-(2-Succinimidylloxycarbonyl)ethylphenyl acridinium esters. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistr**, v. 203, p. 72-79, 2009.

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

SRINIVAS, V. R. et al. Legume lectin family, the ‘natural mutants of the quaternary state’, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **Biochim Biophys. Acta**, v. 1527, 102 – 111. 2001.

SROUG, M. et al. Prostate disease. **Rev. Med**, v.87, p. 166-177, 2008.

STEVENS, A.; LOWE, J. Histologia Humana. Editora Manole. 2ª Edição, 2002.

STOSS, O. HENKEEL, Biomedical marker molecular for câncer – current status and perspectives. **Targets**. v.3, 2004.

STUART, J.; WEEKS, I. Chemiluminescence immunoassay. **Pure e Appl Chem**, v. 57, p. 523-529, 1985.

TONO, T. C. A., SCHOFFEN, J. P. F. Câncer de próstata: uma revisão de literatura. **Revista Saúde e Pesq**, Brasil, v. 2, p. 403-410, 2009.

TSAI, C.C. et al. Cianovirin-N inibits AIDS virus infections in vaginal transmission models. **AIDS Res Hum Retro-viruses**, v. 20, p. 11-18, 2004.

YANG, M. et al. Electrochemiluminescence assay for the detection of acridinium esters. **Analítica et Chimica Acta**, v. 461, p. 141-146, 2002.

YIN, D.; CUI, D.; GAO, F.; HE, R.; HE, Y.; LIU, Y.; SHEN, D.; WU, M. A rapid and sensitive chemiluminescent immunoassay of total thyroxine with DMAE.NHS-labeled, J. **Immunoassay Immunochem**. v. 29, p. 257–265, 2008.

XIAO-JING, M. U. et al. Synthesis and spectroscopic properties of acridinium- 9-sulfonamides. **Chin J Anal Chem**, v. 37, p. 970-974, 2009.

WANG, H. X.; HG, T.B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. **Biochem Biophys Commun**, v. 342, p. 349-353, 2006.

WEEKS, I. et al. Acridinium esters as high-specific-activity label in immunoassay. **Clin Chem**, v. 29, p. 1474-1479, 1983.

WEEKS, J. et al. Immunoassay using acridinium esters. **Methods in Enzimology**, v. 133, p. 366-387, 1986.

WEEKS, I. Chemiluminescence immunoassay. In the Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry. Edited by G. Svehla. **Elsevier Publishers B V**, Amsterdam, 1992, p.1.

WELTY, L. et al. Analysis of unconventional approaches for the rapid detection of surface lectin binding ligands on human cell lines. **Acta Histochem**, v. 107, p. 411-420, 2006.

WROCLAWSKI E. R., DAMIÃO R., ORTIZ V: Guia Prático de Urologia da SBU: Segmento, 2003.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Geral**

Avaliar o perfil de expressão de resíduos de carboidratos em tecidos prostáticos humanos normais e neoplásicos utilizando lectinas conjugadas a éster de acridina.

### **4.2 Específicos**

- Conjugar as lectinas (Con A, PNA e UEA-I) ao éster de acridina (EA);
- Purificar o conjugado lectina-EA através de cromatografia de exclusão molecular utilizando Sephadex G-25;
- Marcar os tecidos prostáticos normais e transformados adenocarcinoma prostático (AP) e hiperplasia prostática benigna (HPB) com o conjugado lectina-EA;
- Quantificar a emissão de fótons (RLU) dos conjugados lectina-EA nos tecidos avaliados;
- Correlacionar a intensidade de emissão de fótons (RLU) e avaliar o potencial quimiluminescente dos conjugados lectina-EA com os tecidos diagnosticados como AP e HPB.



**5. ARTIGO:****HISTOCHEMILUMINESCENT DETERMINATION OF GLYCOPHENOTYPE IN PROSTATIC  
NEOPLASIS**

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico Glycobiology.

Fator de Impacto: 3.791



## **HISTOCHEMILUMINESCENT DETERMINATION OF GLYCOPHENOTYPE IN PROSTATIC NEOPLASIS**

Silva L. P. B. G., Almeida S. M. V., Silva M. P. C., Beltrão E. I. C., Carvalho Júnior L. B.\*

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

\*Corresponding author, Carvalho Júnior L. B. Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

Phone: +55(81)21268484 Fax: +55(81)21268485

Email: [lbcj@hotmail.com.br](mailto:lbcj@hotmail.com.br)

## ABSTRACT

This work aimed to develop a chemiluminescent method to evaluate the glycophenotype in prostatic tissues: normal, benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostatic adenocarcinoma (PCa). Tissue samples were incubated with *Concanavalin A* (Con A), *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-I) and *Peanut agglutinin* (PNA) lectins conjugated to acridinium ester (Lectin-AE). The produced conjugates showed to recognize their specific carbohydrate by assaying their hemagglutinating activity. The chemiluminescence of the tissue-lectin-AE complex was expressed in relative light units (RLU). Transformed tissues ( $0.25\text{ cm}^2$  by  $8\text{ }\mu\text{m}$ ) showed a statistical significant lower  $\alpha$ -D-glucose/manose (BPH:  $226,931 \pm 17,436$ ; PCa:  $239,520 \pm 12,398$ ) and Gal- $\beta$ (1-3)-GalNAc (BPH:  $28,754 \pm 2,157$ ; PCa:  $16,728 \pm 1,204$ ) expressions than normal tissues ( $367,566 \pm 48,550$  and  $409,289 \pm 22,336$ , respectively). However, higher  $\alpha$ -L-fucose expression was observed in PCa ( $251,118 \pm 14,193$ ) in relation to normal ( $200,979 \pm 21,318$ ) and BHP ( $169,758 \pm 10,264$ ) tissues. It was observed an expressive decreasing of the values of RLU by inhibition of the interaction between tissues and lectins using their specific carbohydrates. The relationship between RLU and tissue area showed a linear correlation for all lectin-AE and BHP and Pca tissues. These results indicate that the used method is an efficient tool for specific, sensitive and quantitative analyses of prostatic glycophenotype.

**Key words:** chemiluminescence / lectins / carbohydrates / prostatic cancer.

## INTRODUCTION

Histochemistry has been a powerful tool in cancer diagnosis and many techniques have been reported in order to identify their pathological molecular alterations. Among cell differentiation/dedifferentiation the oligosaccharide composition and distribution in the cell surface glycoconjugates is under intensive analysis (Ghazarian, et al, 2011). Lectins have been used to characterize the cancer cell glycophenotype. The most employed visualization of the binding between lectin-carbohydrate in histochemistry is based on enzyme, particularly, peroxidase. There is variability and subjectivity in the interpretation of the biopsy analysis under the conventional method or the parameters adopted by analysts (Veiga, et al., 2009). It should be advisable to introduce specific and quantitative procedures to assist the morphological analysis.

In our lab, histochemistry chemiluminescence has been proposed replacing enzyme as label by luminescent compound (Campos, et al, 2006; Brustein, et al., 2011). Chemiluminescence has been known to be a powerful analytical technique that exhibits high sensitivity with ultra-sensitive detection limits (attomole-zeptomole), selectivity, development of rapid assays and a broad range of analytical applications (Kricka, 2003).

Here, the same approach is suggested to evaluate the glycophenotype in prostatic neoplasias. Prostate fragments diagnosed as benign prostatic hyperplasia (BPH), prostatic adenocarcinoma (PCa) and normal human prostate were investigated.

Prostate cancer is the second most frequently diagnosed cancer and the sixth leading cause of cancer death in males (Jemal, et al., 2011). To date, the diagnosis of prostate cancer (PCa) is based on the histological examination of prostate core needle biopsies, defining the degree of tumor malignancy by the Gleason score, which provides a good description of the aggressiveness of the tumor, but it is insufficient in estimating the prognosis. For this reason some methodologies have been tested for helping this widely used technique (Angelucci, et al., 2011).

In this work it was used the lectins *Concanavalin A* (ConA), *peanut agglutinin* (PNA) e *Ulex europaeus agglutinin* (UEA-I) that are, respectively, specific to  $\alpha$ -D-glucose/manose, Gal- $\beta$ (1-3)-GalNAc and  $\alpha$ -L-fucose after being conjugated to the acridinium ester.

## MATERIAL AND METHODS

### *Reagents*

N-hydroxysuccimide-activated dimethyl ester (DMAE-NHS) 1966-1-53-2/Organic Lab kindly supplied by Dr. H. H. Weetall. ConA, PNA, UEA-I, N,N-dimethylformamide and Sephadex G-25 were purchased from Sigma-Aldrich (St.Louis, Mo,USA).

### *Samples*

Prostate fragments diagnosed benign prostatic hyperplasia (BPH) (n=49), prostatic adenocarcinoma (PCa) (n=50) and normal human prostate (n=5) were obtained through paraffin-embedded biopsies from Tissue Bank of the Clinic Hospital at the Federal University of the State of Pernambuco, Northeast Brazil. The diagnosis of prostatic neoplasia was based on histopathology and established by a pathologist of this service. Patient's ages for BPH and PCa varied between 47 and 89 years (mean 64), and 58 and 84 years (mean 67) respectively.

### *ConA, PNA and UEA-I conjugations with Acridinium Ester (AE)*

AE was conjugated to lectins according to Weeks et al. (1986). Briefly, lectins (1mL containing 2 mg of protein) were incubated with 10  $\mu$ L of acridinium ester solution (0,2 mg diluted in 400  $\mu$ L of N.N-dimethylformamide) for 1h at 25°C under rotary stirring. The conjugate (lectin-AE) was applied to a column of Sephadex G-25 (10 x 1cm), previously equilibrated with 10 Mm phosphate buffer, containing 0,15 M NaCL (PBS) pH 7.2, and eluted with this buffer. Aliquots (1mL) were collected and their protein content was spectrophotometrically determined at 280 nm. The aliquots corresponding to the protein peak have their chemiluminescence assayed. After conjugation, Con A-AE and PNA-AE were evaluated regarding the maintenance of its carbohydrate recognition property (hemagglutinating activity) using glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes and human erythrocytes for UEA-I-AE (Beltrão, et al., 1998).

### *Lectin histochemistry*

Paraffin section (8 $\mu$ m) of samples were cut, transferred to glass slides, deparaffinized in xylene (once 5 min, and three-fold 1 min) and rehydrated in graded alcohols (three-fold 100% and once 70% - 1 min each). Slides were treated with 0.1% (w/v) trypsin solution at 37°C for two minutes. Slides were washed (twice, 5 min each time) with PBS. Afterwards tissue slices were incubated with (100 $\mu$ L -100 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) lectins-AE conjugates for 2 h at 4°C, followed by washing (three-fold 5 min) with 15 mL of PBS. Then the tissues were cut, the area of the tissue section (square-shaped) was defined 0.25 cm<sup>2</sup>, and transferred to polypropylene test tub containing 50  $\mu$ L of PBS. Finally, solutions of 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.1 N HNO<sub>3</sub> (50  $\mu$ L) and 0.25 M NaOH (50  $\mu$ L) were added for chemiluminescent measurement

using a luminometer Modulus Single Tube 9200-001 (Turner BioSystems, USA). The emission intensity was determined as relative light units (RLU) with a counting time of 5 seconds per sample. Triplicate measurements were carried out throughout in this study. Lectin binding inhibition assays were accomplished by incubating each lectin solution with 300 Mm methyl- $\alpha$ -D-mannoside (Con A), D-galactose (PNA) and  $\alpha$ -L-fucose (UEA-I) for 45 min at 25°C prior to their incubation with tissues. The following steps were as described previously for the binding protocol.

Chemiluminescent emission profile from the identification of the expression pattern of carbohydrates by specific lectins was evaluated as a function of tissue area, using the conjugated Con A-AE, PNA-AE, UEA-AE and samples of benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma, adopting tissue areas that comprising sizes of 0.125 to 1.0 cm<sup>2</sup>.

#### *Statistical analysis*

The software Origin Pro 8 (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA) was used for the statistical analysis and data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Obtained data were compared using ANOVA test followed by post-hoc Tukey test for the results from Con A and UEA stain, and Kruskal-Wallis followed by post-hoc Conover test for the PNA stain results ( $p < 0.5$ ).

## RESULTS

Typical purification profile of Con A, PNA and UEA-I lectins conjugated to acridinium ester were similar to those described by Campos et al. (2006) and Brustein et al. (2011). Thus all elution profiles showed a protein (absorbance 280 nm) and chemiluminescence peaks around the 10<sup>th</sup> fraction, indicating that the lectins obtained from these aliquots were conjugated to acridinium ester and the last chemiluminescence peak without concomitant protein presence corresponds to the free ester. Furthermore, after the process of conjugation and elution, all lectins conjugates were still able to recognize specific carbohydrates by hemagglutinating activity assay, confirming that the conjugation and elution processes do not cause alterations in the site of carbohydrate recognition of the used lectins.

Con A-AE, PNA-AE and UEA-AE conjugates were used to investigate the expression profiles of carbohydrates in prostatic normal and neoplastic tissues. The finding results are displayed in figure 1. It was observed a lower expression of  $\alpha$ -D-glucose/mannose residues, recognized by Con A-AE through the emission of photons in RLU between neoplastic benign (BHP) and malignant (PCa) conditions when compared with the normal counterpart, presenting values of RLU equal to  $226,931 \pm 17,436$ ;  $239,520 \pm 12,398$  and  $367,566 \pm 48,550$ , respectively. The expression pattern of  $\beta$ -Gal(1-3)-GalNac also decreased in the neoplastic conditions, BPH ( $28,754 \pm 2,157$ ) and PCa ( $16,728 \pm 1,204$ ) compared to normal conditions ( $409,289 \pm 22,336$ ). In relation to  $\alpha$ -L-fucose, it was observed an increase of the expression in PCa ( $251,118 \pm 14,193$ ) compared to normal ( $200,979 \pm 21,318$ ) and BHP ( $169,758 \pm 10,264$ ) tissues.



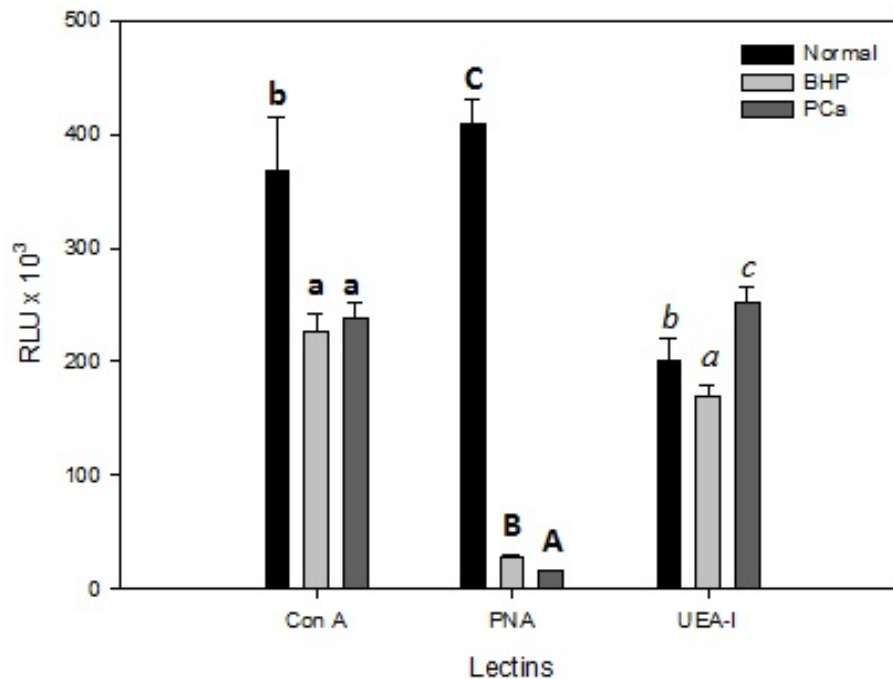


Figure 1. Chemiluminescence in normal prostate tissues (n=5), benign prostatic hyperplasia (n= 49) and prostate adenocarcinoma (n=50), using the conjugate ConA-AE, PNA-AE and UEA-AE. All measurements are mean of triplicate.

Inhibition assay (figure 2), was performed using methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, D-galactose and D-fucose sugars for Con A, PNA and UEA-I, respectively. It was observed an expressive decreasing of the values of RLU for inhibited Con A-AE both for BPH (from  $275,113 \pm 23,023$  to  $43,734 \pm 2,874$ ) and PCa (from  $253,209 \pm 26,388$  to  $66,317 \pm 7,377$ ) in comparison to Con A- AE no inhibited. This behavior was also observed for PNA-AE (from  $27,987 \pm 1,649$  to  $15,242 \pm 2,739$ ) in HPB and PCa tissues (from  $22,630 \pm 1,119$  to  $14,363 \pm 1,891$ ). For UEA-I-AE conjugate was also noted a decrease in the values of RLU for HPB ( $183,387 \pm 10,411$  to  $58,267 \pm 7,116$ ) and for PCa ( $271,273 \pm 17,565$  to  $63,896 \pm 8,363$ ). These decreases in RLU values indicate that binding non-specific between the acridinium ester and cell surface glycoconjugates does not occur.

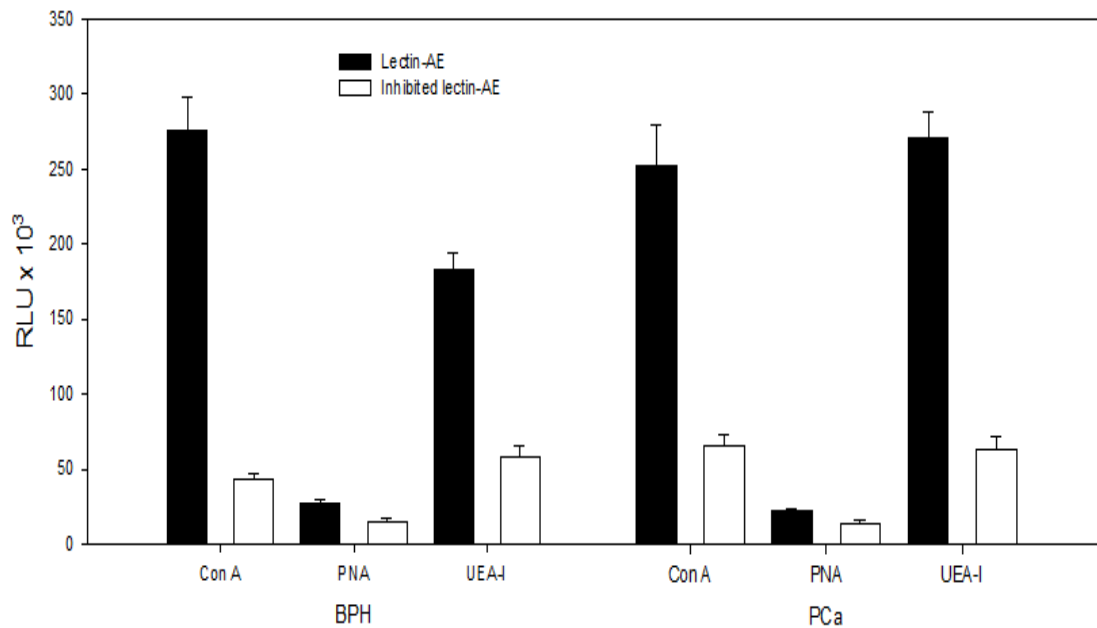


Figure 2. Lectin binding inhibition assay in prostate tissues diagnostic as benign prostatic hyperplasia (n= 5) and prostate adenocarcinoma (n=5), using the conjugate ConA-AE, PNA-AE and UEA-AE inhibited using the sugars (methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, D-galactose and D-fucose) respectively. All measurements are mean of triplicate.

The relationship between emission of photons (RLU) and tissue area showed a linear correlation (figure 3). This behavior was similar among all adopted conjugates and also between neoplastic conditions (BHP and PCa). These results reveal that the intensity of emitted light is directly proportional to available tissue area as well as to the content of exposed carbohydrate residues, besides the recognizing ability of the conjugates to specific glycans on the analyzed surface tissue.

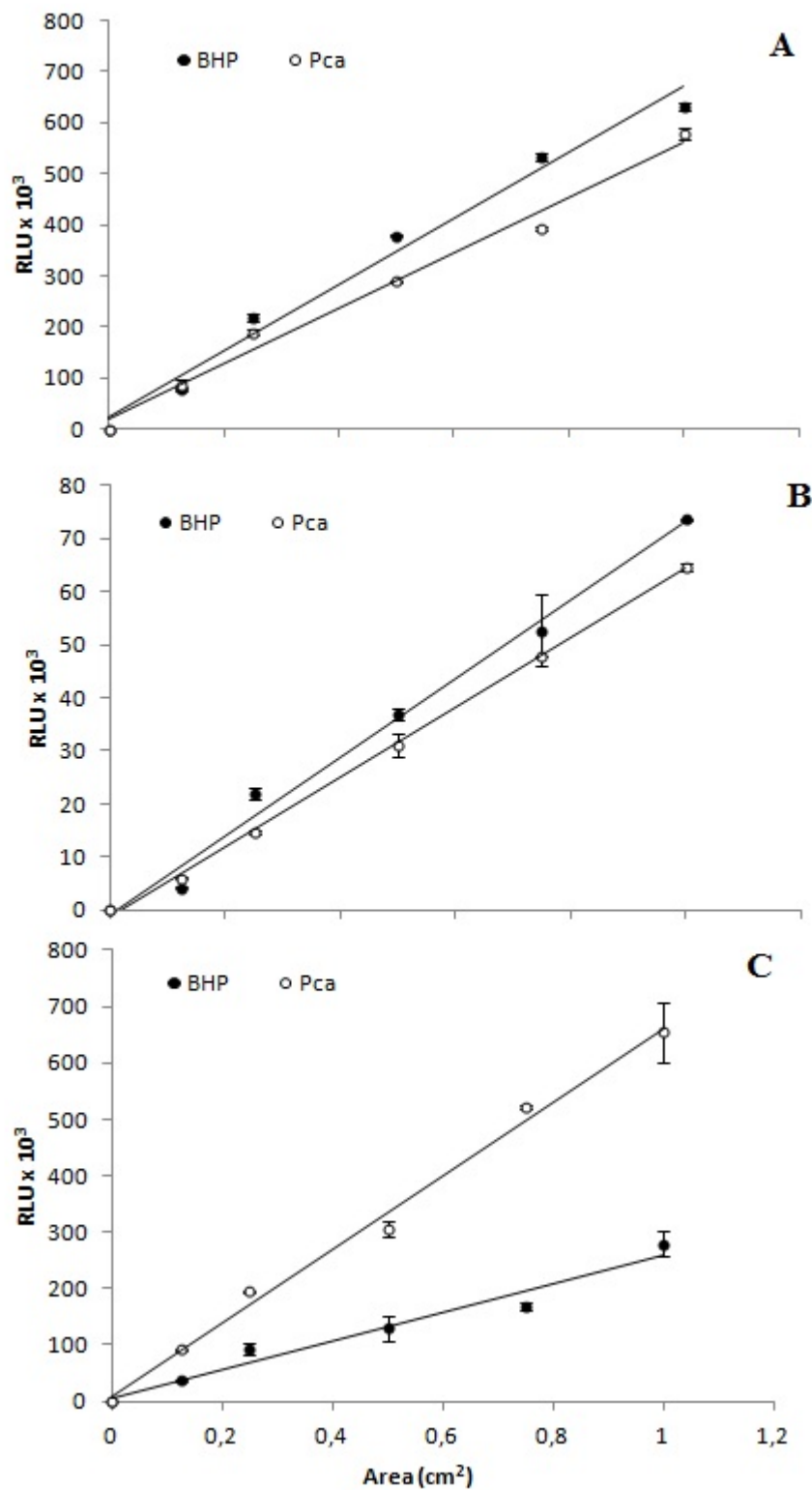


Figure 3. Relationship between RLU and area (0.125 to 1.0 cm<sup>2</sup>) of prostate tissue diagnosed as benign hyperplasia prostatic and adenocarcinoma prostate by using Con A-AE (A), PNA-AE (B) and UEA-AE(C) conjugates. All measurements are mean of triplicate.

## DISCUSSION

Glycans are involved in several physiological and pathological conditions, such as host-pathogen interactions, cell differentiation, migration, tumour invasion and metastasis, cell trafficking and signaling (Reis, C.A., et al., (2011)). The cancer is associated with glycosylation alterations in glycoproteins and glycolipids, these changes can affect interactions between tumor cell-surface glycans and endogenous lectins, which may determine the metastatic potential of the tumor cell. Several common structural changes occur in tumor glycans, including increases in the level of truncation and branching of structures as well as an increased expression of unusual terminal sequences (Kim and Varki, 1997).

The present study demonstrated that the transformed prostatic tissues presented an expression of  $\alpha$ -D-glucose/mannose significantly lower ( $p < 0.5$ ) when compared to normal prostatic tissues. However the difference between malignant and benign conditions was not statistically significant. These results disagree with those reported by Lima et al. (2010), where they noted an increase of  $\alpha$ -D-glucose/mannose expression in hyperplastic tissues compared to normal and prostatic adenocarcinoma tissues. It is important to call attention these authors employed lectins conjugated to peroxidase and colorimetric revelation. Afterwards, an arbitrary staining score was adopted to quantify the carbohydrate expression. Arenas et al. (1999) also observed a high expression of glucose/mannose residues in prostatic tissue, however, it was not observed significant differences among the normal, benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma tissues. It is likely that no differences are due different enzymatic treatments that can had cleaved the  $\alpha$ -D-glucose/mannose residues maintaining the same level of expression in surface glycoconjugates.

The recognition of the pattern of Gal- $\beta$ (1-3)-GalNAc expression obtained by PNA lectin according to this work showed a decreasing in these glycans with the malignancy development. Significant differences were observed between the neoplastic tissues (BHP and

PCa) and between these two conditions and normal tissue. These results are consistent with those demonstrated by Lima et al. (2010). Nevertheless, they did not report no significant difference between the neoplastic conditions, but only between these conditions and normal tissue. Different behavior was also reported by Arenas et al. (1999), in this study was noted that PNA lectin presented a lower staining in normal prostate and benign prostatic hyperplasia, and a stronger staining in prostatic adenocarcinoma.

With respect the expression of L-fucose residues identified by UEA-I lectin, this work observed a statistical significant increasing in their expression in prostatic adenocarcinoma compared to benign prostatic hyperplasia and normal tissue. These late conditions also presented statistically significant differences among them. These results corroborate those reported by Arenas et al. (1999) and Khabaz et al. (2010). The increased expression of L-fucose residues in the malignant condition has also been observed in the carbohydrates fraction of serum PSA from individuals with prostatic adenocarcinoma (Dwek, et al., 2010).

Lectins conjugated to a chromogenic label have been widely adopted as histochemical probes for investigation of glycophenotype from various human normal and malignant tissues (Beltrão, et al., 1998; Beltrão, et al., 2003; Melo-Júnior, et al., 2006, 2008; Sobral, et al., 2010). The analysis of this stained preparation is either performed through light microscopy by an observer or quantified by several morphometric proposals based on these images. Here, chemiluminescent probes consisting of lectins labeled with acridinium ester have provided a simple, specific and efficient tool in the quantitative determination of the tissue glycode as previously reported by Campos et al. (2006) and Brustein et al. (2011). This procedure is the first report for prostatic transformed tissues. Similar to these preceding report of our lab it was observed relationship between the light emitted by the chemiluminescent reaction (RLU) and the tissue area. The nature (linear, hyperbolic and other parameters) of this relation differs according to the lectin and tissue indicating that the binding forces between them also play an

important role in this evaluation. The quantitative advantage of the use of chemiluminescence to establish the glycophenotype of tissue may add other data to the analysis such as maximum carbohydrate per tissue area and association/dissociation constants.

## CONCLUSION

The chemiluminescent method presented in this contribution to evaluate the glycophenotype of prostatic tissues showed to be promising. Normal, benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma tissue samples were incubated with *Concanavalin A* (Con A), *Ulex europaeus agglutinin* (UEA-I) and *Peanut agglutinin* (PNA) lectins conjugated to acridinium ester (Lectin-AE). The chemiluminescence of the tissue-lectin-AE complex expressed in relative light units (RLU) showed statistical significant difference depending on the lectin and the tissue. The light emitted was abolished by inhibiting the interaction between tissues and lectins with their specific carbohydrates. The relationship between RLU and tissue area showed a linear correlation for all lectin-AE and prostatic tissues. These results indicate that the used method is an efficient tool for specific, sensitive and quantitative analyses of prostatic glycophenotype.

## REFERENCES

- Angelucci, A., Pace, G., Sanità, P., et al. (2011) Tissue print of prostate biopsy: a novel tool in the diagnostic procedure of prostate cancer. *Diagnostic Pathologic*, 6: 34.
- Arenas, M.I., Romo, E., et al. (1999) A lectin histochemistry comparative study in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma. *Glicoconjugate Journal*, 16, 375-382.
- Beltrão, E.I.C., Correia, M.T.S., et al. (1998) Binding evaluation de isoform *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 74, 125-134.

- Beltrão, E.I.C., Medeiros, P.L., et al. (2003) *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningotheelial tumour. *Eur J Histochem*, 47, 139-142.
- Brustein, V.P., Cavalcanti, C.L.B., et al. (2011) Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. *Appl Biochem Biotechnol*.
- Campos, L.M., Cavalcanti, C.L.B., et al. (2006) Acridinium Ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers*, 11, 480-484.
- Dwek, M.V., Jenks, A., et al. (2010) A sensitive assay to measure biomarker glycosylation demonstrates increased fucosylation of prostate specific antigen (PSA) in patients with prostate cancer compared with benign prostatic hyperplasia. *Clinica Chimica Acta*, 411, 1935-1939.
- Ghazarian, H., Idoni, B., et al. (2011) A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem*, 113, 236-254.
- Jemal, A., Bray, F., et al. (2011) Global Cancer Statistics. *Cancer J Clin*, 61, 69–90.
- Khabaz, M.N., McClure, S., et al. (2010) Glycophenotype of prostatic carcinomas. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 48, 637- 645.
- Kim, Y.J. and Varki, A. (1997) Perspective on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconjugate Journal*, 14, 469-76.
- Kricka, L.J. (2003) Clinical applications of chemiluminescence. *Anal Chim Acta*, 500, 279-286.
- Lima, A.L.R., Cavalcanti, C.C.B., et al. (2010) Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 16.
- Melo-Junior, M.R., Araújo-Filho, J.L.S., et al. (2006) Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potencial marker to biochemical alterations and tumor differential diagnosis. *J Bras Patol Med Lab*, 42, 455-460.
- Melo-Junior, M.R., Cavalcanti, C.L.B., et al (2008) Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to *Helicobacter pylori*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 238-240.
- Reis, C.A., Osório, H., et al. (2011) Alterations in glycosylations as biomarkers for câncer detection. *J Clin Pathol*, 63, 322-29.
- Sobral, A.P., Rego, M.J., Cavacanti, C.L.B., et al. (2010) Con A and UEA-I lectin histochemical of parotid gland mucoepidermoid carcinomas. *Journal of Oral Science*, 52, 49-54.

Veiga, R.K.A., Melo-Junior, M.R., et al. (2009) Avaliação digital comparative da expressão tecidual da proteína CerbB-2 em mulheres portadoras de doenças tumorais da mama. *Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 45, 131-37.

Weeks, J., Sturgess, M.I., et al. (1986) Immunoassay using acridinium esters. *Methods in Enzimology*, 133, 366-87.



## 6. CONCLUSÃO

A aplicação do método histoquimiluminescente, proveniente da marcação de lectinas ao éster de acridina, objetivando investigar quantitativamente o padrão de expressão de carboidratos em neoplasias prostáticas, considerando a especificidade das lectinas por glicanos de superfície celular específicos, demonstrou que os tumores prostáticos apresentam uma menor expressão de resíduos de  $\alpha$ -D-glicose/manose e Gal- $\beta$ (1-3)-GalNAC e uma maior expressão de resíduos de  $\alpha$ -L-fucose, identificados pelos diferentes valores de RLU. Esses resultados revelam que as lectinas podem ser utilizadas como ferramentas auxiliares complementando a análise histopatológica, revelando mais um aspecto molecular das neoplasias prostáticas. Sendo assim, a histoquimiluminescência é um método simples e eficaz na investigação de neoplasias prostáticas, importante para eliminar a subjetividade da técnica colorimétrica/qualitativa convencionalmente adotada.