

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

Amanda Lucena Rosendo de Lima

Lectinas de *Cratylia mollis* como ferramentas e biomarcadores no diagnóstico do câncer de próstata e colo uterino

Recife
2013

Amanda Lucena Rosendo de Lima

Lectinas de *Cratylia mollis* como ferramentas e biomarcadores no diagnóstico do câncer de próstata e colo uterino

Tese apresentada ao Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor sob orientação da Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia e co-orientação do Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão.

Recife
2013

**Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728**

Lima, Amanda Lucena Rosendo de

Lectinas de *Cratylia mollis* como ferramentas e biomarcadores no diagnóstico do câncer de próstata e colo uterino/ Amanda Lucena Rosendo de Lima– Recife: O Autor, 2013.

125 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Lectinas 2. Câncer 3. Histoquímica I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora) II. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (coorientador) III. Título**

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 075

Amanda Lucena Rosendo de Lima

Lectinas de *Cratylia mollis* como ferramentas e biomarcadores no diagnóstico do câncer de próstata e colo uterino

Tese apresentada ao Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor sob orientação da Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia e co-orientação do Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia - UFPE

Prof. Dr. Antônio Fernando de Melo Vaz - UFCG

Profa. Dra. Márcia Vanuza da Silva - UFPE

Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha - UFPE

Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima - UFPE

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra – UFPE (Suplente)

Prof. Dr. Roberto Araújo Sá – UFPE (Suplente)

Recife
2013

*Aos meus pais, **Lúcia e Manoel** que em toda minha vida foram exemplos de força e bom caráter sempre me apoiaram, participando de todas as minhas conquistas. Agradeço o valor dado a minha educação;*
*Ao meu esposo, **Jonh Cleidson da Silva**, pela dedicação, companheirismo e amor e por vibrar sempre na conquista de meus objetivos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar força, luz e capacidade para seguir buscando meus objetivos.

Ao minha orientadora Profa. Dra. Maria Tereza pela oportunidade e confiança desde a graduação, pela dedicação concedida à minha tese e pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Beltrão pela confiança e apoio dado no seu grupo de pesquisa e por todo amadurecimento científico adquirido.

À amiga Raiana Apolinário, por não medir esforços em ajudar-me durante todos os momentos que precisei, pelo aprendizado adquirido e por todos os momentos que dividimos.

A todos servidores e alunos que tive a oportunidade de conhecer no Departamento de Bioquímica, pelos laços de amizade formados e que ficarão nas minhas lembranças.

Aos amigos do grupo Biomarcadores no Câncer, em especial, Juliana Vasconcelos e Ana Rosa pelo carinho e pela amizade construída.

A todos os professores e amigos que contribuíram de alguma forma neste trabalho.

A todos os servidores da Unidade de Urologia, do Laboratório de Análises Clínicas e do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Pernambuco pela disponibilidade, contribuição e atenção dadas a este trabalho.

A Roberto Sá, por ter sido a fonte e o elo da minha ida para o Centro Acadêmico do Agreste, sempre serei grata por essa felicidade.

A todos do Laboratório de Química e do Centro Acadêmico do Agreste que estiveram juntos nos trabalhos ou que torceram pela concretização dessa etapa.

A amiga Claudete Marques, pelo carinho, pela amizade incondicional, pela ajuda e pela compreensão que sempre teve comigo.

A Érika Marinho, pela oportunidade em trabalhar no Laboratório de Química, pela amizade e por toda compreensão durante esse período do doutorado.

Ao meu tio João Rosendo, em nome de qual agradeço também a toda minha família, pelo acolhimento e cuidados e por toda torcida para alcançar essa vitória.

Aos meus pais, Lúcia e Manoel, e a minha irmã, Alba, por todo amor, carinho, compreensão, dedicação e ajuda dispensados a mim em todos os momentos da minha vida.

Ao meu esposo, Jonh, por todo amor incondicional e por toda paciência enfrentada durante a fase final dessa etapa.

Agradeço imensamente a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização dessa tese.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

Lectinas constituem um largo grupo de proteínas ou glicoproteínas que compartilham a propriedade de reconhecer e interagir com glicanos, os quais estão envolvidos nos processos de desenvolvimento e diferenciação celular de neoplasias. O câncer de próstata (CaP) e de colo uterino são tumores malignos de alta incidência em homens e mulheres, respectivamente, e por isso têm sido alvo de inúmeras pesquisas científicas. O objetivo do nosso trabalho foi investigar a capacidade das lectinas de sementes de *Cratylia mollis* interagirem com o glicocódigo tecidual e sérico de pacientes com patologias prostáticas e de colo uterino. Para o conhecimento da identidade sacarídica dos glicoconjugados celulares foi utilizada a histoquímica com lectinas, as quais conjugadas à peroxidase foram aplicadas em cortes de biópsias de próstata e colo uterino. Para purificação e caracterização parcial de glicoproteínas dos soros de pacientes com alterações prostáticas e indivíduos saudáveis, a cromatografia de afinidade com Cramoll-1,4 imobilizada e SDS-PAGE foram utilizadas. A histoquímica mostrou que as lectinas de *C. mollis* ligam-se diferentemente aos glicoconjugados expostos pelas células prostáticas (normal, hiperplasia benigna prostática e câncer de próstata) e do colo do útero (normal, neoplasia intra-epitelial cervical III e carcinoma celular escamoso). Através da cromatografia de afinidade com Cramoll-1,4 imobilizada, os soros de indivíduos normais, com hiperplasia benigna prostática e em diferentes estágios do CaP apresentaram expressão diferencial de glicoproteínas. Os resultados obtidos sugerem que as lectinas de *Cratylia mollis* são efetivos biomarcadores histoquímicos dos processos de diferenciação celular anormal nos tecidos prostáticos e cervicais uterinos. Essas lectinas também mostraram ser ferramentas para identificar o padrão de expressão de glicoproteínas durante os processos de desenvolvimento patológico prostático.

Palavras - chaves: Cramoll 1,4. Cramoll 3. Histoquímica.

ABSTRACT

Lectins are a large group of proteins or glycoproteins that share common property to recognize and interact with glycan structures, which are involved in developmental processes such as cell differentiation and carcinogenesis. Prostate cancer (PCa) and cervical are malignant tumors of high incidence in men and women, respectively, and therefore have been target of much scientific research. The aim of our work was to investigate the ability from *Cratylia mollis* seed lectins to interact with the tissue and serum glycoconjugates of patients with prostatic and uterine cervix diseases. To knowledge of saccharide identity of cellular glycoconjugates was used lectin histochemistry, in which the lectins conjugated to peroxidase were applied in biopsy slices of prostate and uterine cervix. Affinity chromatography with immobilized ConA 1.4 and SDS-PAGE were used for purification and partial characterization of glycoproteins from patient sera with prostatic alterations and healthy subjects. The histochemistry showed that *C. mollis* lectins bind differently to glycoconjugates exposed by prostate cells (normal, benign prostate hyperplasia and prostate cancer) and uterine cervix (normal cervical intraepithelial neoplasia III and squamous cell carcinoma). Affinity chromatography with immobilized ConA 1.4, sera from normal subjects with benign prostatic hyperplasia and in different stages of PCa presented differential expression of glycoproteins. These findings suggest that lectins from *Cratylia mollis* are effective histochemical biomarkers for abnormal cell differentiation processes in uterine cervix and prostate tissues. These lectins also proved to be useful tools for identifying the expression pattern of glycoproteins during pathological development processes of prostate.

Keywords: Cancer. *Cratylia mollis*. Lectin histochemistry. Prostate. Uterine cervix.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DA LITERATURA

	Página
Figura 1 – Tipos de crescimento celular anormal	21
Figura 2 – Carboidratos de superfície celular envolvidos no reconhecimento molecular	24
Figura 3 – Delineamento de estratégias para a descoberta de biomarcadores através da utilização de tecnologias emergentes	27
Figura 4 – Anatomia da próstata	28
Figura 5 – Divisão anatômica da próstata adulta	29
Figura 6 – Corpos amiláceos (setas) em glândula hiperplásica	30
Figura 7 – Graus histológicos do carcinoma prostático, de acordo com o sistema Gleason	35
Figura 8 – Cérvix uterina e órgãos vizinhos.	37
Figura 09 - Evolução das neoplasias intraepiteliais cervicais até o câncer de colo do útero	39
Figura 10 - Tecnologias emergentes para desvendar o glicocódigo	45
Figura 11 - Esquema ilustrativo de um ensaio de hemaglutinação e de sua inibição	49
Figura 12 – Histoquímica com lectinas conjugadas a peroxidase	52
Figura 13 - Caracterização de <i>Cratylia mollis</i>	55

LISTA DE FIGURAS DOS ARTIGOS

Capítulo I

	Página
Figure 1 - Basic and native protein gel electrophoresis of <i>Cratylia mollis</i> seed lectins and conjugates. (A) Cramoll-1,4-HRP, (B)Cramoll-1,4, (C) cytochrome C, (D) Cramoll-3-HRP, and (E) Cramoll-3.	72
Figure 2 - Histochemistry of prostatic tissues using Con-A, Cramoll-1,4, PNA, and Cramoll-3. (a) Normal prostate stained with Con-A. Epithelial cells (<i>arrow</i>) present a weak staining while stroma (<i>asterisk</i>) is intensely stained. (b)Moderate staining by Cramoll-1,4 in epithelium of normal glands. (c and d) Normal prostate epithelium and stroma (<i>asterisks</i>) presenting weak staining by PNA and Cramoll-3, respectively. (e) Con-A moderate staining of BPH glands (<i>arrow</i>). (f) BPH epithelial cells showing intense staining by Cramoll-1,4 in apical cytoplasm (<i>arrowheads</i>) and membrane (<i>arrow</i>). (g and h) BPH glands (<i>arrows</i>) were not stained or only weakly stained by PNA and Cramoll-3, respectively. (i and j) Gleason score 2 and 3 PCa cells stained with a moderate pattern, respectively. (k)Weak staining in Gleason score 4 PCa cells. (l) Nonstaining cells in Gleason score 5 PCa. (m and n) PCa gland lumens (<i>arrows</i>) presented an intense staining pattern for PNA and Cramoll-3, respectively. Magnification (a, b, c, d, k, m, and n) x100 and (e, f, g, h, i, j, and l) x400.	73
Figure 3 - Statistical analysis of lectin histochemistry of normal human prostate, BPH, and PCa with Con-A and Cramoll-1,4 (a) and PNA and Cramoll-3 (b) ($P < .05$).	74
Figure 4 - Lectin histochemistry of corpora amylacea (<i>arrows</i>) in BPH ((a) to (d)). In glands, corpora amylacea presented weak binding with Con-A (a) and non-staining to PNA (c); BPH glands were Cramoll-1,4 (b) and Cramoll-3 (d) moderately and weakly stained, respectively. Magnification x100.	75

Capítulo II

	Página
Figure 1 - Staining and inhibition of lectins in normal squamous epithelium. A, B. Basal cells and lower third of the squamous epithelium marked with Cramoll-1,4 and Cramoll-3, respectively. C, D. Inhibition of A and B, respectively. A,C (x400) and B, D (x100).	82
Figure 2: Staining and inhibition of lectins in normal glandular epithelium. A, B. Apical region of normal glandular epithelial cells labeled with Cramoll-1,4 and Cramoll-3, respectively. C, D. Inhibition of A and B, respectively. A, B, C, D (x400).	84
Figure 3: Staining and inhibition of lectins in squamous epithelium affected by CIN 3. A, B. Squamous epithelium affected by CIN 3 labeled Cramoll-1,4 and Cramoll-3, respectively. C, D. Inhibition of A and B, respectively. A,C (x400) and B, D (x100).	85
Figure 4: Squamous cell carcinoma (SCC) A, B. Absence of staining by Cramoll-1,4 and 3, respectively, in the cells of squamous cell carcinoma. A,B (x400).	86

Capítulo III

Página

Figure 1: Cibacron Blue 3GA chromatography columns. The columns were equilibrated with 10mM Tris-HCl, pH 7,5and pools from seven study groups, were chromatographed. Fractions were eluted at a flow rate of 10 mL/h. Bounded proteins (e.g., albumin) were desorbed with 1.5 M NaCl in the same buffer. Fractions (1 mL) were collected and absorbance at 280nm was measured.

100

Figure 2: SDS-PAGE of cibacron affinity from serum samples from seven study groups. Analysis of applied and retied fractions in cibacron: Line 1 (MW, GE), line 2 (start material of one group), line 3 (eluted fraction of one group), line 4 (start material of two group), line 5 (eluted fraction of two group), line 6 (start material of tree group), line 7(eluted fraction of tree group) , line 8 (start material of four group), line 9 (eluted fraction of four group), line 10 (start material of five group), line 11 (eluted fraction of five group), line 12 (start material of six group), line 13 (eluted fraction of six group), line 14 (start material of seven group), line 15 (eluted fraction of seven group).

101

Figure 3: Affinity chromatography on immobilized Cramoll-1,4-Sepharose. The columns were equilibrated with 0.15M NaCl and unbound pools in cibacron from seven study groups (A, B, C, D, E, F and G) were chromatographed. Fractions were eluted at a flow rate of 10 mL/h. Bounded proteins were desorbed with 0.3M glucose in the same buffer. Fractions (1 mL) were collected and absorbance at 280nm was measured.

102

Figure 4: SDS-PAGE under denaturing and reducing conditions of eluted glycoproteins in Cramoll-1,4-Sepharose. Samples with 15µL of eluted protein sample with 0.3 M glucose. Healthy individuals (lane 1), BPH (lane 2), PCa Score 5 (lane 3), PCa Score 6 (lane 4), PCa Score 7 (lane 5), PCa Score 8 (lane 6), PCa Score 9 (lane 7). Gel stained with Colloidal Comassie.

104

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO DA LITERATURA

	Página
Tabela 1 – Tipos de Câncer	21
Tabela 2 – Biomarcadores no Câncer	25
Tabela 3 – Estadiamento do carcinoma do colo do útero de acordo com a FIGO	42

LISTA DE TABELAS DOS ARTIGOS

Capítulo II

	Página
Table 1: Staining intensity in tissues of the cervix.	82

Capítulo III

Table 1: Clinical characteristics of study groups	97
Table 2: Yield of the adsorbed serum proteins to Cramoll-1,4 Sepharose chromatography	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS: American Cancer Society
AH: Atividade Hemaglutinante
BPH: Benign Prostatic Hyperplasia
C. mollis: *Cratylia mollis*
CA: Corpo Amiláceo
CaP: Adenocarcinoma Prostático
CIN 3: degree III cervical intraepithelial neoplasia
Con-A: Lectina de *Canavalia ensiformis*, Concanavalina A
Cramoll: Lectina de semente de *Cratylia mollis*
DAB: Diaminobenzidina
EDR: Exame Digital Retal
FIGO: Fundação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
GSI: Lectina de *Griffonia simplicifolia* I
HBP: Hiperplasia Benigna Prostática
HIV: Sigla em inglês do vírus da imunodeficiência humana
HPV: Human Papiloma Virus (em português: vírus do papiloma humano)
HRP: Peroxidase
INCA: Instituto Nacional do Câncer
JEC: Junção escamo-colunar
NCI: National Cancer Institute
NIC: Neoplasia intraepitelial cervical
OMS: Organização Mundial da Saúde
PCa: Prostate Cancer
PHA: Lectina de *Phaseolus vulgaris*
PN: Próstata Normal
PNA: Lectina de *Arachis hypogea*
RCA: Lectina de *Ricinus communis*
SBA: Lectina de *Glycine Max*
SCC: squamous cell carcinoma
SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirada
WGA: Lectina do germe de trigo

SUMÁRIO	Páginas
INTRODUÇÃO	18
REVISÃO DA LITERATURA	19
1 Câncer	19
1.1 Considerações Gerais	19
1.2 Aspectos Bioquímicos	23
1.3 Biomarcadores do Câncer	25
2 Próstata	27
2.1 Considerações Gerais (Anatomia e Histologia)	27
2.2 Hiperplasia Benigna Prostática (HPB)	31
2.3 Câncer de Próstata (CaP)	32
3 Colo Uterino	36
3.1 Considerações Gerais	36
3.2 Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC)	38
3.3 Câncer de Colo Uterino: Carcinoma invasivo de células escamosas	40
4 Glicômica	43
5 Lectinômica	45
5.1 Breve Histórico	45
5.2 Definição, Distribuição e Função	46
5.3 Purificação e Caracterização	47
5.4 Aplicações	49
5.4.1 Histoquímica com Lectinas	51
5.4.2 Cromatografia de Afinidade com Letinas Imobilizadas	53
5.5 Lectinas de <i>Cratylia mollis</i>	55
OBJETIVOS	57
REFERÊNCIAS	58
CAPÍTULO I – Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with <i>Cratylia mollis</i> Seed Lectin.	69
CAPÍTULO II – Histochemical Differential Staining by Isolectins from <i>Cratylia mollis</i> Seed during the Progression of Human Cervix Neoplasia	77

CAPÍTULO III – Isolation of serum glycoproteins by lectin affinity chromatography in prostatic alterations	92
CONCLUSÕES	109
ANEXOS	110

INTRODUÇÃO

O câncer, uma das causas principais de morte mundial, é uma doença crônica e caracteriza-se pelo crescimento anormal de células ao proliferar-se de forma descontrolada, e, em alguns casos, metastizar. No Brasil, o câncer de próstata é o tumor maligno de maior incidência em homens e o do colo do útero em mulheres.

Na carcinogênese ocorrem mudanças na expressão de proteínas teciduais e de fluidos celulares influenciadas pela alteração no padrão de glicosilação. Os glicanos têm papéis em diversos processos biológicos, tais como: sinalização celular, reconhecimento imunológico, diferenciação celular e metástase. Assim, cresce o interesse em estudar os glicanos na busca de novos biomarcadores e estimula-se o estudo das lectinas nessa investigação.

Enquanto os açúcares são capazes de carrear uma informação biológica, as lectinas são capazes de decifrar esse glicocódigo. A partir dessa habilidade em decifrar glicocódigos, elas têm sido ferramentas úteis na histoquímica ao interpretar mudanças nos carboidratos de superfícies celulares no processo neoplásico e também têm sido imobilizadas em diferentes suportes cromatográficos para separação e purificação por afinidade de glicoconjugados, os quais possam ser possíveis biomarcadores de processos patológico como o câncer.

Das sementes de *Cratylia mollis* (feijão camaratu), leguminosa nativa da Região Semi-Árida de Pernambuco, são extraídas lectinas que reconhecem distintos carboidratos e têm favorecido diversas aplicações biotecnológicas.

Nosso trabalho propôs avaliar as possíveis alterações no padrão de carboidratos teciduais expressos em patologias prostáticas e uterinas através da análise histoquímica com duas lectinas de *C. mollis* (Cramoll-1,4 e Cramoll-3) e isolar e caracterizar os perfis de glicoproteínas séricas de pacientes com alterações prostáticas através da lectina de *C. mollis* (Cramoll-1,4) imobilizada.

REVISÃO DA LITERATURA

1 Câncer

1.1 Considerações Gerais

O Câncer, uma das principais causas de morte mundial, excedido apenas por doenças cardiovasculares no mundo desenvolvido (HANAHAN; WEINBERG, 2011), é o termo usado para caracterizar um grupo de mais de cem doenças nas quais células multiplicam-se de forma descontrolada e são capazes de invadir outros tecidos através do sistema sanguíneo e linfático (AMERICAN..., 2012; NATIONAL..., 2006).

Dados estatísticos da American Cancer Society (2012) indicam o câncer como o maior problema de saúde pública nos Estados Unidos e em muitas outras partes do mundo. Uma em cada quatro mortes nos Estados Unidos é devido a esta doença. Estimou-se que cerca de 577.190 americanos morreram de câncer em 2012, correspondente a mais de 1.500 mortes por dia. Câncer de pulmão, próstata (em homens), mama (em mulheres) e colorretal são os 4 tipos de câncer responsáveis por quase metade do total de morte por câncer entre homens e mulheres (SIEGEL *et al.*, 2012).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2013 apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, reforçando a magnitude do problema do câncer no país e excluindo os casos de câncer da pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil novos casos. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, colorretal e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, colorretal e glândula tireóide para o sexo feminino (INSTITUTO..., 2011).

Os tumores começam nas células, as quais constituem os tecidos e formam os órgãos do corpo. Todas as células do corpo são “programadas” para se desenvolver, crescer, diferenciar-se e morrer. O tumor resulta quando uma dessas etapas não é regulada e as células apresentam-se com potencial de crescimento e proliferação descontrolados (HARRINGTON, 2011). Assim, novas células se formam quando o corpo não precisa e as células velhas não morrem quando deveriam, originando um acúmulo de células extras que podem formar uma massa tecidual chamada de tumor, o qual pode ser benigno ou maligno (NATIONAL..., 2006).

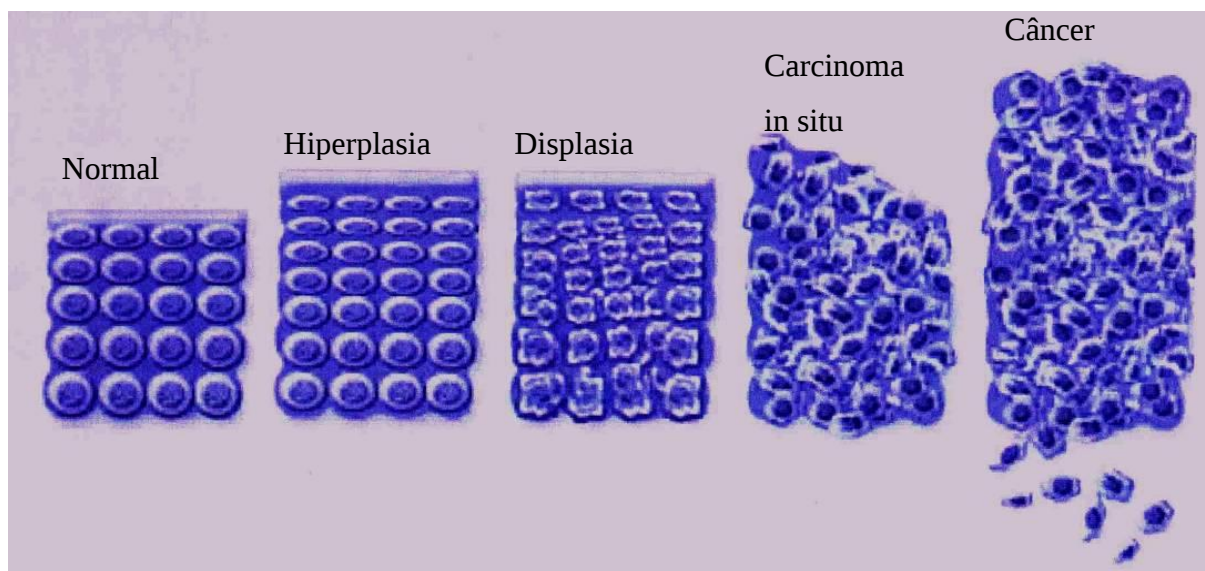
Os tumores benignos não são câncer, normalmente crescem devagar, podendo evoluir por anos sem sintomas ou com manifestações discretas, mas mesmo sendo benignos podem

evoluir negativamente para o êxito letal (ainda que não se malignize) caso estejam localizados em órgãos vitais (NATIONAL..., 2006). Esses tumores geralmente assemelham-se ao seu tecido de origem, mas nem todo componente tecidual precisa estar envolvido e as células podem ou não estar na sua relação normal. Elas aparecem em muitos tecidos, aumentadas de tamanho, mas não são invasivas (FRANKS; TEICH, 1999) sendo geralmente tratadas por remoção cirúrgica completa e não voltam a crescer.

Os tumores malignos são o câncer propriamente dito e são geralmente mais graves do que tumores benignos. Eles podem ser fatais, pois apesar de poderem ser removidos, às vezes, voltam a crescer. Eles tendem, geralmente, a proliferar em ritmo acelerado traduzido, a princípio, por aumento das figuras de mitose ao exame histológico. Entretanto, este achado nem sempre significa malignidade porque alguns podem estar crescendo lentamente e bruscamente mudar para um padrão de proliferação rápido (NATIONAL..., 2006). Esses tumores apresentam dois aspectos característicos: anormalidades celulares e invasão do tecido ao redor. Quando ambos estão presentes o diagnóstico torna-se mais fácil. O critério de padrão celular inclui um aumento local no número celular, perda do arranjo regular normal, variação no tamanho e formato celular, aumento nuclear (reflexo de um aumento de DNA total) e aumento da atividade mitótica. As células desenvolvem-se de forma muito mais desorganizada do que a encontrada nos tumores benignos (FRANKS; TEICH, 1999).

De acordo com Peterson (2010) e Belovic (2011), o desenvolvimento do câncer segue um processo de múltiplos estágios, a partir da célula normal e é caracterizado pelo acúmulo de alterações genéticas que interferem no controle normal do crescimento e diferenciação celular, ou seja, células normais passam a ser hiperplásicas ou displásicas ou podem se transformar num câncer localizado e, posteriormente, metastizar (Figura 1) (BELOVIC *et al.*, 2011; PETERSON, 2010). O que leva a malignidade no câncer é sua habilidade em quebrar a arquitetura tecidual, invadir fronteiras teciduais rompidas e metastizar para órgãos distantes. Em termos simples, câncer é uma doença de desenvolvimento, ou seja, resultante da perda dos controles normais, os quais conduzem as células para acumular-se nos tecidos (INGBER, 2008). Para a formação do câncer, é necessário o crescimento descontrolado das células, porém não é suficiente. Apenas, quando o crescimento torna-se autônomo e leva à desorganização da arquitetura do tecido normal é que um patologista pode reconhecer quando um tecido normal sofre “transformação neoplásica” (INGBER, 2008).

Figura 1 – Tipos de crescimento celular anormal.



Fonte: Adaptada de Peterson (2010)

As células cancerosas podem ocorrer em líquidos, como na leucemia. Entretanto, a maioria ocorre como tumores sólidos que originalmente aparecem nos tecidos em várias partes do corpo. Os tipos de câncer podem ser agrupados em categorias de acordo com o órgão ou tipo de célula em que eles começaram a se desenvolver (Tabela 1) (AUYANG, 2000).

Tabela 1 - Tipos de Câncer.

Nomenclatura	Tecido de origem
Carcinoma	Pele ou tecidos de órgãos internos
Sarcoma	Osso, cartilagem, gordura, músculos, vasos sanguíneos
Leucemia	Tecidos da formação sanguínea
Linfoma e mieloma	Células do sistema imune
Câncer do Sistema Nervoso Central	Cérebro e medula espinhal

Fonte: Adaptada do National Institute Cancer (2012)

Vale salientar que, quando o câncer se espalha e forma um novo tumor em outra parte do corpo, o novo tumor tem o mesmo tipo de células anormais e o mesmo nome que o tumor primário. Por exemplo, se o câncer da próstata se espalha para os ossos, as células

cancerígenas nos ossos são chamadas células cancerosas da próstata. A doença é câncer metastático da próstata e não câncer ósseo. Por essa razão, ele é tratado como câncer de próstata.

Pesquisas mostram que determinados fatores de risco aumentam a probabilidade de uma pessoa desenvolver câncer. Os fatores de risco mais comuns para o câncer são: envelhecimento, tabaco, luz solar, radiação ionizante, certos produtos químicos, alguns vírus e bactérias, certos hormônios, história ou herança familiar, álcool, má alimentação, falta de atividade física e excesso de peso (NATIONAL..., 2006).

Breivik (2005) resume que o tempo, meio ambiente e herança são os três principais aspectos que devem ser unidos por um modelo de carcinogênese. Tempo-dependente porque a incidência de câncer aumenta com a idade e em países com elevada expectativa de vida, aproximadamente 40% da população sofre algum tipo de câncer na vida. Dados epidemiológicos demonstram uma clara associação entre os fatores ambientais e de desenvolvimento do câncer como, por exemplo, fumo, obesidade e radiação ultravioleta. E, muitos aspectos do desenvolvimento do câncer foram explicados pelas alterações no código genético, envolvendo a herança não só entre as gerações, mas também entre as células de um organismo, caracterizando o câncer como uma doença definitivamente hereditária (BREIVIK, 2005). Outros estudos epidemiológicos também investigaram os fatores de risco psicossociais para o câncer e embora seja uma associação não completamente compreendida, uma análise com foco apenas em estudos prospectivos mostraram recentemente que sofrimento psíquico, como depressão, ansiedade e má qualidade de vida, foram associadas com um aumento de 13% no risco de incidência de câncer e um aumento de 27% no risco de mortalidade (CHIDA *et al.*, 2008).

Na tentativa de combater esta doença, a World Health Organization (WHO) desenvolveu três princípios para sua prevenção: 1) estimaram que as estratégias de prevenção atuais podem prevenir um terço dos novos cânceres; 2) sugeriram que o rastreio precoce pode resultar na detecção de um terço dos cânceres no estágio inicial; 3) propuseram que uma estratégia de tratamento abrangente pode melhorar a sobrevivência e qualidade de vida para outro terço dos pacientes com câncer avançado (NGOMA, 2006). Estas estratégias oferecem o controle do câncer a longo prazo de maneira mais rentável (CAO *et al.*, 2011).

A interação entre alterações patológicas e morfológicas e sinais moleculares irão orientar o diagnóstico e a terapia do câncer. A reprogramação metabólica está provando ser difundida nas células cancerosas e é considerada como um marco no estudo do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Por outro lado, baseado no sucesso dos rastreios de

marcadores de proteínas tumorais específicas, tais como α -fetoproteína (AFP) e antígeno específico da próstata (PSA), vários novos biomarcadores de câncer serão incluídos nos exames médicos de rotina. Além disso, o rastreo de alvos moleculares específicos melhorarão e orientarão o desenvolvimento eficaz da medicina personalizada ou individualizada. Claramente, uma mudança de ênfase no tratamento para uma ênfase na prevenção do câncer e na combinação de tratamento e prevenção será fundamental para uma estratégia eficaz para eliminar esta doença crônica (STRATTON, 2011).

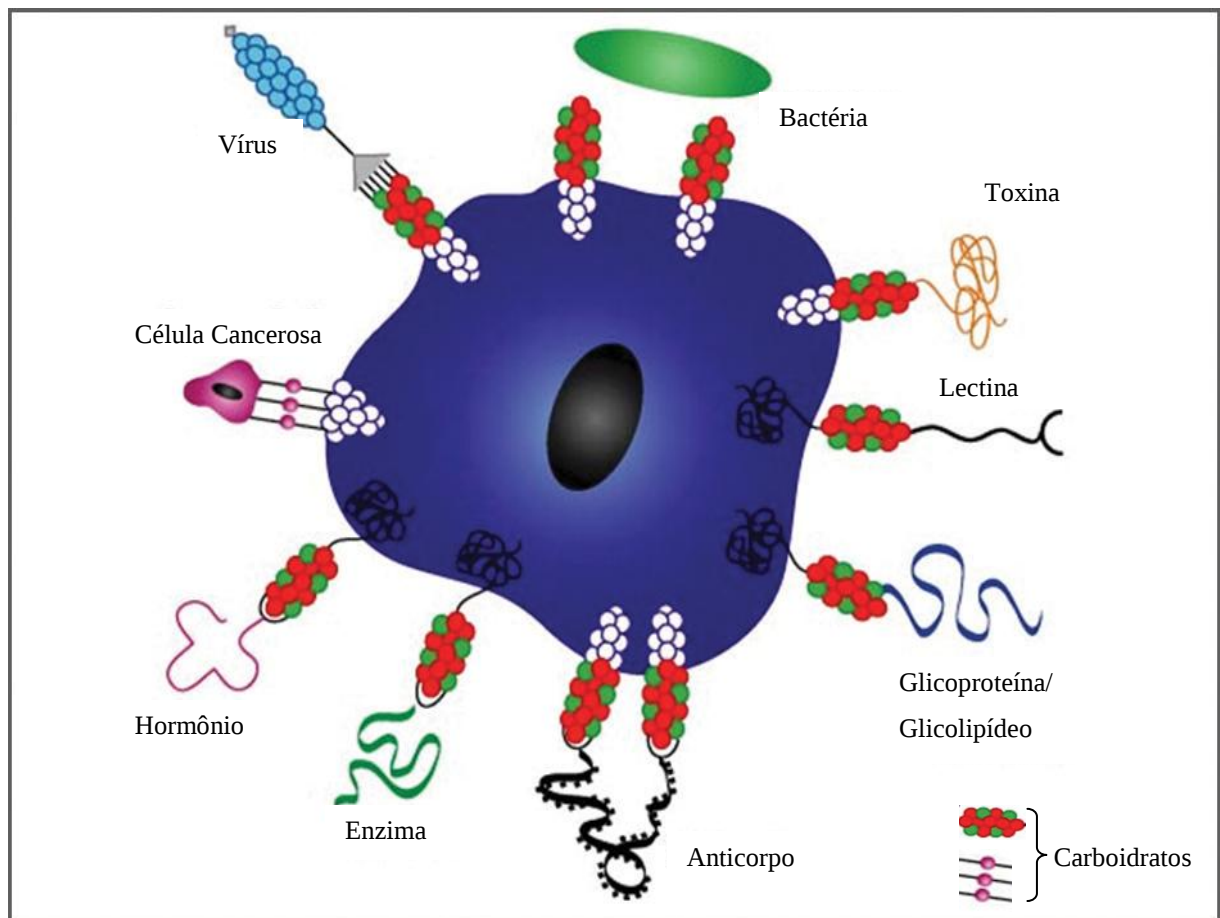
1.2 Aspectos Bioquímicos

Pelo menos no último século, todos os esforços intelectuais e tecnológicos empreendidos na cura do câncer, contribuíram para revelar um intrincado mecanismo de comunicação molecular, intra e intercelular que, em condições fisiológicas, atua na homeostase dos sistemas vivos. Essa complexa rede de sinalização é constituída de vias metabólicas formadas de genes, proteínas e pequenas moléculas, que contêm inúmeros pontos de regulação, sinais divergentes e locais de cruzamento com outras cascatas de sinalização, exercendo mútuas influências (TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006).

As interações proteína-carboidrato ocupam importante papel no repertório de interações moleculares que sustenta o desenvolvimento e função de organismos multicelulares. Os carboidratos de superfície, ligados a proteínas ou lipídios, servem como pontos de interação que resultam em adesão intercelular (Figura 2), de bactérias infecciosas, vírus e toxinas, que freqüentemente procuram um meio de entrada nas células alvo, como também de receptores de hormônios e anticorpos, mediadores da resposta imunológica (DRICKAMER; TAYLOR, 2002). Portanto, as glicoproteínas de superfície celular têm um papel importante na pinocitose, diferenciação, reconhecimento, adesão intercelular e carcinogênese (MANOHARAN *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de processos neoplásicos é associado com modificações quantitativas e/ou qualitativas nos resíduos de glicanos de glicolipídeos, glicoproteínas e proteoglicanos presente na superfície ou organelas celulares (GUILLOT *et al.*, 2004). As alterações no padrão de glicosilação de glicoconjugados de células tumorais têm sido relevantes para o reconhecimento de um desenvolvimento anormal e metástase (ADAMCZYK; THARMALINGAM; RUDD, 2012).

Figura 2 – Carboidratos de superfície celular envolvidos no reconhecimento molecular.



Fonte: Adaptada de Chun-Hung Lin, disponível em:

http://www.bc.sinica.edu.tw/teacher/teacher_images_chunhung_125-02.jpg

Seguindo a lógica de serem menos diferenciadas e estarem voltadas à reprodução, as células das neoplasias malignas apresentam, inicialmente, exacerbação da via glicolítica. Este processo permite a obtenção de energia de modo mais rápido e independente de oxigênio. A glicose e/ou outros carboidratos são incorporados mais facilmente pelas células malignas. Desse modo, o tumor cresce em detrimento das células normais (DAKUBO, 2010).

Muitas pesquisas estão interessadas na alteração de glicosilação de células cancerosas a fim de identificar moléculas que reconhecem estes carboidratos e caracterizar quantitativamente e qualitativamente a interação entre os carboidratos e moléculas de reconhecimento, como as lectinas (FRANKS; TEICH, 1999). Esta parece ser uma abordagem promissora, não somente no diagnóstico, mas também no tratamento como veículo para conduzir drogas ou outros agentes coadjuvantes. Nos últimos 20 anos, a análise morfológica de rotina tem sido auxiliada pela inserção de técnicas bioquímicas e imunoquímicas que

permitem uma análise mais sofisticada da estrutura e função celular (SMETANA; ANDRÉ, 2008).

1.3 Biomarcadores do Câncer

O National Cancer Institute (2012) define como biomarcador uma molécula biológica encontrada no sangue, em outros fluidos corporais ou em tecidos que é um sinal normal ou anormal de um processo, ou de uma condição ou de uma doença (NATIONAL..., 2012).

Os biomarcadores tumorais são indicadores do estado fisiológico e de alterações que ocorrem durante o processo neoplásico. A expressão destes marcadores pode refletir diversos processos, tais como hiperproliferação, alteração de padrões de expressão gênica, hiperplasia, genotoxicidade, inflamação e alterações enzimáticas relacionadas com o desenvolvimento tumoral (TERMINI; VILLA, 2008). Fornecer uma indicação precoce e monitorar a progressão da doença, proporcionar facilidade de detecção, determinar o risco de desenvolvimento e o prognóstico, bem como o sucesso do tratamento em resposta a uma determinada medicação e/ou procedimento, constituem a principal razão para a identificação de marcadores biológicos ou biomarcadores (TERMINI; VILLA, 2008). Na tabela 2 apresentamos uma síntese do uso dos biomarcadores na medicina do câncer.

Tabela 2 – Biomarcadores no câncer.

Usos de Biomarcadores na Medicina do Câncer						
Antes do Câncer	Diagnóstico	Depois do Diagnóstico do Câncer				Pós-tratamento
Avaliar o risco	Diagnóstico	Prognóstico	Predizer a resposta ao tratamento	Farmacocinética	Monitorar resposta ao tratamento	Recorrência
Eu tenho risco aumentado para câncer?	Eu tenho câncer? Que tipo de câncer eu tenho?	Qual o rumo esperado para meu câncer?	Meu câncer responde a essa droga?	Eu devo receber uma dose normal ou menor? Ou nenhuma dose?	Como meu câncer responde a esse tratamento?	Meu câncer pode voltar?

Fonte: Adaptada de Research Advocacy Network (2010)

Os biomarcadores usados hoje na medicina e na pesquisa geralmente se enquadram em três categorias principais: 1) Biomarcadores moleculares, também chamados de marcadores

moleculares ou bioquímicos, são um dos tipos mais comuns e são moléculas biológicas encontradas nos fluidos corporais e tecidos, como as proteínas; 2) Biomarcadores fisiológicos relacionados com os processos funcionais do corpo, tais como a pressão sanguínea e 3) Biomarcadores anatômicos relacionados com a estrutura do organismo e a relação com suas partes (RESEARCH..., 2010).

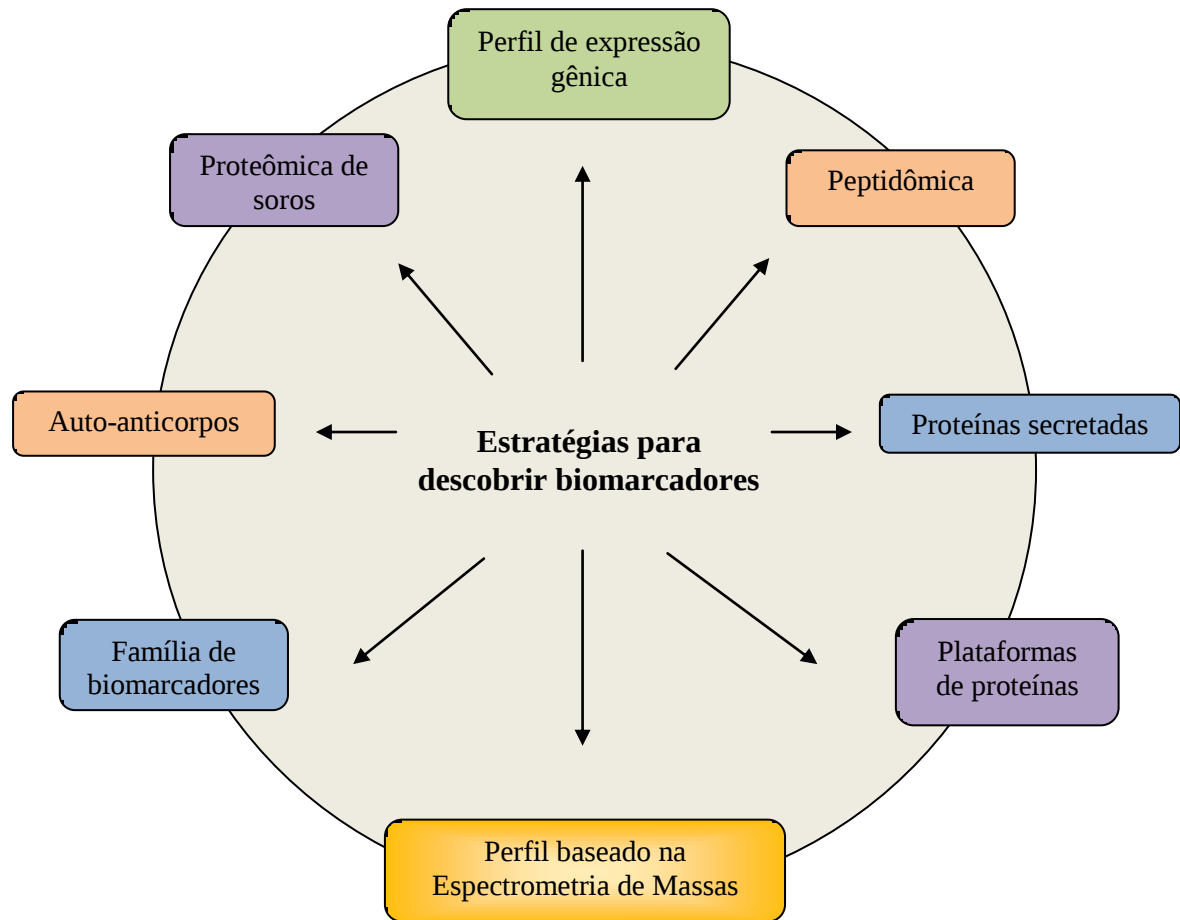
Biomarcadores de fluidos corporais têm o potencial de detectar uma ampla variedade de tumores primários e metástases e incluem uma variedade de componentes no sangue, urina ou outros fluidos como, por exemplo, as células tumorais circulantes (CTC) e macromoléculas, tais como lípidos, proteínas, RNA, DNA, carboidratos (MISHRA; VERMA 2010). Além das CTC, outras células circulantes estão sendo exploradas como células imunológicas, estromal e endotelial (MARTIN *et al.*, 2010). Eles possuem vantagens sobre o diagnóstico por imagem já que são convenientes, não invasivos e na maioria das vezes de baixo custo (MARTIN *et al.*, 2010).

Os recentes avanços na bioinformática, bioengenharia e nas tecnologias genômica, proteômica e transcriptômica (Figura 3) têm gerado estratégias para descoberta de novos biomarcadores. Nesta era de tecnologias moleculares altamente inovadoras em laboratórios de investigação, existe uma necessidade crítica de trazer de forma eficiente os testes para a clínica, pois, diversas pesquisas sobre biomarcadores foram publicadas na última década, mas poucas foram aplicadas clinicamente na rotina (KULASINGAM; DIAMANDIS, 2008; MARTIN *et al.*, 2010). A glicoproteômica, uma área da proteômica com significado biológico e clínico, ganha destaque por ser um campo emergente na pesquisa com biomarcadores (PAN *et al.*, 2011; MEANY; CHAN, 2011).

Atualmente, os biomarcadores podem ser inicialmente introduzidos como exames complementares para confirmar resultados positivos de métodos de rastreio convencionais e para ajudar na decisão de tratamentos adicionais (MARTIN *et al.*, 2010). Como em todos os programas de rastreio, a medida do sucesso de um biomarcador será reduzir a mortalidade específica por câncer através da detecção precoce (MARTIN *et al.*, 2010).

As taxas de mortalidade de alguns tipos de câncer caíram recentemente por causa da detecção precoce através dos biomarcadores. Por exemplo, o teste de Papanicolau detecta e permite a remoção do câncer cervical pré-sintomático. Houve também sucessos em programas de triagem para detecção dos cânceres de mama e de próstata. Entretanto, permanece um desafio para os pesquisadores desenvolver métodos que superem os problemas atuais e detectem eficazmente o câncer precoce e tratável (MARTIN *et al.*, 2010).

Figura 3 – Delineamento de estratégias para a descoberta de biomarcadores através da utilização de tecnologias emergentes.



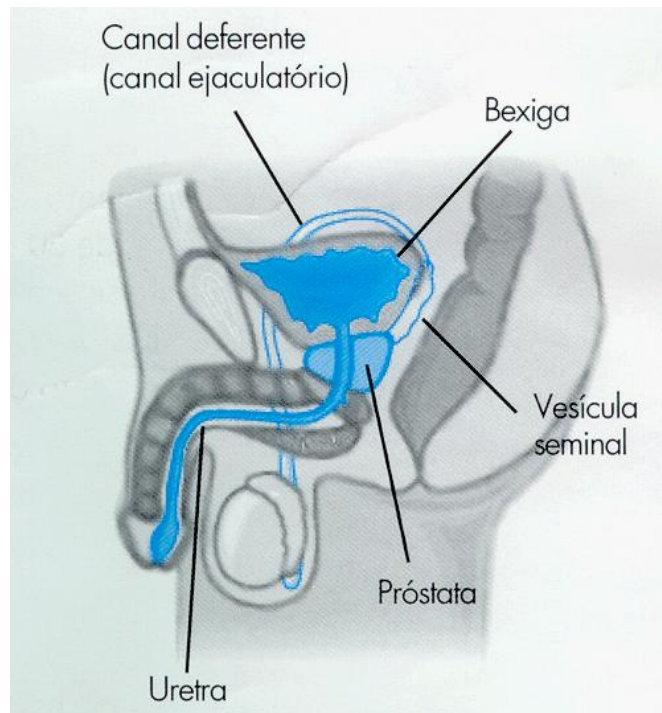
Fonte: Adaptada de Kulasingam e Diamandis (2008)

2 Próstata

2.1 Considerações Gerais (Anatomia e Histologia)

A origem da palavra próstata vem do grego “pro – histanai”, “estar à frente”, estrutura que está abaixo da bexiga e à frente do reto (Figura 4) (NATIONAL..., 2012). A próstata está envolvida na produção do líquido prostático (aproximadamente 30% do volume de fluido seminal) que atua na nutrição e preservação dos espermatozóides presentes no esperma (JOSHUA *et al.*, 2008; RIZZO; ATTARD; HUDSON, 2005).

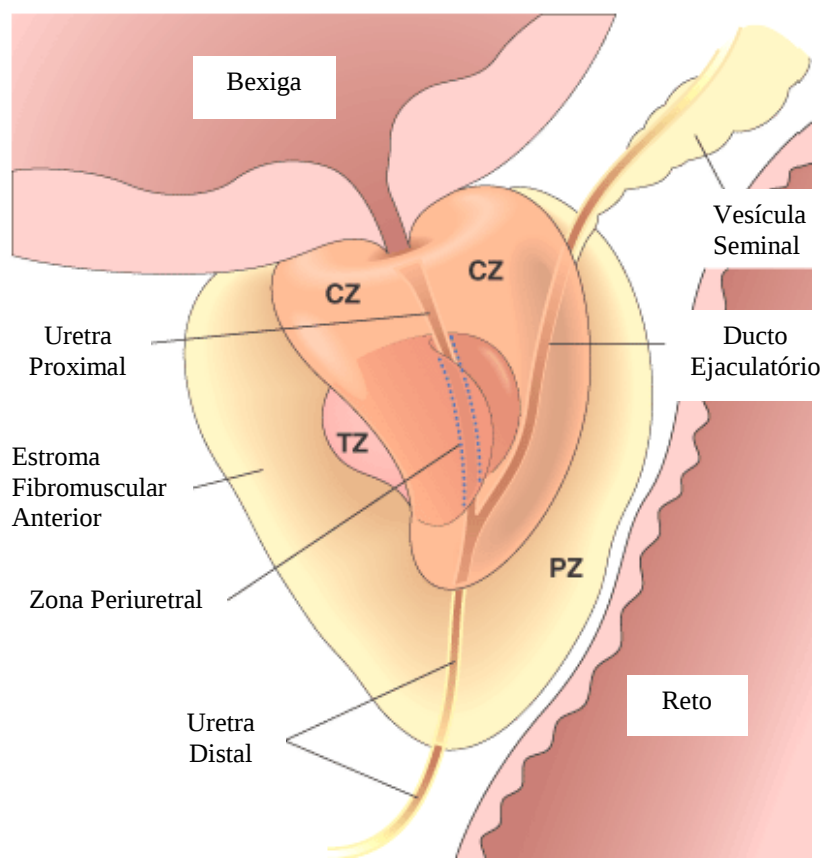
Figura 4 – Anatomia da Próstata.



Fonte: Material Informativo da Comissão de Educação Continuada da Sociedade Brasileira de Urologia.

Na década de 1960, J.E. McNeal definiu a subdivisão anatômica da próstata em três zonas distintas: periférica, transicional e central, ainda hoje universalmente aceita (MARANDOLA *et al.* 2004) com uma quarta zona chamada de zona periuretral (Figura 5). Os tipos de lesão proliferativa são diferentes em cada região. Enquanto a HBP (hiperplasia benigna prostática) ocorre quase exclusivamente na zona transicional, a maioria dos adenocarcinomas ocorre na zona periférica e apenas 30% na zona transicional (JOSHUA, 2008).

Figura 5 - Divisão Anatômica de Próstata de Adulto. A próstata normal contém as zonas: central (CZ), periférica (PZ), transicional (TZ) e periuretral.



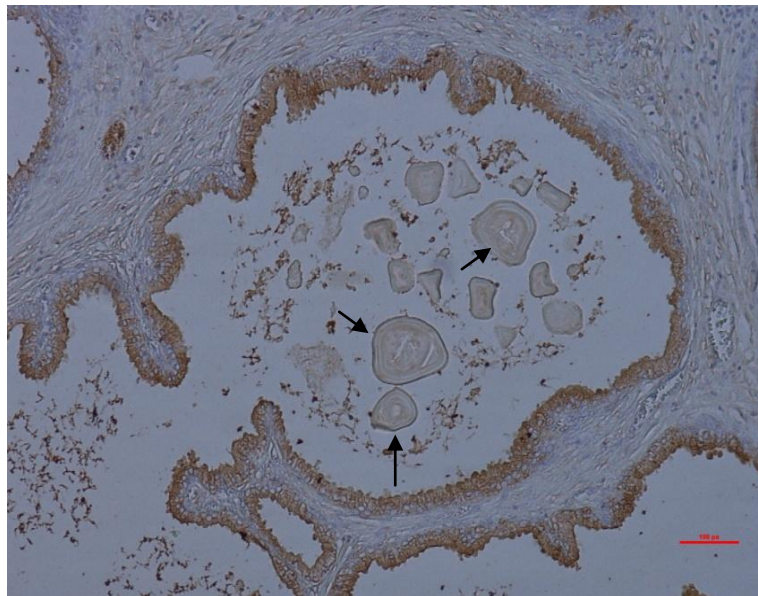
Fonte: Adaptada de Kumar, Abbas e Fausto (2010)

A próstata é um órgão complexo que reúne elementos acinares, musculares e estroma (SMITH, 2010), o tecido epitelial é constituído por glândulas e o estroma aparece situado entre as glândulas. O epitélio prostático é constituído principalmente de três tipos celulares: secretórias, basais e células neuroendócrinas (JOSHUA *et al.*, 2008; SMITH, 2010). As células secretórias enfileiradas formam as glândulas e ductos prostáticos e são responsáveis pelas secreções fisiológicas da glândula que produz um número amplo de compostos tais como fosfatase ácida, desidrogenase, PSA (antígeno específico da próstata, do inglês: prostatic specific antigen), prostaglandina, espermina, fibrogenase, aminopeptidase, zinco, citrato, pepsinogênio II e lactoferrina (MARANDOLA *et al.*, 2004). As células basais são muito menos abundantes, repousam na parte basal das células secretórias e atuam como células de reserva, diferenciando-se em células epiteliais secretoras (SMITH, 2010). Sua ausência é um importante indicador de câncer de próstata (JOSHUA *et al.*, 2008). As células neuroendócrinas estão espalhadas pela glândula e acredita-se estarem envolvidas na regulação

da atividade secretória prostática (JOSHUA *et al.*, 2008). O estroma é composto de tecido fibroso, músculo liso, linfócitos e tecido neurovascular presentes numa matriz extracelular de apoio sustentando a próstata (JOSHUA *et al.*, 2008; SMITH, 2010).

A nível intraluminal das glândulas prostáticas há formações ou concreções nodulares pequenas chamadas corpos amiláceos (CAs) (Figura 6), as quais também já foram descritas em outros tecidos, como cérebro, pulmão e útero (BALEA; ILLES; SCHÖBER, 2006; CHRISTIAN *et al.*, 2005; MORALES *et al.*, 2005). No cérebro, sua presença está associada com idade, assim como em várias outras condições neurológicas, tais como Alzheimer e esclerose múltipla (BALEA; ILLES; SCHÖBER, 2006).

Figura 6 – Corpos amiláceos (setas) em glândula hiperplásica.



Fonte: Próprio Autor

Na próstata, a prevalência destas formações aumenta com a idade. Inicialmente aparecem entre a 3ª e 5ª décadas de vida e torna-se mais freqüente em homens mais velhos. Ao microscópio de luz, CAs prostáticos podem variar em tamanho e forma, mas são mais freqüentemente redondos e mostram uma disposição de um material eosinofílico acelular de intensidade variável (CHRISTIAN *et al.*, 2005). Ultra-estruturalmente, os CAs são constituídos por bandas concêntricas e fibrilares e ocasionalmente por áreas polimórficas eletrodensas e pequenas espalhadas entre as fibras. Entretanto, a presença dessas laminações concêntricas é variável (MORALES *et al.*, 2005).

Corpos amiláceos da próstata são corpos protéicos com um alto conteúdo de mucopolissacarídeos. Bioquimicamente, os CAs são compostos de substância amilóide, primariamente β_2 – microglobulina, mais carboidratos que proteínas numa relação de 2:1, altas concentrações de açúcares (glicosamina e galactose) e glicosaminoglicanos sulfatados (CAVANAGH, 1999; CHRISTIAN *et al.*, 2005; MORALES *et al.*, 2005).

A origem e a função dos CAs são debatidas e diferentes teorias são propostas: uns apontam que são um acúmulo de substância amilóide como uma consequência de um possível processo degenerativo do epitélio ou da amiloidose focal, outros defendem que CAs são a consequência final da secreção prostática apócrina e do acúmulo de restos celulares; este processo seria regulado e baseado nos grânulos da secreção prostática (MORALES *et al.*, 2005). CAs estão presentes em ácinos benignos da próstata de aproximadamente 25% dos homens de 20-40 anos, mas são raros no adenocarcinoma (MORALES *et al.*, 2005). Entretanto, sua presença não deve ser usada como um critério para exclusão de malignidade (CHRISTIAN *et al.*, 2005).

Há três processos patológicos que afetam a glândula prostática com maior frequência que são: inflamação, aumento nodulares benignos e adenocarcinoma. Destes três, os aumentos nodulares benignos são os mais comuns e ocorrem com tanta frequência na idade avançada e podem ser considerados um processo “normal” do envelhecimento. O adenocarcinoma prostático é também uma lesão extremamente comum e, portanto, merece uma consideração cuidadosa. Os processos inflamatórios têm, em geral, pouca importância clínica já que podem ser tratados facilmente. Assim, discutiremos adiante o processo hiperplásico e neoplásico.

2.2 Hiperplasia Benigna Prostática (HBP)

HBP é incomum em homens jovens, mas é uma das circunstâncias mais comuns associadas ao envelhecimento dos homens, geralmente inicia-se aos 30 anos e desenvolve-se lentamente (LEPOR, 2005; WEBBER, 2004). Mais de um a cada três homens acima de 50 anos de idade sofrem de sintomas relacionados à HBP e sua evidência histológica ocorre em 90% daqueles com 80 anos de idade (RIZZO; ATTARD; HUDSON, 2005). Ela é também conhecida como hipertrofia benigna prostática ou como hiperplasia nodular da próstata.

HBP é corretamente definida como aumento da glândula prostática a partir da hiperplasia progressiva das células prostáticas glandulares e estromais resultando na formação de nódulos grandes, relativamente nítidos, na região periuretral da próstata (JAYAPALAN *et al.*, 2012; NICKEL, 2007).

Essa condição prostática não maligna se origina quase exclusivamente no aspecto interno da glândula prostática, na zona de transição, o crescimento da glândula em tamanho e/ou aumento da quantidade de tecido muscular que se contrai por ação de um hormônio (noradrenalina), agrava o efeito compressor da próstata sobre a uretra, que tem seu caminho pelo centro da próstata, impedindo o fluxo da urina da bexiga até sua eliminação (LEPOR, 2005; NICKEL, 2007). Os mecanismos de causa são pouco evidentes, porém a idade relacionada à obstrução no esvaziamento da bexiga é um fator importante pelo fato de levar a retenção urinária e a necessidade freqüente de urinar (LEPOR, 2005; WEBBER, 2004).

Microscopicamente, a marca característica da HBP é a nodularidade devida à proliferação ou dilatação glandular e proliferação fibrosa ou muscular do estroma. A proporção destes elementos varia de nódulo a nódulo, desde nódulos fibromusculares estromais até nódulos fibroepiteliais com predominância glandular. A proliferação glandular torna a forma de agregados de glândulas cisticamente dilatadas pequenas ou grandes, revestidas por duas camadas, uma interna colunar e outra externa de epitélio cubóide ou planificado, repousando sobre uma membrana basal intacta e observa-se um estroma escasso (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010).

A aparência clínica clássica para hiperplasia prostática tem sido descrita como combinação de três propriedades: volume aumentado da próstata, presença de sintomas de prostatismo e evidências de obstrução do fluxo da bexiga (LEPOR, 2005). Portanto, a hiperplasia é uma doença progressiva caracterizada, principalmente, por sintomas no trato urinário baixo cada vez mais prevalente em homens de idade avançada e que se apresentada de forma severa pode levar a complicações como retenção urinária aguda e cirurgia (NICKEL, 2007).

2.3 Câncer de Próstata (CaP)

CaP é reconhecido atualmente como um dos problemas médicos mais importante que afeta a população masculina. O CaP é o tumor maligno de maior incidência em homens nos países desenvolvidos e a segunda causa de morte por câncer, atrás apenas dos tumores de pulmão de acordo com a American Cancer Society (2012).

Esse câncer é considerado a neoplasia maligna mais comum em homens idosos e é freqüentemente complicado por metástase óssea (NATIONAL..., 2012). As taxas de incidência são cerca de três vezes maiores nos países desenvolvidos comparados aos países em desenvolvimento justamente devido a afetar os homens idosos com mais freqüência do

que os homens jovens (NATIONAL..., 2012). Contudo, durante as últimas décadas, a sobrevida global aumentou de 67% para 89%, devido a melhores programas de triagem e sensibilização aumentada da doença entre os médicos e o público geral (STANGELBERGER; SCHALLY; DJAVAN, 2008).

No Brasil, conforme estimativas do Instituto Nacional de Câncer (2011), o CaP permanece na 2ª colocação, em incidência, atrás dos tumores de pele (não-melanoma) e, na mortalidade, é superado apenas pelo câncer de pulmão. O INCA estimou para o ano de 2012 a ocorrência de 60.680 casos novos de câncer da próstata no país, valor que corresponde a um risco estimado de 62 casos novos a cada 100 mil homens. Esse aumento na taxa de incidência ao longo dos anos provem do aumento da expectativa de vida, a melhoria e a evolução dos métodos diagnósticos e da qualidade dos sistemas de informação do país. Mais do que qualquer outro tipo de câncer, este é considerado o câncer da terceira idade, uma vez que aproximadamente 62% dos casos de câncer da próstata diagnosticados no mundo acometem em homens com 65 anos ou mais. Com o crescimento da expectativa de vida mundial, é esperado que o número de novos casos aumente cerca de 60% até o ano de 2015 (INSTITUTO..., 2011).

Os fatores que determinam o risco de desenvolver esse câncer não são bem conhecidos, mas há três fatores de risco bem estabelecidos como o envelhecimento (idade maior ou igual a 50 anos), a origem étnica (maior prevalência entre negros norte-americanos e africanos) e a hereditariedade (história familiar de pai ou irmão com câncer da próstata antes dos 60 anos de idade) (AMERICAN..., 2012; JAYAPALAN *et al.*, 2012). Outros fatores etiológicos relacionados estão influência hormonal, alcoolismo, exposição à radiação ultravioleta, dieta (consumo aumentado de gordura) e o estilo de vida (INSTITUTO..., 2011).

O CaP precoce normalmente não apresenta sintomas. No entanto, com a doença mais avançada, os indivíduos sentem o fluxo urinário fraco ou interrompido; incapacidade de urinar ou dificuldade para iniciar ou parar fluxo de urina; necessidade freqüente de urinar, principalmente à noite; sangue na urina, ou urinar com dor ou ardor. No estágio avançado da doença geralmente se espalha para os ossos, o que pode causar dor no quadril, coluna, costelas, ou outras áreas. No entanto, vale salientar que muitos desses sintomas não são específicos para câncer de próstata (AMERICAN..., 2012).

No Brasil, a mortalidade por esse tipo de neoplasia apresenta um perfil ascendente semelhante ao da incidência, embora sua magnitude seja mais baixa. Esse câncer pode ser considerado um câncer de bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente (INSTITUTO..., 2011). Em relação aos aspectos morfológicos, aproximadamente 70% dos

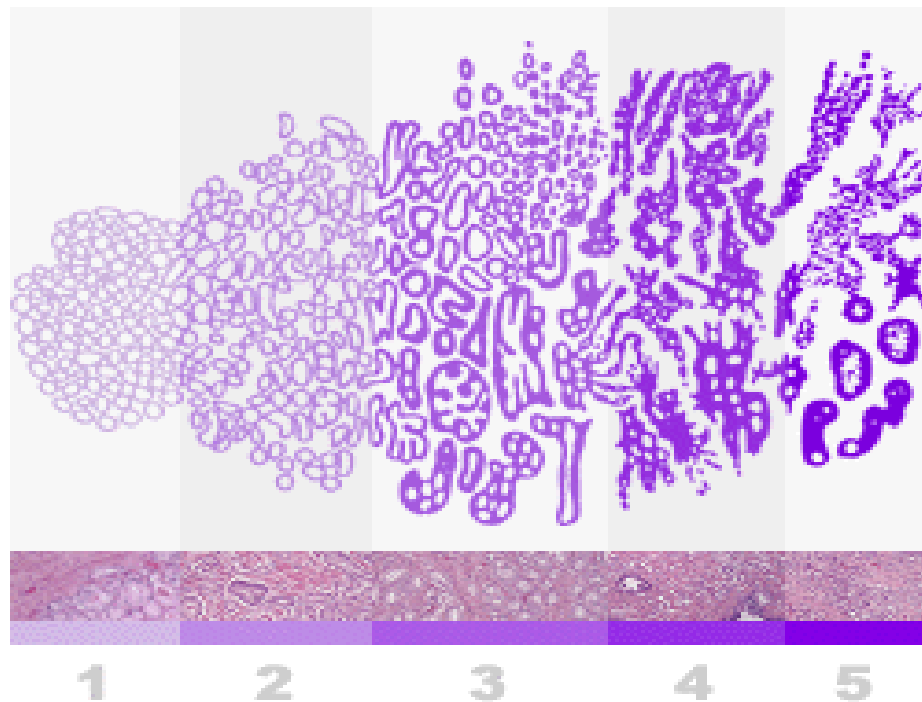
casos de carcinoma surgem na zona periférica da glândula, freqüentemente palpável ao exame retal. Em pacientes com suspeita sob o toque retal ou alterações no nível do PSA, encaminha-se para biópsia prostática, a qual consiste na retirada de pequenos fragmentos da zona periférica da glândula a fim de identificar ou não qualquer malignidade na histopatologia (JAYAPALAN *et al.*, 2012) .

O exame histológico revela o adenocarcinoma, em geral, constituído, por pequenos ácinos que infiltram difusamente o estroma e o arranjo dos ácinos é útil diagnosticamente para determinar o grau do tumor. Ácinos malignos têm um arranjo irregular e casual espalhados no estroma em conglomerados ou cachos e o espaçamento entre ácinos malignos varia amplamente. A camada de células basais é normalmente ausente em CaP, porém fibroblastos podem imitar células basais mas são apenas vistos focalmente na periferia do ácino. Os fatores citológicos incluem alargamento nuclear e nucleolar que ocorre na maioria das células malignas. O estroma no câncer freqüentemente contém colágeno jovem o qual aparece fracamente eosinofílico e as fibras musculares são, às vezes, rompidas (MONTIRONI *et al.*, 2006).

No estudo microscópico, entre os vários sistemas de graduação existentes, o de Gleason é, universalmente, mais utilizado, baseado na diferenciação glandular e no padrão de crescimento em relação ao estroma (NATIONAL..., 2012). Neste sistema, não se consideram a atípica característica nuclear e, até hoje, não foi demonstrado superioridade da avaliação nuclear em relação ao padrão glandular no adenocarcinoma da próstata.

De acordo com este sistema, o escore de Gleason é a soma dos dois padrões mais comuns (graus de 1 a 5) do desenvolvimento tumoral e a contagem final está entre 2 e 10, com 2 sendo o menos agressivo e 10 o mais agressivo. Há uma definição para os 5 graus de diferenciação (Figura 7): Em 1 e 2, a neoplasia mostra apenas desarranjo arquitetural, as glândulas crescem proximamente junto; em 3, 4 e 5, há infiltração do estroma e em 5 o arranjo é sólido bem indiferenciado (WETZEL; BECICH, 2000) . A maioria dos tumores contém mais de um padrão, e nesse caso é designado um grau primário para o padrão dominante e um grau secundário para o padrão subdominante. Os dois graus numéricos são então somados para se obter um grau ou escore de Gleason combinado (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010). Assim, por exemplo, se o grau histológico de 90% da área examinada é 3 e de 10% é 4, o grau do tecido neoplásico será 3 + 4 o que daria uma contagem final de 7. Caso o grau histológico seja 3 em toda a área examinada, repete-se o número; o grau será 3 + 3 e a contagem final 6.

Figura 7 - Graus histológicos do Carcinoma Prostático, de acordo com o sistema Gleason.



Fonte: Wetzel e Becich (2000)

Em relação ao diagnóstico de CaP, a atual diretriz de avaliação do paciente é o exame digital retal (EDR), a concentração sérica do PSA e a ultra-sonografia transretal que levam a detecção desta doença, resultando em tratamento precoce e melhor recuperação dos pacientes (STANGELBERGER; SCHALLY; DJAVAN, 2008). Entretanto, o diagnóstico definitivo depende da verificação histopatológica de adenocarcinoma em biópsia de próstata ou espécimes operatórios.

Os níveis de PSA aumentam no soro de indivíduos com patologias prostáticas e sua dosagem é largamente utilizada como um marcador prostático tumoral auxiliando na detecção de câncer de próstata na avaliação da progressão da doença e para estimar a resposta terapêutica (HERWIG *et al.*, 2008). Entretanto, os pacientes com níveis entre 4,0 e 10 ng/mL são classificados dentro da categoria de zona “cinzenta” de diagnóstico, não permitindo uma diferenciação clara entre CaP e HPB (TABARÉS *et al.*, 2006). Entre os pacientes com níveis de PSA dentro da zona “cinzenta”, aproximadamente 25% tem sido diagnosticado com CaP. Significa que os outros 75% de pacientes não tem câncer, mas devem ser submetidos à desconfortável biópsia prostática (OHYAMA *et al.*, 2004).

Outro tema emergente é a incidência crescente de CaP com baixos níveis de PSA. Estudos recentes têm relatado uma incidência de 20,5% de CaP quando os níveis de PSA entre 2,5 e 4 ng/mL (TABARÉS *et al.*, 2006). Portanto, tem sido imperativo, obter mais características bioquímicas do PSA, tais como alterações de glicosilação, para melhorar a eficiência na discriminação de CaP e HBP livrando os pacientes de exames invasivos desnecessários (OHYAMA *et al.*, 2004; PERACAULA *et al.*, 2003), não obstante também buscar novas glicoproteínas e suas alterações de glicosilação que possam servir de possíveis ferramentas ou biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico das alterações prostáticas.

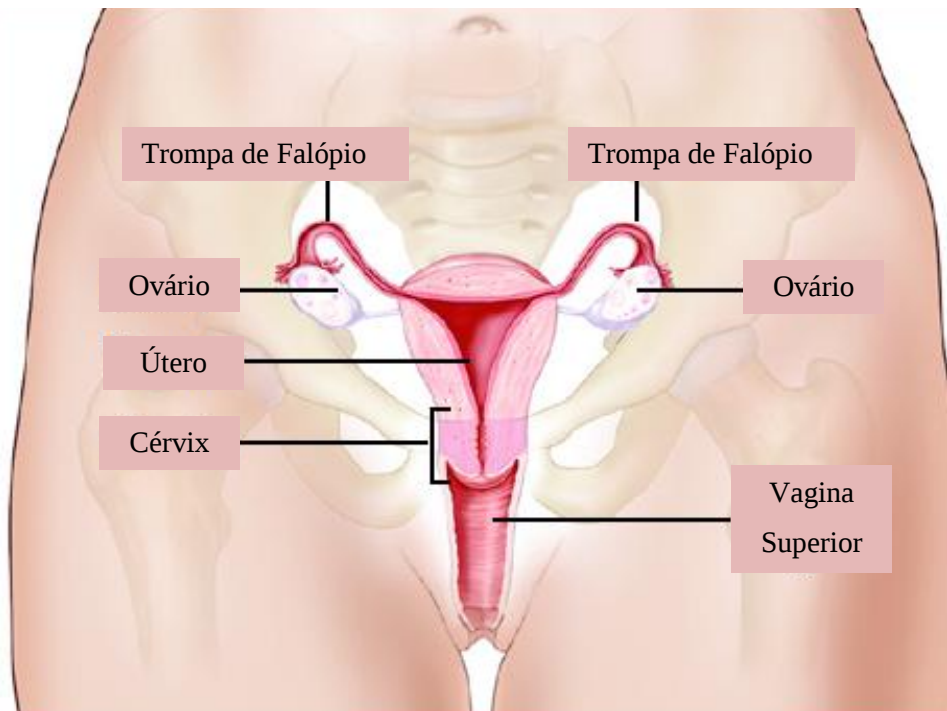
3 Colo Uterino

3.1 Considerações gerais

O útero é um órgão muscular do sistema reprodutor feminino, de paredes grossas, que se localiza na pelve, por trás da bexiga e na frente do reto e é dividido em corpo e colo (Figure 8) (BASTOS, 2006; NATIONAL..., 2012). Esta última parte é a porção inferior do útero e se localiza dentro da cavidade vaginal. O útero tem como funções sustentar, nutrir e proteger o conceito durante a gravidez ao manter o colo fechado durante esse período (BASTOS, 2006).

O colo uterino ou cérvix representa a porção inferior do órgão, têm forma cilíndrica e apresenta, em seu interior, um canal, chamado de canal endocervical, que comunica a cavidade uterina com a luz vaginal. A superfície mucosa do canal endocervical é chamada de endocérvice e é recoberta por epitélio simples colunar mucossecretor. Já a superfície mucosa cervical voltada para a vagina é denominada de ectocérvice e é revestida por epitélio estratificado escamoso não-queratinizado, também chamado de epitélio malpighiano. Abaixo do epitélio simples colunar, existem células de reserva, multipotentes, capazes de se diferenciar tanto em células colunares quanto em células escamosas (BASTOS, 2006; NATIONAL..., 2012).

Figura 8 - Cérvix uterina e órgãos vizinhos.



Fonte: Adaptada do National Cancer Institute (2012)

A área de junção entre o epitélio da ectocérvice e da endocérvice é chamada de junção escamo-colunar (JEC), que pode estar tanto na ecto como na endocérvice, dependendo da fase hormonal da mulher. Na infância e no período pós-menopausa, geralmente, a JEC situa-se dentro do canal cervical. No período da menacme, quando ocorre produção estrogênica, geralmente a JEC situa-se ao nível do orifício externo ou para fora do canal (BASTOS, 2006; NATIONAL..., 2012). Por ser uma área de intensa mudança, a JEC é bastante sensível, sendo a principal área de instalação de lesões no colo uterino (BASTOS, 2006).

As lesões de maior importância clínica do colo do útero correspondem ao carcinoma escamoso invasor e suas lesões precursoras, como as neoplasias intraepiteliais cervicais (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010). O colo do útero consiste tanto uma sentinela para as infecções do aparelho genital superior potencialmente graves, quanto um alvo para carcinógenos virais, os quais quando se instalam no colo levam a infecções crônicas ou displasias, que se não tratadas podem conduzir ao carcinoma invasivo (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010).

3.2 Neoplasia intraepitelial cervical (NIC)

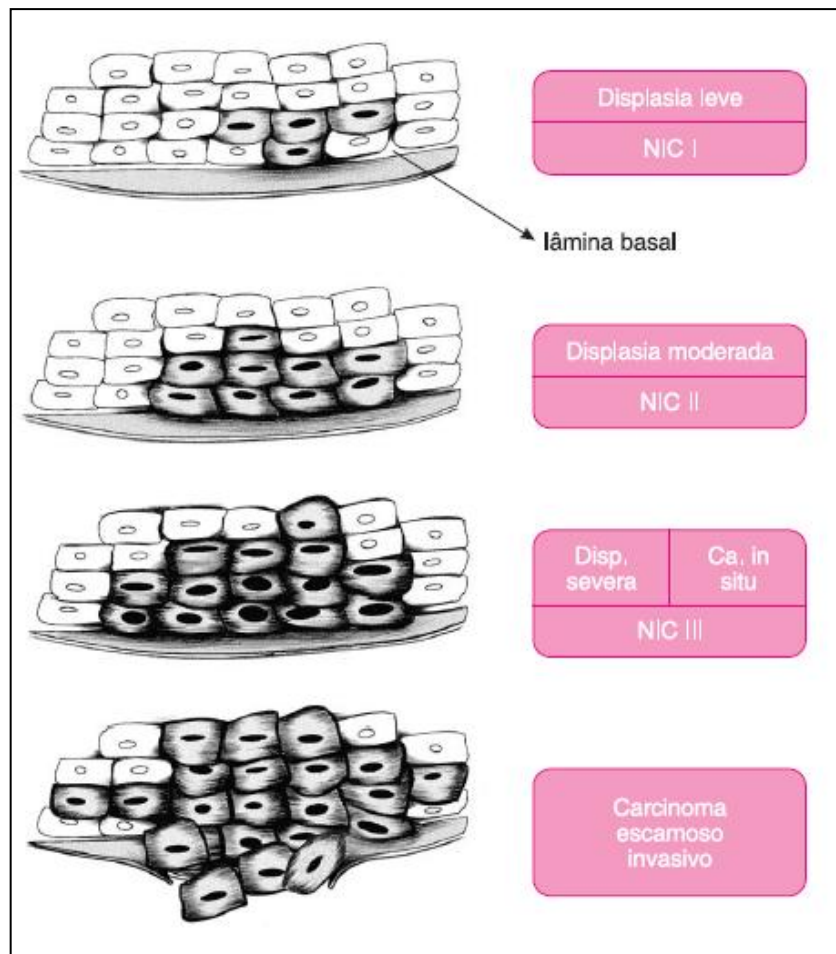
Classicamente, a história natural do câncer do colo do útero é descrita como uma afecção iniciada com transformações intra-epiteliais progressivas que podem evoluir para uma lesão cancerosa invasora, num prazo de 10 a 20 anos (INSTITUTO..., 2002).

Estas lesões pré-cancerosas já foram classificadas de diversas maneiras. A primeira classificação proposta foi feita em 1956 e era baseada no sistema displasia/carcinoma *in situ*, no qual a displasia leve estava situada em uma das extremidades e a displasia intensa e carcinoma *in situ* estavam situados na outra extremidade. No final da década de 60, foi proposto o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) para referir-se a um espectro de alterações intraepiteliais que se iniciariam com a displasia leve e iriam até carcinoma invasor. Dessa forma, NIC I corresponde à displasia leve, NIC II à displasia moderada e NIC III à displasia intensa e carcinoma *in situ* (Figura 9). Esse termo foi bem mais aceito e é usado ainda hoje, pois engloba em um mesmo grupo dois termos diferentes (displasia intensa e carcinoma *in situ*) que apresentam o mesmo processo patológico (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010).

Quando a desordenação ocorre nas camadas mais basais do epitélio estratificado, estamos diante de uma displasia leve ou neoplasia intra-epitelial cervical grau I (NIC I). Cerca de 60% das mulheres com NIC I vão apresentar regressão espontânea, 30% podem apresentar persistência da lesão como tal, e das demais, menos de 10% irão evoluir para NIC III, sendo a progressão para o câncer invasor estimada em cerca de 1%. Se a desordenação avança até os três quartos de espessura do epitélio, preservando as camadas mais superficiais, estamos diante de uma displasia moderada ou NIC II (INSTITUTO..., 2002).

Na NIC III, o desarranjo é observado em todas as camadas. Esta desordenação das camadas é acompanhada por alterações nas células que vão desde núcleos mais corados até figuras atípicas de divisão celular. Quando as alterações celulares se tornam mais intensas e o grau de desarranjo é tal que as células invadem o tecido conjuntivo do colo do útero abaixo do epitélio, temos o carcinoma invasor. Para chegar ao câncer invasor, a lesão não tem, obrigatoriamente, que passar por todas estas etapas. As lesões de alto grau são consideradas como as verdadeiras precursoras do câncer e, se não tratadas, em boa proporção dos casos, evoluirão para o carcinoma invasor do colo do útero (INSTITUTO..., 2002).

Figura 9: Evolução das neoplasias intraepiteliais cervicais até o câncer de colo do útero.



Fonte: Instituto Nacional do Câncer (2002)

De acordo com a reprodutibilidade clínica, com o risco de desenvolver câncer e com necessidades diferentes de tratamento, uma nova forma de classificar essas lesões foi proposta: lesão intraepitelial de baixo grau, que corresponde a NIC I, e lesão intraepitelial de alto grau, que engloba NIC II e III (BASTOS, 2006; SUWANNARURK *et al.*, 2009). Essa classificação surgiu através das observações de que cerca de 60 a 85% das lesões de NIC I sofriam regressão espontânea dependendo da idade do paciente, da competência imunológica, de hábitos de fumar e do tipo causal do vírus do papiloma humano (VPH ou HPV, do inglês human papiloma virus), e apenas 1% dos NIC I progrediam para carcinoma escamoso invasivo. Enquanto que a regressão espontânea nos casos de NIC II e III é bastante improvável, e se não tratada, o risco de progressão para o câncer invasivo aumenta substancialmente de 5% para 22%, tornando justificada a necessidade do diagnóstico precoce aliado ao tratamento imediato (KIETPEERAKOOL; SRISOMBOON, 2009).

O fato de o câncer cervical evoluir a partir das neoplasias intraepiteliais cervicais, faz com que elas compartilhem os mesmos fatores de risco. O principal é a infecção pelo HPV, no qual as evidências são suficientes para estabelecer uma relação causal entre infecção pelo HPV e desenvolvimento da NIC (GIORGI ROSSI; GUGLIELMO, 2013). Porém sabe-se que infecções por HPV por si só não são suficientes para desenvolver NIC em imunocompetentes, sendo necessário co-fatores, como o tabagismo, os efeitos hormonais dos contraceptivos orais, gravidez, carências alimentares, a imunossupressão, inflamações crônicas, início precoce da vida sexual, aborto e condições sócio-econômicas (INSTITUTO..., 2011).

Não existem sinais e sintomas característicos de NIC. A NIC é uma lesão inicial e assintomática, que pode evoluir para o câncer cervical e somente aí será sintomática. Daí a importância da colpocitologia oncótica como método de rastreamento dessas lesões, para que seja feito o tratamento mais precocemente possível a fim de evitar a evolução para o carcinoma invasivo (BASTOS, 2006). Como o NIC I costuma regredir espontaneamente, ele é apenas acompanhado a cada quatro meses durante um ano, persistindo a lesão é que se procede para a sua remoção da lesão, porém, em casos de NIC II e III, as quais costumam progredir para o câncer cervical, deve-se retirar cirurgicamente a lesão (BASTOS, 2006).

A colpocitologia oncótica realmente é capaz de diminuir bastante os novos casos de câncer de colo de útero, porém apresenta uma sensibilidade baixa, de 50 a 60%, necessitando de repetições periódicas, o que aumenta substancialmente os custos e pode aumentar também os falsos-positivos. Dessa forma é importante a busca de novos diagnósticos complementares e mais sensíveis (LÖRINCZ, 2003).

3.3 Câncer de colo de útero: Carcinoma invasivo de células escamosas

O câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres (GIORGI ROSSI; GUGLIELMO, 2013) com 500 mil casos novos por ano e morte de, aproximadamente, 230 mil mulheres por ano no mundo. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos, do que nos mais desenvolvidos (AMERICAN..., 2012). Entretanto, a incidência e a mortalidade de câncer cervical têm diminuído, em parte pelo diagnóstico precoce e tratamento de lesões precursoras do câncer cervical (INSTITUTO..., 2002).

No Brasil, é o segundo tumor mais frequente na população feminina, atrás apenas do câncer de mama, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil. Por ano, faz 4.800 vítimas fatais e apresenta 18.430 novos casos. A prova de que o país avançou na sua

capacidade de realizar diagnóstico precoce é que na década de 1990, 70% dos casos diagnosticados eram da doença invasiva, ou seja, o estágio mais agressivo da doença e atualmente, 44% dos casos são de lesão precursora do câncer. Mulheres diagnosticadas precocemente, se tratadas adequadamente, têm praticamente 100% de chance de cura (INSTITUTO..., 2011). O câncer do colo do útero é raro em mulheres até 30 anos e sua incidência aumenta progressivamente até ter seu pico na faixa de 45 a 50 anos (INSTITUTO..., 2011).

O câncer do colo do útero é caracterizado pela replicação desordenada do epitélio de revestimento do órgão, comprometendo o tecido subjacente (estroma) e podendo invadir estruturas e órgãos contíguos ou à distância. Há duas principais categorias de carcinomas invasores do colo do útero, dependendo da origem do epitélio comprometido: o carcinoma escamoso ou de células escamosas, que é o tipo mais incidente e acomete o epitélio escamoso (representa cerca de 90% dos casos de câncer de colo de útero), e o adenocarcinoma, tipo mais raro e que acomete o epitélio glandular (Bastos, 2006; INSTITUTO..., 2011). É uma doença de desenvolvimento lento e silencioso, que pode cursar sem sintomas em fase inicial e evoluir para quadros de sangramento vaginal intermitente ou após a relação sexual e dor abdominal associada com queixas urinárias ou intestinais nos casos mais avançados (INSTITUTO..., 2011).

Atualmente, a teoria mais aceita para a explicação do aparecimento do câncer do colo do útero repousa na transmissão sexual. Desde 1992, a WHO (2010) considera que a persistência da infecção pelo HPV, especialmente o HPV-16 e o HPV-18, representa o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença (WORLD..., 2010). Sabe-se também que esse tipo de infecção é essencial, mas não suficiente para a evolução do câncer, pois as anormalidades morfológicas celulares (coilocitos) provocadas pelo efeito citopático do vírus, podem ou não estar presentes no câncer cervical (INSTITUTO..., 2002).

Além de aspectos relacionados à própria infecção do HPV (subtipo e carga viral, infecção única ou múltipla), outros fatores ligados à imunidade, à genética e ao comportamento sexual parecem influenciar os mecanismos ainda incertos que determinam a regressão ou a persistência da infecção e também a progressão para lesões precursoras ou câncer. São considerados fatores de risco de câncer do colo do útero a multiplicidade de parceiros e a história de infecções sexualmente transmitidas (da mulher e de seu parceiro); a idade precoce na primeira relação sexual e a multiparidade. Além desses fatores, estudos epidemiológicos sugerem outros, cujo papel ainda não é conclusivo, tais como tabagismo e o uso de anticoncepcionais (INSTITUTO..., 2002).

Na maioria das vezes a infecção cervical pelo HPV é transitória e regride espontaneamente, entre seis meses a dois anos após a exposição (INSTITUO..., 2011). No número de casos nos quais a infecção persiste pode ocorrer o desenvolvimento das lesões precursoras cuja identificação e tratamento adequados possibilitam a prevenção da progressão para o câncer cervical invasivo (WORLD..., 2010).

O carcinoma de células escamosas se origina, normalmente, na JEC, uma área de instabilidade celular, a partir de uma lesão precursora não tratada, a NIC. Em suas fases precursoras, fica localizado na própria espessura do colo, porém, quando se torna invasivo, tende a acometer vasos linfáticos e a partir desses disseminar-se, podendo atingir os paramétrios, os linfonodos pélvicos, as paredes vaginais e, em fases mais adiantadas, órgãos vizinhos, ou até mesmo órgãos distantes, podem ser comprometidos (BASTOS, 2006). O estadiamento do carcinoma do colo do útero segundo a Fundação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) está apresentado na Tabela 3 (BENEDET *et al.*, 2000) .

Tabela 3: Estadiamento do carcinoma do colo do útero de acordo com a FIGO.

Estadiamento	Descrição
Estádio 0	Carcinoma <i>in situ</i> (NIC III).
Estádio I	Carcinoma confinado ao colo do útero sem extensão ao corpo.
Estádio II	O carcinoma estende-se para além do colo do útero, mas não atinge a parede pélvica. O carcinoma invade a vagina, com exceção de seu terço inferior.
Estádio III	O carcinoma já se estendeu até a parede pélvica. O tumor invade o terço inferior da vagina.
Estádio IV	O carcinoma já se estendeu para além da pelve ou já atingiu a mucosa da bexiga e do reto. Esse estágio engloba aqueles com disseminação metastática.

Fonte: Adaptada de Benedet e colaboradores (2000)

De acordo com a WHO (2010), as estratégias para a detecção precoce desse carcinoma são o diagnóstico precoce (abordagem de pessoas com sinais e/ou sintomas da doença) e o rastreamento (aplicação de um teste ou exame numa população assintomática, aparentemente saudável, com objetivo de identificar lesões sugestivas de câncer e encaminhá-la para investigação e tratamento) (WORLD..., 2010). O método principal e mais amplamente utilizado para rastreamento do câncer do colo do útero é o teste de Papanicolaou (exame citopatológico do colo do útero), que deve ser oferecido às mulheres na faixa etária de 25 a 64 anos e que já tiveram atividade sexual (INSTITUTO..., 2011). Segundo a WHO (2010), com

uma cobertura da população-alvo de, no mínimo, 80% e a garantia de diagnóstico e tratamento adequados dos casos alterados, é possível reduzir, em média, de 60 a 90% a incidência do câncer cervical invasivo (WORLD..., 2010).

Microscopicamente, o carcinoma de células escamosas, na maioria dos casos, é do tipo bem diferenciado, em que as células são grandes, com núcleo vesiculoso, nucléolo evidente e mostram queratinização individual ou formam pérolas córneas. Quando não formam pérolas córneas, apresentam as mesmas características do bem diferenciado, ele é chamado de moderadamente diferenciado. Outro tipo, de pouca ocorrência, é o carcinoma escamoso mal diferenciado de células pequenas e, o mais incomum, carcinoma indiferenciado de células pequenas. Esses dois últimos possuem um prognóstico muito ruim em decorrência da propagação precoce pelos vasos linfáticos e da disseminação sistêmica (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010).

Entre os tratamentos mais comuns para o câncer do colo do útero estão a cirurgia e a radioterapia. O tipo de tratamento dependerá do estadiamento da doença, tamanho do tumor e fatores pessoais, como idade e desejo de preservação da fertilidade (INSTITUTO..., 2011).

4 Glicômica

Em paralelo com abordagens da genômica, proteômica e lipidômica, os glicobiologistas inseriram o termo glicômica (do inglês: “glycomics”) para referir-se aos estudos do perfil do glicoma, o qual descreve o repertório completo de glicanos e glicoconjugados que as células produzem sob condições específicas de tempo, espaço e meio ambiente (BERTOZZI *et al.*, 2009; GUPTA, SUROLIA, 2012). A glicômica procura entender como os glicanos participam de quase todos os processos biológicos, desde uma sinalização intracelular até o crescimento de um tumor (BERTOZZI *et al.*, 2009).

O impedimento primário no estudo do glicoma é sua complexidade, pois ao contrário das proteínas e ácidos nucleicos, os glicanos não são codificados pelo genoma (GUPTA, SUROLIA, 2012; TURNBULL; FIELD, 2007). Eles são ligados a proteínas ou lipídeos por reações de modificação pós-traducional que são governadas por glicosiltransferases altamente específicas (GUPTA, SUROLIA, 2012). Há mais que 20 tipos de modificações pós-traducionais de proteínas na célula eucariótica, dentre os mais comuns estão a glicosilação, ubiquitilação, fosforilação, metilação e acetilação (JIA; YANTING; YANMEI, 2006). O processo de glicosilação, que envolve um sistema firmemente regulado de enzimas e transportadores, é um das mais comuns modificações co- ou pós-traducionais que produz um

sistema abundante, diversificado e altamente regulado de glicanos celulares que são freqüentemente ligados a proteínas e lipídeos (MARKIV; RAMBARUTH; DWEK, 2012).

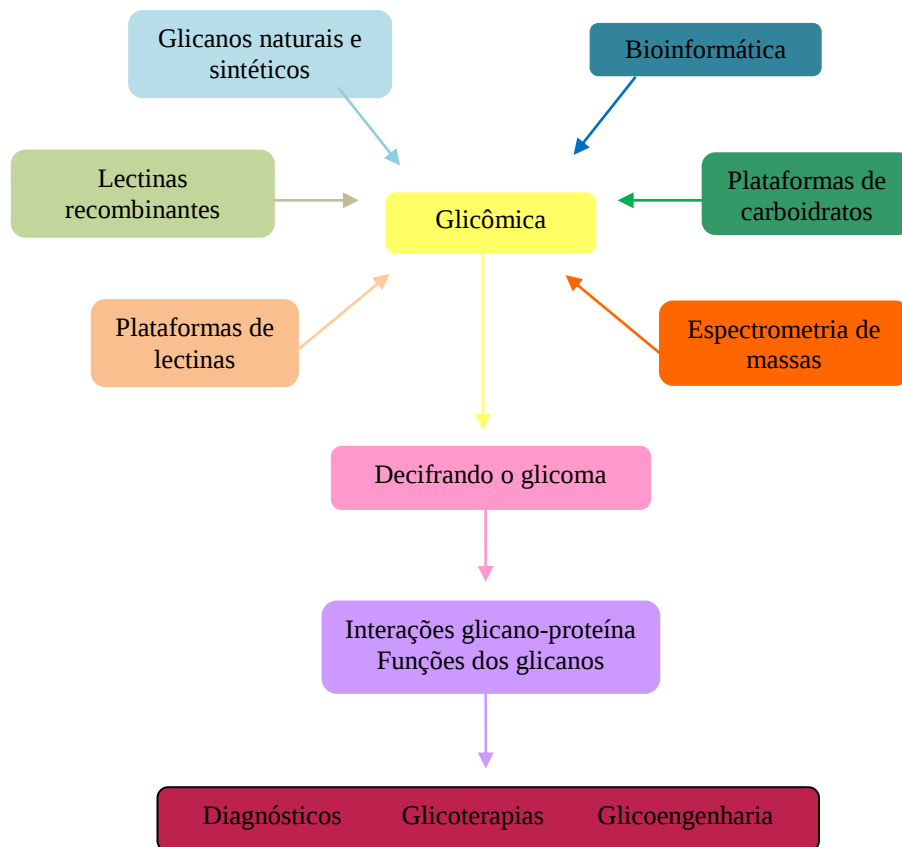
As glicoproteínas participam de muitos processos biológicos importantes, tais como reconhecimento molecular, sinalização inter e intracelulares, defesa imune, inflamação, processos de divisão e adesão celular, infecções parasitárias e progressão do câncer (ADAMCZYK; THARMALINGAM; RUDD, 2012; OHTSUBO; MARTH, 2006). Quase todos os tipos de células malignas e muitas células de tecidos doentes demonstram alterações no seu padrão de glicosilação, quando comparadas com as suas contrapartes normais (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011). As alterações nos padrões de glicosilação são frequentemente um resultado de atividades alteradas das glicosiltransferases e glicosidases como é evidente na exibição específica e preferencial de glicoconjugados em certas células cancerosas (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011). Algumas células cancerosas utilizam cadeias de carboidratos para escapar do reconhecimento imunológico e poderem migrar através do corpo (NANGIA-MAKKER *et al.*, 2002). Conseqüentemente há uma contínua necessidade em analisar os padrões de glicosilação de glicoproteínas produzidas por sistemas de expressão diferentes (GEYER; GEYER, 2006).

Pan e colaboradores (2011) discutiram que as glicoproteínas são alvos importantes na busca de biomarcadores por algumas razões: 1) mais que 50% das proteínas secretadas são glicoproteínas, as quais aparecem dentro de células, em membranas celulares e nas matrizes extracelulares criando pontos de contato das interações celulares; 2) a glicosilação alterada nos tecidos e soro de pacientes com doenças tem sido implicada na patogênese; 3) as alterações na glicosilação ocorre em muitas proteínas, incluindo as proteínas abundantes, aumentando assim a probabilidade de detecção precoce; 4) a forma glicosilada de uma proteína particular é geralmente estável para um determinado tipo celular e estado fisiológico, e 5) como uma das funções importantes dos glicanos é nas interações célula-célula e conseqüentemente no controle das funções celulares, alterações na glicosilação de proteínas pode ser alvos de diagnóstico de uma doença (PAN *et al.*, 2011). As glicoproteínas podem ser vistas nas doenças com sítios hipoglicosilados, hiperglicosilados ou novos locais glicosilados e / ou cadeias de glicanos alteradas (CHOI; HILL, 2012; PAN *et al.*, 2011).

As investigações de glicosilação alterada são necessárias e podem ajudar os cientistas a compreender os mecanismos da carcinogênese e sua progressão, identificar novos marcadores e fornecer uma base para o diagnóstico precoce e tratamento (ADAMCZYK; THARMALINGAM; RUDD, 2012; LI *et al.*, 2011). Assim, a fim de desvendar o glicocódigo, uma diversidade de tecnologias e estratégias estão entrando em cena (Figura 10)

e a glicômica funcional mostra seu potencial ao lado dos outros domínios de ômicas já estabelecidos (TURNBULL; FIELD, 2007; GEMEINER *et al.*, 2009).

Figura 10 - Tecnologias emergentes para desvendar o glicocódigo.



Fonte: Adaptada de Turnbull e Field (2007)

5 Lectinômica

5.1 Breve Histórico

O marco inicial para os estudos das lectinas foi em 1888, quando Stillmark durante seus estudos observou que extratos de sementes de mamona, *Ricinus communis*, tinham a capacidade de aglutinar eritrócitos. Subseqüentemente, Helin (1889) demonstrou a presença de uma hemaglutinina tóxica em extratos de semente de jequiriti, *Abrus precatorius* (SHARON, 1998). Com essas descobertas intensificaram-se as pesquisas em sorologia e imunologia em relação às propriedades hemaglutinantes dessas lectinas. Nesse tempo Erlich conseguiu estabelecer alguns dos conceitos fundamentais da imunologia (SHARON; LIS, 2004).

Duas grandes descobertas ocorridas no início dos anos 60 foram fundamentais, para colocar as lectinas em evidência. A primeira delas foi à observação por Nowel (1960) de que a lectina de sementes de *Phaseolus vulgaris* (PHA) estimulava a divisão de linfócitos (NOWEL, 1960). A segunda foi realizada por Aub e colaboradores, em 1963, quando eles observaram que a lectina do germe do trigo (WGA), aglutinava preferencialmente células malignas (AUB *et al.*, 1963; NASCIMENTO *et al.*, 2012). Esta descoberta foi observada por outros pesquisadores com outras lectinas e, tais investigações sugeriram que mudanças nas superfícies celulares estavam associadas ao desenvolvimento do câncer (SHARON; LIS, 2004).

Em 1981, Debray e seus colaboradores fazendo um levantamento em estudos com lectinas afirmaram que elas vinham sendo purificadas, tanto de animais quanto de plantas. Continuando as descobertas, Gabius e colaboradores introduziram, em 1987, o estudo de neoglicoconjugados para diagnósticos de tumores, aumentando o espectro de utilização dessas proteínas no campo científico (SHARON; LIS, 2004).

Assim, continuam ampliando-se as pesquisas e aplicações das lectinas nas mais diversas áreas do conhecimento como, por exemplo, na bioquímica e patologia (LAM; NG, 2011).

5.2 Definição, distribuição e função

Em 1954, Boyd e Shapleigh propuseram o termo lectina, a partir da palavra em latim *legere* (que significa "selecionar") (TEXEIRA *et al.*, 2012). Posteriormente, várias definições e descrições foram propostas para lectinas. Atualmente, são aceitas como lectinas, as proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, de distribuição ubíqua e que têm pelo menos um domínio não catalítico que exhibe ligação reversível a monossacarídeos ou oligossacarídeos específicos sem alterar as propriedades dos carboidratos (LAM; NG, 2011).

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em bactérias, vírus, plantas, animais e humanos (KUMAR *et al.*, 2012). Nas plantas, são principalmente encontradas nas sementes e, em menor extensão, em outros tecidos, tais como folhas, cascas, frutos, raízes, bulbos e tubérculos (LAM; NG, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2012).

Em poucos anos, centenas de lectinas de plantas foram purificadas e caracterizadas em detalhe quanto às suas propriedades bioquímicas, especificidades de ligação a carboidratos e funções biológicas (NASCIMENTO *et al.*, 2012). As lectinas mais investigadas foram extraídas de membros da família Leguminosae. Lectinas de leguminosas

são um grande grupo de proteínas que compartilham um elevado grau de semelhança estrutural com especificidades a carboidratos distintas. A subtribo Diocleinae (Leguminosae) compreende 13 gêneros, mas, apenas três destes gêneros (ou seja, *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*) são consideradas as principais fontes para a purificação de proteínas (TEXEIRA *et al.*, 2012).

Devido a sua grande diversidade estrutural, especificidade sacarídica e ocorrência, não se justifica esperar por uma função comum para todas as lectinas de plantas. Mesmo uma lectina particular pode assumir diferentes funções dependendo de onde e quando é expressa (KUMAR *et al.*, 2012). Texeira e colaboradores (2012) afirmam que, no que diz respeito às atividades biológicas, as lectinas de leguminosas são enigmáticas (TEXEIRA *et al.*, 2012).

Algumas das funções já propostas relacionam as lectinas como participantes da proteção das plantas contra microrganismos e insetos fitopatogênicos como também contra animais predadores (SHARON; LIS, 2004) além de servirem como mediadoras da simbiose entre as plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio (SHARON; LIS, 2004). O papel das lectinas nos fungos envolve a biossíntese da parede celular e diferenciação do micélio, a adesão de esporos de espécies patogênicas a insetos e ainda podem atuar como proteínas de estoque e apresentar atividade pesticida (TRIGUEROS *et al.*, 2003).

As lectinas encontradas em tecidos animais parecem estar envolvidas com o mecanismo de endocitose e translocação intracelular de glicoproteínas (SMETANA; ANDRÉ 2008), no sistema imune de aves e mamíferos (LU *et al.*, 2002; LU, 2005; RABINOVICH; TOSCANO 2009) e como moduladoras da progressão tumoral (RADOSAVLJEVIC, 2012). A lectina ligadora de manose (MBL), proteína sangüínea cálcio-dependente produzida pelo fígado, tem importância na resposta imunológica inata por mediar a opsonização e a fagocitose de microrganismos como vírus e bactérias em humanos (JACK; TURNER, 2003; KILPATRICK, 2002; THIEL; FREDERIKSEN; JENSENIUS, 2006).

5.3 Purificação e Caracterização

As lectinas podem ser purificadas por uma combinação de diferentes técnicas de purificação. A fim de produzir uma grande quantidade de lectinas, o primeiro critério na purificação é um conteúdo elevado de lectina no material de partida (ou seja, na fonte) e o segundo critério é a utilização de um protocolo de purificação simples (LAM;NG, 2011). Vale salientar que, atualmente, lectinas recombinantes estão sendo sintetizadas, apesar do alto custo e baixo rendimento. Entretanto, de acordo com o levantamento

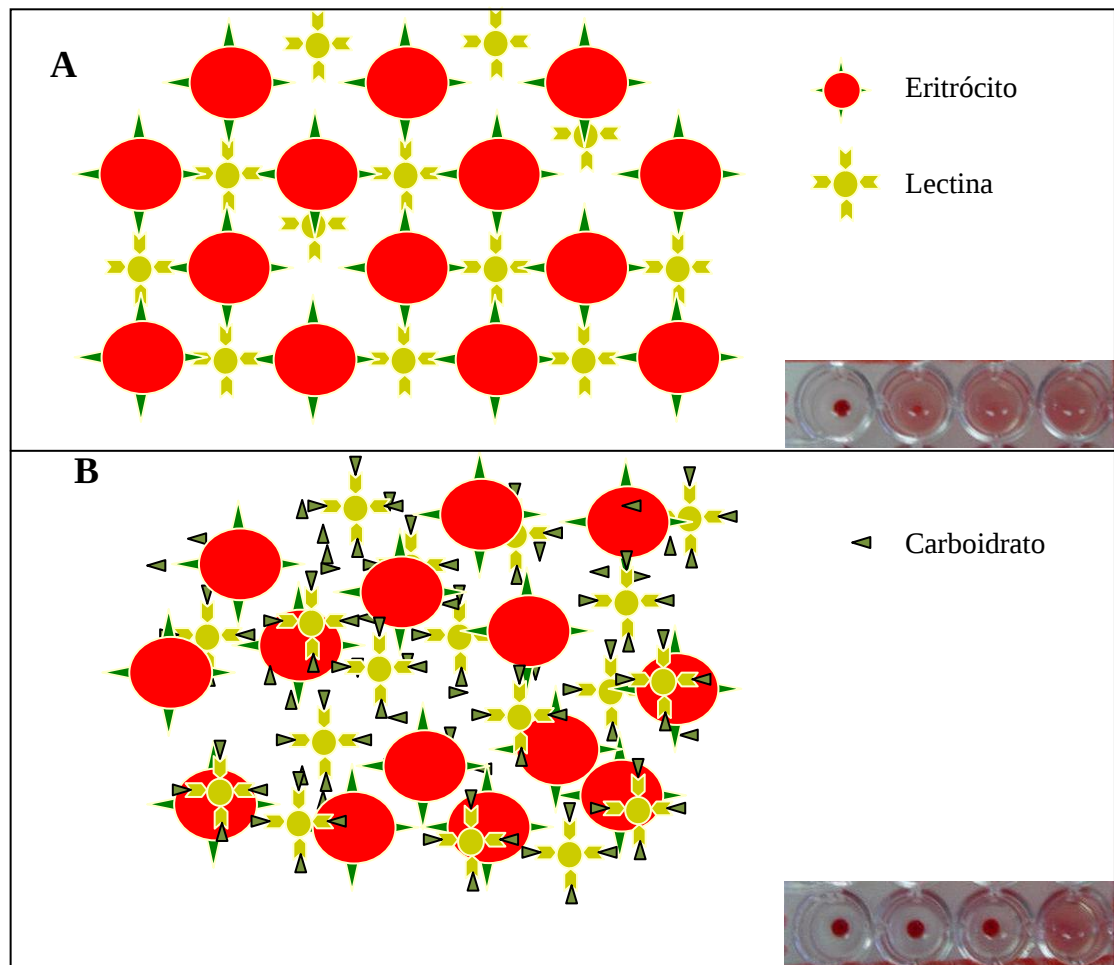
bibliográfico, a produção de lectinas continua, na maioria dos casos, dependente do isolamento cromatográfico de fontes vegetais (LAM; NG, 2011).

No início do processo de purificação, primeiro seleciona-se a fonte de extração. Depois, procede-se primeiramente, a produção do extrato com solução aquosa salina ou tampão (HUGHES; STOCK, 2012). Os extratos com atividade hemaglutinante são submetidos à purificação parcial por fracionamento salino em diferentes concentrações e diálise. Após purificação parcial são realizadas as cromatografias que aumentam a pureza e a seleção da proteína de interesse. A maioria das lectinas é purificada por cromatografia de afinidade, técnica que se baseia na capacidade das mesmas em se ligarem específica e reversivelmente a carboidratos. Entretanto, outras cromatografias também são muito utilizadas, tais como: cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

Em adição à cromatografia, os métodos eletroforéticos são utilizados na caracterização estrutural de proteínas, assim como para avaliar o grau de pureza, onde as proteínas são separadas de acordo com sua migração em um gel, quando um campo elétrico é aplicado.

Cada etapa da purificação das lectinas é monitorada pela atividade hemaglutinante. Ensaio de hemaglutinação com eritrócitos de animais e/ou humanos detectam a presença de lectinas em uma amostra (Figura 11A). A hemaglutinação ocorre quando há a formação de uma rede ou malha pela interação entre as proteínas e os carboidratos presentes na membrana dos eritrócitos (XIONG *et al.*, 2006). A especificidade na ligação carboidrato-lectinas tem sido estudada pela inibição convencional da hemaglutinação (Figura 11B) usando vários açúcares e derivados ou glicoproteínas como inibidores (WANG; NG, 2006; XIONG *et al.*, 2006).

Figura 11: Esquema ilustrativo de um ensaio de hemaglutinação (A) e de sua inibição (B).



Fonte: Próprio autor.

5.4 Aplicações

Devido a sua habilidade em ligar-se a carboidratos de forma altamente específica e geralmente reversível e sem alterar a estrutura dos ligantes reconhecidos, as lectinas têm se destacado como importantes ferramentas em pesquisas englobando diversas áreas da ciência, em especial, Bioquímica, Biologia Celular e Molecular, Imunologia, Farmacologia, Medicina e Análises Clínicas.

As lectinas são sugeridas como um dos agentes promissores contra pragas de insetos e atuaram com sucesso em uma variedade de culturas, incluindo trigo, arroz, tabaco e batatas (LAM;NG, 2011). Há aquelas com atividades antimicrobianas podendo ser úteis em aplicações terapêuticas e na microbiologia clínica (BRUSTEIN *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Estudos têm empregado lectinas na pesquisa de biomarcadores, como potenciais marcadoras dos estados de doença como câncer (HAAB, 2012), como anticarcinogênicas através da atividade anti-proliferativa (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012) ou induzindo apoptose e autofagia (DEEPAA *et al.*, 2012; LIU; BIAN; BAO, 2010; NUNES *et al.*, 2012;). Essas biomoléculas são usadas também como mediadoras de drogas em sistemas de direcionamento para alvos específicos (GADHAWALA *et al.*, 2012; JUBELI *et al.*, 2012; SWAIN *et al.*, 2012) e alguns ensaios pré-clínicos já avançaram colocando as lectinas como potenciais drogas anti-neoplásicas (LIU; BIAN; BAO, 2010).

As lectinas são potenciais fármacos no tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), pois várias investigações apontam que as lectinas têm diferentes mecanismos anti-HIV (sigla em inglês do vírus da imunodeficiência humana), tais como inativação do vírus, supressão na produção do antígeno viral ou bloqueio de sua entrada na célula (KOHARUDIN; GRONENBORN, 2013; LAM; NG, 2011; LI *et al.*, 2008).

Sonawane e colaboradores (2007) ao estudarem a cólera observaram que a conjugação de inibidores de canais clorídricos reguladores de condutância transmembrana com lectinas é potente em reduzir a secreção de fluidos intestinais nessa doença (SONAWANE *et al.*, 2007).

No geral, as lectinas são rotineiramente utilizadas em laboratórios acadêmicos para caracterização das estruturas de carboidratos, para a purificação de glicoproteínas e para ligação a epítomos específicos da superfície celular (ARNAUD; AUDFRAY; IMBERTY, 2013). Lectinas imobilizadas em diferentes suportes têm sido utilizadas para separação e purificação por afinidade de glicoconjugados (FANAYAN *et al.*, 20012; LEE *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2011). Como essas biomoléculas podem explorar superfícies celulares, ligando-se a porção carboidrato dos glicoconjugados que se projetam na célula, elas têm sido utilizadas também, em histoquímica, para detectar alterações na composição desses carboidratos que acompanham processos de desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica (BROOKS; HALL, 2012; LEAL *et al.*, 2012; SOBRAL *et al.*, 2010).

Como consideramos acima, as lectinas são objeto de investigações intensas e à medida que mais lectinas são isoladas, mais estudos são conduzidos pelas suas atividades biológicas e mecanismos de ação. Assim, conforme a produção de lectinas é melhorada, novas aplicações biotecnológicas podem ser encontradas (LAM; NG, 2011).

5.4.1 Histoquímica com lectinas

As técnicas histoquímicas que foram introduzidas no começo do século 20 são ainda comumente usadas (WICK, 2012). Os maiores avanços em histoquímica advieram justamente com a descoberta das lectinas promovendo um enorme impacto na biologia e histopatologia celular. Por muitos anos, as lectinas foram usadas para isolar e purificar glicoproteínas e determinar a posição dos glicoconjugados nas células. As funções celulares dos carboidratos unidos às proteínas foram relatadas e observou-se que eram afetadas pela glicosilação e subsequente modificação por rearranjos ou adição de açúcares em processos patológicos (YAMAMOTOA *et al.*, 2005). A histoquímica com lectinas surge para decifrar essas alterações nas cadeias de carboidratos de glicoconjugados celulares (SHARON, 2007).

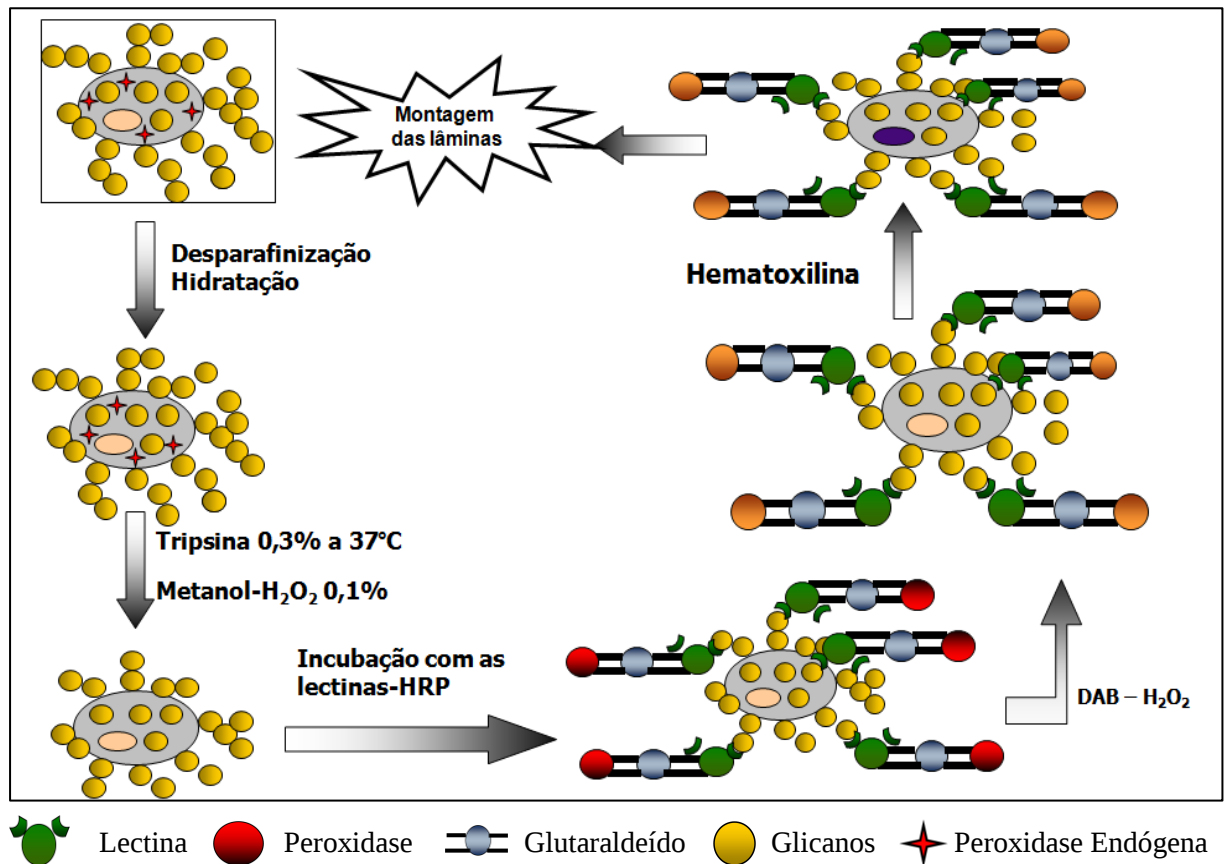
A interação das lectinas com seus locais de ligação nas superfícies celulares ou em secções de células e tecidos pode ser visualizada utilizando marcadores diferentes, da mesma maneira que os anticorpos podem ser utilizados para detectar antígenos em células ou tecidos usando imunocitoquímica (BROOKS; HALL, 2012). Na histoquímica com lectinas, peroxidase de rabanete e ouro coloidal são marcadores adequados tanto para microscopia de luz quanto eletrônica (BROOKS; HALL, 2012; ROTH, 2011) (Figura 12). A fim de demonstrar a especificidade de ligação da lectina aos tecidos, algumas condições devem ser testadas, como, por exemplo, omissão do passo de incubação da lectina e/ou pré-incubação da lectina com concentrações milimolares de mono/dissacarídeos ou glicoproteínas como inibidores (ROTH, 2011).

Importantes variações na composição de açúcares de glicoconjugados podem ocorrer em estados de doença como câncer e inflamação. Conseqüentemente é importante compreender as bases moleculares para a interação destes glicanos com as lectinas, para o desenvolvimento de agentes para diagnóstico clínico e terapêutico das doenças (AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005; PARK *et al.*, 2008).

Os primeiros estudos de cânceres empregando histoquímica com lectinas foram realizados por Klein e colaboradores (1981). Como as lectinas podem distinguir alterações sutis na glicosilação celular, elas são úteis em explorar as mudanças de glicosilação que atendem tanto a transformação para malignidade quanto a progressão tumoral (BROOKS; HALL, 2012; KUMAR *et al.*, 2012). Os estudos histoquímicos e/ou imunohistoquímicos são particularmente úteis para demonstrar a arquitetura estromal de um tumor, por ressaltar estruturas da matriz extracelular e freqüentemente a dimensão da extensão tumoral (KUMAR *et al.*, 2012). Desta forma, vários estudos têm colocado as lectinas como ferramentas

diagnósticas relevantes na diferenciação histoquímica para glicoconjugados de superfície e intracelulares de células transformadas (INDRAMANEE *et al.*, 2012; KOROURIAN *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2010; THÖM *et al.*, 2007; SCHNEGELSBERG, B.; SCHUMACHER, U.; VALENTINER, U., 2011).

Figura 12: Histoquímica com lectinas conjugadas a peroxidase



Fonte: Próprio Autor

É na perspectiva a longo-prazo de projetar ligantes seletivos de alta afinidade, como lectinas, que a citoquímica e a histoquímica visam uma contribuição na relação estrutura-função ao nível celular, tecidual, orgânico e sistêmico de organismos (KUMAR *et al.*, 2012). A histoquímica com lectinas a partir da sua seletividade a glicosilação tipo-célula promove um reconhecimento específico de glicanos por seus receptores (lectinas), que traduzem a fisiopatologia celular através da decodificação dos glicanos (KALTNER *et al.*, 2012).

5.4.2 Cromatografia de Afinidade com Lectinas Imobilizadas

A cromatografia de afinidade é um tipo de cromatografia líquida, que faz uso de interações biológicas entre duas moléculas para separação e análise específica de componentes da amostra; é uma técnica utilizada para purificar os compostos, tais como glicoproteínas, que têm a capacidade ligar de uma forma não covalente e reversível moléculas específicas (HAGE, 2012). No desenvolvimento de um sistema de cromatografia de afinidade, vários fatores são considerados importantes, tais como a escolha do ligante de afinidade, o material de suporte, o método de imobilização e as condições de eluição (COELHO *et al.*, 2012; HAGE, 2012).

Esse tipo de cromatografia pode ser usada com diferentes objetivos finais. Se o objetivo é uma purificação rápida de uma macromolécula com um rendimento alto, é necessário estabelecer as melhores condições para uma bioseletividade alta do sistema; o pesquisador deve estar preparado para ajustar as condições cromatográficas e para contornar possível ausência de bioseletividade ou rendimentos baixos. Se o objetivo é primeiro demonstrar uma bioseletividade para posterior purificação, a escolha do adsorvente bioseletivo é dependente da interação fisiológica entre o componente bioseletivo e a macromolécula a ser purificada. Neste caso, o pesquisador deve gastar muito tempo para estabelecer a bioseletividade antes de iniciar os experimentos de purificação (COELHO *et al.*, 2012).

Um bom suporte para cromatografia de afinidade deve ser quimicamente inerte ou ter mínima interação com outras moléculas, possuir elevada porosidade e grande número de grupos funcionais capazes de formar ligações covalentes com a molécula a ser imobilizada (COELHO *et al.*, 2012). Uma variedade de suportes com ligantes imobilizados através de diferentes grupos funcionais são comercialmente disponível (URH; SIMPSON; ZHAO, 2009). A molécula ligante a ser utilizada deve conter um grupo capaz de ser quimicamente modificado, frequentemente um grupo amino, o qual permitirá a ligação com o matriz sem destruir a sua capacidade de se ligar à molécula de interesse (COELHO *et al.*, 2012).

Muitas proteínas têm a capacidade de se ligar fortemente (mas não covalentemente) a moléculas específicas e, portanto, podem ser purificada por cromatografia de afinidade. Os passos de uma afinidade cromatografia para o isolamento de uma proteína são os seguintes: 1) O suporte de afinidade deve ser equilibrado com um tampão de ligação, para obter as condições adequadas para a interação entre proteína e a molécula imobilizada; 2) Quando uma solução impura (extrato bruto ou uma preparação parcialmente purificada) passa através do

suporte de afinidade, a proteína de interesse interage com o ligante (adsorção) e os outros contaminantes (proteínas ou outras moléculas) são lavadas a partir da coluna com o tampão de ligação; 3) A molécula desejada pode ser eluída alterando as condições de pH, força iônica ou ou com uma solução contendo uma elevada concentração de ligante livre que competirá pelos sítios de ligação da proteína (COELHO *et al.*, 2012; MISLOVIČOVÁ *et al.*, 2009; MONZO; BONN; GUTTMAN, 2007).

A cromatografia de afinidade é uma ferramenta útil em estudos proteômicos, este método tem papel essencial no isolamento de complexos de proteínas e na identificação das redes de interação proteína-proteína.

Várias aplicações biotecnológicas tem sido desenvolvidas para as lectinas e uma muito importante é sua imobilização em um suporte para separação de glicoproteínas ou proteoglicanos que contenham grupos de carboidratos específicos de uma preparação bruta, como em amostras biológicas complexas (soro, plasma, tecido, entre outras) através da cromatografia de afinidade (MONZO, A.; BONN, G. K.; GUTTMAN, A., 2007; PAN *et al.*, 2011). A eluição do material adsorvido normalmente é realizada com uma solução contendo um glicosídeo competitivo em pH neutro com efeitos deletérios mínimos para a glicoproteína (COELHO *et al.*, 2012).

Lectinas com especificidades a carboidratos diferentes, imobilizadas em Sepharose, têm sido aplicadas com uma ferramenta analítica para avaliar e comparar os resíduos de carboidratos (COELHO *et al.*, 2012). Muitos estudos de glicosilação de proteínas de soro em processos patológicos, como o câncer, têm-se utilizado da purificação de glicoconjugados com lectinas (PLAVINA *et al.*, 2007; TURNER, 1992). Con-A, WGA e jacalina são muitas vezes utilizadas em conjunto para atingir uma forma mais extensa de caracterização glicoproteômica (KULLOLLI; HANCOCK; HINCAPIE, 2008; WANG; WU; HANCOCK, 2006).

Heo e colaboradores (2007) isolaram glicoproteínas do soro de três indivíduos sadios e três pacientes com câncer de pulmão por cromatografias de afinidade por multilectinas e posterior caracterização por espectrometria de massas e sugeriram uma kalicreína como candidata potencial a biomarcador sorológico desse câncer (HEO *et al.*, 2007). Há também estudos para isolamento de glicoproteínas e análises de alteração de glicosilação para o câncer de mama (ZENG *et al.*, 2011), câncer de col retal (YAO *et al.*, 2012) e câncer de próstata ao analisar alterações de glicosilação do PSA (VERMASSEN *et al.*, 2012).

Como muitos marcadores clínicos são glicoproteínas e estudos glicoproteômicos utilizam técnicas de afinidade de lectina, esta técnica continuará ser de interesse para muitas

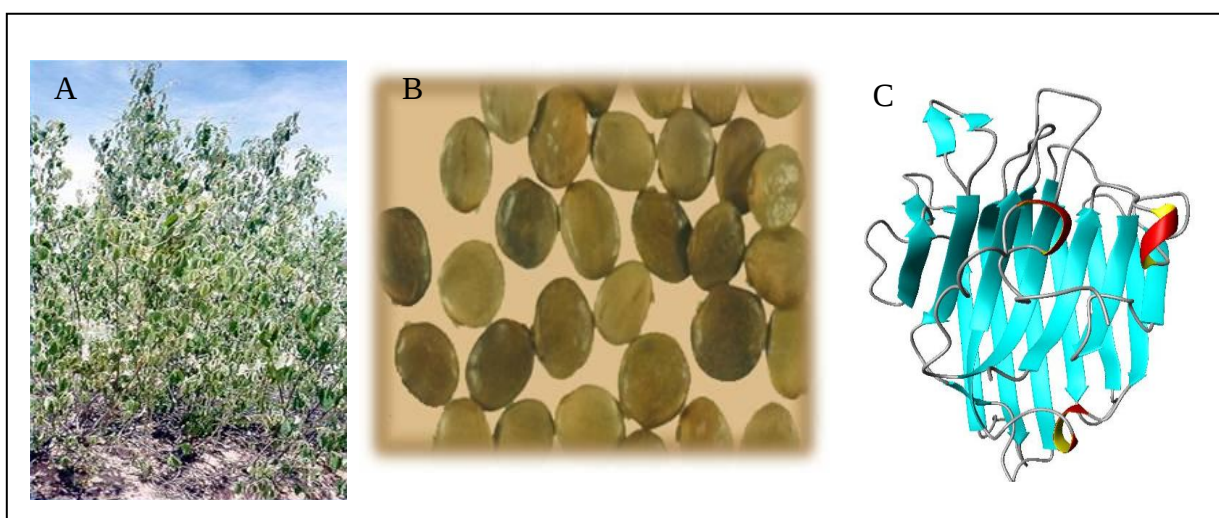
pesquisas científicas intencionadas em determinar a estrutura de biomarcadores específicos da doença ou descobrir novos biomarcadores.

5.5 Lectinas de *Cratylia mollis*

Cratylia mollis (feijão camaratu) é uma leguminosa nativa da Região Semi-Árida de Pernambuco; a planta (Figura 13A) pertence à família *Fabaceae*, grupo *Phaseoleae*, subgrupo *Dioclineae*, que contém o gênero *Canavalia* ao qual pertence a Con-A, lectina mais utilizada como padrão internacional em estudos com lectinas e botanicamente relacionada com a *Cratylia* (CORREIA; COELHO, 1995).

As sementes de *C. mollis* (Figura 13B) têm sido consideradas fontes importantes de lectinas (Cramoll), fornecendo múltiplas formas moleculares com especificidades diferentes para carboidratos (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll-3, Cramoll 4, além de uma preparação que contém as isoformas Cramoll 1 e Cramoll 4, a Cramoll-1,4, similar a Con-A) (PAIVA; COELHO, 1992; CORREIA; COELHO, 1995). Há três formas moleculares mais estudadas, a Cramoll 1 (Figura 13C) e a Cramoll-1,4, que reconhecem glicose/manose e a Cramoll-3 que é galactose específica. Estas isolectinas migram diferentemente em gel de eletroforese de poliacrilamida para proteínas nativas, mas aglutinam eritrócitos similarmente (SANTOS; PEIXOTO; COELHO, 2004).

Figura 13: Características de *Cratylia mollis*. Planta do feijão de camaratu (A), sementes de *Cratylia mollis* (B) e estrutura cristalográfica do monômero de Cramoll 1 (C).



Vale salientar que, Cramoll 1 e Con-A, embora sejam taxonomicamente relacionadas e tenham a mesma especificidade monossacarídica, têm perfis de ligação a glicoproteínas

diferentes (BELTRÃO *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 2003). Souza e colaboradores (2003) reportaram que Cramoll 1 consiste de 236 resíduos, com 82% de homologia com a Con-A e que possuem sítios de ligação idênticos com interações tipo pontes de hidrogênio idênticas entre a proteína e metil- α -D-manosídeo. Entretanto, observaram seis substituições num encaixe adjacente ao sítio de ligação a glicanos e dois no próprio sítio que podem explicar as diferenças de ligação a oligossacarídeos e glicoproteínas entre Cramoll 1 e Con-A.

As lectinas de sementes de *C. mollis* vêm sendo estudadas nas mais diversas áreas da biotecnologia. Há experimentos envolvendo isolamento de inibidores de tripsina (Paiva *et al.*, 2003), de glicoproteínas do plasma (LIMA *et al.*, 1997) e da soja (SILVA *et al.*, 2011); como marcadoras de superfície celular de tecido mamário e cerebral (BELTRÃO *et al.*, 1998, 2003); na indução de resposta mitogênica e produção de citocinas (DE MELO *et al.*, 2011); como biosensores na identificação de diferentes sorotipos da dengue (OLIVEIRA *et al.*, 2011); na atividade antitumoral quando encapsulada em lipossomas (ANDRADE *et al.*, 2004); como indutoras de morte de epimastigotas de *Trypanosoma Cruzi* por necrose (FERNANDES *et al.*, 2010), com potencial anti-hemintíco contra *Schistosoma mansoni* (MELO *et al.*, 2011a) e também estão envolvidas na cicatrização de feridas cutâneas experimentais (MELO *et al.*, 2011b).

OBJETIVOS

1 Geral

Investigar a capacidade das lectinas isoladas das sementes de *Cratylia mollis* em interagir com o glicocódigo tecidual e sérico de pacientes com patologias prostáticas e de colo uterino.

2 Específicos

- Purificar Cramoll-1,4 e Cramoll-3;
- Conjugar Cramol 1,4 e Cramoll-3 com a peroxidase;
- Obter biópsias de indivíduos controle e pacientes com alterações prostáticas e de colo uterino;
- Realizar histoquímica com lectinas de *C.mollis* (Cramoll-1,4 – glicose/manose específica e Cramoll-3 – galactose específica) em tecidos prostáticos e uterinos;
- Imobilizar Cramoll-1,4 em Sepharose;
- Obter soros de indivíduos normais, pacientes com hiperplasia benigna prostática e câncer de próstata;
- Aplicar soros em coluna de Cibacron para depletar proteínas altamente abundantes, como albumina;
- Aplicar os soros depletados de albumina em coluna de Cramoll-1,4 imobilizada;
- Analisar as glicoproteínas purificadas da cromatografia de afinidade com Cramoll-1,4 através de SDS-PAGE.

REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, B.; THARMALINGAM, T.; RUDD, P.M. Glycans as cancer biomarkers. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1820, p. 1347-1353, 2012.
- AMBROSI, M.; CAMERON, N.R.; DAVIS, B.G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic and Biomolecular Chemistry**. v. 3, n. 9, p. 1593-608, 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts and figures 2012. **American Cancer Society**, 2012.
- ANDRADE, C. A. S. *et al.* Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 278, p. 435–445, 2004.
- ARNAUD, J.; AUDFRAY, A.; IMBERTY, A. Binding sugars: from natural lectins to synthetic receptors and engineered neolectins. **Chemical Society Reviews**, 2013.
- AUB, J. C.; TIESLAV, C.; LANKESTER, A. (1963) Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes, I. Wheat – germ lipase and associated mucopolysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 50, p. 613-9, 1963.
- AUYANG, S. Y. Cancer causes and cancer research on many levels of complexity. Disponível em: www.creatingtechnology.org/biomed/cancer.pdf , 2000.
- BALEA, I. A.; ILLES, P.; SCHOBBER, R. Affinity of corpora amylacea for oligonucleotides: Sequence dependency and proteinaceous binding motif. **Neuropathology**. n. 26, p. 277–282, 2006.
- BASTOS, A. C. **Ginecologia**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2006.
- BELOVIĆ, M. M. *et al.* Potential of bioactive proteins and peptides for prevention and treatment of mass non-communicable diseases. **Food and Feed Research**. v. 38, n. 2, p. 51-61, 2011.
- BELTRÃO, E.I.C. *et al.* *Parkia pendula* lectin histochemistry marker for meningothelial tumor. **European Journal Histochemistry**. v.47, n.2, p. 139-142, 2003.
- BELTRÃO, E.I.C. *et al.* Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 74, p.125-134, 1998.
- BENEDET, J.L., *et al.* FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. **International Journal Gynaecology & Obstetrics**. v.70, n. 2, p. 209-62, 2000.
- BERTOZZI, C.R. *et al.* Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 48. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1965/>

BREIVIK, J. (2005) The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. **Seminars in Cancer Biology**. v. 15, p. 51–60, 2005.

BROOKS, S. A.; HALL, D. M. Lectin histochemistry to detect altered glycosylation in cells and tissues. **Methods in molecular biology (Clifton, NJ)**, v. 878, p. 31, 2012.

BRUSTEIN, V. P. *et al.* A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. **Inflammopharmacology**, p. 1-8, 2012.

CAO, Y. *et al.* Cancer research: past, present and future. **Nature Reviews | Cancer**. v. 11, p. 749- 754, 2011.

CAVANAGH, J.B. Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. **Brain Research Reviews**. n. 29, p. 265–295, 1999.

CHIDA, Y. *et al.* Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? **Nature clinical practice Oncology**. v. 5, n. 8, p. 466-475, 2008.

CHOI, E.; HILL, M. M. Targeted High-Throughput Glycoproteomics for Glyco-Biomarker Discovery, Integrative Proteomics, Dr. Hon-Chiu Leung (Ed.), ISBN: 978-953-51-0070-6, InTech. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/integrative-proteomics/targeted-high-throughput-glycoproteomics-forglyco-biomarker-discovery>. 2012.

CHRISTIAN, J. D. *et al.* Corpora amylacea in adenocarcinoma of the prostate: incidence and histology within needle core biopsies. **Modern Pathology**. n. 18, p. 36–39, 2005.

COELHO, L. C. B. B.; DA SILVA, M. B. R. Simple method to purify miligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**. v. 11, p. 1-6, 2000.

COELHO, L.C.B.B. *et al.* Chapter 3: Protein Purification by Affinity Chromatography. **Biochemistry, Genetics and Molecular Biology** » "Protein Purification", book edited by Rizwan Ahmad, ISBN 978-953-307-831-1, Published: January 20, 2012.

CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Purification of a Glucose/ Mannose Specific Lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 55, p. 261-273, 1995.

DAKUBO, G. D. Chapter 2: The Warburg Phenomenon and Other Metabolic Alterations of Cancer Cells. **Mitochondrial Genetics and Cancer**. 2010, XVI, 356 p., 31 illus., Hardcover.

DE MELO, C. M. L. *et al.* Mitogenic Response and Cytokine Production Induced by Cramoll 1, 4 Lectin in Splenocytes of Inoculated Mice. **Scandinavian journal of immunology**, v. 73, n. 2, p. 112-121, 2011.

DEEPAA, M. *et al.* Purified mulberry leaf lectin (MLL) induces apoptosis and cell cycle arrest in human breast cancer and colon cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, 2012.

DRICKAMER, K.; TAYLOR, M.E. Glycan arrays for functional glycomics. **Genome Biology**. v. 3, n. 12, p. 1034.1–1034.4, 2002.

FAHEINA-MARTINS, G. V. *et al.* Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**, 2012.

FANAYAN, Susan *et al.* Using lectins to harvest the plasma/serum glycoproteome| Macquarie University ResearchOnline. 2012.

FERNANDES, M. P. *et al.* Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 42, n. 1, p. 69-78, 2010.

FRANKS, L. M.; TEICH, N. M. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. 3^a edition. Oxford University Press Inc., 1999.

GABIUS, H.J. Glycohistochemistry: The Why and How of Detection and Localization of Endogenous Lectins. **Anatomia, Histologia, Embryologia**. v. 30, p. 3-31, 2001.

GADHAWALA, Zakir M. *et al.* New Approach In Targeted Drug Delivery System. **Journal of Pharmacy Research (New Journal BioMedRx)**, v. 5, n. 8, 2012.

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

GEYER, H.; GEYER, R. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1764, p. 1853–1869, 2006.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta histochemica**, v. 113, n. 3, p. 236-247, 2011.

GIORGI ROSSI, P.; GUGLIELMO R. The Present and Future of Cervical Cancer Screening Programmes in Europe. **Current Pharmaceutical Design** v. 19, n. 8, p. 1490-1497, 2013.

GOMES, B. S. *et al.* Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 770-778, 2012.

GUILOT, J. *et al.* Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas. **Bull Cancer**. v. 2, p. 141-58, 2004.

GUPTA, G.; SUROLIA, A. Glycomics: An Overview of the Complex Glycocode. **Biochemical Roles of Eukaryotic Cell Surface Macromolecules**. p. 1-13, 2012.

HAAB, B. B. Using lectins in biomarker research: Addressing the limitations of sensitivity and availability. **Proteomics-Clinical Applications**, v. 6, n. 7-8, p. 346-350, 2012.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v. 144, p. 646–674, 2011.

HARRINGTON, K. J. Biology of cancer. **Medicine**, v. 39, n. 12, p. 689-692, 2011.

HEO, S.H. *et al.* Identification of putative serum glycoprotein biomarkers for human lung adenocarcinoma by multilectin affinity chromatography and LC-MS/MS. **Proteomics**. v. 7, p. 4292–4302, 2007.

HERWIG, R. *et al.* Detecting prostate cancer by intracellular macrophage prostate-specific antigen (PSA): a more specific and sensitive marker than conventional serum total PSA. **European journal of clinical investigation**. v. 38, n. 6, p. 430-437, 2008.

HUGHES, S. H.; STOCK, A. M. Conventional protein purification. 2012.

INGBER, D. E. Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment? **Seminars in Cancer Biology**. v. 8, n. 5, p. 356-64, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Câncer do colo do útero. Revista brasileira de cancerologia, Rio de Janeiro, v.46, n. 4, p.351-354. 2000. (Condutas do INCA/MS).

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero. Rio de Janeiro: INCA, 2011. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/Titulos/Nomenclatura_colo_do_uterio.pdf. Acesso em: 06 jul. 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Ministério da Saúde. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro : INCA, 2011. 118 pág.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância (Conprev) Falando sobre câncer do colo do útero. – Rio de Janeiro: MS/INCA, 2002. 59 pág.

JACK, D.L.; TURNER, M.W. (2003) Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. **Biochem Soc Trans**. 31 (4): 753-7.

JAYAPALAN, J. J. *et al.* Identification of potential complementary serum biomarkers to differentiate prostate cancer from benign prostatic hyperplasia using gel-and lectin-based proteomics analyses. **Electrophoresis**. v. 33, n. 12, p. 1855-1862, 2012.

JIA, H.U.; YANTING, G.U.O.; YANMEI, L.I. Research progress in protein post-translational modification. **Chinese Science Bulletin**. v. 51, n. 6, p. 633-645, 2006.

JOSHUA, A.M. *et al.* Prostatic preneoplasia and beyond. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 2, n. 1785, p. 156-181, 2008.

JUBELI, E. *et al.* E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 2, p. 194-206, 2012.

KALTNER, H.; GABIUS, H. J. A toolbox of lectins for translating the sugar code: the galectin network in phylogenesis and tumors. **Histology and Histopathology**. v. 27, p. 397-416, 2012.

KIESSLING, L. L.; SPLAIN, R. A. Chemical approaches to glycobiology. **Annual review of biochemistry**, v. 79, p. 619-653, 2010.

KIETPEERAKOOL, C.; SRISOMBOON, J. Medical treatment of cervical intraepithelial neoplasia II, III: an update review. **International Journal Clinical Oncology**. v. 14, p. 37-42, 2009.

KILPATRICK, D.C. (2002) Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1572 (2-3):401-13.

KLEIN, P. J. *et al.* The importance of lectin binding sites and carcinoembryonic antigen with regard to normal, hyperplastic, adenomatous, and carcinomatous colonic mucosa. **Recent Results Cancer Research**. v. 79, p. 1-9, 1981.

KOHARUDIN, Leonardus MI; GRONENBORN, Angela M. Structures of Novel HIV-Inactivating Lectins. **Biophysics and Structure to Counter Threats and Challenges**, p. 59-67, 2013.

KOROURIAN, S. *et al.* Expression analysis of carbohydrate antigens in ductal carcinoma in situ of the breast by lectin histochemistry. **BMC cancer**, v. 8, n. 1, p. 136, 2008.

KULASINGAM V.; DIAMANDIS E. P. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. **Nature Clinical Practice Oncology**. v. 588-599, 2008.

KULLOLLI, M., HANCOCK, W. S., HINCAPIE, M. Preparation of a high-performance multi-lectin affinity chromatography (HP-M-LAC) adsorbent for the analysis of human plasma glycoproteins. **Journal of Separation Science**. v. 31, p. 2733-2739, 2008.

KUMAR, K. K. *et al.* Biological role of lectins: A review. **Journal of Orofacial Sciences**, v. 4, n. 1, p. 20, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 8ª ed. São Paulo: Elsevier, 2010.

LAM, S.K.; NG, T.B. Lectins: production and practical applications. **Applied microbiology and biotechnology**. v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.

LEAL, A. F. *et al.* Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Aspergillus* species in brain and lung tissues using lectin histochemistry. **Medical Mycology**. p. 1-4, 2012.

LEE, Ling Y. *et al.* An optimized approach for enrichment of glycoproteins from cell culture lysates using native multi-lectin affinity chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 18, p. 2445-2452, 2012.

LEPOR, H. Pathophysiology of Benign Prostatic Hyperplasia in the Aging Male Population. **Reviews in urology** v.7, p. S3-S12, 2005.

- LI, GUOQING, *et al.* Cancer: A proteomic disease. **Science China Life Sciences**. v. 54, n. 5, p. 403-408, 2011.
- LI, Y. *et al.* Algal lectins for potential prevention of HIV transmission. **Current Medicinal Chemistry**. v. 15, n. 11, p. 1096-104, 2008.
- LIMA, V. L. M. *et al.* Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers**. v. 33, p. 27-32, 1997.
- LIU, B.; BIAN, He-jiao; BAO, Jin-ku. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer letters**. v. 287, n. 1, p. 1-12, 2010.
- LÖRINCZ, A. T. Screening for cervical cancer: new alternatives and research. **Salud Pública de México**. v. 45, n. 3, p. 376-387, 2003.
- LU, J. Collectins: collectors of microorganisms for the innate immune system. **Bioessays**. v. 19, n. 6, p. 509-518, 2005.
- LU, Ji. *et al.* Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1572, n. 2, p. 387-400, 2002.
- MANOHARAN, S. *et al.* Analysis of glycoconjugates in patients with oral squamous cell carcinoma. **Clinica Chimica Acta**. v. 339, p. 91–96, 2004.
- MARANDOLA, P. *et al.* (2004) Molecular Biology and the Staging of Prostate Cancer. **Academia of Science**. n. 1028, p. 294–312, 2004.
- MARTIN, K. J. *et al.* A Need for Basic Research on Fluid-Based Early Detection Biomarkers. **Cancer Research**. v. 70, n. 13, p. 5203–5206, 2010.
- MCNEAL, J.E. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. **Investigative Urology**. v.15, p. 340 – 345, 1978.
- MEANY, D.; CHAN. D. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. **Clinical Proteomics**. v.1, n. 8, p. 7, 2011.
- MELO, C. M. L. *et al.* Healing activity induced by Cramoll 1, 4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International journal of pharmaceutics**, v. 408, n. 1, p. 113-119, 2011b.
- MELO, C.M.L. *et al.* Potential effects of Cramoll-1,4 lectin on murine *Schistosomiasis mansoni*. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 152-158, 2011a.
- MISHRA, A.; VERMA, M. Cancer Biomarkers: Are We Ready for the Prime Time? **Cancers**. v.1, n. 2, p.190-208, 2010.
- MISLOVIČOVÁ, D. *et al.* Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. **Biologia**. v. 64, n. 1, p. 1-19, 2009.

MONTIRONI, R. *et al.* 2005 Update on Pathology of Prostate Biopsies with Cancer. **European Urology**. v. 49, n. 3, p. 441-447, 2006.

MONZO, A.; BONN, G. K.; GUTTMAN, A. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 26, n. 5, p. 423-43, 2007.

MORALES, E. *et al.* Characterization of corpora amylacea glycoconjugates in normal and hyperplastic glands of human prostate. **Journal of Molecular Histology**. n. 36, p. 235–242, 2005.

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

NASCIMENTO, K. S. *et al.* An overview of lectins purification strategies. **Journal of Molecular Recognition**, v. 25, n. 11, p. 527-541, 2012.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. What You Need To Know About Cancer. **NIH** Publication No. 06–1566. Revised February 2005. Reprinted July 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. What You Need To Know About Cervical Cancer. **NIH** Internet Edition. Revised January 2012.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What You Need To Know About Prostate Cancer**. **NIH** Publication n°. 12-1576. Revised June 2012. Printed September 2012.

NGOMA, T. World Health Organization cancer priorities in developing countries. **Annals Oncology**. v. 17, p. viii9–viii14, 2006.

NICKEL, J.C. Inflammation and Benign Prostatic Hyperplasia. **Urologic Clinics North America**. v. 35, p. 109–115, 2007.

NILSSON, C.L. (2007) Lectins: Analytical Tools from Nature. Tallahassee, USA:Elsevier.

NOWEL, P.C. (1960) Phytohemagglutinin: na initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Research**. 20: 462-6.

NUNES, E. S. *et al.* Cytotoxic effect and apoptosis induction by< i> Bothrops leucurus</i> venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**. v. 59, n. 7, p. 667-671, 2012.

OHTSUBO, K.; MARTH, J.D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. **Cell**. v. 126, p. 855 – 867, 2006.

OHYAMA, C. Carbohydrate structure and differential binding of prostate specific antigen to Maackia amurensis lectin between prostate cancer and benign prostate hypertrophy. **Glycobiology**. v. 14, n. 8, p. 671-679, 2004.

OLIVEIRA, M. D. L. *et al.* Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on< i> Cratylia mollis</i> lectin affinity. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 155, n. 2, p. 789-795, 2011.

OLIVEIRA, M.D. *et al.* Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**. v. 46, n. 3, p. 371-376, 2008.

PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 36, p.113-118, 1992.

PAN, S. *et al.* Mass Spectrometry Based Glycoproteomics— From a Proteomics Perspective. **Molecular Cell Proteomics** v.1, n. 10, p. 1–14, 2011.

PARK, S. *et al.* Chemical Tools for Functional Studies of Glycans. **Chemical Society Reviews**. v. 37, p. 1579-1591, 2008.

PERACAULA, R. *et al.* Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. **Glycobiology**. v. 13, p. 457-470, 2003.

PETERSON, E.A. (2010) Normal cell growth and development. Disponível em: <<http://healthlibrary.epnet.com/GetContent.aspx?token=88a4eeeb-f78d-4522-b3c7-3e4ecb98dd7c&chunkid=36702>>. Acessado em 28 de agosto, 2012.

PLAVINA, T. *et al.* Combination of abundant protein depletion and multi-lectin affinity chromatography (M-LAC) for plasma protein biomarker discovery, **Journal Proteome Research**. v.6, p. 662–671, 2007.

RABINOVICH, G.A.; TOSCANO, M.A. Turning ‘sweet’ on immunity: galectin–glycan interactions in immune tolerance and inflammation. **Nature Review Immunology**. v. 9, p. 338–352, 2009.

RADOSAVLJEVIC, G. *et al.* The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. **Immunologic research**. p. 1-11, 2012.

RESEARCH ADVOCACY NETWORK. Biomarkers in Cancer: An Introductory Guide for Advocates. 2010. Disponível em: www.researchadvocacy.org. Acessado em: 04 de janeiro de 2013.

RIZZO, S., ATTARD, G., HUDSON, D. L. Prostate epithelial stem cells. **Cell Proliferation**. v. 38, p. 363–374, 2005.

ROTH, J. Lectins for histochemical demonstration of glycans. **Histochemical Cell Biology**. v. 136, p.117–130, 2011.

SANTOS, A.C.O.; PEIXOTO, C.A.; COELHO, L.C.B.B. Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds. **Mícron**. v. 35, p. 613-618, 2004.

SCHNEGELSBERG, B.; SCHUMACHER, U.; VALENTINER, U. Lectin Histochemistry of Metastasizing and Non-metastasizing Breast and Colon Cancer Cells. **Anticancer research**, v. 31, n. 5, p. 1589-1597, 2011.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **Journal of Biological Chemistry**. v. 282 , n. 5, p. 2753–2764, 2007.

SHARON, N. Lectins: from obscurity into the limelight. **Protein Science**. v. 7, p. 2042–2048, 1998.

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

SIEGEL, R.; DEEPA NAISHADHAM, M.A; AHMEDIN JEMAL, D.V.M. Cancer Statistics, 2012. **CA Cancer Journal for Clinicians**. v. 62, p. 10–29, 2012.

SILVA, M.C.C. *et al.* Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with *in vitro* platelet antiaggregation and anticoagulant activities. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 74-80, 2011.

SMETANA, K. JR.; ANDRÉ, S. Mammalian lectin as tool in glycochemistry and histochemistry with relevance for diagnostic procedure. **Methods in Molecular Biology**. v. 418, p. 171-86, 2008.

SMITH, D.R. (2010) Urologia Geral. Editora: Guanabara Koogan, 17ª edição, Rio de Janeiro.

SOBRAL, A. P. V. *et al.* ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. **Journal of oral science**. v. 52, n. 1, p. 49-54, 2010.

SONAWANE, N.D. Lectin Conjugates as Potent, Nonabsorbable CFTR Inhibitors for Reducing Intestinal Fluid Secretion in Cholera. **Gastroenterology**. v. 132, n. 4, p. 1234-1244, 2007.

SOUZA, G.A. *et al.* (2003) Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. **Glycobiology**. v.13, n. 12, p. 961-72, 2003.

STANGELBERGER, A.; SCHALLY, A.V.; DJAVAN, B. New treatment approaches for prostate cancer based on peptide analogues. **European Urology**. v. 53, n. 5, p. 890-900, 2008.

STRATTON, M. R. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. **Science**. v. 331, p. 1553–1558, 2011.

SUWANNARURK, K. *et al.* Hospital-based prevalence and sensitivity of high-risk human papillomavirus in Thai urban population. **Cancer Epidemiology**. v. 33, p. 56-60, 2009

SWAIN, S. *et al.* Modified Alginate Beads for Mucoadhesive Drug Delivery System: An Updated Review of Patents. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 6, n. 3, p. 259-277, 2012.

TABARÉS, G. *et al.* Different glycan structures in prostate-specific antigen from prostate cancer sera in relation to seminal plasma PSA. **Glycobiology**. v. 16, n. 2, p. 132–145, 2006.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, R. Critical nodes in signalling pathways: insight into insulin action. **Nature Reviews / Molecular Cell Biology**. v. 7, p. 85-96, 2006.

TERMINI, L.; VILLA, L. L. Biomarcadores na Triagem do Câncer do Colo Uterino. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v. 20, n. 2, p. 125-131, 2008.

THIEL, S.; FREDERIKSEN, P. D.; JENSENIUS, J. C. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. **Molecular immunology**, v. 43, n. 1, p. 86-96, 2006.

THÖM, I. *et al.* Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung. **Lung Cancer**. v. 56, p. 391-397, 2007.

TRIGUEROS, V. *et al.* Xerocomus chrysenteron lectin: identification of a new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1621, n. 3, p. 292-298, 2003.

TURNBULL, J. E.; FIELD, R. A. Emerging glycomics technologies. **Nature Chemical Biology**. v. 3, n. 2, p. 74-77, 2007.

TURNER, G.A. N-Glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectins. **Clinica Chimica Acta**. v. 208, p. 149-171, 1992.

URH, Marjeta; SIMPSON, Dan; ZHAO, Kate. Chapter 26: Affinity chromatography: general methods. **Methods in enzymology**. v. 463, p. 417-438, 2009.

VERMASSEN, T. *et al.* Glycosylation of prostate specific antigen and its potential diagnostic applications. **Clinica Chimica Acta**. v. 413, p. 19-20, 2012.

WANG, H.X.; NG, T.B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 342, n. 1, p. 349-53, 2006.

WANG, Y., WU, S. L., HANCOCK, W. S. (2006) Approaches to the study of N-linked glycoproteins in human plasma using lectin affinity chromatography and nano-HPLC coupled to electrospray linear ion trap–Fourier transform mass spectrometry. **Glycobiology**. v. 16, p. 514–523, 2006.

WEBBER, R. (2004) Men's health - Benign prostatic hyperplasia. **Clinical Evidence**. n. 11, p.1119–1138, 2004.

WETZEL, A; BECICH M. An Objective View of Cancer. 2000. Disponível em: < http://www.psc.edu/science/2000/wetzel/an_objective_view_of_cancer.pdf>. Acessado em 22 de maio de 2006.

WICK, M. R. Histochemistry as a tool in morphological analysis: a historical review. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 16, n. 1, p. 71-78, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; ICO Information Centre on Human Papilloma Virus (HPV) and Cervical Cancer. Human papillomavirus and related cancers in Brazil. Disponível em: < www.who.int/hpvcentre>. Acesso em: 20 jul. 2010. (Summary Report 2010).

XIONG, C. *et al.* Anormal mucin-binding lectin from the sponge Craniella australiensis. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology & Pharmacology**. v.1, p. 9-16, 2006.

YAMAMOTOA, K. *et al.* Measurement of the carbohydrate-binding specificity of lectins by a multiplexed bead-based Xow cytometric assay. **Analytical Biochemistry**. v. 336, p. 28–38, 2005.

YAO, L. *et al.* Identification of EFEMP2 as a Serum Biomarker for the Early Detection of Colorectal Cancer with Lectin Affinity Capture Assisted Secretome Analysis of Cultured Fresh Tissues. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 6, p. 3281-3294, 2012.

ZENG, Z. *et al.* A Proteomics Platform Combining Depletion, Multi-lectin Affinity Chromatography (M-LAC) and Isoelectric Focusing to Study the Breast Cancer Proteome. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 12, p. 4845, 2011.

CAPÍTULO I

Artigo publicado no periódico *Journal of Biomedicine and Biotechnology*

Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with *Cratylia mollis* Seed Lectin

Amanda L. R. de Lima, Carmelita C. B. Cavalcanti, Mariana C. C. Silva, Patrícia M. G. Paiva,
Luana C. B. B. Coelho, Eduardo I. C. Beltrão and Maria T. dos S. Correia

Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with *Cratylia mollis* Seed Lectin

Amanda L. R. de Lima ^{1,2}, Carmelita C. B. Cavalcanti ², Mariana C. C. Silva ¹, Patrícia M. G. Paiva ¹, Luana C. B. B. Coelho ¹, Eduardo I. C. Beltrão ^{1,2} and Maria T. dos S. Correia¹

1. Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.
2. Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.
3. Serviço de Anatomia Patológica, Hospital das Clínicas de Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

*Corresponding author.

E-mail: mtscorreia@gmail.com

Tel.: +55 81 88125659.

Research Article

Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with *Cratylia mollis* Seed Lectin

Amanda L. R. de Lima,^{1,2} Carmelita C. B. Cavalcanti,² Mariana C. C. Silva,¹
Patricia M. G. Palva,¹ Luana C. B. B. Coelho,¹ Eduardo I. C. Beltrão,²
and Maria T. dos S. Correia¹

¹Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
50670-901 Recife, PE, Brazil

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil

Correspondence should be addressed to Maria T. dos S. Correia, mtscorreia@gmail.com

Received 26 August 2009; Revised 16 March 2010; Accepted 13 April 2010

Academic Editor: Richard D. Ludescher

Copyright © 2010 Amanda L. R. de Lima et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Lectins, proteins which selectively recognize carbohydrates, have been used in histochemistry for the evaluation of changes in glycosylation in processes of cellular differentiation and/or dedifferentiation. *Cratylia mollis* seed lectins (Cramoll 1,4 and Cramoll 3), conjugated to horseradish peroxidase, were used as histochemical probes in human prostate tissues: normal (NP), hyperplasia (BPH), and prostate carcinoma (PCa). The staining pattern of Con-A and Cramoll 1,4 in BPH was more intense than in NP. These lectins also showed staining differences between BPH and PCa; the latter showing decreased staining intensity with an increased degree of malignancy. PNA and Cramoll 3 stained epithelial cells similarly in all diagnoses although they did present intense staining of PCa glands lumen. Corpora amylacea were not differentially recognized by any of the lectins. Cramoll 1,4 and Cramoll 3 seed lectins present themselves as candidates for histochemical probes for prostate pathologies when compared to commercial lectins such as Con-A and PNA.

1. Introduction

Prostate cancer is the most diagnosed male malignancy and the second leading cause of cancer-related death among American men. Fortunately, mortality rates have increased less than incidence rates in many countries [1]. In Brazil, according to the National Cancer Institute [2], prostate carcinoma (PCa) is the second most common cancer, in incidence, after skin tumors (non-melanoma), and, in terms of mortality, it is exceeded only by lung cancer. The etiologic factors associated with prostate cancer are varied, encompassing both host genetic and environmental influences [3].

Glycosylation is one of the most common co- or posttranslational modifications. Inside a cell, complex glycosylation pathways assemble these oligosaccharides and attach them to proteins and lipids as they travel to the cell surface [4]. Furthermore, by virtue of their peripheral

location, particular oligosaccharide epitopes on proteins or lipids exert key functions in important intercellular communication processes such as fertilization [5], immune response, pathogen anchoring, or metastasis [6]. These particular carbohydrate epitopes are recognized by membrane-anchored carbohydrate-recognition domains of different molecules such as receptors, enzymes, antibodies, or lectins [6]. The latter class comprises proteins of nonimmune origin that display specificity for terminal or subterminal carbohydrates, forming non-covalent bonds. On account of these specific affinities, lectins have been extensively used as histochemical probes to characterize various cell types at various stages of differentiation and maturation of cancer [4, 6, 7]. Thus, modern lectin histochemistry has become a valuable instrument to analyze patterns of glucide composition in glycoconjugates and their modifications in the cell during malignant transformation in tumors [8].

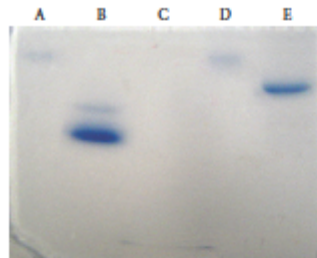


FIGURE 1: Basic and native protein gel electrophoresis of *Cratylia mollis* seed lectins and conjugates. (A) Cramoll 1,4-HRP, (B) Cramoll 1,4, (C) cytochrome C, (D) Cramoll 3-HRP, and (E) Cramoll 3.

Cratylia mollis (camaratu bean) is a native forage from the semiarid region of the Northeast of Brazil, and its seeds are considered an important lectin source (Cramoll), supplying multiple molecular forms (Cramoll 1 to 4) with different carbohydrate specificities [9, 10].

The aim of the present investigation was to evaluate the binding pattern of two preparations containing isoforms from *C. mollis* seed lectin (Cramoll 1,4, a preparation containing Cramoll 1 and Cramoll 4 glucose/mannose-specific and Cramoll 3 galactose-specific) in human prostate tissues. Con A and PNA were used for binding comparison since they possess the same carbohydrate specificity as Cramoll 1,4 and Cramoll 3, respectively.

2. Materials and Methods

2.1. Tissue Sections. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks of eight cases of normal human prostate were obtained from the Obit Identification Service at the Federal University of Pernambuco, Brazil; 61 cases of BPH and 82 cases of PCa were obtained from the Tissue Bank of the University Hospital of the Federal University of Pernambuco, Brazil. Patient ages varied between 31 and 69 years (mean 44) at the time of diagnosis for normal tissues, 46 and 92 years (mean 69) for BPH, and 52 and 88 years (mean 66) for PCa.

2.2. Horseradish Peroxidase (HRP) Lectin Conjugation. Cramoll 1,4 and Cramoll 3 were extracted, isolated, and purified from seeds of *C. mollis* according to Correia and Coelho [10] and Paiva and Coelho [9] at the Glycoprotein Laboratory at the Biochemistry Department of the Federal University of Pernambuco, Brazil. Cramoll 1,4 and Cramoll 3 HRP conjugation was performed according to Beltrão et al. [11]. *Canavalia ensiformis* agglutinin (Concanavalin A (Con-A)) and *Arachis hypogaea* (peanut) agglutinin (PNA) conjugated to HRP (Con A-HRP and PNA-HRP) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.3. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Basic and native polyacrylamide gel electrophoresis (10% w/v) was carried out with conjugated and nonconjugated *C. mollis* isoforms.

Protocols were followed as described by Paiva and Coelho [9].

2.4. Lectin Histochemistry. Tissue slices (4 μ m) were cut, adhered to albumin-treated slides, deparaffinized in xylol, and hydrated in graded ethanol (100%–70%). Slices were treated with 0.1% (w/v) trypsin solution for 2 minutes at 37°C and afterwards with 0.3% (v/v) methanolic hydrogen peroxide solution for 15 minutes at 25°C. Sections were incubated with HRP-conjugated lectins (Con-A-HRP, Cramoll 1,4-HRP, PNA-HRP, and Cramoll 3-HRP, at various concentrations –8, 15, 25, 30 and 60 μ g/mL) for 2 hours at 4°C. Slices were washed (twice for 5 minutes) with 10 mM phosphate buffer saline solution (PBS) pH 7.2, containing 0.15 M NaCl, after each step. Lectin staining was visualized with 3,3'-diaminobenzidine- (DAB-) hydrogen peroxide in PBS for 4 minutes at 25°C [11]. Thereafter, tissues were rinsed in distilled water, counterstained with haematoxylin, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylol, and mounted. Inhibition lectin-carbohydrate binding controls were performed using the specific sugars at a final concentration of 0.3 M for each lectin (methyl- α -D-mannopyranoside for Cramoll 1,4 and Con-A; D-galactose for Cramoll 3 and PNA). The rest of the protocol was as described above.

2.5. Light Microscopy. Tissue sections were examined using an optical microscope (Nikon Eclipse 50i, USA). Staining intensity was determined as the pattern observed in at least 20% of cells with cytoplasm or membrane staining, in luminal secretion, corpora amylacea, and stroma and scored in four categories: 0—no staining, 1—weak staining, 2—moderate staining, and 3—intense staining. For image acquisition, an Image Analyses System (software NIS—Elements F version 2.30—Nikon, USA) was used.

2.6. Statistical Analysis. Staining intensity was analyzed by nonparametric tests (Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis, followed by multiple comparison posttest of Dunn) with a significance level of 95% ($P < .05$) using GraphPad Prism version 5.00.

3. Results

3.1. Horseradish Peroxidase (HRP) Lectin Conjugation. Conjugation efficiency of Cramoll 3 and Cramoll 1,4 to HRP was evaluated using gel electrophoresis for basic and native proteins. Nonconjugated samples were also included. The results showed that conjugated lectins migrated more slowly than their respective nonconjugated counterparts (Figure 1). Lectin conjugates maintained their hemagglutinating activities (data not shown).

3.2. Pathologic Findings. Corpora amylacea were observed in 50.8% of the 61 cases of BPH. The Gleason score for PCa ($n = 82$) was of 2 + 2 = 4 in 3 samples, 2 + 3 = 5 in 1, 3 + 2 = 5 in 1, 3 + 3 = 6 in 24, 3 + 4 = 7 in 36, 4 + 3 = 7 in 3, 3 + 5 = 8 in 3, 4 + 4 = 8 in 2, 4 + 5 = 9 in 3, 5 + 4 = 9 in

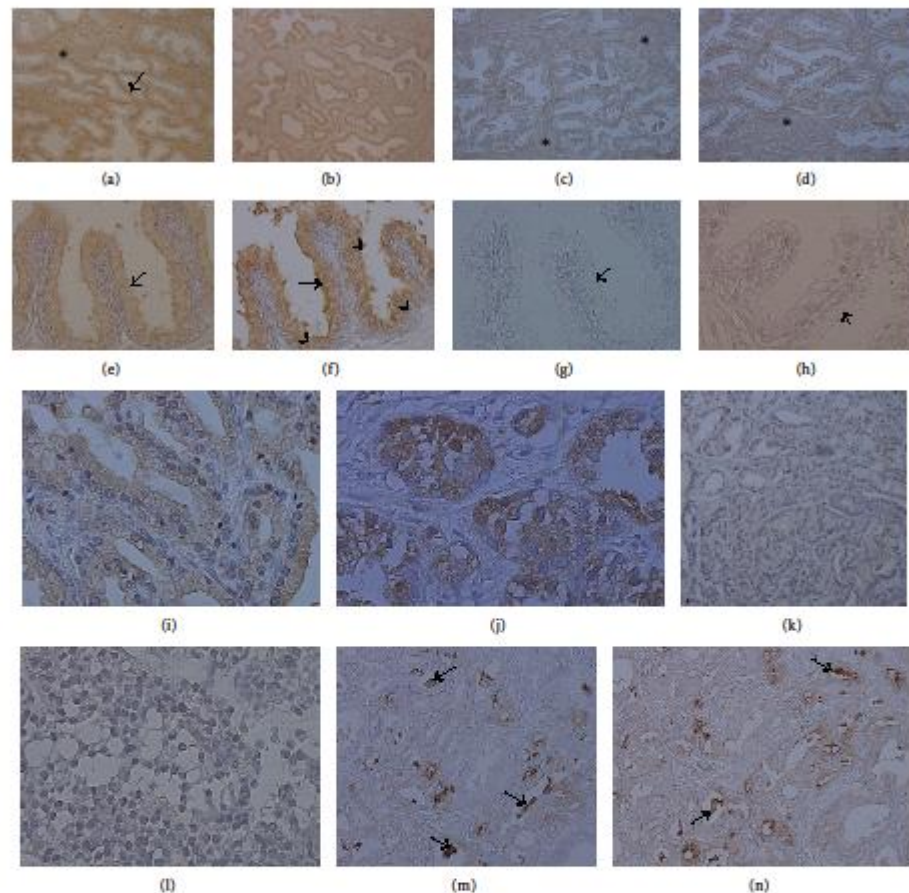


FIGURE 2: Histochemistry of prostatic tissues using Con A, Cramoll 1,4, PNA, and Cramoll 3. (a) Normal prostate stained with Con-A. Epithelial cells (arrow) present a weak staining while stroma (asterisk) is intensely stained. (b) Moderate staining by Cramoll 1,4 in epithelium of normal glands. (c and d) Normal prostate epithelium and stroma (asterisks) presenting weak staining by PNA and Cramoll 3, respectively. (e) Con A moderate staining of BPH glands (arrow). (f) BPH epithelial cells showing intense staining by Cramoll 1,4 in apical cytoplasm (arrowheads) and membrane (arrow). (g and h) BPH glands (arrows) were not stained or only weakly stained by PNA and Cramoll 3, respectively. (i and j) Gleason score 2 and 3 PCa cells stained with a moderate pattern, respectively. (k) Weak staining in Gleason score 4 PCa cells. (l) Nonstaining cells in Gleason score 5 PCa. (m and n) PCa gland lumens (arrows) presented an intense staining pattern for PNA and Cramoll 3, respectively. Magnification (a, b, c, d, k, m, and n) $\times 100$ and (e, f, g, h, i, j, and l) $\times 400$.

3, and $5 + 5 = 10$ in 3. Corpora amyloacea were visualized in 40.2% of PCa in which the Gleason score was usually 3.

3.3. Lectin Histochemistry. Cytoplasm of normal prostate cells was weakly and moderately stained by Con-A and Cramoll 1,4, both at $15 \mu\text{g/mL}$. Normal tissue stroma was moderately stained by Con-A but no staining was observed with Cramoll 1,4 (Figures 2(a) and 2(b)). Hyperplastic epithelial cells were stained by lectins, Con-A, and Cramoll

1,4, mainly in the apical cytoplasm and cell borders. Cramoll 1,4 staining pattern in BPH was intense in most cases (Figures 2(e) and 2(f)). In PCa samples, characterized by heterogeneous Gleason scores, Con-A and Cramoll 1,4 staining intensity decreased while the malignancy degree increased, that is, in well differentiated tissues both lectins showed moderate staining while in undifferentiated tissues no staining was observed. PCa cell staining was more evident using Cramoll 1,4 (Figures 2(i) to 2(l)). Stroma in

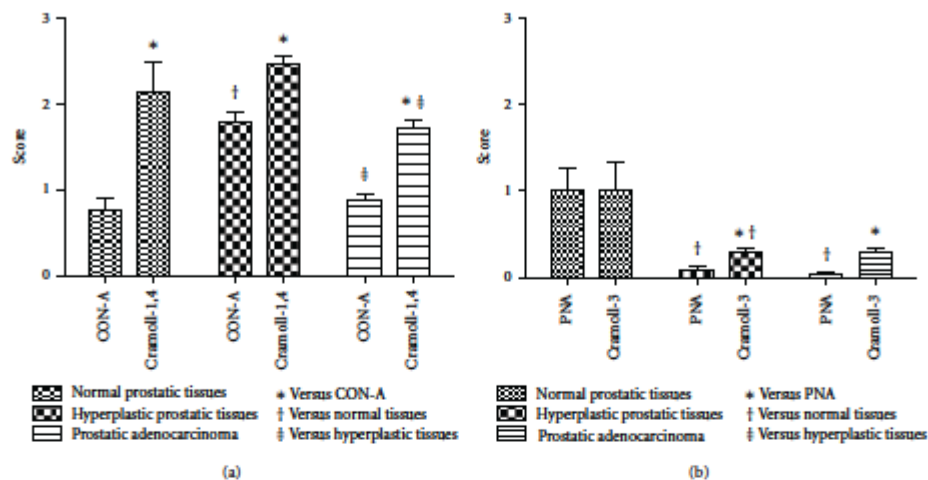


FIGURE 3: Statistical analysis of lectin histochemistry of normal human prostate, BPH, and PCA with Con-A and Cramoll 1,4 (a) and PNA and Cramoll 3 (b) ($P < .05$).

hyperplastic and neoplastic tissues was not stained by either lectin. Figure 3(a) presents the statistical comparison of the staining patterns of Cramoll 1,4 and Con-A in normal and transformed prostate tissues.

PNA and Cramoll 3 (25 $\mu\text{g/mL}$ —galactose specific) weakly stained the normal tissue and did not present a different staining pattern between stroma and glandular tissue (Figures 2(c) and 2(d)). BPH and PCA neoplastic cells were not differentially stained by these two lectins, rendering a non-staining or a weakly heterogeneous pattern (Figures 2(g) and 2(h)). In PCA PNA and Cramoll 3 presented a focal and intense staining pattern in luminal secretion and apical membrane of glandular tumor cells (Figures 2(m) and 2(n)). PCA stroma was moderately stained by PNA and Cramoll 3. Statistical comparison between staining patterns of Cramoll 3 and PNA in studied samples is abridged in Figure 3(b).

Corpora amylacea in BPH were stained in a heterogeneous pattern for all lectins used. The staining pattern for Cramoll 1,4 and Cramoll 3 was more intense than that observed when commercial lectins were used (Figures 4(a) to 4(d)). In PCA the corpora amylacea were not stained by the four lectins used.

Lectin staining was completely abolished in all tissues by inhibition of the lectin carbohydrate-binding site with solutions of methyl- α -D-mannopyranoside (0.3 M) for Con-A and Cramoll 1,4 and of D-galactose (0.3 M) for PNA and Cramoll 3.

4. Discussion

Cramoll 3 and Cramoll 1,4 were properly conjugated to HRP. Enzyme conjugation efficiency of in-house purified proteins

is very important to assure the quality of histochemical assays [11].

Con-A and Cramoll 1,4 (glucose/mannose specific) data were similar to those reported by Morales et al. [12] using (*Galanthus nivalis* agglutinin GNA—10 $\mu\text{g/mL}$) and Con-A (20 $\mu\text{g/mL}$) for normal and hyperplastic prostate cells. They observed that normal prostatic glands showed low content or nonaccessibility to glucose/mannose residues when compared to the hyperplastic glands in which the high staining pattern indicates a high content or accessibility to these saccharides in secretory cells (apical cytoplasm of epithelium and luminal content). The lectin staining of secreted glycoconjugates with mannose/glucose residues is observed in human hyperplastic prostatic glands.

The increase in glucose/mannose glycocalyx content can be related to high production of glycoconjugates bearing these residues as observed by lectin histochemistry. In prostatic hyperplastic glands the presence of acid phosphatase which contains N-linked high-mannose chains in its structure was observed by Jakob et al. [13]. The present study also suggests that the increased lectin staining in BHP could be related to an increased secretor activity of prostatic cells in this pathology [14].

Con A staining of normal prostate stroma is in disagreement with the results of Arenas et al. [15] that observed a weak stroma staining of normal, BPH, and PCA tissues. This occurred probably because they used different enzymatic treatments that may have cleaved expressed stroma glycoconjugates bearing glucose/mannose residues in contrast to our trypsin treatment.

Con-A and Cramoll 1,4 different staining patterns indicate that the latter has greater diagnostic value for prostate diseases than the commercially available lectin.

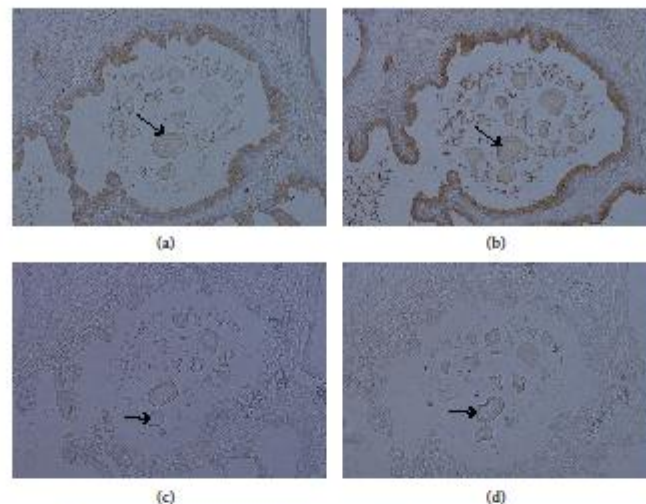


FIGURE 4: Lectin histochemistry of corpora amylacea (arrows) in BPH ((a) to (d)). In glands, corpora amylacea presented weak binding with Con-A (a) and non-staining to PNA (c); BPH glands were Cramoll 1,4 (b) and Cramoll 3 (d) moderately and weakly stained, respectively. Magnification x100.

Such differences in staining can be explained by their similar but not equal quaternary structure which influences the stabilization of the lectin-carbohydrate complex [16]. Thus, the glycoconjugates expressed in pathological prostatic tissues seem to be more likely or prone to form more stable complexes with Cramoll 1,4.

In the present study, PNA and Cramoll 3 increased staining patterns from normal to PCa tissues are in agreement with the results of Janssen et al. [17] who observed that the binding of PNA increases from BPH to cancers. These authors also established a significant positive correlation between the number of PNA acceptors and those of prostatic-specific antigen.

Arenas et al. [15], using PNA, found an increasing staining pattern of epithelial cells in normal and BPH to PCa. We observed that using PNA as well as Cramoll 3 in PCa, galactose residues content increased only in luminal secretion and the apical membrane of malignant tumor glands and not in the cytoplasm of epithelium cells. The absence and/or nonaccessibility of galactose residues in epithelial cell glycoconjugates can be evaluated using a neuraminidase pretreatment instead of or together with trypsin (as used in our work) in order to expose galactose nonaccessible residues due to the presence of sialic acid residues. PNA staining in PCa stroma suggests that the development of PCa is associated with an increase in galactose residues in glycoconjugates at luminal border of prostate cells and stroma. Such results are in agreement with Arenas et al. [15].

The low incidence of corpora amylacea in PCa cannot be used to exclude malignancy as also observed by Christian and collaborators [18]. Corpora amylacea contain an amyloid

substance, β_2 -microglobulin, a double content of sugars (glucosamine and galactose) in relation to proteins and sulfur atoms that suggest the presence of glycosaminoglycans [12, 18]. Our labeling for BPH glands and normal prostate are similar to those observed by Morales et al. [12]. The intense lectin staining in corpora amylacea of secretory cells of BPH is probably due to the accumulation of keratan sulfate after luminal secretion, a component which has been identified in both prostatic secretor cells and corpora amylacea [19]. The origin and function of corpora amylacea have been debated but its function continues to be unknown. Research indicates that corpora amylacea have a secretory origin [12, 20].

Beyond structural roles in increasing the protein stability, protecting from proteolysis, and improving the protein solubility [21], glycosylation promotes also general functional diversity reflected on the high structural possibilities of glycans [22] which can be acting as key events in apoptosis, immunomodulation, and antiproliferative activity in tumor cells [23]. And the lectins remain in focus to decipher these diverse glycan chains, being intensively used as cyto- and histochemistry tool for diagnosis and prognosis of cancer [23].

5. Conclusions

Our results showed that *C. mollis* lectin isoforms are able to recognize cells and an extracellular structure (corpora amylacea) of prostatic tissues. Proving that lectins bind differently the glycode of normal and tumor cells and are able

to detect subtle neoplastic changes of histologically related or similar pathologies; these two isoforms of a Brazilian Northeast native forage plant can be used as auxiliary tools in prostate cancer diagnosis compared to commercial lectins such as Con-A and PNA. The knowledge of the saccharide identity of cell glycoconjugates enables them to be used as targets for drug delivery and immunomodulation.

Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for research grants.

References

- [1] R. J. Bryant and E. C. Hamdy, "Screening for prostate cancer: an update," *European Urology*, vol. 53, no. 1, pp. 37–44, 2008.
- [2] Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde, "Estimativas 2008: incidência de câncer no Brasil," Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2007, http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/estimativa_incidence_cancer_2008.pdf.
- [3] W. Isaacs, A. De Marzo, and W. G. Nelson, "Focus on prostate cancer," *Cancer Cell*, vol. 2, no. 2, pp. 113–116, 2002.
- [4] C. T. Campbell, S.-G. Sampathkumar, and K. J. Yarema, "Metabolic oligosaccharide engineering: perspectives, applications, and future directions," *Molecular BioSystems*, vol. 3, no. 3, pp. 187–194, 2007.
- [5] J. G. Velázquez, S. Canovas, and P. Barajas et al., "Role of sialic acid in bovine sperm-zona pellucida binding," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 74, no. 5, pp. 617–628, 2007.
- [6] C. Jiménez-Castells, B. G. De La Torre, D. Andreu, and R. Gutiérrez-Gallego, "Neo-glycopeptides: the importance of sugar core conformation in oxime-linked glycoproteins for interaction studies," *Glycoconjugate Journal*, vol. 25, no. 9, pp. 879–887, 2008.
- [7] N. Sharon and H. Lis, "History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules," *Glycobiology*, vol. 14, no. 11, pp. 53–62, 2004.
- [8] N. Sharon, "Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 5, pp. 2753–2764, 2007.
- [9] P. M. G. Paiva and L. C. B. B. Coelho, "Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (amaratu bean)," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 36, no. 2, pp. 113–118, 1992.
- [10] M. T. S. Correia and L. C. B. B. Coelho, "Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (amaratu bean)," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 55, no. 3, pp. 261–273, 1995.
- [11] E. I. C. Beltrão, M. T. S. Correia, J. Figuerêdo-Silva, and L. C. B. B. Coelho, "Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues," *Applied Biochemistry and Biotechnology A*, vol. 74, no. 3, pp. 125–134, 1998.
- [12] E. Morales, L. A. Polo, and L. M. Pastor et al., "Characterization of corpora amylacea glycoconjugates in normal and hyperplastic glands of human prostate," *Journal of Molecular Histology*, vol. 36, no. 4, pp. 235–242, 2005.
- [13] C. G. Jakob, K. Lewinski, R. Kuciel, W. Ostrowski, and L. Lebiada, "Crystal structure of human prostatic acid phosphatase," *Prostate*, vol. 42, no. 3, pp. 211–218, 2000.
- [14] C. Carson III and R. Rittmaster, "The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia," *Urology*, vol. 61, no. 4, pp. 2–7, 2003.
- [15] M. I. Arenas, E. Romo, and I. de Gaspar et al., "A lectin histochemistry comparative study in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma," *Glycoconjugate Journal*, vol. 16, no. 7, pp. 375–382, 1999.
- [16] G. A. de Souza, P. S. L. Oliveira, and S. Trapani et al., "Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin," *Glycobiology*, vol. 13, no. 12, pp. 961–972, 2003.
- [17] T. Janssen, M. Petein, and R. Van Velthoven et al., "Differential histochemical peanut agglutinin stain in benign and malignant human prostate tumors: relationship with prostatic specific antigen immunostain and nuclear DNA content," *Human Pathology*, vol. 27, no. 12, pp. 1341–1347, 1996.
- [18] J. D. Christian, T. C. Lamm, J. E. Morrow, and D. G. Bostwick, "Corpora amylacea in adenocarcinoma of the prostate: incidence and histology within needle core biopsies," *Modern Pathology*, vol. 18, no. 1, pp. 36–39, 2005.
- [19] R. J. Cohen, J. W. Holland, S. L. Redmond, J. E. McNeal, and H. J. S. Dawkins, "Identification of the glycosaminoglycan keratan sulfate in the prostatic secretory cell," *Prostate*, vol. 44, no. 3, pp. 204–209, 2000.
- [20] R. J. Cohen, J. E. McNeal, and S. L. Redmond et al., "Luminal contents of benign and malignant prostatic glands: correspondence to altered secretory mechanisms," *Human Pathology*, vol. 31, no. 1, pp. 94–100, 2000.
- [21] R. Rosenfeld, H. Bangio, and G. J. Gerwig et al., "A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation," *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 70, no. 3, pp. 415–426, 2007.
- [22] S. Angeloni, J. L. Ridet, and N. Kusy et al., "Glycoproteomics with micro-arrays of glycoconjugates and lectins," *Glycobiology*, vol. 15, no. 1, pp. 31–41, 2005.
- [23] G. Końska, U. Wójcik, and A. Pituch-Noworolska, "Possible application of lectins in diagnostics and therapy. Part I. Diagnostic application," *Przegląd Lekarski*, vol. 65, no. 4, pp. 189–194, 2008.

CAPÍTULO II

Artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Biomedical Science*

Histochemical Differential Staining by Isolectins from *Cratylia mollis* Seed during the Progression of Human Cervix Neoplasia

Lima, A. S. M.; Vasconcelos, J. L. A.; Moura, R. D. S.; Cavalcanti, C. L. B.; Lima, A. L. R.; Paiva,
P.M.G.; Coelho, L. C. B. B.; Beltrão, E. I. C. & Correia, M. T. S

Histochemical Differential Staining by Isolectins from *Cratylia mollis* Seed during the Progression of Human Cervix Neoplasia

Lima, A. S. M.^{1,2}; Vasconcelos, J. L. A.²; Moura, R. D. S.²; Cavalcanti, C. L. B.²; Lima, A. L. R.^{1,2}; Paiva, P.M.G.¹; Coelho, L. C. B. B.¹; Beltrão, E. I. C.^{1,2} & Correia, M. T. S.¹

¹ Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica; ² Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

ABSTRACT

Carcinoma of the uterine cervix is the second most common cancer in women worldwide and that yet has a poorly known pathobiochemistry. Lectins, due to their ability to bind and recognize specific carbohydrates, present themselves as important tools for studying cell surface glycoconjugates that can be involved in the development or progression of human cervix cancer. This work evaluated the potential of isolectins from *Cratylia mollis*, Cramoll-1,4 and Cramoll-3, as histochemical probes for neoplastic and normal tissues of the human cervix. In normal squamous tissue, degree III cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma presented similar staining by Cramoll-1,4 and Cramoll-3. In normal squamous tissue, the staining was cytoplasmic only in the basal and inner third of the epithelium. In degree III cervical intraepithelial neoplasia, the staining intensity was higher and present in the whole extension of the epithelium, while in the squamous cell carcinoma no staining was evident. In the normal glandular epithelium, staining patterns were different, Cramoll-3 stained cell cytoplasm, while Cramoll-1,4 stained the apical region of cell. These findings suggest these lectins can be used as histochemistry biomarkers in cell differentiation and in identification of biochemical changes in carbohydrate profile of the cell surface glycoconjugates in human cervical tissues.

Key-words: cervical cancer, CIN 3, *Cratylia mollis*, histochemistry, lectins.

Corresponding author: Maria Tereza dos Santos Correia. Laboratório de Glicoproteínas/UFPE. Avenida Prof. Moraes Rego, s/n – CDU – Recife, PE, BRASIL. 50670-901. Phone: + 55 81 21268540. E-mail adress: mtscorreia@gmail.com.

INTRODUCTION

Cervical cancer remains a significant health problem for women worldwide and is the second most common cause of cancer-related deaths in women living in developing countries [1]. Cancer of the cervix is rare in women under 30 years and their incidence and mortality increases progressively from the fourth decade of life. In Brazil in 2012, 17,540 new cases are expected, with an estimated risk of 17 cases per 100,000 women [2].

High-quality screening with cytology (Papanicolaou [Pap] testing) has markedly reduced mortality from squamous cell cervical cancer, which comprises 80% to 90% of cervical cancers [3]. However, the true sensitivity of the conventional test is on the order of 50 to 60% in the routine screening setting, including the need for frequent repetition of the test, which raises costs considerably and results in excessive interventions secondary to the increase in false-positive rates [4]. Thus it is important to seek new complementary and sensitive diagnostics.

Currently little is known of the pathobiology of cervical carcinogenesis, therefore cellular and molecular characteristics of cervical cancer and its precursors need to be quantified in order to provide insights into the multistep process of cervical carcinogenesis [5]. Due to the fact that cancer of the cervix is characterized by a long pre-invasive stage, research of cells in this location is ideal to study the gradual transition from normal to invasive cancer, as well as changes in cell surface carbohydrates of various degrees of injury [6]. The neoplastic growth is associated with quantitative and/or qualitative changes in the structure of the carbohydrate residues of glycoproteins and glycolipids present on the cell surface [7], but the functional significance of this involvement of glycoconjugates is still not as well defined. It can be related to the metastatic process and prognosis of a number of human tumors [8].

Due to their ability to bind and recognize specific carbohydrates, lectins are invaluable tools for the detection, isolation, and characterization of glycoconjugates, primarily of glycoproteins, for histochemistry of cells and tissues and for the examination of changes that occur on cell surfaces during physiological and pathological processes, such as cell differentiation and cancer [9,10]. Therefore, they have been widely used in histochemistry to monitor changes in cellular environment, being used as indicators of cell type and stages of development, which has a huge impact on cell biology and histopathology [11, 12, 13, 14]. Among the lectins studied in our laboratory, *Cratylia mollis* seed lectins have stood out with

many applications in various areas of biotechnology, including histochemistry [15, 16, 17, 18, 19].

The search for pathobiochemical patterns coupled with the development of novel biomarkers are useful ways of prematurely trace the gradual transition from normal tissue to human cervix neoplasia. Thus, this work aims to evaluate possible changes in the expressed carbohydrates in tissues of the human cervix using lectin histochemistry of different specificities as possible biomarkers of cervical cancer.

MATERIALS AND METHODS

Cratylia mollis isolectins were purified from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean) seeds and characterized in the UFPE's Laboratory of Glycoproteins as previously described [20, 21]. Paraffin-embedded uterine cervix biopsies and with diagnostics of squamous cervical carcinoma (SCC), degree III cervical intraepithelial neoplasia (NIC 3) and normal tissue (n=14 for each group) were obtained from the archives of the Pathology Department of Pernambuco Clinical Hospital.

Four micrometer-thick paraffin-embedded sections were deparaffinized in xylan and hydrated in ethylic alcohol (70-100%). The following were treated with 1% (w/v) trypsin solution at 37°C for 2 min and a solution of 0.3% (v/v) hydrogen peroxide in methanol- H₂O₂ for 15 min at room temperature. Histological sections were incubated with peroxidase-labeled lectins [Cramoll-1,4 (45 µg/ml) and Cramoll-3 (60µg/ml)] for 2h at 4°C. The sections were then washed (two times, 5 min) with 10mM sodium phosphate buffer (PBS) pH 7.2 containing 150 mM NaCl after each step previously performed. The staining was revealed by incubation (5-8 min) solution of 20% (w/v) DAB-H₂O₂ in PBS. The histologic sections were then counterstained with hematoxylin followed by dehydration with 100% alcohol and fixation with xylol. After assembly of the slides, they were evaluated by light microscopy. To confirm the specificity of the lectins, each lectin was preincubated with the appropriate inhibitory sugar using solutions of α -methyl-D-mannopyranoside and galactose to 300 mM in PBS to Cramoll-1,4 and 3, respectively.

To evaluate the staining intensity of lectins, a qualitative scale of at least 50% of the cells was used: no stained (0), weak (+), moderate (+ +) and strong (+ + +). The presence of cytoplasmic and/or apical staining was given as present or absent. In normal tissue, the squamous epithelium and glandular epithelium were studied separately, and the squamous

epithelium was divided into four layers: basal layer, the lower third, middle third and upper third.

RESULTS AND DISCUSSION

Cell surface carbohydrates are involved as markers of cellular differentiation in various tissues, including epithelial, and the lectins are important tools for studying these carbohydrates [9, 22, 23]. In squamous epithelium of normal biopsies, Cramoll-1,4 and 3 stained 92,85 % of the cases studied. Both isolectins marked only the cytoplasmic portion of the basal layers and the lower third of the squamous epithelium according to cell maturation of this epithelium (Figure 1). In the single case in which there was no labeling of lectins in squamous epithelium, there was a predominance of squamous metaplasia, without atypia (Table 1).

The staining of the lectins was completely inhibited by the solutions of α -methyl-D-mannopyranoside and D-galactose at a concentration of 300mM for Cramoll-1,4 and 3, respectively (Figures 1, 2, 3 in C and D) to ensure that the labeling corresponds to the specific carbohydrate-lectin binding.

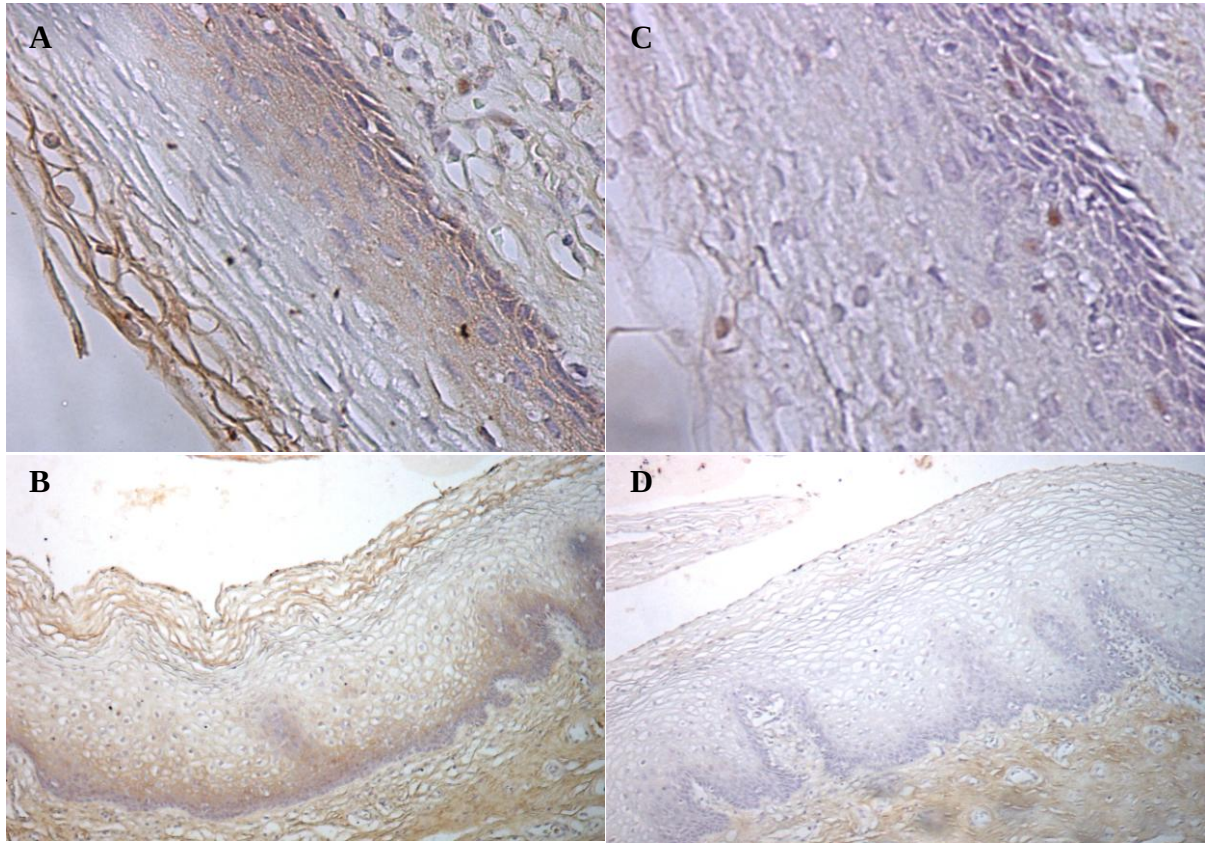


Figure 1: Staining and inhibition of lectins in normal squamous epithelium. **A, B.** Basal cells and lower third of the squamous epithelium marked with Cramoll-1,4 and Cramoll-3, respectively. **C, D.** Inhibition of A with α -methyl-D-mannopyranoside and B with galactose, respectively. A,C (x400) and B, D (x100).

Table 1: Staining intensity in tissues of the cervix.

Intensity	Normal squamous epithelium		Normal glandular epithelium		CIN 3		SCC	
	Cramoll		Cramoll		Cramoll		Cramoll	
	1,4	3	1,4	3	1,4	3	1,4	3
0	1	1	-	-	-	-	14	14
+	13	13	5	6	5	4	-	-
++	-	-	9	8	9	10	-	-
+++	-	-	-	-	-	-	-	-

CIN 3: degree III cervical intraepithelial neoplasia; SCC: squamous cell carcinoma; Cra 1,4: Cramoll-1,4; Cra 3: Cramoll-3; 0: no staining; +: weak staining; ++: moderate staining; +++: strong staining.

These lectins can be used as tools to study cellular differentiation of normal cervical squamous epithelium. A possible explanation for this tag may be the presence of glucose/mannose and galactose residues only in the most immature cells or such cells are located in regions of cell surface more accessible to Cramoll-1,4 and 3. This change in expression of glycoconjugates may be related to alterations in the availability of glycosyltransferases responsible for adding of carbohydrate residues on glycoproteins or glycolipids in the cell surface. This same pattern of staining was observed for other lectins, the *Griffonia simplicifolia* I (GSI) which has the same specificity as Cramoll-3 and *Griffonia simplicifolia* II (GSII) which reflected the squamous epithelial maturation [24]. *Canavalia ensiformis* (Con-A) and *Glycine max* (SBA), which have similar specificity of Cramoll-1,4 and 3, respectively, showed different staining pattern in normal squamous tissue. In this case all layers of the squamous epithelium were labeled, with predominance in the membrane [24]. In another study with Con-A [25], no differences in intensity or binding distribution were identified in the different layers of normal squamous epithelium. The staining of *Arachis hypogaea* (PNA) was distributed within the cytoplasm from the basal layer of squamous epithelial cells to the plasma membranes of cells in the lower parabasal layers. This can be explained by the complexity of the cell surface glycan sequences of this tissue and another factor that may be associated with structural differences among lectins of similar specificity, contributing to why some are able to reach and bind to certain structures and not others [9].

Only normal glandular tissue, the staining presented by Cramoll-1,4 differed from presented by Cramoll-3 (Figure 2). With weak to moderate intensity, Cramoll-1,4 marked the apical part of columnar cells, while Cramoll-3 was predominantly cytoplasmic. In studies of Bychkov & Toto [26] and Gloor & Hurlimann [27], they used various lectins, including Con-A and PNA, to study epithelia of the uterine cervix, lectins showed cytoplasmic staining in cells of normal glandular tissue. The Cramoll-3 showed no disagreement with the result presented by PNA, but Cramoll-1,4 demonstrated disagreement with the result of Con-A, which reinforces that cell surface carbohydrates are complex and can lead to differences between the links of lectins with the same monosaccharide specificity.

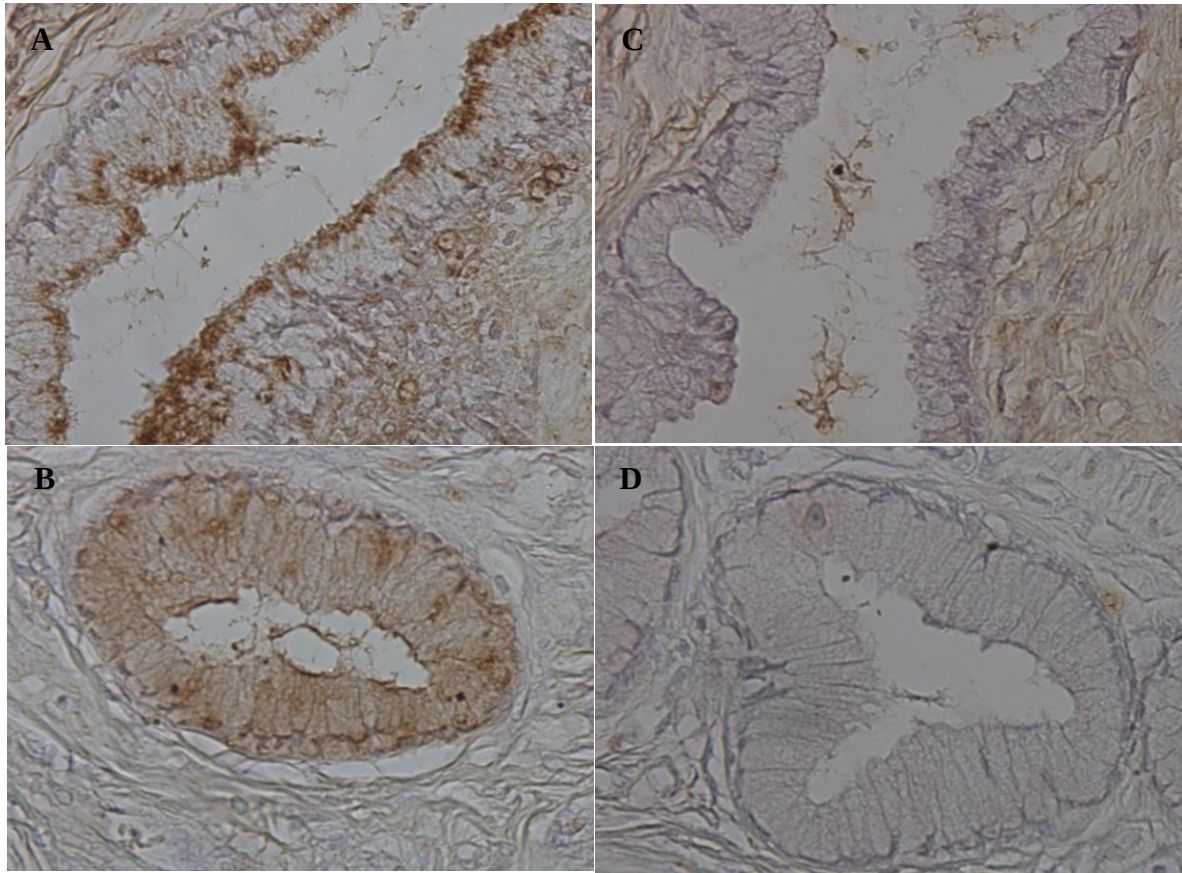


Figure 2: Staining and inhibition of lectins in normal glandular epithelium. **A, B.** Apical region of normal glandular epithelial cells labeled with Cramoll-1,4 and Cramoll-3, respectively. **C, D.** Inhibition of A with α -methyl-D-mannopyranoside and B with galactose, respectively. A, B, C, D (x400).

Degree III cervical intraepithelial neoplasia (CIN 3) showed the same staining pattern for both lectins (Figure 3): cytoplasmic, with weak to moderate intensity. CIN has been traditionally defined as a continuum of intraepithelial squamous abnormalities which exhibit nuclear atypia in all epithelial layers and possess some potential for progression to invasive carcinoma if not removed [28]. The histopathology of CIN provides clinical evidence for the multistep process of deregulation of proliferation and differentiation. While the presence of CIN 3 implies a greater risk for the development of invasive cancer than does the presence of CIN 1 or 2, it is only a relative risk. There are currently no objective markers of increased risk for progression and invasion [5].

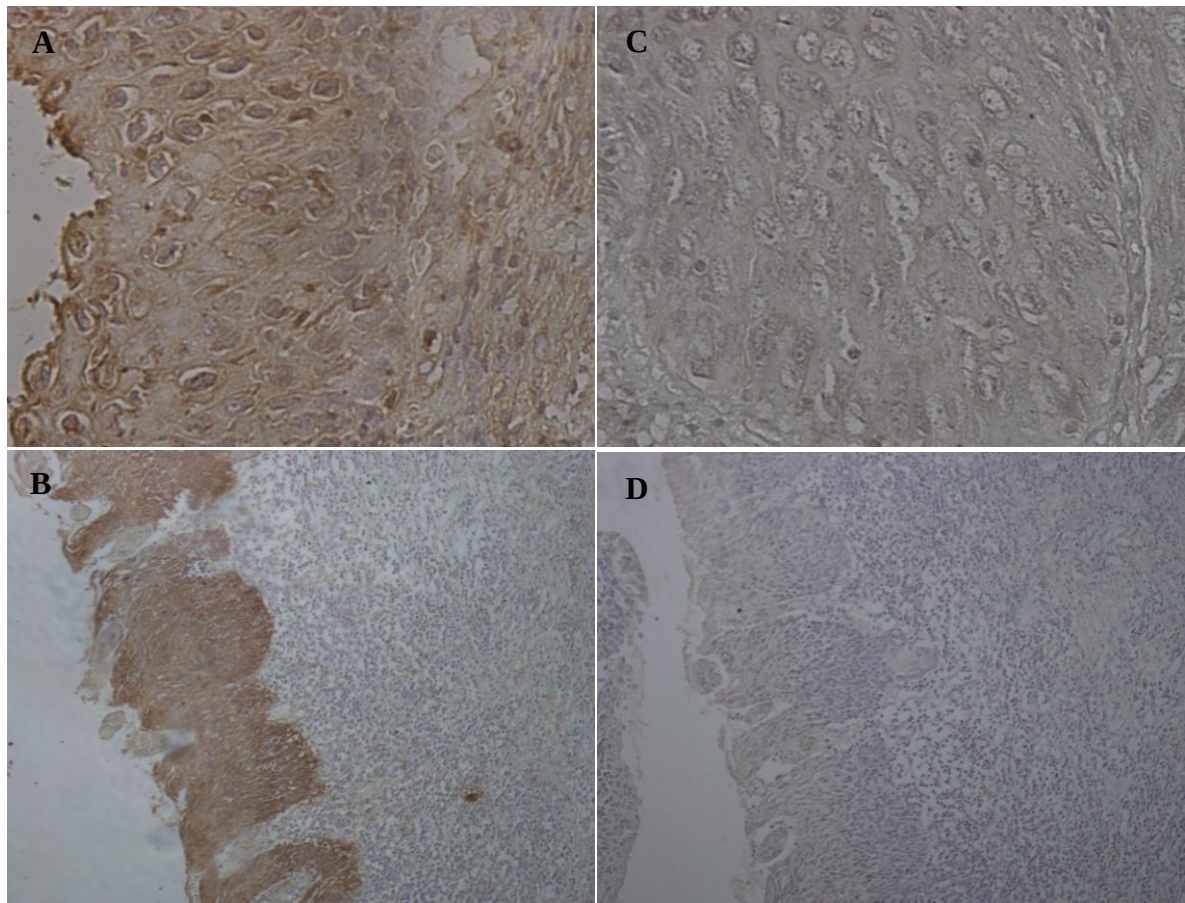


Figure 3: Staining and inhibition of lectins in squamous epithelium affected by degree III cervical intraepithelial neoplasia. **A, B.** Staining of Cramoll-1,4 and Cramoll-3 in entire epithelium, respectively. **C, D.** Inhibition of A with α -methyl-D-mannopyranoside and B with galactose, respectively. A,C (x400) and B, D (x100).

In our work, it was observed clearly that in tissues affected by CIN 3, there is increased expression of the glucose/mannose and galactose residues in comparison with normal tissue. Similar results of increased intensity of CIN 3 staining in comparison with normal tissue were observed in the studies of Byrne *et al.* [6] for other lectins with the same characteristics of Cramoll-1,4 to 3 such as Con-A and SBA, respectively. Gloor & Hurlimann [27], in also studying specific galactose lectins, PNA and *Ricinus communis* (RCA), observed similar staining by Cramoll-3 for CIN 3. Knowing that changes in cell surface carbohydrates are related to cell differentiation [6, 29], our results corroborate this affirmation, reinforcing the capacity of Cramoll-1,4 and 3 to be used as tools for the study of cell differentiation in uterine cervix.

There no staining in all cases of squamous cell carcinoma using both lectins (Figure 4). This can be explained by glucose/mannose and galactose residues suppression in cells due to cellular activity loss and/or reduction, dysregulation in the glycosyltransferase synthesis responsible for transferring residues to glycoconjugates or by a loss of accessibility to residues by these lectins. Byrne and collaborators [6] showed heterogeneous labeling in cases of cervical squamous cell carcinoma for all studied lectins, including ConA and SBA. There is also disagreement with research of Banerjee *et al.* [25] using Con-A and PNA. Most malignant cells in all squamous cell carcinomas bound Con-A, however, with heterogeneous binding distribution throughout the tumors with no specific pattern of apparent localization. With PNA, 73% of cervical squamous carcinomas showed binding predominantly in better-differentiated squamous carcinoma cells within the centers of tumor islands [25].

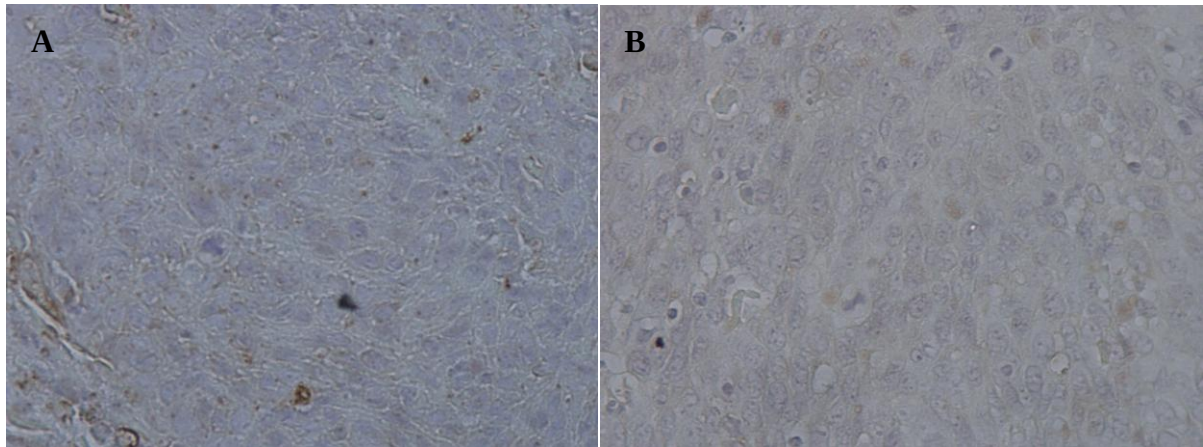


Figure 4: Squamous cell carcinoma. **A, B.** Absence of staining by Cramoll-4 and 3, respectively, in the cells of squamous cell carcinoma. A, B (x400)

Cell surface carbohydrates appear to be related to the development of malignancy, participating in the process of invasion and metastasis [8]. Many authors have observed an increase in the appearance of the marking of lectins in malignant tumor tissue, the metastatic process correlated with increased expression of certain carbohydrates or carbohydrate with aberrant expression that were not present in normal tissue [16, 30, 31]. However, our results suggest that the development of malignancy may be related to the loss or non-accessibility of the residues of glucose/mannose and galactose. Results similar to ours were reported by other works, emphasizing the possibility of loss or reduction of carbohydrates in the process of carcinogenesis [19, 32].

Cellular and molecular characteristics of the pathobiology of cervical cancer and its precursors need to be quantified in order to provide insights into the multistep process of cervical carcinogenesis [5]. Once markers of the multistep process are found, they can be used to identify those precancerous lesions at highest risk for progression to invasion and/or may be used as potential targets for intervention with chemo-preventive agents, thus shortening the follow-up time for these studies [5]. A recent study described a molecular imaging approach in which fluorescence endoscopy and a fluorescently labeled lectin were used to detect the changes in glycan expression of the epithelial cell surface that accompany the transition of dysplasia to *in situ* carcinoma from esophagus, proposing lectins as relatively cheap and nontoxic imaging probes [33].

As observed in others malignant tumours, our study reinforces the findings of Beltrão *et al.* [16] and Lima *et al.* [19], by demonstrating the utility of Cramoll-1,4 and 3 as tools to study cell differentiation in the process of malignant transformation by histochemical tests. These lectins recognized CIN 3 with a moderate and homogenous staining pattern in most of cases studied and with significant difference in relation to normal tissue and squamous cell carcinoma, indicating that glucose/manose/galactose glycans are present in a higher content in CIN 3.

CONCLUSIONS

Our findings showed that the glycan phenotype in abnormal cell differentiation processes in human uteri cervix is different from their normal counterparts. *Cratylia mollis* lectins may be potential histochemical biomarkers in distinguish and/or characterizing CIN3 and SCC.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Maamri, A.; El Hfid, M.; Chafi, A.; Abdesslam, B. **Cervix and breast cancers in Oujda city in Eastern Morocco: Determinants and risk factors.** *Open Journal of Preventive Medicine* 2012, **2**: 9-15.
2. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2012. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2011.
3. Saslow, D. ; Solomon, D.; Lawson, H. W.; Killackey, M.; Kulasingam, S. L.; Cain, J.; Garcia, F. A. R.; Moriarty, A. T.; Waxman, A. G.; Wilbur, D. C.; Wentzensen, N.; Downs Jr, L. S.; Spitzer, M.; Moscicki, A. B.; Franco, E. L.; Stoler, M. H.; Schiffman, M.; Castle, P. E.; Myers, E. R. **American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer.** *American Journal Clinical Pathology* 2012,**137**: 516-542.
4. Lörincz, A. T. **Screening for cervical cancer: new alternatives and research.** *Salud Pública de México* 2003, **45(3)**: 376-387.
5. Mitchell, M. F.; Hittelman, W. N.; Hong, W. K.; Lotan, R.; Schottenfeld, D. **The Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia: An Argument for Intermediate Endpoint Biomarkers.** *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1994, **3**: 619 – 626.
6. Byrne, P.; Willians, A.; Rollason, T. **Studies of lectin binding to the human cervix uterine: II. Cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous carcinoma.** *Histochemical Journal* 1989b, **21(6)**: 323-336.

7. Guillot, J.; Guerry, M.; Konska, G.; Caldefie-Chezet, F.; Latour, M.; Penault-Llorca, F. **Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas.** *Bull Cancer* 2004, **91(2)**: 141-158.
8. Brooks, S. A.; Hall, D. M. S. **Investigations into the potential role of aberrant n-acetylgalactosamine glycans in tumor cell interactions with basement membrane components.** *Clinical & Experimental Metastasis* 2002, **19**: 487-493.
9. Gabius, H. J.; André, S.; Kaltner, H.; Siebert, H. C. **The sugar code: functional lectinomics.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2002, **1572(2)**:165-177.
10. Sharon, N.; Lis, H. **History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules.** *Glycobiology* 2004, **14(11)**: 53-62.
11. Beltrão, E. I. C.; Medeiros, P. L.; Rodrigues, O. G.; Figueredo-Silva J.; Valença, M. M.; Coelho, L. C. B. B.; Carvalho, L. B. Jr. **Parkia pendula lectin as histochemistry marker for meningotheelial tumour.** *European Journal of Histochemistry* 2003, **47(2)**:139-142.
12. Nishimura, A.; Sawadaa, S.; Ushiyamaa, I.; Yamamotoa, Y.; Nakagawaa, T.; Tanegashimab, A.; Nishia, K. **Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain.** *Forensic Science International* 2000, **113(1)**: 265-269.
13. Tatsuzuki, A.; Ezaki, T.; Makino, Y.; Matsuda, Y.; Ohta, H. **Characterization of the sugar chain expression of normal term human placenta villi using lectin histochemistry combined with immunohistochemistry.** *Archives of Histology and Cytology* 2009, **72(1)**: 35-49.
14. Collin, E.; Kilcoyne, M.; Grad, S.; Alini, M.; Joshi, L.; Pandit A. **Cell Surface Glycosylation and Glycosaminoglycan Composition Profiles in Immature and Mature Intervertebral Disks.** *Global Spine Journal* 2012, **02**: 74.
15. Silva, M. C. C.; Santana, L. A.; Silva-Lucca, R. A.; Lima, A. L. R.; Ferreira, J. G.; Paiva, P. M. G.; Coelho, L. C. C. B.;Correia, M. T. S. **Immobilized Cratylia mollis lectin: An**

affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with *in vitro* platelet antiaggregation and anticoagulant activities. *Process Biochemistry*, 2011 **46(1)**: 74-80.

16. Beltrão, E. I.; Correia, M. T.; Figueredo-Silva, J.; Coelho, L. C. B. B.. **Binding evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1998, **74(3)**: 125-134.

17. de Melo, C. M. L., Melo, H., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., da Silva, M. B., & Pereira, V. R. A. **Mitogenic Response and Cytokine Production Induced by Cramoll 1, 4 Lectin in Splenocytes of Inoculated Mice.** *Scandinavian journal of immunology* 2011, **73(2)**: 112-121.

18. Melo, C. M. L. D., de Lima, A. L. R., Beltrão, E. I. C., Cavalcanti, C. C. B., de Melo-Júnior, M. R., Montenegro, S. M. L., Coelho, L.C.C.B., Correia, M.T.S., Carneiro-Leão, A. M. D. A. Potential effects of Cramoll 1, 4 lectin on murine *Schistosomiasis mansoni*. *Acta tropica* 2011, **118(2)**: 152-158.

19. Lima, A.L.R.; Cavalcanti, C.C.B.; Silva, M.C.C.; Paiva, P.M.G.; Coelho, L.C.B.B.; Beltrão, E.I.C. & Correia, M.T.S. **Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 1-6.

20. Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B. **Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean).** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1995, **55**: 261-273.

21. Paiva, P. M. G.; Coelho, L. C. B. B. **Purification and partial characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean).** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1992, **36**:113-118.

22. Reano, A.; Faure, M.; Jacques, Y.; Reichert, U.; Schaefer, H.; Thivolet, J. **Lectins as markers of human epidermal cell differentiation.** *Differentiation* 1982, **22**: 205-210.

23. Nemanic, M. K.; Whithead, J. S.; Elias, P. M. **Alterations in membrane sugars during epidermal differentiation: Visualization with lectins and role of glycosidases.** *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1983, **31**: 887-897.
24. Byrne, P.; Willians, A.; Rollason, T. **Studies of lectin binding to the human cervix uteri: I. Normal cervix.** *Histochemical Journal* 1989a, **21(6)**:323-336.
25. Banerjee, S.; Robson, P.; Soutter, W. P.; Foster, C. S. **Modulated expression of glycoprotein oligosaccharides identifies phenotypic differentiation in squamous carcinomas of the human cervix.** *Human Pathology* 1995, **26**: 1005-1013.
26. Bychkov, V.; Toto, P. D. **Lectin binding to normal, dysplastic and neoplastic cervical epithelium.** *American Journal of Clinical Pathology* 1986, **85**: 542-547.
27. Gloor, E.; Hurlimann, J. **Cervical intraepithelial glandular neoplasia (Adenocarcinoma In Situ and Glandular Dysplasia). A correlative study of 23 cases with histologic grading, histochemical analysis of mucins, and immunohistochemical determination of the affinity for four lectins.** *Cancer* 1986, **58**: 1272-1280.
28. Crum, C. P.; Mclachlin, C. M. **Cervical intraepithelial neoplasia.** *Journal of Cellular Biochemistry* 1995, **59**: 71-79.
29. Chen, S.; Zheng, T.; Shortreedm. R.; Alexander, C.; Smith, L. M. **Analysis of cell surface carbohydrate expression patterns in normal and tumorigenic human breast cell lines using lectin arrays.** *Analytical Chemistry* 2007, **79(15)**: 5698-5702.
30. Brooks, S. A. **The involvement of *Helix pomatia* lectin (HPA) binding N-acetylgalactosamine glycans in cancer progression.** *Histology and histopathology* 2000, **15**:143-158.
31. Thöm, I.; Schult-Kronefeld, O.; Burkholder, I.; Goern, M.; Andritzky, B.; Blonski, K.; Kugler, C.; Edler, L.; Bokemeyer, C.; Schumacher, U.; Laack, E. **Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung.** *Lung Cancer* 2007, **56(3)**: 391-397.

32. Arenas, M. I.; Romo, E.; Gaspar, I.; Bethencourt, F. R.; Sánchez-Chapado, M.; Fraile, B.; Paniagua, R. **A lectin histochemistry comparative study in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma.** *Glycoconjugate Journal* 1999, **16(7)**: 375-382.
33. Bird-Lieberman, E. L.; Neves, A. A.; Lao-Sirieix, P.; O'donovan, M.; Novelli, M.; Lovat, L. B.; Eng, W. S.; Mahal, L. K.; Brindle, K. M.; Fitzgerald R. C. **Molecular imaging using fluorescent lectins permits rapid endoscopic identification of dysplasia in Barrett's esophagus.** *Nature Medicine* 2012, **18**: 315-321.

CAPÍTULO III

Artigo a ser submetido ao periódico *Biotechnology Progress*

Isolation of serum glycoproteins by lectin affinity chromatography in prostatic alterations

Lima, A. L. R.; Paula, R.A.; Zingali, R. B.; Coelho, L. C. B. B.; Beltrão, E. I. C.& Correia, M. T. S

Isolation of serum glycoproteins by lectin affinity chromatography in prostatic alterations

Lima, A. L. R.^{1,2}; Paula, R.A.¹; Zingali, R.B.³; Coelho, L. C. B. B.¹; Beltrão, E. I. C.^{1,2} & Correia, M. T. S¹

¹ Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, UFPE, Brazil; ² Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami, UFPE, Brazil.; ³ Laboratório de Hemostase e Venenos, UFRJ, Brazil.

Abstract

Lectins, proteins which recognize selectively carbohydrates and have the capacity to interact with molecules of biological fluids, have been used as affinity chromatography to purify glycoproteins. We have applied a simple method for isolating and purifying differential serum glycoproteins from patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer using *Cratylia mollis* seed lectin immobilized on Sepharose CL-4B as affinity matrix. Our results suggest that this one-step purification method utilizing immobilized Cramoll-1,4 lectin has potential separate glycoproteins from subjects with prostatic alterations and can be auxiliary tool for the identification of new cancer biomarkers.

Keywords: biomarker, cancer, glycoproteins, lectin chromatography, prostate, serum.

Corresponding author: Maria Tereza dos Santos Correia. Laboratório de Glicoproteínas/UFPE. Avenida Prof. Moraes Rego, s/n – CDU – Recife, PE, Brasil. 50670-901. Phone: + 55 81 21268540. E-mail adress: mtscorreia@gmail.com

1. Introduction

In Western societies the process of aging is closely related to the onset of chronic diseases, such as coronary artery disease, diabetic nephropathy or different types of malignancies [1]. Cancer remains a major health problem in the world due to the dramatic increase in the number of cancer-related deaths in recent years [2] and the prostate cancer is now recognized as one of the most important medical problems of the male population [3]. The high incidence of prostate cancer lesions found at postmortem evaluation of asymptomatic men suggests that overtreatment is likely if all cancers would be detected and treated earlier in life. An over diagnosis rate of 15% has been estimated suggesting that biological markers of disease progression are essential to clinical practice [4]. Therefore, novel biomarkers are urgently needed to assist in managing this disease.

Parallel to technical advancements possibilities for the analysis of the human proteome for biomarkers have recently made considerable progress [5]. Thus, proteomic tools are increasingly being utilized for the discovery of biomarkers which will allow us to make clinical decisions about patient treatment at an earlier stage. The proteome have led to a new era of research aimed at improving prognoses, diagnoses, and monitoring responses to therapy through detection of biomarkers in human body fluids (i.e., plasma, serum, saliva, and urine) [5,6]. Overall, in terms of specific methods, a variety of protocols, including lectin and antibody has been developed for the capture of glycoproteins and glycopeptides to determine differences between samples obtained from patient subjects and control individuals. [6].

Lectins are multivalent in nature and can bind to the carbohydrate moieties, without altering the properties of the carbohydrates [7]. Many of them have been applied in affinity chromatography that is a form of chromatography in which they are immobilized on gel beads, glycoproteins are then adsorbed by lectins and eluted with specific carbohydrates [7, 8]. So, it can be employed to fractionate and purify glycoproteins based on their specific features. Lectin-based protocols include those using single species [9, 10, 11], as well as mixtures [6]. Serial lectin column chromatography is useful for isolation of extremely small amounts of glycoproteins [7].

Cratylia mollis (Camaratu bean) plant is native forage from the State of Pernambuco, Northeast of Brazil used as cattle feed. Cramoll-1,4 containing the molecular forms 1 and 4 (Cramoll-1,4), which has been immobilized on sepharose. It was therefore the aim of the present study to purify serum glycoproteins from benign prostatic hyperplasia and prostate cancer patients and healthy individuals through lectin-affinity chromatography with *C. mollis*

lectin (Cramoll-1,4) and to identify differences in expression patterns of glycoproteins in these prostatic alterations.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Electrophoresis reagents were obtained from Bio-Rad (Richmond, USA) and Amersham Pharmacia (New Jersey, USA). Sephadex G-75 and Cibacron Blue 3 GA, Agarose, Type 3000 were purchased from Sigma (Saint Louis, USA). Cyanogen bromide activated Sepharose CL 4B and standard molecular weight markers were purchased from Amersham Pharmacia (New Jersey, USA). The other reagents used were of analytical grade.

2.2 Human serum samples

Serum samples were collected of patients that had diagnostic pathologically confirmed for BPH (age 54-80 year) or PCa (age 57-95 year) at various clinical stages in Urology unit of Clinics Hospital (Pernambuco, Brazil) and gifted a blood sample to the study after informed consent, the patient details are given in Table 1. PCa patients were stratified in five groups according to grading system according to Gleason [12]. The serum use for research purposes has been approved by the Ethics Committee at the Pernambuco Federal University sob number n° 0158.0.172.000-09. Elderly healthy male subjects (age 43–74 year) without any prostatic complications were also included in this work, totaling seven study groups.

The serum samples were collected in blood collection tubes no additive. A sample of the blood was sent for routine PSA testing and the remainder was allowed to clot; centrifuged at 1500 g for 5 min, the supernatant was transferred to a new tube. The serum was immediately stored at –80 °C in 0.5 ml aliquots until use. Concentrations of serum-PSA were assayed by Enzyme Immunoassay (EIA) method in the Laboratory of Clinical Hospital of Pernambuco.

Table 1. Clinical characteristics of study groups.

Groups	Number of subjects	Age (years*^a)	PSA_t*^b (ng/mL*^a)
Control	19	61 (43-74)	2,028 (0,24-12,07)
BPH	29	68 (54-80)	3,336 (0,44-9,04)
PCa Score 5	2	79 (63-95)	1,6 (0-3,2)
PCa Score 6	24	74 (57-91)	3,965 (0-46,99)
PCa Score 7	18	74 (61-84)	5,091 (0-31,72)
PCa Score 8	3	73 (59-86)	17,286 (0,01-50)
PCa Score 9	6	70 (63-77)	55,038 (0,307-100)

a) Values expressed in mean and the range is given in parenthesis.

b) Total PSA values.

2.3 Isolation and immobilization of Cramoll-1,4 lectin

Cramoll-1,4 lectin was purified from 10% (w/v) *C. mollis* seed extract following the previously established protocol [13]. Cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (1 g) was washed with 1 mM HCl, followed by 100 mM NaHCO₃ buffer, pH 8.3 containing 500 mM NaCl and 1 mM HCl. The coupling reaction was proceeded by mixing Cramoll-1,4 lectin (30mg of protein) and the resin for 2 h at 24°C, stirring. The non-coupled lectin was removed by filtration on a sintered glass filter. The gel was transferred to 1M ethanolamine, pH 8.0 during 2 h at 24°C for blocking any remaining active groups of the Sepharose. Finally, the Cramoll-1,4-Sepharose was washed with 100 mM CH₃COONa buffer, pH 4.0 containing 500 mM NaCl, followed by 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 500 mM NaCl, 100 mM sodium acetate buffer, pH 4.0 containing 500 mM NaCl and 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 500 mM NaCl. The amount of immobilized protein was calculated by the difference between the offered protein amount and that found in the filtrates; measurements were performed according to Lowry *et al.* [14] using bovine serum albumin as standard, at a range of 0–500 mg/mL. The support Cramoll-1,4 Sepharose was kept in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 500 mM NaCl at 4°C until use.

2.4 Removing high abundant protein with Cibacron Blue 3GA, Agarose, type 3000 column chromatography

To minimize interference in the electrophoretic pattern, the majority of the albumin present in the serum samples was removed with Cibacron Blue Agarose. Approximately 1mL of cibacron resin was applied in glass columns and equilibrated with 10mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. The experimental procedure follows the protocol provided by manufacturer (Sigma-Aldrich). This column enables removal of albumin in a single step. Human serum samples (seven groups) were diluted for 1mL (1:4) with 10mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 and were applied to columns and circulated through the column (four times). Fractions (1 mL) were collected at a flow rate of 10 mL / h with 10mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 for the removal of unbound material. The adsorbed proteins (albumin) were eluted with a solution of 1.5 M NaCl in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. For each group were performed four Cibacron columns. The highest unbound fractions (albumin depleted) of each group were unified and concentrated using Rotational-Vacuum-Concentrator (RVC) (Martin Christ, USA). Protein assays were carried out, according to the Smith *et al.* [15] using bovine serum albumin as standard, at a range of 0–500 mg/mL.

2.5 Cramoll-1,4 lectin-affinity column chromatography

Briefly, columns of Cramoll-1,4-Sepharose 4B (1mL) were equilibrated 150 mM NaCl and activated with buffers containing 0.02% CaCl, 0.02% MnCl. Pooled serum samples (approximately 1mL) and obtained of four cibacron columns were applied to the glass column (2mL) and reapplied through the column (four times), followed by washing with 150 mM NaCl of the buffer . Fractions (1mL) were collected and monitored for their absorbance at 280 nm. The first fraction was designated as the lectin unbound fraction. Elution of lectin-bound fraction was performed with 300 mM D-glucose.

The bound fractions were pooled and dialyzed against 5 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 at 4°C. The dialysis was concentrated in RVC and kept at –20°C for subsequent analysis by SDS-PAGE.

2.6 SDS-PAGE

Electrophoresis under denaturing and reducing conditions in the presence of reducing agent (beta-mercaptoethanol) was done according to Laemmli [16], using a 5% (w/v) stacking gel and a 12% (w/v) separating gel. The gels of cibacron columns were stained overnight with 2% (w/w) Colloidal Coomassie G-250 prepared in H₂O and destained in H₂O. The gels of were also stained for glycoprotein by the Periodic acid-Schiff (PAS) technique [17]. The standard molecular weight markers were phosphorylase b (97 kDa) albumin bovine serum (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsinogen (24 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α -lactalbumin (14.2 kDa).

3. Results and discussion

Proteomic profiling is one of the most commonly applied strategies for cancer biomarker discovery. There are two general differential proteomic strategies: comparing protein patterns in cancer tissue with their normal counterparts and comparing plasma/serum from cancer patients with those from normal controls [18]. In this work, the second strategy was used with sera of prostate cancer patients. One of the best ways to diagnose cancer early, aid in its prognosis, or predict therapeutic response, is to use serum or tissue biomarkers [19].

Body fluids, like blood and urine, are comparatively easy to obtain and are useful for the detection of novel diagnostic markers by applying new technologies, like proteomics [20]. Human plasma and serum represents an important biological material for disease diagnosis. However, the wide dynamic range in protein concentration remains a major challenge in the development of diagnostic assays for the very low concentration of biomarker proteins in the presence of high abundance proteins. A practical and effective strategy is to remove 99% of the diagnostically uninformative proteins in order to enhance the detection of the low abundance proteins and penetrate deeper into the plasma proteome. More than 100 proteomic studies using human plasma or serum with a focus on prostate cancer research have been reported [21].

The abundant blood proteins, such as albumin immunoglobulin, fibrinogen, transferrin, haptoglobin and lipoproteins, may mask the less abundant proteins, which are usually potential markers [22]. Therefore, depletion of at least these two high abundance proteins is a prerequisite of a successful search for disease markers in blood. Nevertheless,

these methods may sacrifice other proteins by nonspecific binding, thus lowering the screen efficiency [23].

Although albumin is not a glycoprotein, it binds to other glycoproteins so that partial binding to lectins occurs and it is stained by the glycoprotein dye. Since many important marker proteins are detected in low concentration in biological samples, removing the high abundant proteins may be a critical strategy for serum biomarker discovery [24]. In our study, highly abundant protein (albumin) was removed using an affinity column of Cibacron Blue 3GA Agarose 3000 and albumin depletion was similar and efficient for the seven groups (Figure 1).

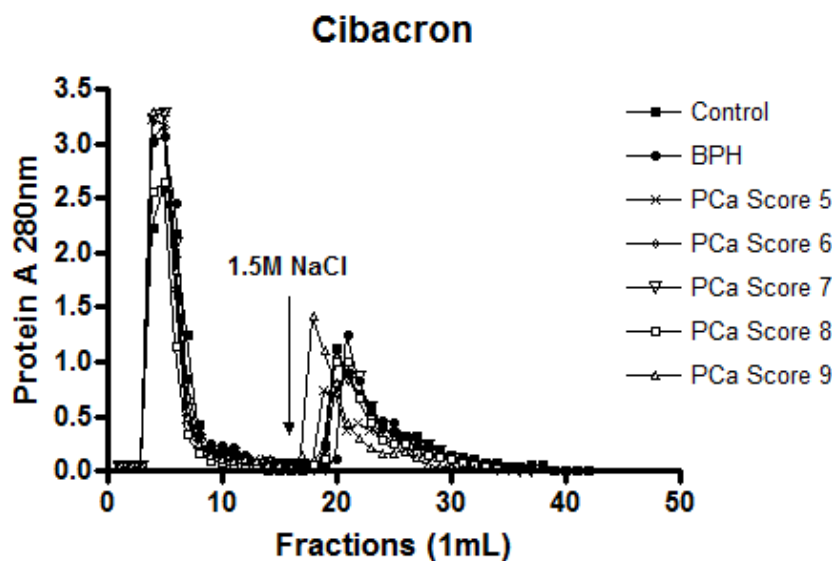


Figure 1: Cibacron Blue 3GA chromatography columns. The columns were equilibrated with 10mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 and pools from seven study groups, were chromatographed. Fractions were eluted at a flow rate of 10 mL/h. Bounded proteins (e.g., albumin) were desorbed with 1.5 M NaCl in 10mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. Fractions (1 mL) were collected and absorbance at 280nm was measured.

In electrophoresis (Figure 2), we can distinguish that in patients with BPH and control individuals, the level of albumin is a little higher in relation to cancer stages corroborating other studies that analyzed serum protein patterns and observed that there is slight or no hypoalbuminemia in early stages of cancer but as the disease progresses albumin levels drop significantly and can serve as good indicators of prognosis of cancer [25]. Serum albumin is generally used to assess the nutritional status, severity of disease, disease progression and prognosis [26]. Serum albumin has also been described as an independent prognosticator of

survival in various cancers like lung, pancreatic, gastric, colorectal and breast [26]. By electrophoresis also proved the efficiency of albumin depletion mainly in cases of BPH and PC a compared to control individuals. With removal of this highly abundant protein, the remaining proteins can be identified over a relatively high dynamic range [24].

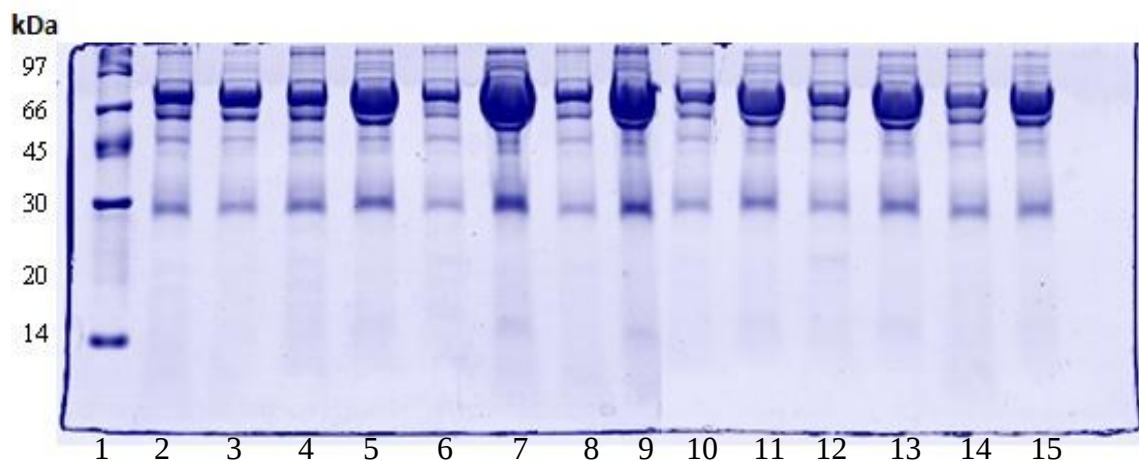


Figure 2: SDS-PAGE of cibacron affinity from serum samples from seven study groups. Analysis of applied and retied fractions in cibacron: Line 1 (MW, GE), line 2 (start material of one group), line 3 (eluted fraction of one group), line 4 (start material of two group), line 5 (eluted fraction of two group), line 6 (start material of tree group), line 7(eluted fraction of tree group) , line 8 (start material of four group), line 9 (eluted fraction of four group), line 10 (start material of five group), line 11 (eluted fraction of five group), line 12 (start material of six group), line 13 (eluted fraction of six group), line 14 (start material of seven group), line 15 (eluted fraction of seven group).

Given the complexity and wide range of protein concentrations in the plasma/serum proteome, most workflows have incorporated one of the several available methods for depletion of abundant proteins as the first step in the fractionation of serum or plasma. And lectins are being used singly, in serial combinations or as mixtures of lectins in affinity chromatography [27, 28]. Many laboratories have successfully employed this technique to characterize glycoproteomes [29, 30, 31]. Therefore, we besides classical depletion strategy that involved the use of a cibacron column apply singly lectin affinity chromatography with Cramoll-1,4.

The coupling of Cramoll-1,4 lectin to Sepharose 4B was efficient; 99% of the lectin (35 mg) was estimated to be covalently attached to 4 mL of the hydrated CNBr activated Sepharose 4B beads as indicated by disappearance of protein from the supernatant. This result

showed be reproducible and was similar to those obtained for Lima *et al.* [32], which reported for the first time the attached of Cramoll-1,4 to Sepharose 4B with a yield of 95 %.

Cramoll-1,4-Sepharose was examined separately for the capture of proteins from human serum. An equivalent sample of depleted albumin serum of each group was loaded on lectin affinity column and the captured proteins were eluted with 0.3M D-glucose. The affinity chromatography results from pools depleted of albumin are showed in Figure 3 and also presented a similar pattern for seven groups in study (Figure 3).

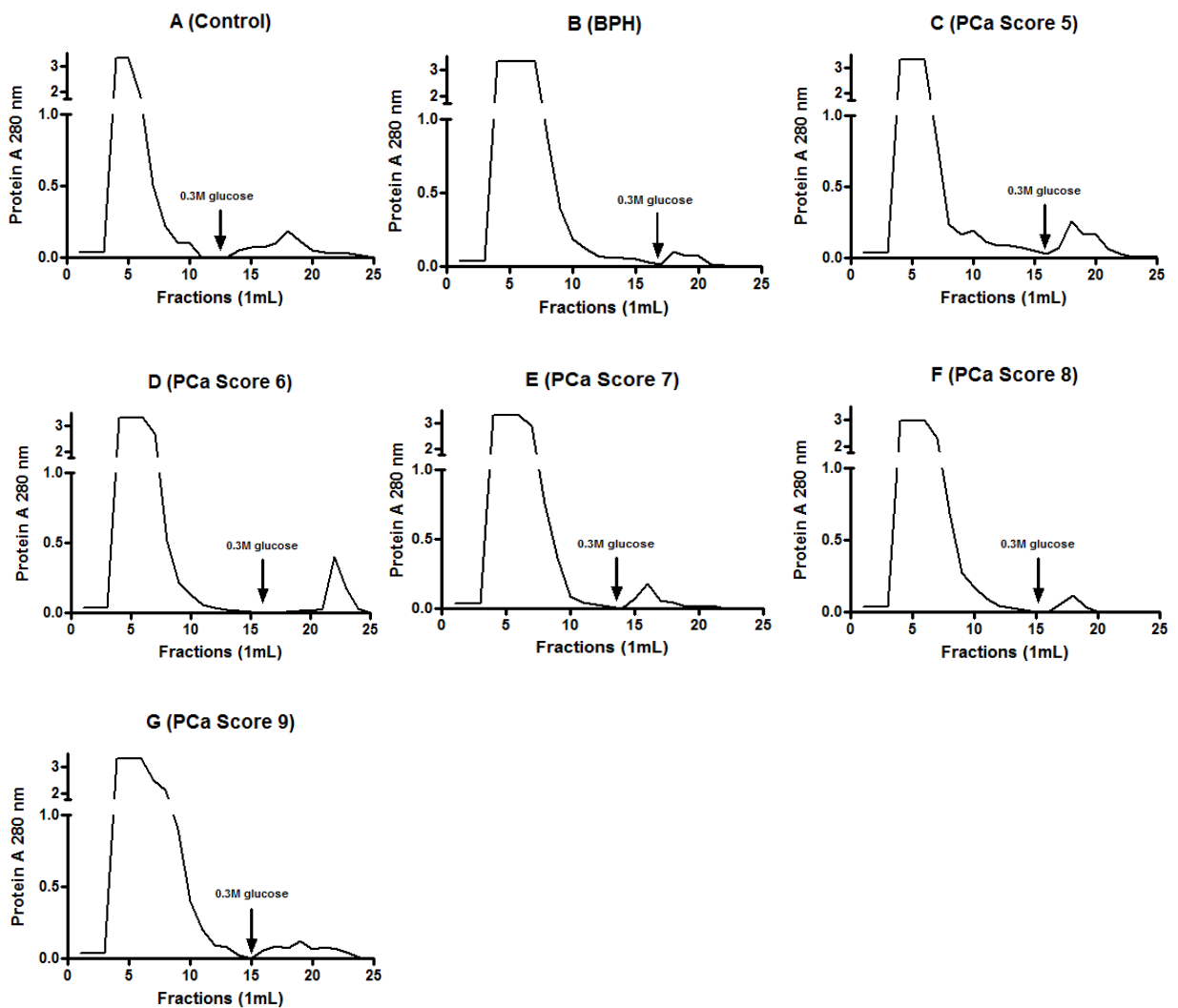


Figure 3: Affinity chromatography on immobilized Cramoll-1,4-Sepharose. The columns were equilibrated with 0.15M NaCl and unbound pools in cibacron from seven study groups (A, B, C, D, E, F and G) were chromatographed. Fractions were eluted at a flow rate of 10 mL/h. Bounded proteins were desorbed with 0.3M D-glucose in 0.15M NaCl. Fractions (1 mL) were collected and absorbance at 280nm was measured.

The yield of the adsorbed proteins from each chromatography is summarized in table 2. It can be observed that has a difference between applied protein concentration and the proteins amount bound to Cramoll-1,4 Sepharose among groups in study. The yields were lower for BPH, PCa Score 6 and PCa Score 7.

Table 2. Yield of the adsorbed serum proteins to Cramoll-1,4 Sepharose chromatography.

Serum	Applied Protein (mg)	Obtained Protein (mg)	Yield (%)
Control	36.5	6.8	18.6
BPH	63.5	3.2	5
PCa Score 5	30.9	5.1	16.5
PCa Score 6	61.7	2.2	3.5
PCa Score 7	69.9	2.6	3.7
PCa Score 8	27.4	10	36.4
PCa Score 9	44.2	6.1	13.8

After, each eluted pool of immobilized Cramoll1,4 was dialyzed in 0.15M NaCl and concentrated in RVC. The captured protein samples were analyzed on SDS-PAGE and visualized using Colloidal Comassie (G-250) and with Schiff's reagent (data not show). Electrophoretic patterns of Cramoll-reactive proteins isolated by affinity chromatography from pooled human normal (healthy) and PCa-sera are shown in Figure 4. Under the experimental conditions used, electrophoretic patterns of Cramoll-bound proteins were observed in the range of 30 kDa – 100 kDa and it could be noticed different bands in each serum.

Kosanovic and Jankovic [33] evaluated comparatively the glycoprotein patterns of human prostate cancer (PCa) and normal human sera regarding sialylation and fucosylation as structural characteristics relevant for cancer progression. They isolated glycoproteins using affinity chromatography on Sambucus nigra agglutinin (SNA)- and Lens culinaris agglutinin (LCA)-columns and subsequently characterized by SDS-PAGE. The main differences found were more abundant 40–150 kD SNA-reactive molecular species an more abundant 50–150 kD LCA-reactive molecular species in PCa-sera than in normal sera. In PCa there was a general increase in sialylation and decrease in fucosylation of human serum glycans compared to normal sera [33].

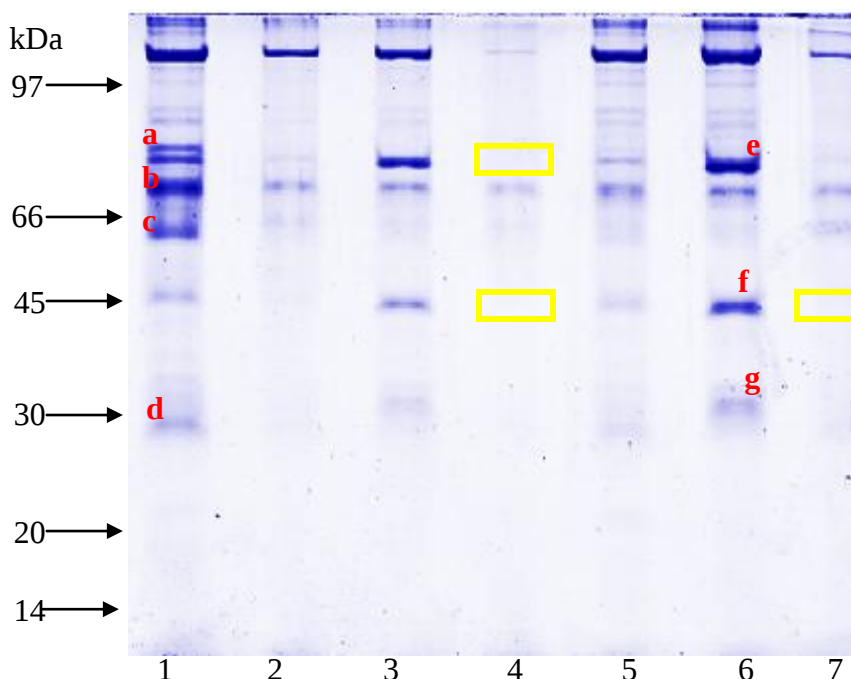


Figure 4: 12% SDS-PAGE under denaturing and reducing conditions of eluted glycoproteins in Cramoll1,4-Sepharose. Samples with 15 μ L of eluted protein sample with 0.3 M glucose. Healthy individuals (lane 1), BPH (lane 2), PCa Score 5 (lane 3), PCa Score 6 (lane 4), PCa Score 7 (lane 5), PCa Score 8 (lane 6), PCa Score 9 (lane 7). Gel was stained with Colloidal Comassie. Expression different proteins (in red: a, b, c, d, e, f, g). No expression of proteins (yellow squares).

The proteins captured by the Cramoll-1,4 lectin showed different SDS-PAGE profile. Only one gel band “a” was shown in the lane of healthy individuals. Meanwhile, some bands from different samples had different staining (expression) intensity although they migrated with the same approximate molecular weight, such as bands “b, c, d” in the lane of healthy individuals and bands “e, f, g” in the lane of PCa Score 8. Some proteins were not expressed in PCa Score 6 (e and f) and in PCa Score 9 (band f).

Based on the staining (expression) intensity, singly Cramoll-1,4 can perform selection of some glycoproteins from human serum, despite did not capture as much glycoprotein from serum as the other studies that lead to the concept of a multi-lectin affinity enrichment. Zhao *et al.* [24] used three separate lectin-agarose conjugates consisting of wheat germ agglutinin (WGA), *Sambucus nigra* lectin (SNA) and *Maackia amurensis* lectin (MAL) as part of sample preparation to selectively enrich sialic-acid containing glycoproteins from human cancer serum. The eluate from each lectin column was further separated using other analytical separation methods as SDS-PAGE. Another applications of serial lectin affinity chromatography was demonstrated by Sumi *et al.* [34] who proposed that N-

acetylglucosaminyltransferase IV is upregulated in patients with early stage prostate cancer compared with those with benign prostatic hyperplasia and by Yang & Hancock [35] that combined the affinity of Con-A, WGA, and Jacalin to capture the majority of glycoproteins present in human serum. These researches indicated that each lectin can enrich specific sets of glycoproteins with some of overlap glycoprotein specificities [35].

4. Conclusions

This results showed that immobilized Cramoll-1,4 alone was able to isolate serum distinct glycoproteins, which can be possible glyco-biomarkers for diagnosis and prognosis of prostatic alterations. This lectin can be an auxiliary tool in characterization of serum glycoproteins in pathological processes.

5. Acknowledgements

This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

6. References

1. Schiffer, E, Mischak, H, Zimmerli, LU Proteomics in gerontology: current applications and future aspects--a mini-review. *Gerontology*. 2009; 55(2):123-37.
2. Basha, MR, Baker, CH, Abdelrahim, M Biomarkers Clinical Relevance In Cancer: Emphasis On Breast Cancer And Prostate Cancer. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 2009; 3(1):1-7.
3. Heidenreich, A, Bastian, PJ, Bellmunt, J, Bolla, M, Joniau, S, Mason, MD, Matveev, V, Mottet, N, van der Kwast, TH, Wiegel, T, Zattoni, F (2012) Guidelines on Prostate Cancer. 164 pages. *European Association of Urology*. Disponível em: http://www.uroweb.org/gls/pdf/08%20Prostate%20Cancer_LR%20March%2013th%202012.pdf

4. Van der Poel, HG Molecular markers in the diagnosis of prostate cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2007; 61: 104–139.
5. Siwy, J, Vlahou, A, Zimmerli, LU, Zurbig, P, Schiffer, E (2011) Clinical proteomics: Current techniques and potential applications in the elderly. *Maturitas*. 2011; 68 (3): 233-244.
6. Drake, PM, Schilling, B, Niles, RK, Braten, M, Johansen, E, Liu, H, Lerch, M, Sorensen, DJ, Li, B, Allen, S, Hall, SC, Witkowska, HE, Regnier, FE, Gibson, BW, Fisher, SJ (2011) A lectin affinity workflow targeting glycosite-specific, cancer-related carbohydrate structures in trypsin-digested human plasma. *Analytical Biochemistry*. 2001; (408)1: 71-85.
7. Lam, SK, Ng, TB Lectins: production and practical applications. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011; 89(01): 45-55.
8. Kumar KK, Chandra KL, Sumanthi J, Reddy GS, Shekar PC, Reddy B Biological role of lectins: A review. *Journal of Orofacial Science*. 2012; 4: 20-25.
9. Comunale, MA, Wang, M, Hafner, J, Krakover, J, Rodemich, L, Kopenhaver, B, Long, RE, Junaidi, O, Bisceglie, AM, Block, TM, Mehta, AS Identification and development of fucosylated glycoproteins as biomarkers of primary hepatocellular carcinoma. *Journal of Proteome Research*. 2009; 8: 95–602.
10. Jung, K, Cho, WE, Regnier, F Glycoproteomics of plasma based on narrow selectivity lectin affinity chromatography. *Journal of Proteome Research*. 2009; 8: 643–650.
11. Xiong, L, Andrews, D, Regnier, F Comparative proteomics of glycoproteins based on lectin selection and isotope coding. *Journal of Proteome Research*. 2003; 2: 618– 625.
12. Gleason, DF Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Human Pathology*. 1992; 23(3): 273–279.
13. Correia, MTS, Coelho, LCBB Purification of a glucose/mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1995; 55:261–73.

14. Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL, Randall, RJ Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193:265–75.
15. Smith, PK, Krohn, RI, Hermanson, G., Mallia, AK, Gartner, FH, Provenzano, MD, Fujimoto, EK, Goeke, NM, Olson, BJ, and Klenk, DC Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 1985; 150 (1): 76–85.
16. Laemmli, UK Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: b 680–685.
17. Zacharius, RM, Zell, TE, Morrison, JH, Woodlock, JJ Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 1969; 30: 148–52.
18. Xue, H, Lu, B, Lai, M The cancer secretome: a reservoir of biomarkers. *Journal of Translational Medicine*. 2008; 6: 52.
19. Kulasingam, V, Diamandis, EP (2008) Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature Clinical Practice Oncology*. 2008; 5: 588-599.
20. Fountoulakis, M, Juranville, JF, Jiang, L, Avila, D, Röder, D, Jakob, P, Berndt, P, Evers, S, Langen, H Depletion of the high-abundance plasma proteins. *Amino Acids*. 2004; 27: 249–259.
21. Goo, YA; Goodlett, DR Advances In Proteomic Prostate Cancer Biomarker Discovery. *Journal of Proteomics*. 2010; 73: 1839 – 1850.
21. Yocum AK, Yu K, Oe T, Blair IA Effect of immunoaffinity depletion of human serum during proteomic investigations. *Journal of Proteome Research*. 2005; 4: 1722-1731.
22. Omenn, GS, States, DJ, Adamski, M, Blackwell, TW, Menon, R, Hermjakob, H, Apweiler, R, Haab, BB, Simpson, RJ, Eddes, JS (2005) Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and

multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics*. 2005; 5: 3226-3245.

24. Zhao, J, Simeone, DM, Heidt., D, Anderson, MA, Lubman, DM (2006) Comparative serum glycoproteomics using lectin selected sialic acid glycoproteins with mass spectrometric analysis: application to pancreatic cancer serum. *Journal of Proteome Research*. 2006; 5(7): 1792-802.

25. McMillan DC, Watson WS, O’Gorman P, Preston T, Scott HR, McArdle CS Albumin concentrations are primarily determined by the body cell mass and the systemic inflammatory response in cancer patients with weight loss. *Nutrition and Cancer*. 2001; 39:210-213.

26. Gupta, D, Lis, CG Pretreatment serum albumin as a predictor of cancer survival: A systematic review of the epidemiological literature. *Nutrition Journal*. 2010; 9:69.

27. Mechref, Y, Madera, M, Novotny, MV Glycoprotein enrichment through lectin affinity techniques. *Methods in Molecular Biology*. 2008; 424: 373–396.

28. Wang, Y, Ao, X, Vuong, H, Konanur, M, Miller, FR, Goodison, S, Lubman, DM (2008) Membrane glycoproteins associated with breast tumor cell progression identified by a lectin affinity approach. *Journal of Proteome Research*. 2008; 7: 4313-4325.

29. Fang, XM, Zhang, WW Affinity separation and enrichment methods in proteomic analysis. *Journal of Proteome Research*. 2008; 71: 284–303.

30. Hirabayashi, J Lectin-based structural glycomics: Glycoproteomics and glycan profiling. *Glycoconjugate Journal*. 2008; 21:35–40.

31. Plavina T, Wakshull E, Hancock WS, Hincapie M Combination of abundant protein depletion and multi-lectin affinity chromatography (M-LAC) for plasma protein biomarker discovery. *Journal of Proteome Research*. 2007; 6: 662–671.

32. Lima, VLM., Correia, MTS., Cechinel, YMN., Sampaio, CAM., Owen, JS, Coelho, LCBB Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma

glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers*. 1997; 33: 27-32.

33. Kosanović, M, Janković, M (2009) Evaluation of the pattern of human serum glycoproteins in prostate cancer. *Journal of Medical Biochemistry*. 2009; 28: 184-190.

34. Sumi S, Arai K, Kitahara S, Yoshida K: Serial lectin affinity chromatography demonstrates altered asparagine-linked sugar-chain structures of prostate-specific antigen in human prostate carcinoma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1999; 727:9-14.

35. Yang, Z, Hancock, WS Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. *Journal of Chromatography A*. 2004; 1053: 79–88.

CONCLUSÕES

1. Cramoll-1,4 e Cramoll-3 foram eficientes biomarcadores na caracterização do glicocódigo tecidual prostático sob condições normais, com hiperplasia benigna e com câncer em diferentes estágios através da técnica de histoquímica.
2. Cramoll-1,4 e Cramoll-3 também apresentaram diferenças significativas, quanto a marcação histoquímica no estudo da diferenciação celular dos tecidos do colo uterino humano. A marcação foi mais expressiva para NIC 3 em relação ao tecido normal e o carcinoma de células escamosas.
3. Cromatografia de afinidade com Cramoll-1,4 imobilizada purificou glicoproteínas distintas nos soros de pacientes com patologias prostáticas (HPB e CaP em diferentes estágios). Portanto, sugere-se o potencial dessa lectina como ferramenta auxiliar para a identificação de novos biomarcadores.

ANEXOS

A. NORMAS DAS REVISTAS

1. Journal of Biomedicine and Biotechnology

Author Guidelines

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online [Manuscript Tracking System](#). Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact jbb@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, review, or thesis) and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All enquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to jbb@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. Submissions will be considered by an associate editor and—if not rejected right away—by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

The submitting author will be asked during the submission process to provide the names of 6 proposed reviewers accompanied with their email addresses. These reviewers should not be affiliated to the same institution of the submitting author(s). In addition, these proposed reviewers should be acting within the research field of interest and should not have had any input into the manuscript submitted or have had any collaboration with one of the authors during last 3 years. The proposed reviewers should also be geographically dispersed (e.g., they should be based in at least 2-3 different countries).

Microarray Data Submission

Before publication, the microarray data should be deposited in an appropriate database such as [Gene Expression Omnibus \(GEO\)](#) or [Array Express](#), and an entry name or accession number must be included in the manuscript prior to its publication. Microarray data should be [MIAME](#) compliant.

During the reviewing process, submitting authors are committed to provide the editor and the reviewers handling his/her manuscript with the login information by which they can access this information in the database.

Article Processing Charges

Journal of Biomedicine and Biotechnology is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of Journal of Biomedicine and Biotechnology, please visit the [Article Processing Charges](#) information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

Paper title
 Full author names
 Full institutional mailing addresses
 Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 150 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Each figure should be integrated in the paper body and should be cited in a consecutive order. Each figure is subject to resizing to fit into the column's width of (80 mm) or the full text width (165mm) for consistency and clarity. The labels of the figures are also subject to resizing to be of minimum 8pt according to journals in-house specifications. After the acceptance of the paper, each figure should be resent in a separate electronic file.

Electronically supplied figures are acceptable in the following formats:

Vector art figures:

Illustrator (EPS, WMF), FreeHand, and CorelDraw are preferable formats. Also, Microsoft Office files (Word, PowerPoint, Excel) are acceptable.

Bitmap images:

Photoshop TIFF is preferable. Also, GIF, and JPEG formats are acceptable.

Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least. This is not applicable only if the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If Bitmap images have labels, it is recommended to be embedded in a separate layer.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution license, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal all possible conflicts of interest in their submitted manuscripts.

Ethical Guidelines

New methods and ethically relevant aspects must be described in detail, bearing in mind the following:

I) Human Experiments

All work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Papers describing experimental work on human subjects who carry a risk of harm must include:

A statement that the experiment was conducted with the understanding and the consent of the human subject.

A statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments.

II) Animal Experiments

Papers describing experiments on living animals should provide:

A full description of any anaesthetic and surgical procedure used.

Evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment. Papers describing experiments on isolated tissues must indicate precisely how the donor tissues were obtained.

2. Journal of Biomedical Science

Instructions For Authors

Research Articles

Submission process

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

The publication costs for *Journal of Biomedical Science* are covered by the National Science Council (NSC), Taiwan, so authors do not need to pay an article-processing charge.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, *Journal of Biomedical Science* accepts only online submission.

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time; when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of word processor and graphics file formats that can be accepted for the main manuscript document by the online submission system. Additional files of any type, such as movies, animations, or original data files, can also be submitted as part of the manuscript.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Use this to explain why your manuscript should be published in the journal, to elaborate on any issues relating to our editorial policies in the 'About *Journal of Biomedical Science*' page, and to declare any potential competing interests. You will be also asked to provide the contact details (including email addresses) of potential peer reviewers for your manuscript. These should be experts in their field, who will be able to provide an objective assessment of the manuscript. Any suggested peer reviewers should not have published with any of the authors of the manuscript within the past five years, should not be current collaborators, and should not be members of the same research institution. Suggested reviewers will be considered alongside potential reviewers recommended by the Editor-in-Chief and/or Editorial Board members.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from BioMed Central customer support team.

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use BioMed Central's TeX template)
- DeVice Independent format (DVI)

Users of other word processing packages should save or convert their files to RTF before uploading. Many free tools are available which ease this process.

TeX/LaTeX users: We recommend using BioMed Central's TeX template and BibTeX stylefile. If you use this standard format, you can submit your manuscript in TeX format. If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

Note that figures must be submitted as separate image files, not as part of the submitted manuscript file.

Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given below.

Overview of manuscript sections for Research Articles

Manuscripts for Research Articles submitted to *Journal of Biomedical Science* should be divided into the following sections (in this order):

- Title page
- Abstract
- Keywords
- Background
- Methods
- Results and discussion
- Conclusions
- List of abbreviations used (if any)
- Competing interests
- Authors' contributions
- Authors' information
- Acknowledgements
- Endnotes
- References
- Illustrations and figures (if any)
- Tables and captions
- Preparing additional files

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database (EMBL), DNA Data Bank of Japan (DDBJ), GenBank at the NCBI (GenBank), Protein Data Bank (PDB), Protein Information Resource (PIR) and the Swiss-Prot Protein Database (Swiss-Prot).

You can download a template (Mac and Windows compatible; Microsoft Word 98/2000) for your article.

For reporting standards please see the information in the About section.

Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors

- indicate the corresponding author

Please note:

- abbreviations within the title should be avoided

Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract.

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

Methods

The methods section should include the design of the study, the type of materials involved, a clear description of all comparisons, and the type of analysis used, to enable replication.

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in 'About this journal'.

Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.

- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, datasets and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding '*et al.*'.

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- [BibTeX](#)
- EndNote style file
- Reference Manager
- Zotero

Examples of the *Journal of Biomedical Science* reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Examples of the *Journal of Biomedical Science* reference style

Article within a journal

Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs.***Nat Genet* 1996, **13**:266-267.

Article within a journal supplement

Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction.***Proteins* 1999, **43**(Suppl 3):149-170.

In press article

Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide.***Eur Respir J*, in press.

Published abstract

Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract]**. *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings

Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms**. In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates**. In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology**. In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage**. In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

PhD thesis

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs**. *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

The Mouse Tumor Biology Database [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Link / URL with author(s)

Neylon C: Open Research Computation: an ordinary journal with extraordinary aims. [http://blogs.openaccesscentral.com/blogs/bmcblog/entry/open_research_computation_an_ordinary]

Dataset with persistent identifier

Zheng, L-Y; Guo, X-S; He, B; Sun, L-J; Peng, Y; Dong, S-S; Liu, T-F; Jiang, S; Ramachandran, S; Liu, C-M; Jing, H-C (2011): **Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*)**. *GigaScience*. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our figure preparation guidelines for detailed instructions on maximising the quality of your figures.

Formats

The following file formats can be accepted:

- PDF (preferred format for diagrams)
- DOCX/DOC (single page only)
- PPTX/PPT (single slide only)
- EPS
- PNG (preferred format for photos or images)
- TIFF
- JPEG
- BMP

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing a personal cover page

If you wish to do so, you may submit an image which, in the event of publication, will be used to create a cover page for the PDF version of your article. The cover page will also display the journal logo, article title and citation details. The image may either be a figure from your manuscript or another relevant image. You must have permission from the copyright to reproduce the image. Images that do not meet our requirements will not be used.

Images must be 300dpi and 155mm square (1831 x 1831 pixels for a raster image).

Allowable formats - EPS, PDF (for line drawings), PNG, TIFF (for photographs and screen dumps), JPEG, BMP, DOC, PPT, CDX, TGF (ISIS/Draw).

Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a landscape page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although *Journal of Biomedical Science* does not restrict the length and quantity of data included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

Please note: All Additional files **will be published** along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files should be sent by email to editorial@jbiomedsci.com, quoting the Manuscript ID number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *Journal of Biomedical Science* requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository . Please do not link to data on a personal/departamental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published article as supplied by the author. reuse. *e.g.* We recommend CSV rather than PDF for tabular data.

Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the browser. These include most movie formats (for users with the Quicktime plugin), mini-websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB), geographic data files (KML).

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
 - PDF (Adode Acrobat)
- Animations
 - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
 - MP4 (MPEG 4)
 - MOV (Quicktime)
- Tabular data
 - XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)
 - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions.

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.
5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

Style and language

General

Currently, *Journal of Biomedical Science* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise.

Journal of Biomedical Science will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on Writing titles and abstracts for scientific articles.

Tim Albert has produced for BioMed Central a list of tips for writing a scientific manuscript. American Scientist also provides a list of resources for science writing. For more detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the BioMed Central author academy.

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All pages should be numbered.
- Use the *Journal of Biomedical Science* reference format.
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**
- Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics, and authors are required to use approved gene symbols, names, and formatting. Protein products should be in plain type.

Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).

3. Biotechnology Progress

Submission of Manuscripts

Submit your manuscript online at <http://mc.manuscriptcentral.com/biotechprog/>. If you are a first time user, follow the instructions for creating an author account under “Create Account” (top right of the Login page).

Please submit your manuscript as a Word or rtf file (for text and tables) and tiff or eps (for figures). Other file types are not suitable for production. Please note that ScholarOne Manuscripts does not accept a single file upload from the author. Text, tables, and figures will need to be uploaded individually. Do not embed figures or tables in the document.

Manuscript submissions must be accompanied by a signed Copyright Transfer Agreement. The completed, signed, and dated form should be uploaded to ScholarOne Manuscripts using the File Upload field and designated as a “Copyright Transfer Agreement” file.

LaTeX Users: All files must be formatted in LaTeX version 2.02 or earlier. Figures must be formatted as either .tif or .eps files and saved separately. Directory structures should not be used when referencing external files. This will cause a corrupted upload into ScholarOne Manuscripts and will result in the cancellation of manuscript submission. Class and style files may be either internal or external. ScholarOne Manuscripts provides all standard LaTeX class files for author use; however, you may create your own. Please be sure to check the log file provided at submission to see if you are missing the class file from your document.

For technical assistance, please contact support@scholarone.com

If you have any questions about the online submission process, you may also contact the Biotechnology Progress Editorial Office:

Elizabeth Gillard, Ph.D. Biotechnology Progress Editorial Office Email: biotech-prog@andrew.cmu.edu

Manuscript Preparation

Cover Letter

A cover letter should accompany each submitted manuscript and must be uploaded on the Web submission site. The letter should provide the corresponding author’s name, postal and e-mail addresses, and telephone and fax numbers.

The letter should address the significance of the manuscript and provide a list of 3-5 key words. Authors are also urged to provide the names and email addresses of recommended reviewers.

All editorial correspondence concerning receipt, status, review, revision, and publication of manuscripts will be sent **only** to one person who has been assigned as the “corresponding author” during the evaluation period. The corresponding author is responsible for communicating the manuscript status to all coauthors of the paper.

Copyright Transfer Agreement. Manuscript submissions must be accompanied by a signed Copyright Transfer Agreement. The completed, signed, and dated form should be uploaded to ScholarOne Manuscripts using the File Upload field and designated as a “Supplementary Material Not for Review” file.

Conflict of Interest Disclosure. *Biotechnology Progress* and Wiley-Blackwell require that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be

perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission.

It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Editor, in the manuscript (under the Acknowledgments section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Title. The title should accurately, clearly, and concisely reflect the emphasis and content of the paper. The title must be brief and grammatically correct.

Author List. Use first names, initials, and surnames. At least one author must be designated as the author to whom correspondence should be addressed and email information should be provided.

Address. The affiliation(s) listed should be the institution(s) where the work was conducted. If the present address of an author differs from that at which the work was done, the current address should be given in a footnote.

Abstract. All manuscripts must contain a *short* abstract (no more than 250 words), which should *briefly* state the reason for the work, the significant results, and the conclusions.

Text. The first paragraphs should explain what the motivation and import of the work are, where it fits in the development of the field, and perhaps why it should be of interest to researchers in other areas. It should be possible to do this without excessively increasing the length of the paper. Thoughtful use of schemes and diagrams (with concise and descriptive captions) is recommended, so that even casual browsers can discern the nature of the work. Well-known procedures should be designated by giving them name or literature references. Experimental results are of lasting value and should be clearly and logically presented in separate sections. The addition of a Conclusion section at the end of the paper, which briefly summarizes the principal findings of the work, is recommended. If desired for clarification, main section headings may be given Arabic numbers and subsections numbered in decimals (example, subsection 2.1 and subsection 2.2).

Acknowledgments. Dedications and notes acknowledging financial assistance, thesis work, or oral presentations at a scientific meeting or conference should be brief and placed in the Acknowledgment section.

Supplementary Material Statement. A brief statement, listing the contents of material placed in Supplementary Material, should be included at the end of the manuscript (after the Acknowledgment and before the Literature Cited). For instructions on what material should be provided as supplementary material, see the Supplementary Material section below.

Figures. All figures must be mentioned in the text in consecutive order and be numbered with Arabic numerals. A caption giving the figure number and a brief description, preferably only one or two sentences must be included with each figure. The caption should be understandable without reference to the text.

Color Figure Preparation. For best reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible.

Schemes. Schemes must have brief titles describing their contents and should be numbered with Arabic numerals

Charts. Charts must contain brief titles describing their contents and should be numbered consecutively with Arabic numerals.

Tables. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Each table must have a brief (one phrase) title that describes its contents. The title should be understandable without reference to the text. Details should be put in footnotes, not in the title. Tables should be used when the data cannot be presented clearly as narrative, when many precise numbers must be presented or when more meaningful interrelationships can be conveyed by the tabular format. Tables should supplement, not duplicate, information presented in the text and figures. Tables should be simple and concise. Footnotes in tables should be given letter designations and be cited in the table by italic superscript letters. The sequence of letters should proceed by row rather than by column. In setting up tables, authors should keep in mind the type area of the *Biotechnology Progress* page (17.8 - 25.0 cm) and the column width (8.5 cm) and should make tables conform to the limitations of these dimensions.

Literature Cited

Literature Cited should be formatted according to the AMA style, and must be listed numerically in the order they are cited in the text. Authors will need to provide complete information for each citation, as shown in typical examples below.

Journal:

1. Wang X, Da Silva NA. Estimation of the rate of cloned gene integration via retrotransposition. *Biotechnol Prog.* 1997;13:123-131.

Book:

2. Givan AL. Flow cytometry: first principles (2nd edition). New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

Book Chapter:

3. Luketich JD, Ginsberg RJ. Diagnosis and staging of lung cancer. In: Johnson BE, Johnson DH. Lung cancer. New York: Wiley-Liss, Inc., 1995:161-73.

For a sample article with correct formatting for Literature Cited, [click here](#).

Download Reference Style for this Journal: If you use EndNote, you can [download the reference style](#) for this journal.

Technical Support: If you need assistance using EndNote, contact endnote@isiresearchsoft.com, or visit <http://www.endnote.com/support>.

Topical Areas and Key Words

Select the heading from the six topical areas listed in the ScholarOne Manuscripts pull down menu under the Table of Contents Section. (The topical areas are described in the Aims and Scope section of the journal under Overview.) Provide a minimum of two and a maximum of five key words that best capture the concepts and scope of the work.

Graphics Preparation

All illustration files should be in TIFF or EPS formats. Do not submit native application formats.

Journal quality reproduction requires the following minimum resolution standards:

grey scale files 600 dpi to 1200 dpi

color files 300dpi

Supplementary Material

Biotechnology Progress authors can publish supplementary material online in Wiley Online Library. Supplementary material may include (but is not limited to) video clips, large sections of tabular data, program code, or electronic graphical files that are otherwise not suitable for print media. Supplementary material must be included with the initial manuscript submission so that it is available for peer review.

Additional Reprint Purchases

Should you wish to purchase additional copies of your article, please follow the instructions provided at: <https://caesar.sheridan.com/reprints/redir.php?pub=10089&acro=BTPR>

Copyright Transfer Agreement

No article can be published unless accompanied by a signed Copyright Transfer Agreement from the author(s). The Copyright Transfer Agreement is available by accessing the link at the top of this page. The completed, signed, and dated form should be included with the submitted manuscript and designated as a "Supplementary Material Not for Review" file.

Permission for Reproduction

It is the Author's responsibility to obtain written permission to reproduce material that has appeared in another publication