

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

HISTOQUÍMICA COM LECTINAS DE SEMENTES DE *Cratylia mollis*
ANALISANDO TECIDOS PROSTÁTICOS HUMANOS

Amanda Lucena Rosendo de Lima

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia
Co-Orientador: Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Recife, 2009

Amanda Lucena Rosendo de Lima

**HISTOQUÍMICA COM LECTINAS DE SEMENTES DE *Cratylia mollis*
ANALISANDO TECIDOS PROSTÁTICOS HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Mestrado
em Bioquímica e Fisiologia da
Universidade Federal de Pernambuco
para o cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título de
Mestre.

Recife, Fevereiro 2009

AMANDA LUCENA ROSENDO DE LIMA

“Histoquímica com lectinas de sementes de *Cratylia mollis* analisando tecidos prostáticos humanos”

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

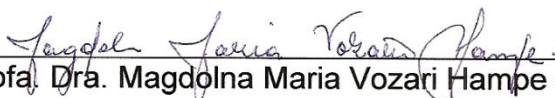
Aprovado por:



Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia - Presidente



Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima – Examinador interno



Profa. Dra. Magdolna Maria Vozari Hampe – Examinador Externo



Dra. Michele Dalvina Correia da Silva – Examinador Externo

Recife, Fevereiro 2009

Se eu pudesse...

**“Se eu pudesse deixar algum presente a você,
deixaria aceso o sentimento de amar
a vida dos seres humanos.**

**A consciência de aprender tudo
o que foi ensinado pelo tempo a fora.
Lembraria os erros que foram cometidos
para que não mais se repetissem.**

**A capacidade de escolher novos rumos.
Deixaria para você, se pudesse,
o respeito àquilo que é indispensável:**

Além do pão, o trabalho.

Além do trabalho, a ação.

E, quando tudo mais faltasse, um segredo:

**O de buscar no interior de si mesmo
a resposta e a força para
encontrar a saída."**

(Mahatma Gandhi)

*Dedico este trabalho, as duas pessoas mais especiais e importantes na minha vida: meus pais, **Maria Lúcia de Lucena Rosendo e Manoel Rosendo de Lima Neto**, que com muita dedicação me apóiam e me dão forças na conquista de meus objetivos e, principalmente, na minha educação e formação pessoal e profissional.*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	07
LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Câncer	15
2.1.1 Considerações Gerais	15
2.1.2 Aspectos Bioquímicos	18
2.2 Próstata	20
2.2.1 Considerações Gerais (Anatomia e Histologia)	20
2.2.2 Hiperplasia Benigna Prostática	22
2.2.3 Câncer de Próstata	23
2.3 Corpos Amiláceos	26
2.4 Glicômica	27
2.5 Lectinômica	30
2.5.1 Breve Histórico	30
2.5.2 Distribuição e Função	31
2.5.3 Purificação e Caracterização	32
2.5.4 Aplicações	35
2.5.5 Lectinas de <i>Cratylia mollis</i>	36
2.6 Histoquímica com Lectinas	38
3. BIBLIOGRAFIA	40
4. MOTIVAÇÃO CIENTÍFICA	57
5. OBJETIVOS	58
5.1 Geral	58
5.2 Específicos	58
6. ARTIGO: Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with <i>Cratylia mollis</i> Seed Lectin	59
7. CONCLUSÕES	83
ANEXOS	84

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e ser meu companheiro diário, escutando meus pedidos e agradecimentos, dando força em cada obstáculo e sempre sendo meu conforto e fortaleza.

A minha mãe, Maria Lúcia de Lucena Rosendo, pelo seu incentivo, atenção e todo companheirismo e ensinamentos diários e ao meu pai, Manoel Rosendo de Lima Neto, pessoa de extrema paciência e que sempre está disposto a cuidar de todos os detalhes de minha formação e minha vida. Amo vocês!!!

A minha irmã, Alba Lúcia Lucena Rosendo de Lima, pelo companheirismo nas horas difícil e incentivo constante.

A Jonh, pessoa especial na minha vida, obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos, suportando todas as minhas alterações de humor e euforia, pelo incentivo no meu crescimento profissional e por todos os momentos de lazer que desfrutamos.

Ao meu tio, João Rosendo de Lima Sobrinho, que tão bem me acolheu na sua família e pelo apoio na minha vida em Recife.

A minha tia, Vera Lúcia Xavier da Mata Rosendo, pela atenção no acolhimento em sua casa e pelas conversas diárias.

A meu primo, Artur Rosendo de Lima Neto pelo companheirismo e atenção.

Aos meus parentes (Lucena e Rosendo) pelo grande incentivo aos meus estudos e pela confiança em mim depositada.

A Edmário Santos, professor e amigo admirável. Obrigada por todos os conselhos e incentivos para minha carreira profissional, mas, principalmente, pelos diálogos e companheirismo em relação ao conhecimento pessoal e da vida.

A Profª Maria Tereza dos Santos Correia, minha orientadora, pela sua amizade, confiança, orientação, incentivo na caminhada científica e, principalmente, minha admiração pela pessoa atenciosa, tranquila e competente que é. Muito Obrigada!

Ao Prof. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, meu co-orientador, pessoa genial e grande incentivador do meu mundo científico. Muito obrigada pelos ensinamentos!

A todos do Laboratório de Glicoproteínas, pelo companheirismo, ajuda, atenção e amizade, em especial, Michele, Fernando, Cris, Roberto, Jayra e Cynthia.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE, principalmente a Djalma, João Virgílio, Maria Reis, Neide e Miron pela amizade, apoio e atenção constantes.

A todos do Setor de Patologia do LIKA, principalmente, aos orientandos e co-orientandos do Prof. Eduardo Beltrão: Ana Rosa, Moacir, Juliana, Marina, Taciliana, Luciano, Gilberto, Raphael pela amizade, companheirismo e por todos os momentos em que discutimos as pesquisas e nos divertimos.

A Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti pela amizade, dedicação e inteiramente disponível para ajudar e apoiar tanto na pesquisa quanto psicologicamente.

A Leucio, que através de Fernando, ajudou-me nas análises estatísticas desta dissertação. Obrigada pela disposição!

Agradecimento mais que especial a todos que fazem o Laboratório de Microscopia Eletrônica (Luiz, Fábio, Rafael, Guilherme, Esmeralda, Marília, Dyana, Marcela, Adriana, Júnior) por tão bem acolher-nos em vosso espaço. Sou grata por toda disposição de vocês e pelas novas amizades. Muito Obrigada!

A meus amigos do Mestrado, principalmente, Giselly, Felipe, Fernando e Lidiane por todos os nossos momentos de pesquisas, estudos e mesmo no cansaço as alegrias e brincadeiras nos davam forças. Fico feliz em tê-los no meu círculo de amizade, vocês são especiais.

A meus amigos da Graduação, Sâmilla, Gabriella, Diego e Juliana, obrigada pela amizade firmada. Agradeço especialmente a Gabi pela sua companhia constante em TODOS os momentos da minha vida.

Agradecimento especial a Miche, pelo seu carisma, por sempre me ajudar e incentivar, pelo eterno apoio em todos os momentos da jornada científica.

A todos amigos, parentes, colegas, conhecidos que direta ou indiretamente me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Tipos de crescimento celular anormal	16
Figura 2 – Carboidratos de superfície celular envolvidos no reconhecimento molecular	19
Figura 3 – Anatomia da Próstata	20
Figura 4 – Divisão Anatômica de Próstata Adulta	21
Figura 5 – Graus histológicos do Carcinoma Prostático, de acordo com o sistema Gleason	24
Figura 6 – Corpos amiláceos em ácinos com adenocarcinoma	26
Figura 7 – Tecnologias emergentes para desvendar o glicocódigo	30
Figura 8 – Esquema ilustrativo de um ensaio de hemaglutinação e de sua inibição	34
Figura 9 – Caracterização de <i>Cratylia mollis</i>	37
Figura 10 - Glicoconjugados de superfície celular	38

LISTA DE ABREVIATURAS

AH: Atividade Hemaglutinante

C. mollis: *Cratylia mollis*

CaP: Adenocarcinoma Prostático

CA: Corpo Amiláceo

Con-A: Lectina de *Canavalia ensiformis*, Concanavalina A

Cramoll: Lectina de semente de *Cratylia mollis*

DAB: diaminobenzidina

HBP: Hiperplasia Benigna Prostática

HRP: Peroxidase

INCA: Instituto Nacional do Câncer

PHA: Lectina de *Phaseolus vulgaris*

PN: Próstata Normal

PNA: Lectina de *Arachis hypogea*

RESUMO

Câncer de próstata é o tumor maligno de maior incidência em homens idosos nos países desenvolvidos e a segunda maior causa de morte por câncer. Lectinas, proteínas ou glicoproteínas, que reconhecem carboidratos livres ou conjugados têm sido estudadas em inúmeras aplicações e que através da sua capacidade de reconhecimento, têm sido utilizadas em histoquímica na análise de mudanças na composição e expressão de carboidratos de glicoconjugados, de superfície celular e citoplasma, em processos de desenvolvimento e diferenciação celular como na carcinogênese. O objetivo deste trabalho foi avaliar duas lectinas de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4 glicose/manose específica e Cramoll 3 galactose específica) como potenciais marcadores histoquímicos de tecidos prostáticos humanos e compará-las a lectinas comerciais de especificidades similares, respectivamente (Con-A e PNA). Cramoll 1,4 e Cramoll 3 foram conjugadas a peroxidase (Cramoll 1,4-HRP e Cramoll 3-HRP) e cortes (4 µm) de biópsias de próstata (normal - PN, hiperplásicas – HBP e carcinoma – CaP) foram submetidos ao ensaio histoquímico com as lectinas em estudo. Ensaio de inibição da ligação lectina-carboidrato foram realizados com os respectivos açúcares na concentração de 0,3M para controle das marcações. O padrão de reconhecimento de Con-A e Cramoll 1,4 (15µg/mL) em HBP foi mais intenso que na próstata normal. Essas lectinas também mostraram diferenças entre HBP e CaP, no qual elas marcaram com diminuição de intensidade à medida que o grau de malignidade aumentava. PNA e Cramoll 3 (25µg/mL) reconheceram similarmente as células epiteliais em todos os grupos, porém uma marcação mais intensa foi observada no lúmen das glândulas do CaP. Nenhuma das lectinas em estudo pode ser empregada como um marcador para corpos amiláceos já que não houve diferença de marcação entre elas na maioria dos casos. Nossos resultados sugerem que a glicosilação das proteínas é modificada tanto na HBP quanto no CaP. Assim, lectinas de sementes de *C. mollis* (Cramoll 1,4 e 3) apresentam-se como fortes candidatas à ferramentas em histoquímica para patologias da próstata quando comparadas as lectinas comerciais como Con-A e PNA.

Palavras - chaves: histoquímica; lectinas; *Cratylia mollis*; próstata; câncer; corpos amiláceos.

ABSTRACT

Prostate cancer is a malignant tumour of major incidence in elderly men in the developed countries and the second major cause of death for cancer. Lectins are proteins or glycoproteins, which recognize specifically and reversibly free or conjugated carbohydrates. They have been used in histochemistry to evaluate changes in the composition and expression of cell-surface and cytoplasm oligosaccharides in glycoconjugates during processes of cellular development and differentiation as well as in carcinogenesis. The aim of this work was to evaluate isoforms from *Cratylia mollis* seed lectin (Cramoll 1,4 glucose/mannose-specific and Cramoll 3 galactose-specific), conjugated to horseradish peroxidase (HRP), as potential histochemical markers for normal and neoplastic tissues of human prostate and to compare them to commercial lectins of similare specificities, respectively (Con-A and PNA). Cramoll 1,4 and Cramoll 3 were conjugated to HRP and biopsies slices (4 µm) from normal prostate, benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostatic carcinoma (PCa) were submitted to histochemistry with the lectins in study. Inhibition assays of lectin-carbohydrate binding were carried out with the specific sugar for each isoform at a concentration of 0.3 M for control. The labeling pattern of Con-A and Cramoll 1,4 in BPH was more intense than in NP. These lectins too showed differences between BPH and PCa, in which marked with decreasing intensity while increased malignancy degree. PNA and Cramoll 3 stained similarly epithelial cells in all groups, although they have presented intense staining of lumen of the PCa glands. None of lectins in study can be employed as a marker for corpora amylacea since there wasn't difference of staining among them in most cases. Present results suggest that the glycosylation of proteins is modified in both BPH and PCa. Thus, Cramoll 1,4 and 3 seed lectins present themselves as candidate for tools in histochemistry for prostate pathologies when compared to commercial lectins as Con-A and PNA.

Keywords: lectin histochemistry; *Cratylia mollis*; prostate; cancer; corpora amylacea.

1. INTRODUÇÃO

O Câncer, que segundo a Sociedade Americana do Câncer (2008) define-se por um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e disseminação de células anormais, é uma das causas principais de morte mundial, geralmente excedido apenas por doenças cardiovasculares (De Meija *et al.*, 2003).

A malignidade do câncer está relacionada à sua habilidade em quebrar a arquitetura tecidual e metastizar para órgãos distantes. Em termos simples, o câncer é uma doença resultante da perda dos controles normais, que conduzem as células para acumular-se nos tecidos e que as mantêm dentro dos limites dos seus órgãos (Ingber, 2008), já que elas proliferam-se descontroladamente. Na carcinogênese ocorrem mudanças na expressão de proteínas celulares que levam a alterações nas vias de sinalização e essas alterações frequentemente induzem mudanças no microambiente tumoral, causam inflamação e resultam em mudança no perfil das proteínas secretadas para o sangue (Kopf and Zharhary, 2007).

O câncer de próstata (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 Sociedade Americana do Câncer (2008) e caracteriza-se por desenvolver-se lentamente e permanecer latente por muitos anos. No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer, INCA, (2008), o CaP permanece em 2º lugar, em incidência, atrás dos tumores de pele (não-melanoma) e, em mortalidade, é excedido apenas pelo câncer de pulmão. Como a maioria dos cânceres, os fatores etiológicos associados ao CaP são variados, desde de fatores genéticos até influências ambientais (Isaacs *et al.*, 2002). Fatores etiológicos incluem idade, descendência familiar, raça, influências hormonais, dieta e estilo de vida (Hsing and Devesa, 2001).

O padrão de glicosilação de proteínas de tecidos e fluidos celulares pode ser influenciado por diversas mudanças fisiológicas, tais como a ocorrência de doença (Ambrosi *et al.*, 2005), ou seja, aumentam-se as evidências indicando que os carboidratos tem papéis em diversos processos biológicos como, sinalização celular, reconhecimento imunológico, diferenciação celular, metástase entre outros (Rosenfeld *et al.*, 2007). Tipos de células diferentes variam na natureza de expressão dos seus carboidratos de superfície e um tipo celular simples pode mudar o perfil de expressão desses carboidratos durante processos de desenvolvimento e diferenciação celulares tais como a carcinogênese (Orntoft *et al.*, 1999; Nangia-Makker *et al.*, 2002; Sharon & Lis, 2004). Por isso, o interesse na busca de novos biomarcadores a fim de definir uma doença a nível molecular, monitorar uma resposta

terapêutica ou predizer o prognóstico ou resposta terapêutica para uma determinada doença (Stoss and Henkel, 2004).

Carboidratos têm um enorme potencial para codificar informação biológica. Eles atuam em processos de reconhecimento, incluindo adesão entre células, células e matriz-extracelular e reconhecimento específico das células por outras (Nangia-Makker *et al.*, 2002; Sharon & Lis, 2004; Taylor & Drickamer, 2002; Zheng *et al.*, 2005). Tem sido observada uma alteração no perfil de alguns carboidratos nas células tumorais como uma forma de escape ao reconhecimento pelas células do sistema imune e o poder destas células de se metastizar (Monzavi-Karbassi *et al.*, 2002; Nangia-Makker *et al.*, 2002). Assim, os progressos enormes que a possibilidade de inibir, ativar ou explorar interações proteína-carboidrato poderia trazer, estimulam o estudo de lectinas e carboidratos para a vanguarda da investigação (Ambrosi *et al.*, 2005; Jiménez-Castells *et al.*, 2008).

Lectinas, proteínas ligadoras de carboidratos e de distribuição ubíqua na natureza, possuem a capacidade de agir como moléculas de reconhecimento dentro de células, na superfície celular e em fluidos fisiológicos (Reuter and Gabius, 1999; Gemeiner *et al.*, 2009). Devido às interações lectina-carboidratos serem reversíveis e altamente específicas, elas têm sido amplamente estudadas em diferentes disciplinas científicas como ferramentas para análise dos carboidratos, quer na forma livre quer ligado a lipídeos ou proteínas (Nilsson, 2007; Gemeiner *et al.*, 2009). Em outras palavras, enquanto os açúcares são capazes de carrear uma informação biológica, lectinas são capazes de decifrar esse glicocódigo (Sharon and Lis, 2004; Ambrosi *et al.*, 2005; Gemeiner *et al.*, 2009). E a partir dessa habilidade em decifrar glicocódigos, elas têm sido ferramentas úteis na histoquímica para interpretação das mudanças nos carboidratos de superfícies celulares no processo neoplásico (Mody *et al.*, 1995; Nangia-Makker *et al.*, 2002; Nilsson, 2003; Sharon & Lis, 2004; Zheng *et al.*, 2005).

Cratylia mollis (feijão camaratu) é uma leguminosa nativa da Região Semi-Árida de Pernambuco e de suas sementes são extraídas isoformas de lectinas que apresentam reconhecimentos a carboidratos distintos (Paiva e Coelho, 1992; Correia e Coelho, 1995) como também possuem diferentes aplicações biológicas (Beltrão *et al.*, 1998; Paiva *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2004).

Assim, este trabalho se propõe, através da histoquímica com lectinas, avaliar as possíveis alterações no padrão de carboidratos expressos em tumores benignos e malignos prostáticos utilizando duas lectinas de *C. mollis* com especificidades diferentes comparando-as com lectinas comerciais (Con-A e PNA).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

2.1.1 Considerações Gerais

A Sociedade Americana do Câncer (2008) caracteriza o câncer como um grupo de mais de cem doenças nas quais as células numa parte do corpo começam a se multiplicar de forma descontrolada. E embora haja muitos tipos de câncer, todos eles iniciam-se dessa proliferação celular anormal.

Breivik (2005) relata que tempo, meio ambiente e herança são os três principais aspectos que devem ser unidos por um modelo de carcinogênese. A carcinogênese é um processo tempo-dependente porque a incidência de câncer aumenta com a idade e em países com elevada expectativa de vida, aproximadamente 40% da população sofreu 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, dieta e radiação. Muitos aspectos do desenvolvimento do câncer foram explicados pelas alterações no código genético, envolvendo a herança entre as gerações.

Quase todo tecido do corpo pode apresentar malignidade e, alguns, podem apresentar diferentes tipos. No entanto, os processos básicos de caracterização parecem similares (Weinberg, 1996).

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 e que as matem dentro dos limites dos seus órgãos (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).

De acordo com Peterson (2005) 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 talvez, posteriormente, metastizar (Figura 1). Todas as células do corpo

são “programadas” para se desenvolver, crescer, diferenciar e morrer. O câncer resulta quando essas etapas são quebradas e as células apresentam-se com potencial de crescimento e proliferação maior do que as de origem e com tendência a se tornarem progressivamente heterogêneas (Gomes, 1997; Elliott & Elliott, 2001).

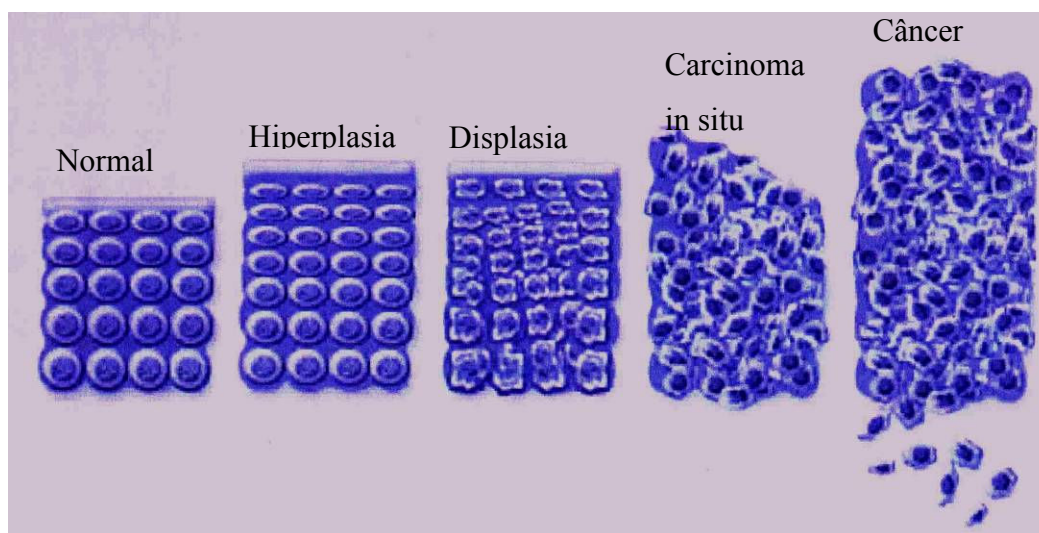


Figura 1 – Tipos de crescimento celular anormal. Fonte: Peterson, 2005.

As células do câncer carregam uma capacidade proliferativa indefinida, sendo capazes de mascarar o compromisso de diferenciação terminal e a quietude pós-mitótica que regulam normalmente a homeostase do tecido em um organismo. Essa proliferação descontrolada das células do câncer é também, freqüentemente, devido à desregulação direta do controle do ciclo celular (Herzig & Christofori, 2002).

Pelo menos no último século, todos os esforços intelectuais e tecnológicos empreendidos na cura dessa doença, contribuíram para revelar um intrincado mecanismo de comunicação molecular, intra e intercelular que, em condições fisiológicas, atua na manutenção 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 *et al.*, 2006).

Dependendo do comprometimento orgânico e geral produzidos pela neoplasia, ela é classificada em: benigna, maligna ou potencialmente maligna (Vasconcelos, 2000). Neoplasias benignas normalmente crescem devagar, podendo evoluir por anos sem sintomas ou com manifestações discretas, mas mesmo sendo benigna pode evoluir negativamente para o êxito letal (ainda que não se malignize) caso esteja localizada em órgãos vitais

(Gomes,1997; Vasconcelos, 2000). Essas neoplasias geralmente assemelham-se ao seu tecido de origem, mas todo componente tecidual não 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.

Neoplasias malignas 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 (Gomes,1997). Essas neoplasias apresentam dois aspectos característicos: anormalidades celulares e invasão do tecido ao redor. Quando ambas 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 das células, variação no tamanho e formato celular, aumento nuclear e da densidade de marcação (ambos reflexos 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).

Segundo Vasconcelos (2000), neoplasias potencialmente malignas ou de malignidade duvidosa são neoplasias cuja classificação em benigno ou maligno é muito difícil, tanto por se tratar de neoplasias com características benignas e malignas simultaneamente, quanto por poderem se tratar de neoplasias benignas em processo de malignização.

Uma característica marcante de progressão tumoral é o encontro de heterogeneidade cada vez mais acentuada. Esta se manifesta na variação de morfologia entre suas células, traduzida ao exame histológico, por pleomorfismo citoplasmático e nuclear. As células do mesmo tumor tendem ainda a ser heterogêneas com relação à presença e a quantidade de receptores, capacidade proliferativa ou metastatizante, sensibilidade à resposta imunitária ou tratamento e grau de autonomia de crescimento (Gomes,1997). A metástase caracteriza-se como um processo complexo, com várias etapas e altamente organizado que envolve invasão das veias e vasos linfáticos por células malignas ao sítio primário, intravasamento, espalhamento hematogênico das células cancerosas e crescimento tumoral secundário (Mody et al., 2005).

O câncer é um das causas principais de morte mundial, geralmente excedido só por doença cardiovascular no mundo desenvolvido. O número de pessoas diagnosticadas com câncer dentro das próximas poucas décadas é esperado dobrar. Portanto será aumentada a

necessidade quanto a diagnósticos e terapias médicas que usem novas fontes não-tradicionais de tratamentos (De Meija *et al.*, 2003).

2.1.2 Aspectos Bioquímicos

As interações proteína-carboidrato ocupam atuação importante 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 (Dabelsteen *et al.*, 1992; 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 (Guilot *et al.*, 2004). Alterações no padrão de glicosilação de glicoconjugados de células tumorais têm sido relevantes para o reconhecimento de um desenvolvimento anormal e metástase (Bryne *et al.*, 1992; Dabelsteen, 1996). A maioria das glicosilações aberrantes freqüentemente resulta num encurtamento das cadeias dos glicanos ou uma super-expressão dessas estruturas nas células (Haseenabeevi *et al.*, 1991; Brooks *et al.*, 1996; Guilot *et al.*, 2000).

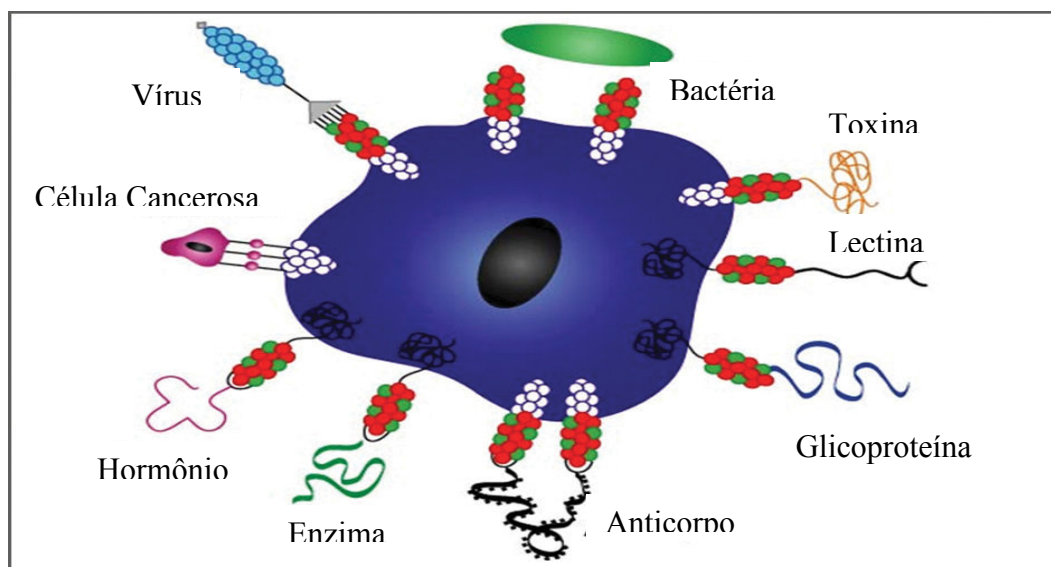


Figura 2 – Carboidratos de superfície celular envolvidos no reconhecimento molecular. Fonte: Modificada de Chun-Hung, 2006.

Seguindo a lógica de serem menos diferenciadas e estarem voltadas à reprodução, as células das neoplasias malignas apresentam, com frequência, exarcebação da via glicolítica. Este processo permite a obtenção de energia de modo mais rápido e independente de oxigênio, embora à custa de grande consumo de glicose. Esta e/ou outros carboidratos são incorporados mais facilmente pelas células malignas. Desse modo o tumor cresce em detrimento das células normais (Brasileiro Filho, 2000).

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 (Satoh, 1999; Franks & Teich, 1999). Esta parece ser uma abordagem promissora, não somente no diagnóstico, mas também como veículo para conduzir drogas ou outros agentes que destruam células do câncer como sua meta específica. Nos últimos 20 anos, a análise morfológica de rotina tem sido aumentada pela aplicação de técnicas bioquímicas e imunoquímicas para todas as células e tecidos. Estas técnicas permitem uma análise mais sofisticada da estrutura e função celular (Franks & Teich, 1999; Smetana and André, 2008).

2.2 Próstata

2.2.1 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 3). A próstata possui uma estrutura glandular predominantemente apócrina e 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 (Netto Jr, 2001; Rizzo *et al.*, 2005; Joshua *et al.*, 2008).

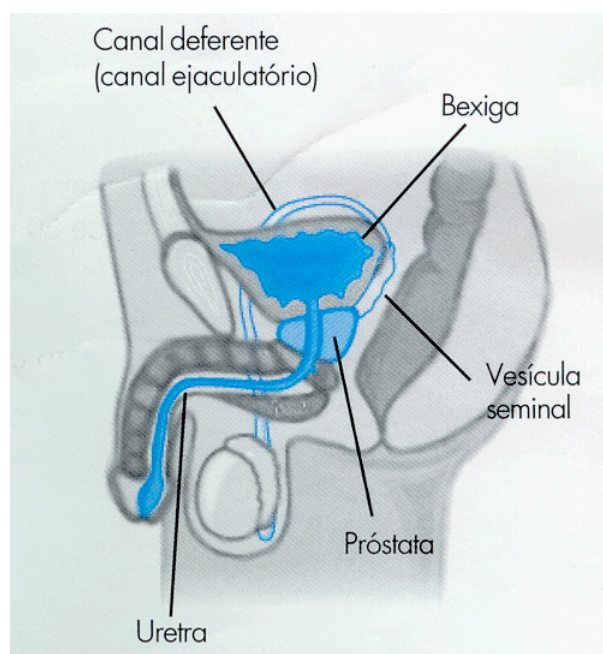


Figura 3 – Anatomia da Próstata. Fonte: Material Informativo da Comissão de Educação Continuada da Sociedade Brasileira de Urologia.

A próstata é um órgão complexo que reúne elementos acinares, musculares e estroma (Smith, 1992), 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 (Signoretti and Loda, 2007; Joshua *et al.*, 2008). 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 (Signoretti and Loda, 2007). 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 e induzir a proliferação de células adjacentes moduladas por secreção parácrina (Van Leenders and Schalken, 2001; Joshua *et al.*, 2008). Há uma quarta população de células distintas que são imunofenotipicamente caracterizadas intermediárias e estão localizadas entre células basais e secretórias (Van Leenders and Schalken, 2001). Um estroma composto de tecido fibroso, músculo liso, linfócitos e tecido neurovascular presentes numa matriz extracelular de apoio sustentando a próstata (Brasileiro Filho, 2000; Joshua *et al.*, 2008).

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 4). 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 ocorrem na zona periférica e apenas 30% na zona transicional (Joshua, 2008).

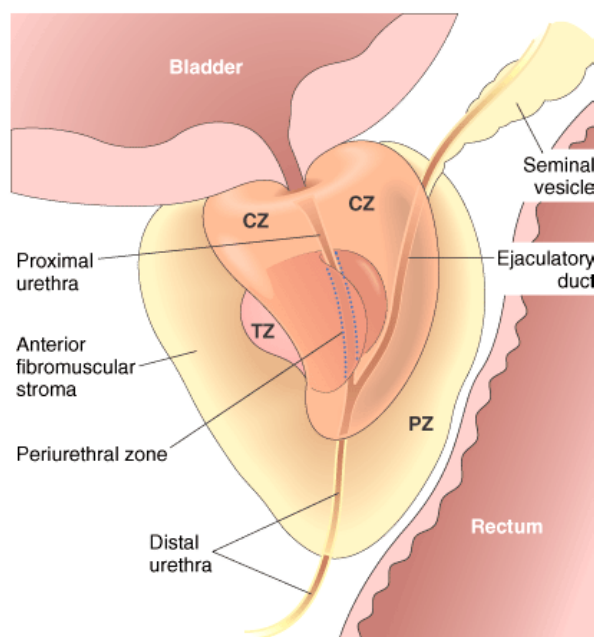


Figura 4 - Divisão Anatômica de Próstata de Adulto. A próstata normal contém as zonas: central (CZ), periférica (PZ), transicional (TZ) e periuretral. Fonte: Robbins e Contram, 2005.

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, de longe, os mais comuns e ocorrem com tanta frequência na idade avançada e podem ser considerados um processo “normal” do envelhecimento. O adenocarcinoma prostático (CaP) 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.

2.2.2 Hiperplasia Benigna Prostática

HBP é incomum em homens jovens, mas é uma das circunstâncias mais comuns associadas ao envelhecimento dos homens (Shin *et al.*, 2004), geralmente tendo início aos 30 anos, desenvolvendo-se lentamente e sendo sintomática de 10-30% em homens a partir dos 70 anos (Webber, 2004). Mais de um em três homens acima de 50 anos de idade sofrem de sintomas relacionados à HBP e a evidência histológica de HBP ocorre em 90% dos homens com 80 anos de idade (Rizzo *et al.*, 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 (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 (Webber, 2004; Nickel, 2007). Os mecanismos de causa são pouco evidentes, porém a obstrução no esvaziamento da bexiga é um fator importante pelo fato de levar a retenção urinária e a necessidade frequente de urinar (Webber, 2004).

Microscopicamente, a marca característica da HBP é a nodularidade devida a 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 *et al.*, 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 HBP-relacionada, que afetam sua vida cotidiana (Weber, 2004; Emberton, 2006; Fitzpatrick, 2006; Nickel, 2007).

2.2.3 Câncer de Próstata

O câncer de próstata (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 Sociedade Americana do Câncer (2008). As taxas de incidência deste tipo de câncer são cerca de seis vezes maiores nos países desenvolvidos comparados aos países em desenvolvimento. Contudo, durante as últimas duas 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 *et al.*, 2008). Esse câncer, também, é considerado a neoplasia maligna mais comum em homens idosos e é frequentemente complicado por metástase óssea (Garnero, 2001; Scott *et al.*, 2001).

No Brasil, conforme estimativas do Instituto Nacional de Câncer (2008), 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 estima para o ano de 2008 a ocorrência de 49.530 casos novos de câncer da próstata no país, valor que corresponde a um risco estimado de 52 casos novos a cada 100 mil homens. Mais do que qualquer outro tipo de câncer, este é considerado o câncer da terceira idade, uma vez que cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos (INCA, 2008).

Como a maioria dos cânceres comuns, os fatores etiológicos associados com o câncer da próstata são variados, abrangendo influências genéticas e ambientais. Os fatores ambientais são indicados claramente por estudos da migração. Outros fatores etiológicos incluem o envelhecimento (idade maior ou igual a 50 anos), história familiar de pai ou irmão com câncer da próstata antes dos 60 anos de idade, raça (maior prevalência entre negros norte-americanos e africanos), influência hormonal, dieta (consumo aumentado de gordura) e o estilo de vida (Hsing e Devesa, 2001; Isaacs *et al.*, 2002).

O câncer de próstata 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. O 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 Cancer Society, 2008).

Em relação aos aspectos morfológicos, aproximadamente 70% dos casos de carcinoma surgem na zona periférica da glândula, freqüentemente palpável ao exame retal.

O exame histológico revela o adenocarcinoma, em geral, constituído, por pequenos ácinos que infiltram difusamente o estroma. O arranjo dos ácinos é útil diagnosticamente e a base da Graduação de Gleason. Ácinos malignos têm um arranjo irregular e casual espalhados no estroma em conglomerados ou cachos. O espaçamento entre ácinos malignos varia amplamente. Variação no tamanho acinar é um critério útil para câncer. 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.*, 2005).

No estudo morfológico, 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 (Billis and Pompeo, 2003). Neste sistema, não se consideram as atipias nucleares 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 grau histológico poderá ser de 1 a 5 e a contagem final de 2 a 10. Há uma definição para os 5 graus de diferenciação (Figura 5): 1 e 2, a neoplasia mostra apenas desarranjo arquitetural, as glândulas crescem proximamente junto, 3, 4 e 5, há infiltração do estroma e em 5 o arranjo é sólido bem indiferenciado (Wetzel and 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 score de Gleason combinado (Kumar *et al.*, 2005). Assim, por exemplo, se o grau histológico de 90% da área examinada for 3 e de 10% for 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 (Billis and Pompeo, 2003).

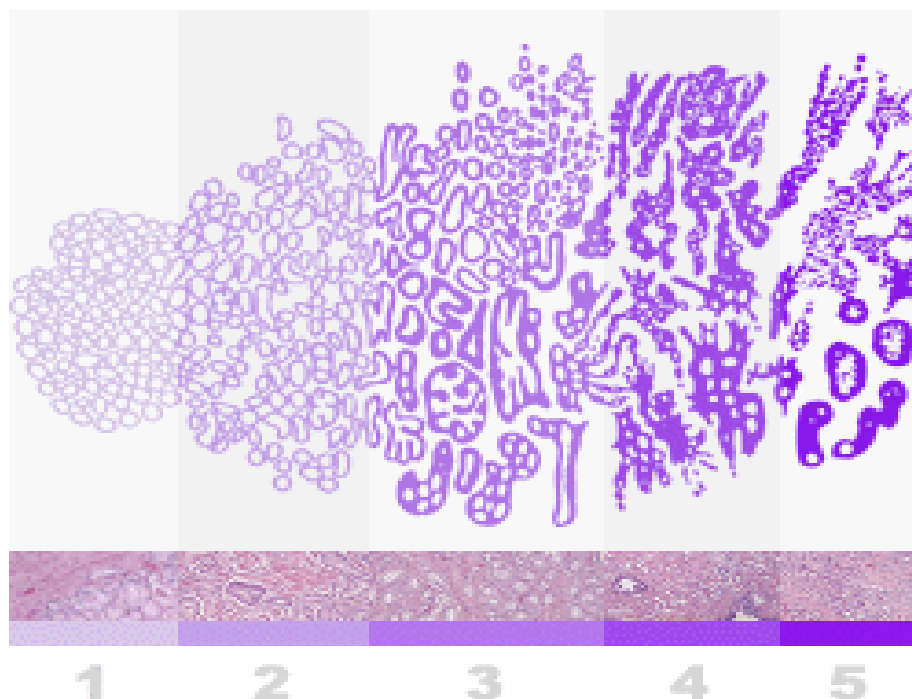


Figura 5 - Graus histológicos do Carcinoma Prostático, de acordo com o sistema Gleason.

Fonte: http://www.psc.edu/science/Wetzel/objective_view_of_cancer.html

Embora haja algumas evidências de que certos cânceres de próstata podem se tornar menos diferenciados com o tempo, em geral o escore de Gleason permanece estável por um período de vários anos. Kumar e colaboradores (2005) enfatizam que a gradação é de particular importância no câncer de próstata porque é o melhor marcador, juntamente com o estadiamento, para se prever o diagnóstico.

Para uma detecção precoce do câncer de próstata, neste momento, existem dados insuficientes para recomendar a favor ou contra os testes de câncer de próstata em homens com risco médio de desenvolver a doença. A Sociedade Americana do Câncer recomenda que o PSA e exame retal digital devam ser oferecidos aos homens com 50 anos. Os indivíduos com alto risco de desenvolver câncer de próstata (como os americanos da África ou homens com uma forte história familiar) devem começar a fazer esses exames aos 45 anos.

2.3 Corpos Amiláceos

Corpos amiláceos (CAs) são considerados formações ou concreções nodulares pequenas, primariamente localizadas a nível intraluminal das glândulas prostáticas (Figura 6), embora eles também sejam descritos em outros tecidos, como cérebro, pulmão e útero (Morales *et al.*, 2005, Christian, 2005, Balea *et al.*, 2006). No cérebro, sua presença está associada com idade, assim como em várias outras condições neurológicas, tais como Alzheimer e esclerose múltipla (Balea *et al.*, 2006).

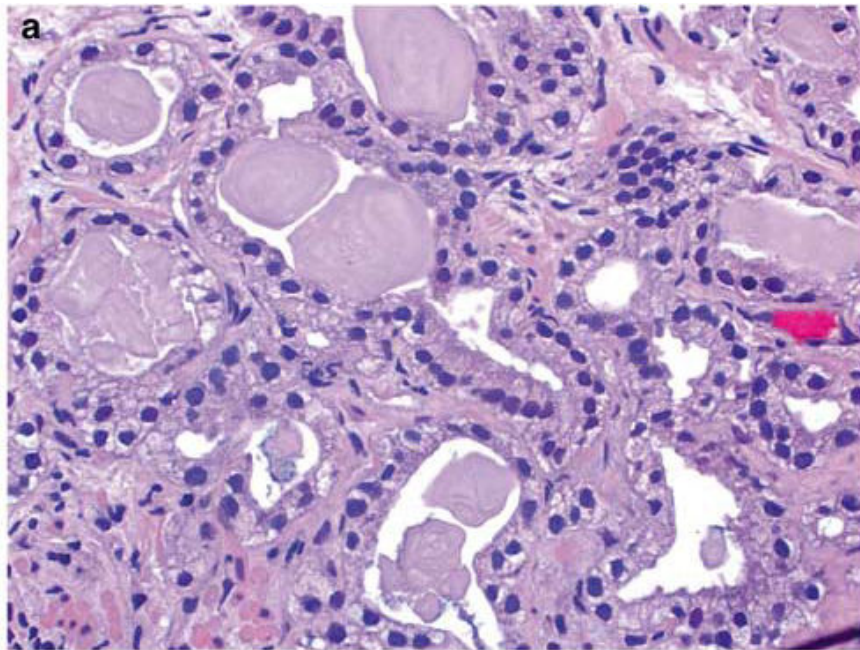


Figura 6 – Corpos amiláceos em ácinos com adenocarcinoma. Fonte: Christian *et al.*, 2005.

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 encontrados ser compostos de substância amilóide, primariamente β_2 – microglobulina, mais carboidratos que proteína numa relação de 2:1, altas concentrações de açúcares (glicosamina e galactose) e sulfurados que sugere a

presença elevada de glicosaminoglicanos sulfatados (compostos de carboidratos e enxofre) (Cavanagh, 1999, Christian *et al.*, 2005, Morales *et al.*, 2005).

Em próstata normal tanto grânulos quanto corpos amiláceos são compostos pelos glicosaminoglicanos sulfatados. Nas glândulas prostáticas malignas o mecanismo é alterado e raros CAs são observados (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, entretanto eles são raros no carcinoma. Apesar de sua alta prevalência em ácinos benignos e raridade em malignos, sua presença não deve ser usada como um critério para exclusão de malignidade (Christian *et al.*, 2005).

2.4 Glicômica

O termo Glicobiologia, introduzido em 1988, focou atenção na estrutura, biossíntese e função biológica dos glicanos e seus derivados (Wormald and Dwek, 1999). A palavra glicano é agora frequentemente utilizada para abranger oligossacarídeos, polissacarídeos e carboidratos. O processo de glicosilação, que envolve um sistema firmemente regulado de enzimas e transportadores, é um das mais comuns modificações co ou pós-traducional produzindo um sistema abundante, diversificado e altamente regulado de glicanos celulares que são frequentemente ligados a proteínas e lipídeos, livres ou de superfície celular (Ohtsubo and Marth, 2006). Esses oligossacarídeos podem influenciar a função de glicoproteínas e glicolipídeos em muitos caminhos (Campbel *et al.*, 2007).

Mais recentemente os glicobiologistas, em paralelo com abordagens da genômica, proteômica e lipidômica, inseriram o termo glicômica (do inglês: “glycomics”) referindo-se ao estudo das estruturas de glicanos que compõem o glicoma de um organismo (Ohtsubo and Marth, 2006; Turnbull and Field, 2007). Em comparação com os cerca de 40.000 genes no genoma humano, o proteoma humano está previsto para ser muito maior (Melton, 2004). Atualmente, não podemos prever com precisão a enorme diversidade do glicoma, mas uma hipótese é muito clara: espera-se que o glicoma venha a ser mais complexo do que um proteoma devido a alguns fatores, tais como variabilidade na sequência da estrutura dos

glicanos utilizando vários monômeros, pontos de ligação individuais moldam estruturas lineares ou ramificadas, entre outros (Gabiús et al., 2004; Turnbull e Field, 2007; Gemeiner et al., 2009). Além disso, a presença e estrutura dos carboidratos não podem ser lidas a partir do genoma uma vez que esta estrutura é produto de múltiplas enzimas de modificação. Globalmente, o campo da glicômica funcional está agora emergindo como um veículo para colocar os carboidratos como principal corrente da biologia e da biomedicina, mostrando seu potencial para ganhar lugar ao lado dos outros domínios de ômicas já estabelecidos (Turnbull and Field, 2007).

Podemos observar, em geral, a participação dos carboidratos ligados a proteínas em muitos processos biológicos importantes, tais como reconhecimento molecular, sinalização inter e intracelulares, desenvolvimento embrionário, fertilização, defesa imune, inflamação, processos de divisão e adesão celular, replicação viral, infecções parasitárias e progressão do câncer (Park et al., 2004; Geyer and Geyer, 2006; Ohtsubo and Marth, 2006).

Estima-se que, em mais de 50% de todas as proteínas, haja glicanos ligados a sítios variados formando as glicoproteínas que aparecem dentro de células, tanto no citoplasma quanto em organelas subcelulares, em membranas celulares assim como nos fluidos e matrizes extracelulares (Geyer and Geyer, 2006). Entretanto, a maioria delas é encontrada na superfície celular.

As interações entre as glicoproteínas envolvidas nos eventos de reconhecimento célula-célula são freqüentemente fracas, porém interações fortes são obtidas do somatório dessas interações que ocorrem simultaneamente em duas superfícies complementares promovendo um alto nível de especificidade. Vale salientar que, a complementaridade destas superfícies não depende apenas da sua composição, mas também da sua apresentação, organização espacial e grau de difusão das muitas proteínas de superfície celular envolvidas. Os glicanos nessas moléculas afetarão sua orientação e seu empacotamento na superfície celular (Wormald and Dwek, 1999).

A diversidade estrutural de oligossacarídeos encontrados em glicoproteínas é enorme, já que sua biossíntese é um processo dirigido, de maneira seqüencial e ordenada envolvendo uma ação coordenada de muitas enzimas (glicosiltransferases e glicosidases) (Ohtsubo and Marth, 2006). A estrutura final não é apenas dependente da base polipeptídica, mas também de um número variável de fatores tais como nível de substrato e a disponibilidade das enzimas, as quais podem mudar durante crescimento, diferenciação e desenvolvimento celular. Conseqüentemente há uma contínua necessidade em analisar os padrões de

glicosilação de glicoproteínas produzidas por sistemas de expressão diferentes (Geyer and Geyer, 2006).

Na célula, os oligossacarídeos estendidos ao longo da superfície celular atuam regulando a associação dos glicoconjugados com moléculas vizinhas e constituem um sistema de estoque de informações denso. Considerando as diversas funções da glicosilação, não é surpresa que anormalidades são intimamente associadas com doenças variando desde desordens congênitas a disfunções imunes e câncer (Ambrosi *et al.*, 2005). Glicosilação é também crítica em doenças infecciosas já que muitas bactérias e vírus contam com o código de carboidratos para reconhecer e infectar células (Campbel *et al.*, 2007).

As cadeias de glicanos podem significativamente alterar a conformação protéica e pode conseqüentemente modular a atividade funcional de uma proteína assim como interações proteína/proteína e assim afetar sua disponibilidade para reconhecimento por lectinas. Por isso, glicanos de glicoproteínas representam uma ferramenta valiosa para ajuste e modulação da estrutura e função protéica (Wormald and Dwek, 1999; Geyer and Geyer, 2006). O entendimento da base molecular para interações proteína-carboidrato não apenas promove informação valiosa sobre processos biológicos de organismos vivos, mas também auxilia no desenvolvimento de agentes biomédicos potenciais (Park *et al.*, 2004)

A variação estrutural dos glicanos de superfície celular durante a glicosilação produz marcadores variados, alguns dos quais se correlacionam com a diferenciação, ativação celular e doenças (Ambrosi *et al.*, 2005; Ohtsubo and Marth, 2006). Por isso, esses glicanos têm sido um foco de muitas tentativas de investigação, principalmente porque algumas células cancerosas utilizam cadeias de carboidratos para escapar do reconhecimento imunológico e poderem migrar através do corpo. Durante metástase, os carboidratos estão envolvidos nas interações entre célula tumoral-célula tumoral, membrana extracelular-célula tumoral e célula tumoral-célula endotelial (Nangia-Makker *et al.*, 2002).

As investigações e a manipulação da glicosilação são necessárias e podem assegurar potencial entendimento das funções biológicas de glicoproteínas e glicolipídeos, buscarem novos marcadores diagnósticos como também alguns tratamentos para doenças (Campbel *et al.*, 2007). Assim, a fim de desvendar o glicocódigo, uma gama diversificada de tecnologias e estratégias está entrando em cena (Figura 7) (Turnbull and Field, 2007; Gemeiner *et al.*, 2009).

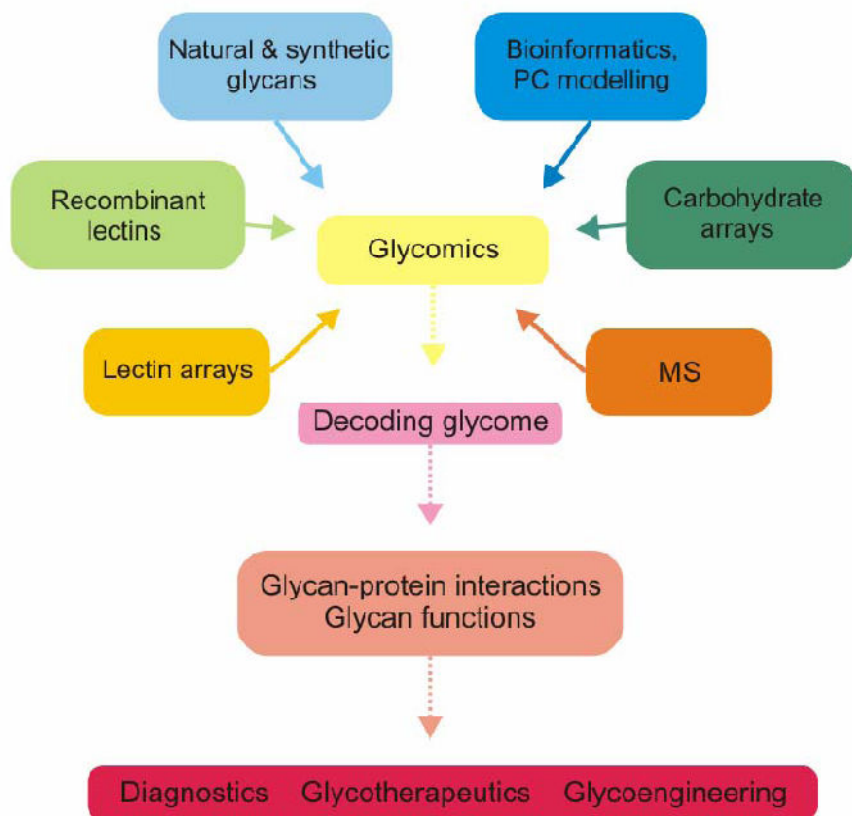


Figura 7: Tecnologias emergentes para desvendar o glicocódigo. Fonte: Turnbull and Field, 2007.

2.5 Lectinômica

2.5.1 Breve Histórico

O marco inicial para os estudos das lectina foi, em 1888, quando Stillmark durante seus estudos observou que extratos de sementes de mamona, *Ricinus communis*, tinham a capacidade de aglutinar eritrócitos. Subseqüentemente, H. Helin (1889) demonstrou a presença de uma hemaglutinina tóxica em extratos de semente de jequiriti, *Abrus precatorius* (Sharon & Lis, 1988).

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).

Outros marcos, na história das lectinas, ocorreram em 1919, quando Summer isolou e purificou em forma cristalina a lectina de *Canavalia ensiformis*, concanavalina A (Con-A) e

quando Karrer, em 1925, analisou a composição de aminoácidos da ricina. Já ao final dos anos 40, Boyd e Reguera começaram a reportar que algumas sementes tinham aglutininas específicas para antígenos dos grupos sanguíneos humanos (Sharon & Lis, 1988).

Duas grandes descobertas ocorridas no início dos anos 60 foram fundamentais colocando as lectinas em evidência. A primeira delas foi a observação por Nowel (1960) de que a lectina de sementes de *Phaseolus vulgaris* (PHA) estimulava a divisão de linfócitos. A segunda descoberta foi feita por Aub e colaboradores, em 1963, quando eles observaram que a lectina do germe do trigo (WGA), aglutinava preferencialmente células malignas (Sharon & Lis, 2004). 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 1965, Agrawal e Goldstein aplicaram a cromatografia de afinidade para promover o isolamento de lectinas. Eles utilizaram uma matriz de dextrana (Sephadex) como suporte para isolamento da Con-A, lectina que interage com glicose e seus derivados.

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.

Assim, continuam ampliando-se as pesquisas e aplicações das lectinas nas mais diversas áreas do conhecimento como, por exemplo, na bioquímica e patologia (Gabor *et al.*, 2001; Triantafyllou *et al.*, 2004; Weng *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2007; Matsuda *et al.*, 2008).

2.5.2 Distribuição e Função

As lectinas são de distribuição ubíqua na natureza, sendo encontradas desde bactérias e vírus a plantas e animais (Ambrosi *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2006; Wang e Ng, 2006). Um grande número de lectinas é isolado predominantemente de sementes da planta. Entretanto, folhas, cascas, frutos, raízes, bulbos e tubérculos também são fontes de lectinas em tecidos vegetais (Rüdiger *et al.*, 2000).

Lectinas já foram identificadas em células animais, sendo algumas solúveis no citosol, núcleo ou líquidos de corpo, e muitas outras presentes na membrana ou na posição intracelular. As lectinas da membrana estão envolvidas tanto no transporte celular como também no reconhecimento célula-célula (Duverger, 2003).

Apesar da sua abundância, o espectro das funções biológicas das lectinas é ainda uma matéria de debate. 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 (Rüdiger *et al.*, 2000).

Algumas das funções já propostas relacionam as lectinas como participantes da proteção das plantas contra microrganismos e insetos fitopatogênicos como também contra animais predadores (Peuman *et al.*, 1995; 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, o reconhecimento fungo-micoparasitas (Kellens & Peumans, 1990) e ainda podem atuar como proteínas estoque e apresentar atividade pesticida (Trigueros *et al.*, 2003).

As lectinas encontradas em tecidos de animais parecem estar envolvidas com o mecanismo de endocitose e translocação intracelular de glicoproteínas (Yamashita *et al.*, 1999; Smetana and André 2008), na ligação a glicoconjugados (Barondes, 1984), com o processo de apoptose (Rabinovich *et al.*, 1999), parecem ainda possuir papéis na defesa contra microorganismos, na regulação dos processos de migração e adesão celular e no processo de ligação de bactérias a células epiteliais (Ponchel and Irache, 1998; Rudiger *et al.*, 2000); possuem também uma função no sistema imune de aves e mamíferos (Holmskov *et al.*, 1994).

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 (Kilpatrick, 2002; Garred *et al.*, 2003; Jack & Turner, 2003).

2.5.3 Purificação e Caracterização

Lectinas são purificadas pelas técnicas “convencionais” de purificação de proteínas incluindo primeiramente a extração com solução aquosa salina ou tampão (Kawagishi *et al.*, 2001; Mladenov *et al.*, 2002). Os extratos com atividade hemaglutinante são submetidos à purificação parcial por fracionamento salino em diferentes concentrações e diálise (Coelho e Da Silva, 2000; Yeasmin *et al.*, 2001). Após purificação parcial são utilizadas as técnicas cromatográficas que aumentam a pureza e o rendimento da proteína (Baynes & Dominiczak, 2000; Lehninger, 2002). 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 (Kennedy *et al.*, 1995; Gerlach *et al.*, 2002). Entretanto, outras cromatografias também são muito utilizadas, tais como: cromatografia de filtração em gel e cromatografia de troca iônica (Lehninger, 2002).

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 baseando-se na migração destas em um gel, quando um campo elétrico é aplicado (Stryer, 1992).

Cada etapa da purificação é monitorada pela atividade hemaglutinante. Ensaio de hemaglutinação com eritrócitos de animais e/ou humanos detectam a presença de lectinas em uma amostra (Figura 8A). 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 (Ozeki *et al.*, 1991; Mo *et al.*, 1993; Xiong *et al.*, 2006). A especificidade na ligação carboidrato-lectinas tem sido estudada pela inibição convencional da hemaglutinação (Figura 8B) usando vários açúcares e derivados como inibidores (Correia e Coelho, 1995; Xiong *et al.*, 2006; Wang e Ng, 2006).

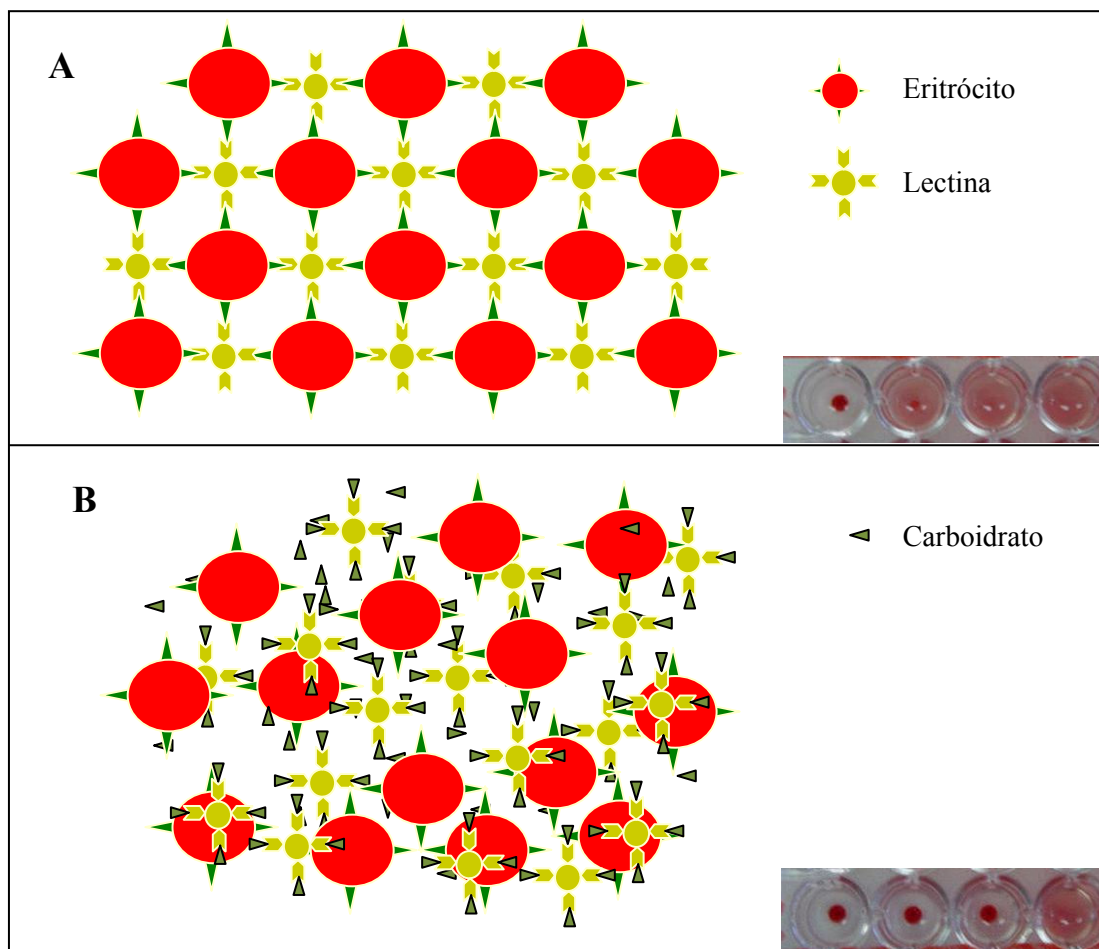


Figura 8 – Esquema ilustrativo de um ensaio de hemaglutinação (A) e de sua inibição (B). Pelo autor.

As proteínas purificadas de plantas com atividade hemaglutinante foram inicialmente denominadas de aglutininas de plantas, fitohemaglutininas, hemaglutininas ou fitoaglutininas (Sharon & Lis, 1988).

Em 1954, Boyd e Shapleigh propuseram o termo “lectina” (originado do latim “lectus”, que significa selecionado, escolhido) para fazer a designação a esse grupo de proteínas que apresentam essa seletividade na interação com carboidratos como característica comum. Este mesmo termo foi generalizado em 1972, por Sharon & Lis, englobando todas as proteínas presentes em fontes de natureza variada, de origem não imunológica, capazes de ligar-se a carboidratos, com especificidade ou não para determinado grupo sanguíneo.

Goldstein e colaboradores (1980) definem lectinas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, interagindo com carboidratos através de pelo menos dois sítios de ligação, aglutinando células vegetais e animais, e precipitando polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos.

Assim, as lectinas foram caracterizadas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, de distribuição ubíqua e que reconhecem reversível e especificamente, através de sítios de ligação, carboidratos livres ou ligados a lipídeos ou proteínas de superfícies celulares. Essa interação com carboidratos ou com outras substâncias ocorre através de pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas, com especificidades características (Kennedy *et al.*, 1995; Nishimura *et al.*, 2000; Ambrosi *et al.*, 2005).

2.5.4 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, na Bioquímica, na Biologia Celular e Molecular, na Imunologia, na Farmacologia, na Medicina e Análises Clínicas.

Algumas lectinas têm sido estudadas como mediadoras de drogas (Bies *et al.*, 2004; Gabor *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2006; Komath *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2007), outras como marcadores taxonômicos de microrganismos diferentes sendo amplamente utilizadas na microbiologia em geral (Slifkin & Doyle, 1990). Há aquelas com atividade antibacteriana podendo ser úteis em aplicações terapêuticas e microbiologia clínica (Holanda *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2008).

Estudos têm empregado lectinas como potenciais anticarcinogênicos (De Meija *et al.*, 2003), conjugadas a agentes quimioterápicos úteis no tratamento de tumores induzidos em animais (Haseenabeevi *et al.*, 1991) ou como uma sonda alternativa em imagens celulares e biomarcadores (Weng *et al.*, 2006).

Muitas estratégias de estudos tem utilizado lectinas imobilizadas em diferentes suportes para separação e purificação por afinidade de glicoconjugados (Monzo *et al.*, 2007) e está técnica já vêm sendo aplicada no diagnóstico de certas condições patológicas, possibilitando o uso deste conhecimento para desenhar tratamentos para várias doenças (Satish e Surolia, 2001).

Pesquisas com lectinas de algas têm descoberto seus potenciais antivirais ao interagir com a proteína do envelope do HIV (Ziółkowska e Wlodawer, 2006), já Li e colaboradores (2008) discutem a utilização das lectinas de algas para prevenir a transmissão desse vírus (Li *et al.*, 2008).

Sonawane e colaboradores (2007) estudando 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.

Outras lectinas promovem nas células estimulação mitogênica (Maciel *et al.*, 2004; Sharon, 2007) e indução de apoptose (Liu, *et al.*, 2007; Sharon, 2007) através da reorganização dos carboidratos de superfície celular. E como as lectinas 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 (Remani *et al.*, 1994; Beltrão *et al.*, 1998, 2000, 2003; Komath *et al.*, 2006; Thöm *et al.*, 2007; Laack *et al.*, 2008).

2.5.5 Lectinas de *Cratylia mollis*

Cratylia mollis (camaratu bean) é uma leguminosa nativa da Região Semi-Árida de Pernambuco; a planta (Figura 9A) 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 9B) 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, Santos *et al.* 2004). Há três formas moleculares mais estudadas, a Cramoll 1 (Figura 9C) 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 *et al.*, 2004).

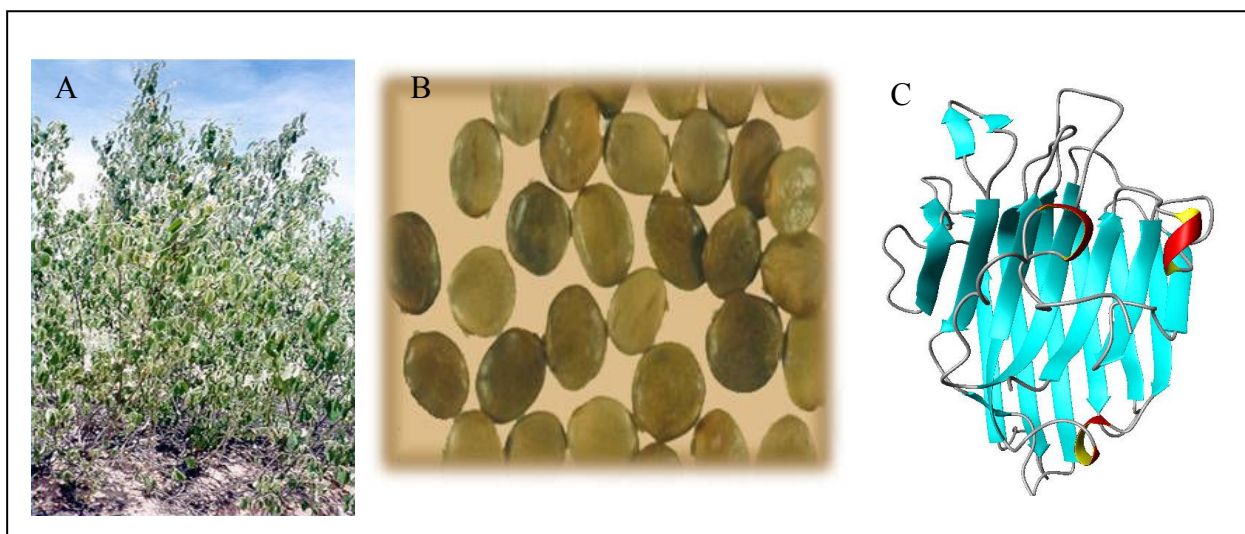


Figura 9 – Características de *Cratylia mollis*. Planta do feijão de camaratu (A), sementes de *Cratylia mollis* (B) e estrutura cristalográfica do monômero de Cramoll 1 (C).

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 (Lima et al., 1997; Beltrao et al., 1998; 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 6 substituições num encaixe adjacente ao sítio de ligação a glicanos e 2 no próprio sítio que podem explicar as diferenças de ligação a oligossacarídeos e glicoproteínas entre Cramoll 1 e Con-A.

As isolectinas de sementes de *C. mollis* vêm sendo estudadas nas mais diversas áreas da biotecnologia. Há experimentos envolvendo atividade antiinflamatória (Cechinel et al., 2001), no isolamento de inibidores de tripsina (Paiva et al., 2003); como marcadoras de superfície celular de tecido mamário e cerebral (Beltrão et al., 1998, 2001, 2003); na avaliação de atividade mitogênica de linfócitos (Maciel et al. 2004); na purificação de glicoproteínas (Lima et al., 1997); na atividade antitumoral na forma livre e encapsulada em lipossomas (Andrade et al., 2004) e também estão envolvidas na cicatrização de feridas cutâneas experimentais (Melo et al., 2003; Albuquerque et al., 2004).

2.6 Histoquímica com lectinas

O interesse nas lectinas intensificou-se quando se descobriu que elas são ferramentas extremamente valiosas para investigação de glicanos de superfície celular, para determinação do papel na diferenciação e crescimento celular, nas interações de células com seu ambiente e também numa variedade de processos patológicos (Sharon, 2007). Nesse contexto, o estudo clássico feito das lectinas por Sumner e colaboradores (1936) foi que promoveu a mais precoce evidência para a presença de açúcares na superfície celular e seu potencial como marcadores da identidade celular quando foi sugerido que a hemaglutinação induzida por elas deve ser uma consequência de sua reação com carboidratos na superfície dos eritrócitos.

As técnicas histoquímicas que foram introduzidas no começo do século 20 ou até antes são ainda comumente usadas (Pearse, 1985). 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 eram afetadas pela glicosilação e subsequente modificação por rearranjos ou adição de açúcares em processos patológicos (Helenius & Aebi, 2001; Yamamoto *et al.*, 2005). A histoquímica com lectinas apareceu creditada em oferecer discernimentos na exposição de epítomos selecionados em cadeias de carboidratos de glicoconjugados celulares nesses processos patológicos (Figura 10).

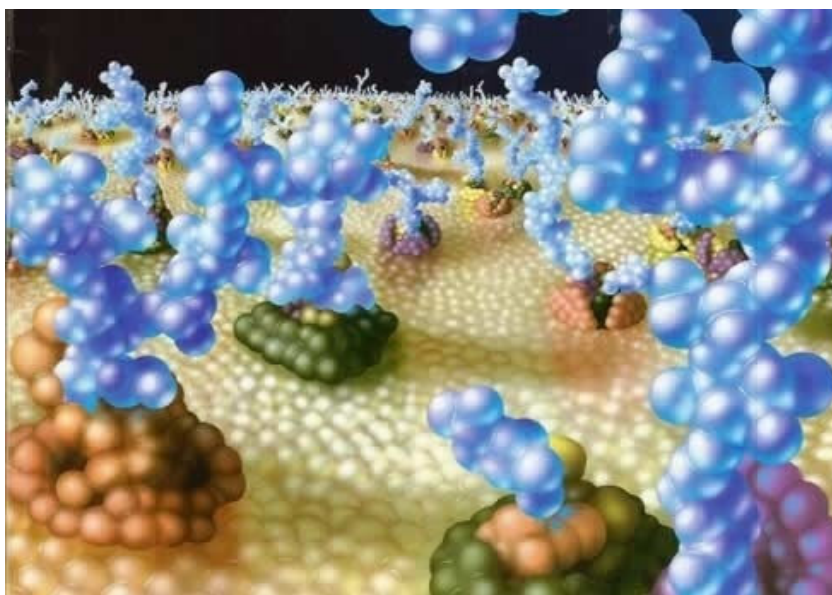


Figura 10 – Glicoconjugados de superfície celular. Fonte: Revista Science, 2001.

Os primeiros estudos de cânceres empregando histoquímica com lectinas foram realizados por Klein e colaboradores (1981). Os estudos histoquímicos e/ou imunohistoquímicos, em que reações químicas são realizadas em secções histológicas, são particularmente úteis para demonstrar a arquitetura estromal de um tumor, por ressaltar estruturas da matriz extracelular e freqüentemente a dimensão da extensão tumoral. A utilidade das lectinas, nesta área de estudo, está baseada na propriedade que têm de analisar os vários tipos de glicoconjugados que encontram-se em proporções variadas em diferentes membranas celulares e fluidos fisiológicos, refletindo a diversidade de seus papéis biológicos (Díaz *et al.*, 1999; Sharon & Lis, 2004).

Eventos de reconhecimento celular baseiam-se na ligação específica de uma estrutura expressa em uma superfície celular a um receptor particular em outra célula. E são os glicanos de superfície celular que servem como ligantes para proteínas que mediam a sinalização, adesão e transporte celular (Gabius *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2008). Importantemente, 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 proteínas, como as lectinas, para o desenvolvimento de agentes para diagnóstico e terapêutica clínicos (Helenius & Aebi, 2001; Yamamotoa *et al.*, 2005; Ambrosi *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2008).

A riqueza dos relatos neste campo e o teste progressivo destas ferramentas convergem para fornecer indícios nas alterações tipo-celular ou diferenciações-dependentes na glicosilação (Gabius, 2001). Entretanto, essa utilização como ferramenta auxiliar no estudo de tumores é recente e necessita de maiores investigações, principalmente devido a pouca disponibilidade de marcadores ou de sondas específicas para alguns tipos de neoplasias (Kannan *et al.*, 1993; Nakanishi *et al.*, 1993; Brooks *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000).

Desta forma, devido à série de mudanças bioquímicas, como as variações do perfil de carboidratos expressos, que ocorrem em um ambiente celular em processos neoplásicos, as lectinas tornam-se interessantes ferramentas diagnósticas na diferenciação histoquímica para glicoconjugados de superfície e intracelulares de células transformadas (Mitchell Schumacher, 1999; Herling *et al.* 2000; Thies *et al.* 2001; Beltrão *et al.* 1998, 2001, 2003; Thöm *et al.*, 2007). É importante salientar que a histoquímica com lectinas tem sido utilizada também em estudos comparativos dos glicoconjugados de superfície de papilas gustativas em cinco ordens de mamíferos (Taniguchi *et al.*, 2008).

Quando os ligantes de letinas envolvidos no reconhecimento celular são porções de açúcares ligados a proteínas e/ou lipídeos e quando quantidades limitadas de material são úteis, é freqüentemente muito difícil elucidar as especificidades destas interações com detalhamento molecular (Yamamotoa *et al.*, 2005; Ambrosi *et al.*, 2005). É na perspectiva a longo-prazo de projetar ligantes seletivos de alta afinidade, empregando tanto lectinas quanto outros marcadores específicos, que a citoquímica e a histoquímica visam uma contribuição na relação estrutura-função ao nível celular, tecidual, orgânico e sistêmico de organismos (Gabius, 2001).

3. BIBLIOGRAFIA

Agrawal, B. L. & Goldstein, I. J. (1965) Specific Binding of Concanavalin A to Cross-Linked Dextran Gels. **Biochemical Journal**. 96: 23.

Albuquerque, E.R.; Melo, C.M.L.; Bezerra, C. *et al.*, (2004) Topical treatment of cutaneous wounds in mice using *Cratylia mollis* lectin: Histopathological Analyses. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, XXX SBBq 1CD-ROM.

Ambrosi, M.; Cameron, N.R.; Davis, B.G. (2005) Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic and Biomolecular Chemistry**. 3(9):1593-608

American Cancer Society. Cancer facts and figures 2008. **American Cancer Society**; 2008.

Andrade, C. A. S.; Correia, M. T.S.; Coelho, L. C.B.B.; Nascimento, S. C. ; Santos-Magalhães, N. S. (2004) Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**. 278: 435–445.

Aub, J. C.; Tieslav, C.; Lankester, A. (1963) Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes, I. Wheat – germ lipase and associated mucopolysacharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 50: 613-9.

Balea, I. A.; Illes, P.; Schober, R. (2006) Affinity of corpora amylacea for oligonucleotides: Sequence dependency and proteinaceous binding motif. **Neuropathology**. 26: 277–282.

Barondes, S.H. (1984) Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. **Science**. 229 (4642): 1259 – 1264.

Baynes, J. & Dominiczak, M. (2000). **Bioquímica Médica**. São Paulo, Manole.

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

Beltrão, E.I.C.; Figuerêdo-Silva, J.; Coelho, L.C.B.B.; Carvalho JR, L.B. (2001) Infiltrating ductal mammary carcinoma: lectin histochemistry study. **Anais Faculdade Medicina Universidade de Pernambuco**, Recife, Brazil 46: 32-5.

Beltrão, E.I.C.; Medeiros, P.L.; Rodrigues, O.G.; Figuerêdo-SILVA, J.; Coelho, L.C.B.B.; Carvalho JR, L.B. (2003) *Parkia pendula* lectin histochemistry marker for meningothelial tumor. **European Journal Histochemistry**. v.47, p.139-42.

Bies, C.; Lehra, C. M.; Woodleyb, J. F. (2004) Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 56 425– 435

Billis, A. & Pompeo, A.C. (2003) Adenocarcinoma da próstata. **International Braz Journal Urology**. 29 (suppl 1): 27-34.

Boyd, W. C. & Shapleigh, E. (1954) Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**. 119: 419.

Brasileiro Filho, G. (2000) Patologia. In: Bogliolo, L. Patologia. Sexta Edição. Editora Guanabara Koogan S.A. Pag: 514-523. 518

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

Brooks, S.A.; Leathem, A.J.C.; Schumacher, U. (1996) Lectin histochemistry. A concise practical handbook. Bios, Oxford

Bryne, M.; Kjaerheim, A.; Schreurs, O.; Dabelsteen, E. (1992) Cell surface carbohydrates are involved in various biological processes. **Tidsskr Nor Lægeforen**. 112: 2859– 62.

Campbell, C. T.; Sampathkumar, S-G.; Yarema, K. J. (2007) Metabolic oligosaccharide engineering: perspectives, applications, and future directions. **Molecular BioSystem**. 3: 187–194

Cavanagh, J.B. (1999) Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. **Brain Research Reviews**. 29: 265–295

Cechinel, Y. M. N.; Correia, M. T. S.; Coelho, L.C.B.B.; Catanho, M. T. J. A. (2001) Evaluation of anti-inflammatory activity from *Cratylia mollis* lectin in mice. In: VI pharmatec, 2001, Recife. **Anais do VI Pharmatec**. (1): 167-168.

Christian, J. D.; Lamm, T. C.; Morrow, J. F.; Bostwick D. G. (2005) Corpora amylacea in adenocarcinoma of the prostate: incidence and histology within needle core biopsies. **Modern Pathology**. 18: 36–39.

Chun-Hung, LIN. Cell Surface Carbohydrates Involved in Molecular Recognition. Institute of Biological Chemistry Disponível em: www.bc.sinica.edu.tw/PI_DetailE.asp?Auto=29. Acessado em 22 de maio, 2006.

Coelho, L. C. B. B. & Da Silva, M. B. R. (2000) Simple method to purify miligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**. 11: 1-6.

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

Dabelsteen, E. (1996) Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. **Journal of Pathology**. 179: 358 – 69.

Dabelsteen, E.; Clausen, H.; Mandel, U. (1992) Carbohydrate changes in squamous cell carcinomas. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. 27:130– 8.

DE Meija, E.G.; Bradford, T.; Haster, C. (2003) The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. **Nutri Rev**. 61 (7): 239-46.

Díaz, P. H.; González, O. M.; Vélez, Y R P.; Báez, C. F. A. G (1999) Aplicaciones de las Lectinas. **Rev Cubana Hematol Immunol Hemoter** 15(2):91-5.

Drickamer, K. & Taylor, M.E. (2002) Glycan arrays for functional glycomics. **Genome Biology**. 3(12):1034.1–1034.4

Duverger, E.; Frison, N.; Roche, A. C.; Monsigny, M. (2003) Carbohydrate-lectin interactions assessed by surface plasmon resonance. **Biochimie**. 85: 167–179

Elliott, W.H. & Elliott, D.C. (2001) Biochemistry and molecular biology. **Oxford University Press**. 2ª edição. Cap. 30.

Emberton, M. (2006) Definition of at-risk patients: dynamic variables. **BJU International**. 97 Suppl 2:12-5; discussion 21-2.

Franks, L. M. & Teich, N. M. (1999) Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Oxford University Press Inc., 3ª edition.

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

Gabius, H.-J.; Andre, S.; Kaltner, H.; Sebert, H.-C. (2002) The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1572: 165–177.

Gabor, F.; Bogner, E.; Weissenboeck, A.; Wirth, M. (2006) The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 56 (4):459-80.

Gabor, F.; Klausegger, U.; Wirth, M. (2001) The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. **International Journal of Pharmaceutics**. 221: 35-47.

Gao, X.; Tao, W.; Lu, W.; Zhang, Q.; Zhang, Y.; Jiang, X.; Fu, S. (2006) Lectin-conjugated PEG-PLA nanoparticles: preparation and brain delivery after intranasal administration. **Biomaterials**. 27(18):3482-90.

Gao, X.; Chen, J.; Tao, W.; Zhu, J.; Zhang, Q.; Chen, H.; Jiang, X. (2007) UEA I-bearing nanoparticles for brain delivery following intranasal administration. **International Journal of Pharmaceutics**. 340 (1-2): 207-215.

Garnero, P. (2001) Markers of bone turnover in prostate cancer. **Cancer Treatment Reviews**. 27: 187-192.

Garred, P.; Larsen, F.; Madsen, H.O.; Koch, C. (2003) Mannose-binding lectin deficiency-revisited. **Molecular Immunology**. 40: 73–84.

Gemeiner, P.; Mislovicová, D.; Tkác, J.; Svitel, J.; Pätöprstý, V.; Hrabárová, E.; Kogan, G.; Kozár, T. (2009) LECTINOMICS. II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances**. 27(1):1-15.

Gerlach, D.; Wagnwr, M.; Schlott, B. *et al.* (2002) Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *cepaea hortensis*. **FEMS microbiology letters**. 10579: 61-68.

Geyer, H. & Geyer, R. (2006) Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1764: 1853–1869.

Gomes, R. (1997) Oncologia Básica. Editora: Revinter, RJ.

Goldstein, I. J.; Hughes, R. C.; Monsigny, M.I.; Osawa, T.; Sharon, N. (1980) What should be called a lectin? **Nature** 285: 66.

Guilot, J.; Guerrv, M.; Konska, G.; Caldefie_Chez, F.; DE Latour, M., Penault-Llorca, F. (2004) Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas. **Bull Cancer**. (2):141-58.

Haseenabeevi, V.M.; Remani, P.; Anil, S.; Viajayakumar, T. (1991) Plant lectins-histochemical and cytochemical applications in oncology. **Indian Journal of Dental Research**. 2(3-4):45-53.

Helenius, A. & Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. **Science**. 291: 2364–2369.

Herling, M.; Knolle, J.; Bahn, H.; Gabius, H.J.; Hinze R. (2000) Glycohistochemical monitoring of chemically induced sarcomas at different stages of tumorigenesis. **In vivo**. 14(4): 499-506.

Herzig, M. & Christofori, G. (2002) Recent advances in cancer research: mouse models of tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1602: 97– 113.

Holanda, M.L.; Melo, V.M.M.; Silva, L.M.C.M.; Amorim, R.C.N.; Pereira, M.G.; BENEVIDES, N.M.B. (2005) Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 38: 1769-1773

Holmskov, U.; Malhotra, R.; Sim, R.B.; Jensenius, J.C. (1994) Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. **Immunology Today**. 15: 67-74.

Hsing, A.W. & Devesa, S.S. (2001). Trends and patterns of prostate cancer: what do they suggest? **Epidemiology Review**. 23: 3–13.

Ingber, D. E. (2008) Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment? **Seminars in Cancer Biology**. 8(5):356-64.

Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2008. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2008. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>.

Isaacs, W.; DE Marzo, A.; Nelson, W. G. (2002) Focus on prostate cancer. **Cancer Cell**. 2: 113-6.

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

Jiménez-Castells, C.; De La Torre, B. G.; Andreu, D.; Gutiérrez-Gallego, R. (2008) Neoglycopeptides: the importance of sugar core conformation in oxime-linked glycoprobes for interaction studies. **Glycoconjugate Journal**. 25(9):879-87.

Joshua, A.M.; Evans, A.; Van Der Kwast, T.; Zielenska, M.; Meeker, A.K.; Chinnaiyan, A.; Squire, J.A. (2008) Prostatic preneoplasia and beyond. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1785(2):156-81.

Kannan, S.; Balaram, P.; Chandran, G.J.; Pillai, M.R.; Mathew, B.; Nair, M.K. (1993) Expression of lectin-specific cellular glycoconjugates during oral carcinogenesis. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. 119(11): 689-694.

Kawagishi, H.; Takagi, J.; Taira, T.; Murata, T.; Usui, T. (2001) Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**. 56: 53-58.

Kellens, J.T.C. & Peumans, W.J. (1990) Developmental accumulation of lectin in *Rhizoctonia solani*: a potential role as a storage protein. **Journal of general microbiology**. 136 (12): 2489-2495.

Kennedy, J. F., Paiva, P. M. G., Correia, M. T. S., Cavalcanti, M. S. M.; Coelho, L. C. B.B. (1995) Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**. 26: 219-30.

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

Klein, P.J.; Osmer, R.; Vierbuchen, M.; Ortmann, M.; Kania, J.; Uhlenbruck, G. (1981) The importance of lectin binding sites and carcinoembryonic antigen with regard to normal, hyperplastic, adenomatous, and carcinomatous colonic mucosa. **Recent Results Cancer Research**. 79: 1-9.

Komath, S.S.; Kavitha, M.; Swamy, M.J. (2006) Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. **Organic Biomolecular Chemistry**. 4(6):973-88.

Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N. **Robbins e Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7ª ed. São Paulo: Elsevier, 2005.

Laack, E.; Nikbakht, H.; Peters, A.; Kugler, C.; Jasiewicz, Y.; Edler, L.; Hossfeld, D. K.; Schumacher, U. (2008) Lectin Histochemistry of Resected Adenocarcinoma of the Lung - Helix pomatia *Agglutinin Binding Is an Independent Prognostic Factor*. **American Journal of Pathology**. 160 (3): 1001-1008.

Lehninger, A. L. Princípios de bioquímica / NELSON, D. L. & COX, M. M. 3ª ed. São Paulo: SARVIER, 2002. 974p.

Li, Y.; Zhang, X.; Chen, G.; Wei, D.; Chen, F. (2008) Algal lectins for potential prevention of HIV transmission. **Curr Med Chem**.15(11): 1096-104.

Lima, V. L. M.; Correia, M. T.S.; Cechinel, Y. M.N.; Sampaio, C. A.M.; Owen, J. S.; Coelho, L.C.B.B. (1997) Immobilized Cratylia mollis lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers**. 33: 27-32.

Liu, B.; Xu, X.; Cheng, Y.; Huang, J.; Liu, Y.; Liu, Z.; Min, M.; Bian, H.; Chen, J.; Bao, J. (2007) Apoptosis-inducing effect and structural basis of *Polygonatum cyrtoneura* lectin and chemical modification properties on its mannose-binding sites. **BMB reports**. 369-375.

Manoharan, S.; Padmanabhan, M.; Kolanjiappan, K.; Ramachandran C.R.; Suresh, K. (2004) Analysis of glycoconjugates in patients with oral squamous cell carcinoma. **Clinica Chimica Acta**. 339: 91–96.

Maciel, E.V.M.; Araújo-Filho, V.S.; Nakazawa, M.; Gomes, Y.M.; Coelho, L.C.B.B.; Correia, M.T.S. (2004) Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**. 32: 57–60.

Marandola, P.; Bonghi, A.; Jallous, H.; Bombardelli, E.; Morazzoni, P.; Gerardini, M.; Tiscione, D.; Albergat, F. (2004) Molecular Biology and the Staging of Prostate Cancer. **Academica of Science**. 1028: 294–312

Matsuda, A.; Kuno, A.; Ishida, H.; Kawamoto, T.; Shoda, J.; Hirabayashi, J. (2008) Development of an all-in-one technology for glycan profiling targeting formalin-embedded tissue sections. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 370(2):259-63.

Mcneal, J.E. (1978). Origin and evolution of benign prostatic enlargement. **Investigative Urology**. 15, 340 - 5.

Melo, C.M.L.; Albuquerque, E.R.; Melo-JR, M.R.; Bezerra, C.; *et al.* (2003) Topical use of *Cratylia mollis* I in wound healing in mice. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, XXX SBBq Anais**. p. 112.

Melton L. (2004) Protein arrays: proteomics in multiplex. **Nature**. 429:101-7.

Mitchell, B.S. & Schumacher, U. (1999) The use of the lectin Helix pomatia agglutinin (HPA) as a prognostic indicator and as tool in cancer research. **Histology and Histopathology**. 14(1): 217-226.

Mladenov, I.; Haralambieva, I.H.; Iankov, I.D.; Mitov, I.G. (2002) Characterization of 20-kDa lectin-spermagglutinin from *Arum maculatum* that prevents *Chlamydia pneumonia* infection of L-929 fibroblast cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 32: 249-254.

Mody, R.; Joshi, S.; Chaney, W. (1995) Use of Lectins as Diagnostic and Therapeutic Tools for Cancer. **Journal of Pharmacological and Molecular Biology**. 33: 1-10.

Mo, H.; Van Damme, E. J. M.; Peumans, W. J.; Goldstein, I. J. (1993) Purification and characterization of a manose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 306 (2): 431-438.

Montironi, R.; Vela-Navarrete, R.; Lopez-Beltran, A.; Mazzucchelli, R.; Bono, A. (2005) Review - Prostate Cancer. Update on Pathology of Prostate Biopsies with Cancer.

Monzavi-Karbassi, B. *et al.* (2002) Use of surrogate antigens as vaccines against cancer. **Hybrid Hybridomics**. 21: 103-109.

Monzo, A.; Bonn, G. K.; Guttman, A. (2007) Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. **Trends in Analytical Chemistry**. 26(5): 423-43

Morales, E.; Polo, L. A.; Pastor, L. M.; Santamarí, L.; Calvo, A.; Zuasti, A.; Ferrer, C. (2005) Characterization of corpora amylacea glycoconjugates in normal and hyperplastic glands of human prostate. **Journal of Molecular Histology**. 36: 235–242

Nakanishi, K.; Kawai, T.; Suzuki, M. (1993) Lectin binding and expression of blood group-related antigens in carcinoma-in-situ and invasive carcinoma of urinary bladder. **Histopathology**. 23(2):153-158.

Nangia-Makker, P.; Conklin, J.; Hogan, V.; Raz, A. (2002) Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. **Molecular Medicine**. 8: 187-192.

Netto JR, N.R. & Wroclawski, E. R. (2001) Urologia – Fundamentos para o Clínico. Editora: Savier – SP. Pag. 177-78.

Nickel, J.C. (2007) Inflammation and Benign Prostatic Hyperplasia. **Urologic Clinics North America**. 35:109–115.

Nilsson, C.L. (2003) Lectins: proteins that interpret the sugar code. **Analytical Chemistry**. 75: 348A-353A.

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

Nishimura, A.; Sawada, S.; Ushiyama, I.; Yamamoto, Y.; Nakagawa, T.; Nishi, K. (2000) Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain. **Forensic Science International**. 113(1-3): 265-269.

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

Ohtsubo, K. & Marth, J.D. (2006) Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. **Cell**. 126: 855 – 867.

Oliveira, M.D.; Andrade, C.A.; Santos-Magalhães, N.S.; Coelho, L.C.; Teixeira, J.A.; Carneiro-da-Cunha, M.G.; Correia, M.T. (2008) Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**. 46(3):371-6.

Orntoft, T.F. & Vestergaard, E.M. (1999) Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. **Electrophoresis**. 20: 362-371.

OZEKI, Y., MATSUI, T., NITTA, K., KAWAUCHI, H., TAKAYANAG, TITANI, K. (1991) Purification and characterization of β -galactoside binding lectin from frog (*Rana catesbiana*) eggs. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. 178: 407-13.

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

Park, S.; Lee, M-R.; Pyo, S-J.; Shin, I. (2004) Carbohydrate Chips for Studying High-Throughput Carbohydrate-Protein Interactions. **Journal of the American Chemical Society**. 126: 4812-4819.

Park, S.; Lee, M-R.; Pyo, S-J.; Shin, I. (2008) Chemical Tools for Functional Studies of Glycans. **Chemical Society Reviews**. 37: 1579-1591.

Pecorino, L. (2005) Molecular Biology of Cancer – Mechanisms. **Targets and Therapeutics**. p. 243.

Peterson, E.A. (2005) Normal cell growth and development. Disponível em: <<http://healthlibrary.epnet.com/GetContent.aspx?token=88a4eeeb-f78d-4522-b3c7-3e4ecb98dd7c&chunkid=36702>>. Acessado em 3 de abril, 2006.

Peumans, W.J. & Van Damme E.J. (1995) The role of lectins in plant defence. **Histochemical Journal**. 27 (4): 253-71.

Ponchel, G. & Irache, J.-M. (1998) Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 34(2-3): 191-219.

Rabinovich, G.A. (1999) Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. **Cell Death & Differentiation**. 6(8):711-21.

Remani, P.; Pillai, K.R.; Haseenabeevi, V.M.; Ankathil, R.; *et al.* (1994) Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. **Neoplasma**. 41 (1): 39-42.

Revista Science 291 nº 5512 (2001). American Association for the Advancement of Science.

Rizzo, S., Attard, G., Hudson, D. L. (2005) Prostate epithelial stem cells. **Cell Proliferation**. 38: 363–374.

Rüdiger, H. (1998) Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomia**. 161 (1-4): 130-52.

Rüdiger, H.; Siebert, H-C.; Solís, D.; Barbero, J.J.; Romero, A.; Lieth, C.W.; Mauriño, T.D.; Gabius, H-J. (2000) Medicinal Chemistry Based on the Sugar Code: Fundamentals of Lectinology and Experimental Strategies with Lectins as Targets. **Current Medicinal Chemistry**. 7: 389-416

Santos, A.C.O.; Peixoto, C.A.; Coelho, L.C.B.B. (2004) Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds. **Micron**. 35: 613-618.

Satish, P.R. & Surolia, A. (2001) Exploiting lectin affinity chromatography in clinical diagnosis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. 49 (1-3): 625-40.

Satoh, A. & Matsumoto, I. (1999) Analysis of Interaction between Lectin and Carbohydrate by Surface Plasmon Resonance. **Analytical Biochemistry**. 275: 268–270.

Scott, L. J.; Clarke, N. W.; George, N. J. R.; Shanks, J. H.; Testa, N. G.; Lang, S. H. (2001) Interactions of human prostatic epithelial cells with bone marrow endothelium: binding and invasion. **British Journal of Cancer**. 84: 1417-1423.

Sharon, N. & Lis, H. (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. 14: 53-62.

Sharon, N. (1998) Lectins: from obscurity into the limelight. **Protein Science**. 7: 2042–2048.

Shi, J.; Sun, Z.; Cai T.; Yang L. (2004) Development and validation of a quality-of-life scale for Chinese patients with benign prostatic hyperplasia. **BJU International**. 94: 837-844.

Sharon, N. (2007) Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **Journal of Biological Chemistry**. 282 (5): 2753–2764.

Signoretti, S. & Loda, M. (2007) Prostate stem cells: From development to cancer. Review - **Seminars in Cancer Biology**. 17: 219–224

Slifkin, M. & Doyle, R. J. (1990) Lectins and their application to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**. 3(3): 197-218

Smetana, K.Jr. & André, S. (2008) Mammalian lectin as tool in glycochemistry and histochemistry with relevance for diagnostic procedure. **Methods in Molecular Biology**. 418:171-86.

Smith, D.R. (1992) Urologia Geral. Editora: Guanabara Koogan, 13ª edição, Rio de Janeiro.

Sonawane, N.D.; Zhao, D.; Zegarra–Moran, O.; Galietta, L.J.V.; Verkman, A.S. (2007) Lectin Conjugates as Potent, Nonabsorbable CFTR Inhibitors for Reducing Intestinal Fluid Secretion in Cholera. **Gastroenterology**. 132 (4): 1234-1244.

Souza, G.A.; Oliveira, P.S.L.; Trapani, S.; Santos, A.C.O.; Rosa, J. C.; Laure, H. J.; Faça, V. M.; Correia, M.T.S.; Tavares, G. A.; Oliva, G.; Coelho, L.C.B.B.; Greene, L. J. (2003) Amino acid sequence and tertiary structure of Cratylia mollis seed lectin. **Glycobiology**. 13(12):961-72.

Stangelberger, A.; Schally, A.V.; Djavan, B. (2008) New treatment approaches for prostate cancer based on peptide analogues. **European Urology**. 53(5):890-900.

Stoss, O. & Henkel, T. (2004) Biomedical marker molecules for cancer – current status and perspectives. **Targets**. Vol. 3, Nº. 6.

Stryer, L. (1992). **Bioquímica**, Rio de Janeiro, Guanabara Kooagan.

Sumner, J. B. & Howell, S. F. (1936) Identification of concanavalin A with the hemagglutinin of jack bean. **Journal Bacteriology**. 32: 227–237.

Taniguchi, C. M.; Emanuelli, B.; Kahn, R. (2006) Critical nodes in signaling pathways: insight into insulin action. **Nature Reviews / Molecular Cell Biology**. 7: 85-96.

Taniguchi, K.; Koida, A.; Mutoh, K. (2008) Comparative lectin histochemical studies on taste buds in five orders of mammals. **Journal of Veterinary Medical Science**. 70(1):65-70.

Taylor, M. E. & Drickamer, K. **Introduction to Glycobiology**; Oxford University Press: Oxford, 2002.

Thies, A.; Moll, I.; Berger, J.; Schumacher, U. (2001) Lectin binding to cutaneous malignant melanoma: HPA is associated with metastasis formation. **British Journal of Cancer**. 84(6): 819-823.

Thöm, I.; Schult-Kronefeld, O.; Burkholder, I.; Goern, M.; Andritzky, B.; Blonski, K.; Kugler, C.; Edler, L.; Bokemeyer, C.; Schumacher, U.; Laack, E. (2007) Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung. **Lung Cancer**. 56: 391—397.

Triantafyllou, A.; Fletcher, D.; Scott, J. (2004) Glycosylations in demilunar and central acinar cells of the submandibular salivary gland of ferret investigated by lectin histochemistry. **Archives of Oral Biology**. 49(9):697-703.

Trigueros, V.; Lougarre, A.; Ali-Ahmed, D.; Rahbé, Y.; Guillot, J.; Chavant, L.; Fournier, D.; Paquereau, L. (2003) Xerocomus chrysenteron lectin: identification of a new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1621(3):292-8

Turnbull, J. E. & Field, R. A. (2007) Emerging glycomics technologies. **Nature Chemical Biology**. 3 (2): 74-77.

Van Leenders, G.J.L.H. & Schalken, J.A. (2001) Stem cell differentiation within the human prostate epithelium: implications for prostate carcinogenesis. **BJU International** 88(Suppl. 2): 35- 42.

Vasconcelos, A.C. (2000) Patologia Geral em Hipertexto. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG.

Wang, H.; Gao, J.; Ng, T.B. (2000) A new lectin with highlt potent anti-hepatoma and anti-sarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 275(3): 810-816.

Wang, H.X. & Ng, T.B. (2006) Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with

antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 342 (1): 349-53.

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

Weinberg, R.A. (1996) How cancer arises. **Scientific American**, New York, p. 32-40.

Weng, J.; Song, X.; Li, L.; Qian, H.; Chen, K.; Xu, X.; Cao, C.; Ren, J. (2006) Highly luminescent CdTe quantum dots prepared in aqueous phase as an alternative fluorescent probe for cell imaging. **Talanta**. p.1-6.

Wetzel, A. & Becich M. (2000) An Objective View of Cancer. Disponível em: <http://www.psc.edu/science/Wetzel/objective_view_of_cancer.html>. Acessado em 22 de maio de 2006.

Wormald, M. R. & Dwek, R. A. (1999) Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. **Structure**. 7:155–160

Xiong, C.; Li, W.; Liu, H.; Zhang, W.; Dou, J.; Bai, X.; Du, Y.; Ma, X. (2006) Anormal mucin-binding lectin from the sponge *Craniella australiensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology & Pharmacology**. 1: 9-16.

Yamamotoa, K.; Itoc, S.; Yasukawac, F.; Konamia, Y.; Matsumotoa, N. (2005) Measurement of the carbohydrate-binding specificity of lectins by a multiplexed bead-based Xow cytometric assay. **Analytical Biochemistry**. 336: 28–38.

Yamashita, K.; Hara-Kuge, S.; Ohkura, T. (1999) Intracellular lectins associated with *N*-linked glycoprotein traffic. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1473(1): 147-160.

Yeasmin, T.; Tang, M.A.; Razzaque, A.; Asbar, N. (2001). Purification and characterization of three galactose specific lectins from mulberry seeds (*Morus* sp.). **European Journal of Biochemistry**. 268: 6005-6010.

Ziółkowska, N. E. & Wlodawer, A. (2006) Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity. **Acta Biochimica Polonica**. 53 (4):617–626.

Zheng, T.; Peelen, D.; Smith, L.M. (2005) Lectin arrays for profiling cell surface carbohydrate expression. **Journal of the American Chemical Society**. 127(28): 9982-3.

4. MOTIVAÇÃO CIENTÍFICA

Em alguns tipos de câncer, o diagnóstico diferencial, entre as neoplasias benignas e malignas ou entre as neoplasias e o tecido normal, é dificultado por critérios histopatológicos sendo importante identificar e estabelecer informações extras. Neste aspecto, as lectinas são capazes de identificar modificações nos padrões de expressão de carboidratos nas células dos epitélios normais e transformados contribuindo no diagnóstico e prognóstico de processos neoplásicos.

O câncer de próstata é uma doença de alta incidência com um número cada vez maior de casos diagnosticados anualmente, provavelmente pela expansão da detecção usando técnicas de diagnóstico cada vez mais simples e também pelo aumento do número de homens idosos. Apesar da idade e a história familiar serem os principais fatores de risco dessa doença, ainda há controvérsias quanto à eficiência do tratamento quando do diagnóstico, do próprio diagnóstico, e, em geral, do gerenciamento das muitas etapas desta doença.

Sabendo-se que podem ocorrer aberrações na glicosilação de carboidratos durante processos patológicos e de diferenciação celular como na carcinogênese. As lectinas têm representado serem ferramentas valiosas na identificação e monitoração dessas alterações de glicosilação, por causa de sua especificidade a carboidratos de glicoconjugados de superfície ou de organelas citoplasmáticas.

Lectinas de sementes de *C. mollis* (Cramoll) têm sido investigadas no Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco. Quatro formas moleculares já foram identificadas nas sementes de *C. mollis* com diferentes especificidades a carboidratos e vários estudos já identificaram e continuam avaliando seus diversos papéis biotecnológicos.

Desta forma, despertou-se o interesse em investigar o padrão e as alterações no perfil de carboidratos da superfície celular expressos em tecidos prostáticos humanos, utilizando a histoquímica com lectinas, empregando lectinas de sementes de *C. mollis* como potenciais marcadores histoquímicos. As informações sobre as alterações patobioquímicas da próstata, em diferentes processos neoplásicos, contribuirão com informações para a caracterização dos tumores desse órgão e possibilidade de desenvolvimento de estratégias de utilização de fármacos inteligentes capazes de diminuir os efeitos secundários durante tratamentos. Contribuindo também para a divulgação do potencial de lectinas regionais extraídas e purificadas em nosso laboratório.

5. OBJETIVOS

5.1 GERAL

Avaliar o potencial das isolectinas de *Cratylia mollis*, Cramoll 1,4 e Cramoll 3, conjugadas a peroxidase, frente a lectinas comerciais, como potenciais marcadores histoquímicos para tecidos prostáticos.

5.2 ESPECÍFICOS

- Conjugar Cramoll 1,4 e Cramoll 3 à peroxidase;
- Obter os blocos de tecidos de pacientes com Hiperplasia Benigna Prostática e com Adenocarcinoma Prostático no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Pernambuco;
- Realizar a histoquímica com lectinas das biópsias de tecidos prostáticos (normal, hiperplasia benigna e adenocarcinoma);
- Avaliar o perfil de carboidrato correlacionado com a marcação obtida a partir da histoquímica com lectinas;
- Realizar a comparação de marcação entre as lectinas de *C. mollis* (Cramoll 1,4 e Cramoll3) e as lectinas comerciais (Con-A e PNA);
- Analisar a incidência dos corpos amiláceos na hiperplasia e no adenocarcinoma, bem como caracterizá-los em relação aos perfis de carboidratos expostos.

6. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO *JOURNAL OF BIOMEDICINE AND BIOTECHNOLOGY*

**HISTOCHEMICAL EVALUATION OF HUMAN PROSTATIC TISSUES
WITH *Cratylia mollis* SEED LECTIN**

Lima, A. L. R.^{1,2}; Cavalcanti, C. B. L.²; Melo, R. J. V.³; 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, 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.

ABSTRACT

Lectins, proteins which recognize selectively carbohydrates, have been used in histochemistry for the evaluation of changes in glycosylation in processes of cellular differentiation and/or dedifferentiation. Isoforms from *Cratylia mollis* seeds (Cramoll 1,4 and Cramoll 3), conjugated to horseradish peroxidase, were used as histochemistry 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 where in the later staining intensity decreased while the malignancy degree increased. PNA and Cramoll 3 stained similarly epithelial cells in all diagnosis, although they have presented intense staining of PCa glands lumen. Corpora amylacea was not differentially recognized by none of lectins. Cramoll 1,4 and 3 seed lectins present themselves as candidate for histochemistry probes for prostate pathologies when compared to commercial lectins as Con-A and PNA.

Keywords: lectin histochemistry, *Cratylia mollis*, prostate, cancer, corpora amylacea.

INTRODUCTION

Prostate is one of the major male sex glands and your fluid provides nutritional support to semen [1]. It has three anatomical glandular zones: peripheral, transitional, and central zone. Benign prostatic hyperplasia (BPH) occurs almost exclusively within the transitional zone (TZ) of the prostate. Most prostate cancers (PCa) occur in the peripheral zone (PZ), only 30% of prostate cancers consist of TZ tumors [1,2]. The prostatic epithelium is made up of three major cell types: secretory, basal and neuroendocrine cells. The secretory cells line the prostatic glands and ducts. The basal cells are much less abundant and rest on the adjacent basement membrane. Their absence is a useful marker of prostate cancer. Neuroendocrine cells are scattered throughout the gland. The prostate is supported by a stroma composed of smooth muscle cells, fibroblasts, lymphocytes and neurovascular tissue in a supporting extracellular matrix [1].

At intraluminal region of prostate gland are found small nodular formations, called corpora amylacea (CA), but they are also described in other tissues such as brain, lung and uterus [3, 4, 5]. In prostate, they are protein bodies with a high content of mucopolysaccharides. However, origin and function of these structures are still much debated [3].

The two most common diseases that affect the prostate are BPH and PCa. BPH is correctly defined as enlargement of the prostate gland from the progressive hyperplasia of stromal and glandular prostatic cells and up to 80% of men aged 70–80 years have histological evidence of BPH [1,6]. Clinical BPH refers to the lower urinary tract symptoms (LUTS) associated with benign prostatic enlargement on urethra with acute urinary retention [6].

Prostate cancer is the most commonly diagnosed male malignancy and the second leading cause of male cancer death in the Western world [7,8]. Although prostate cancer is a major cause of cancer-related death, mortality rates have increased less than incidence rates in many countries [8]. In Brazil, according to the National Cancer Institute [9], the PCa remains in 2nd place, in incidence, behind skin tumors (non-melanoma) and, in mortality, is exceeded only by lung cancer. Like most common cancers, the etiologic factors associated with prostate cancer are varied, encompassing both host genetic and environmental influences [10]. Etiologic factors include aging, familial clustering, race, hormonal influences, diet and lifestyle factors [11].

Glycosylation is one of the most common co- or post-translational modifications. Into cells complex glycosylation pathways assemble these oligosaccharides, which attach to proteins and lipids [12,13]. Despite their peripheral localization, these oligosaccharide epitopes exert key functions in most processes that involve cell interactions with their environment, including differentiation, inflammation, fertilization, apoptosis and cell growth [14,15,16]. Glycoconjugates are highly complex and heterogeneous molecules so many advances in analytical methodologies used to characterize them have been made [17]. And particular carbohydrate epitopes are recognized by membrane-anchored carbohydrate-recognition domains of different molecules such as receptors, enzymes, antibodies or lectins [15].

Lectins are proteins that interact with carbohydrate reversibly and with high specificity [18]. They have been used as models for the study of the molecular basis of protein-carbohydrate interaction and specificity. Sharon and Lis [19] have elucidated many involvements of these proteins in diverse biological processes. Lectins act as central mediators of information transfer in biological systems [20] and are often used as tools for the structural and functional study of complex glycans and as diagnostic markers in some diseases such as cancer [13,15,16]. Thus, modifications in the carbohydrate moieties in glycoconjugates in cell surface and in cytoplasm during malign transformation in tumours can be studied with lectin histochemistry.

Cratylia mollis, (camaratu bean), is a native forage from the semi-arid region of the Northeast of Brazil and her seeds have been considered an important lectin source (Cramoll), supplying multiple molecular forms (Cra 1 to 4) with different carbohydrate specificities [21,22].

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 Cra Iso 1 and Cra Iso 4, glucose/mannose-specific and Cramoll 3 galactose-specific) in tissues of human prostate. Con A and PNA were used for binding comparison since possess the same carbohydrate specificity of Cramoll 1,4 e Cramoll 3, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Specimens and tissue processing

Normal human prostate tissue (n=8) was obtained from the Obit Identification Service at Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, Brazil. Biopsies of benign prostatic hyperplasia, BPH (n=61) and prostatic carcinoma, PCa (n=82) fixed in 10% formalin and embedded in paraffin were obtained from the Clinical Hospital of Pernambuco, Brazil. Patients aged between 31-69 years (mean 44) at the time of diagnosis to normal tissue, 46-92 years (mean 69) to benign prostatic hyperplasia and 52-88 (mean 66) to prostatic carcinoma.

Horseradish peroxidase (HRP) Lectins Conjugation

Cramoll 1,4 and Cramoll 3, purified according to Correia and Coelho [22] and Paiva and Coelho [21], respectively, were kindly provided by Glycoproteins Laboratory of Federal University of Pernambuco, Brazil. Lectins (Cramoll 1,4 and Cramoll 3) conjugation to horseradish peroxidase (HRP) was performed according to Beltrão et al [23]. Lectins were dialyzed against 0.1 M sodium phosphate buffer (PBS) pH 6.8 for 16 h at 4 °C. HRP was added to dialyzed lectins (3 mg of HRP for 1 mg of lectin); the solutions were gently stirred and 50 µl of 1% (v/v) glutaraldehyde aqueous solution was added. After conjugation reaction (2 h at 25 °C) solutions were dialyzed against 0.01 M PBS pH 6.8 containing 0.15 M NaCl, for 16 h at 4 °C. The conjugation efficiency of Cramoll 1,4-HRP and Cramoll 3-HRP was evaluated by electrophoresis and hemagglutinating assays [22] using 2.5 % (v/v) glutaraldehyde-treated rabbit erythrocytes solution in 0.15 M NaCl. Con-A and PNA conjugated to peroxidase (Con A-HRP and PNA-HRP) were supplied by Sigma Chemical Company. Inhibition assays of lectin-carbohydrate binding were carried out with lectin specific sugars, methyl- α -D-mannopyranoside for Con A and Cramoll 1,4 and D-galactose for PNA e Cramoll 3, at a final concentration of 0.3 M.

Poliacrylamide gel electrophoresis

Poliacrylamide gel electrophoresis (10% w/v) for basic and native proteins was carried out with conjugated and non-conjugated lectins. Protocols were described by Paiva and Coelho [21].

Lectin Histochemistry

Tissue sections (4 μ m) were adhered to albumenized slides. Histological slices were deparaffinized in xylene and hydrated through graded alcohol (100-70%). Slices were treated with 0.1% (w/v) trypsin solution for 2 min at 37 °C, followed by 0.3% (v/v) methanolic hydrogen peroxide solution for 15 min at 25 °C. Sections were incubated with HRP-conjugated lectins (Con A-HRP, Cramoll 1,4-HRP, PNA-HRP and Cramoll 3-HRP at 8, 15, 25, 30 and 60 μ g/mL) for 2 h at 4 °C. Slides were washed (twice 5 min) with 10mM phosphate buffer (PBS) pH 7.2, containing 0.15 M NaCl, after each step. Peroxidase was visualized with diaminobenzidine (DAB) and hydrogen peroxide in PBS [23]. Tissue sections were counterstained with haematoxylin. Binding inhibition controls were carried out using methyl- α -D-mannopyranoside (0.3 M) for Cramoll 1,4 and Con-A, and D-galactose (0.3 M) for Cramoll 3 and PNA.

Light Microscopy

Tissue sections were examined by an optic microscope (Nikon Eclipse 50i, USA). Intensity scale was determined as the pattern observed in the majority of the cells in the tissue slice and it was scored as 0 - no staining, 1 - minimal staining, 2 - moderate staining and 3 - intense staining. Controls were also evaluated. Digital images were obtained with an Image Analyses System (*software* NIS – Elements F version 2.30 - Nikon^R, USA).

Statistic Analysis

Staining intensity results were analyzed by nonparametric tests (Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis, followed by multiple comparison post-test of Dunn) with significance level of 95% ($p < 0.05$) using the *software* GraphPad Prism version 5.00.

RESULTS

Horseradish Peroxidase (HRP) Lectin Conjugation

The conjugation efficiency was evaluated via gel electrophoresis for basic and native proteins of Cramoll 3 and 1,4 conjugated and not conjugated to HRP. Gel showed that conjugated lectins migrated more slowly than their respective non-conjugated counterparts (Figure 1). Although it decreased the concentration of protein after conjugation, the conjugates did not lose their activities (data not shown).

Pathologic Findings

Corpora amylacea was observed in 50,8% of the 61 cases of BPH. For adenocarcinoma (n = 82 needle biopsy specimens) the Gleason score was of 2+2=4 in 3, 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 3 and 5+5=10 in 3. Of these patterns, corpora amylacea were located in 31 of 82 (40,2%) specimens and, predominantly, within Gleason pattern 3. Results showed that corpora amylacea was more common in BPH but also presented a high incidence in adenocarcinoma.

Lectin Histochemistry

Cytoplasm of normal prostate cells were weak and moderate stained by Con-A and Cramoll 1,4 (15µg/mL), respectively. Normal tissue stroma was moderate stained by Con-A but not by Cramoll 1,4 (Figure 2A, 2B). Hyperplastic epithelial cells were stained by both lectins, Con-A and Cramoll 1,4, mainly in the apical cytoplasm and cellular limits. Cramoll 1,4 staining pattern was high in most of the cases (Figure 2C, 2D). Adenocarcinoma samples presented heterogeneous Gleason scores. Con-A and Cramoll 1,4 staining intensity decreased while the malignancy degree increased, i.e., in well differentiated tissues both lectins showed a moderate staining while in undifferentiated tissues no staining was observed. It is worth mentioning that adenocarcinoma staining was more evident using Cramoll 1.4 (Figure 3A to 3D). Stroma in hyperplastic and neoplastic tissues were not stained by both lectins.

Figure 4 presents the statistical comparison of the staining patterns of Cramoll 1,4 and Con-A in samples studied. Results indicate that in all diagnoses Cramoll 1,4 always presented a higher staining than Con-A. The intensity of staining for both lectins in tissues with hyperplasia was higher and still very strong for Cramoll 1,4. Only Con-A presented a specific pattern of staining in normal tissue different from that observed in hyperplastic tissue. Comparing PCa and hyperplastic tissue both lectins were effective in differentiate one from another regarding their different staining pattern.

PNA and Cramoll 3 (25 µg/mL – galactose specific), stained weakly the normal tissue not presenting a different staining pattern between stroma and glandular tissue (Figure 5A, 5B). BPH and PCa neoplastic cells were not differentially stained by them, showing a very weak to negative and heterogeneous pattern, even using a higher lectin concentration (Figure 5C, 5D). In adenocarcinoma these lectins presented a focal and intense staining pattern in luminal secretion and apical membrane of glandular tumour cells (Figure 5E, 5F). PCa stroma was moderately stained by PNA and Cramoll 3.

The statistical comparison between binding patterns of Cramoll 3 and PNA in cells of in studied samples are abridged in Figure 6. PNA and Cramoll 3 stained weak and similarly the normal tissue but did not recognize the carcinoma and hyperplastic cells, in which they have subtle differences in staining between them.

Corpora amylacea was not stained with a homogeneous pattern for all lectins used. In BPH, the staining pattern for Cramoll 1,4 and Cramoll 3 in some of the cases was more intense than that observed when the commercial lectins were used (Figure 7A to 7D). When observed in PCa the corpora amylacea were not stained by the four lectins used.

Lectin staining was completely abolished by inhibition of the carbohydrate-binding site of lectins with solutions of methyl- α -D-mannopyranoside 0,3M for Con-A and Cramoll 1,4 and D-galactose 0,3M for PNA and Cramoll 3 in all tissues .

DISCUSSION

Lectins probe the localization of their specific sugars in cells and tissues and when conjugated to horseradish peroxidase (HRP), for example, such site can be visualized [24]. Conjugation efficiency to HRP of in house purified proteins is very important to assure the quality of histochemical assays. Ours results indicated that Cramoll 3 and Cramoll 1,4 were properly conjugated to HRP as presented in results using the methodology according to Beltrão et al [23].

A number of cellular recognition events are thought to involve the specific binding of a structure expressed on one cell surface to a particular receptor on another cell. Carbohydrates represent a fundamental building unit of living organisms [25]. Many contemporary researches present these remarkable data storage capacity molecules, as a glycode, which is decoded by special counterpart receptors, naming lectins [25,26].

Lectins are proteins or glycoproteins that bind selectively carbohydrate ligands without enzyme dependence and are present in organisms on different levels of evolutionary development [27]. Due to this ability lectins have been used as a molecular tool in biology and medicine [19].

As histochemical probes, lectins provide practical application during observation of changes occurring in the cell membrane and cytoplasm in different stages of physiological and pathological development of human or animal organisms [19]. Many tissues has been characterized by lectins such as mammary [23, 28, 29, 30], uterine [31], skin [32], lung [33,34], brain [35,36,37], salivary gland [38] as well as alterations of the prostate [39,40,41].

Arenas et al [41] did not observed differences in the staining intensity studying normal, hyperplastic and cancerous epithelium using the Con-A such result is probably due to the lectin concentration used (20µg/mL). Our studies showed that few micrograms are able to change the staining pattern and with that in mind we used the lowest lectin concentration leading to a differential staining pattern.

In our work Con-A and Cramoll 1,4 results were similar to those reported by Morales et al [3] using GNA (*Galanthus nivalis agglutinin* - 10µg/mL) and Con-A (20µg/mL) for normal and hyperplastic cells. They observed that normal prostatic glands showed a low content or accessibility to 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. These results suggest that an important secretion of glycoconjugates with mannose residues is produced in human

hyperplastic prostatic glands. The increase in mannose content can be related to a high production of glycoconjugates bearing mannose residues as observed in prostatic hyperplastic glands by presence of acid phosphatase (PAP) which contains high-mannose chains (N-linked) in its structure. Such feature was observed by Jakob et al [42]. The present study too suggest that the increased affinity for lectins in hyperplastic glands could be related to an increased secretory activity of prostatic cells in this pathological situation because of androgenic stimulation of prostatic epithelium in the hyperplastic tissue [5, 43].

Prostatic stroma constituted by smooth muscular and fibrous tissues with variable quantity of elastic fibers presented an intense staining only with Con-A in normal prostate. This result is in disagreement with Arenas et al [41] that observed a weak staining of stroma in normal, HPB and PCa. This occurred probably because they used different enzymatic treatments that may have cleaved expressed glycans in the stroma and as we treats tissues only with trypsin, Con-A was able to stain strongly to stromal glycans of normal tissues.

The differences between Con-A and Cramoll 1,4 staining patterns presented in this work indicates that Cramoll 1,4 has a diagnostic value to prostate diseases. Souza et al [44] described that Cramoll 1 (also glucose/mannose), purified from *C. mollis* seeds, taxonomically related to *Canavalia ensiformis* (legume which Con-A is extracted) differs from Con-A by 42/236 residues and that their topological architecture is essentially identical. Furthermore they have identical monosaccharide binding sites with identical hydrogen bond interactions between protein and methyl- α -D-mannoside. However, between Con-A and Cramoll 1 structures, they observed six substitutions in a groove adjacent to the mannose/glucose binding site and two in this site, which seem to be relevant to the interaction with oligosaccharides. This may explain the differences in binding of oligosaccharides and glycoproteins between Cramoll 1 and Con-A and possibly one of the explanations for differences of staining between Con-A and Cramoll 1,4, which contains Cramoll 1. Thus, the glycoconjugates expressed in pathological prostatic tissues seem to be more accessible to Cramoll 1,4.

In 1996, Jansen et al [40] observed that the binding of PNA increases from BPH to cancers. These authors also established a significant positive correlation between the numbers of PNA acceptors and those of prostatic specific antigen. In the present study, PNA and Cramoll 3 stainings was not observed in BPH and were very weak in prostatic carcinoma when both were compared to normal glands.

Corroborating with our findings, Arenas et al [41] using PNA at 25 μ g/mL found that epithelial cells in normal and hyperplastic prostate presented a very weak staining. In contrast

with our results, they asserted that most epithelial cells presented an intense staining in PCa for PNA. We observed that using PNA as well as Cramoll 3 (25µg/mL) in PCa, galactose residues increased only in luminal secretion and apical membrane of malign tumour glands and not in cytoplasm of epithelium cells. It is important to note that the absence and/or non-accessibility of these residues in epithelial cells can be evaluated using a neuraminidase pretreatment instead of or together with trypsin (as used in our work) in order to expose galactose non-accessible residues by the presence of sialic acid.

Arenas et al. justified the increase of galactose residues with western blotting, which new bands with molecular weight of 37, 42, 45 and 53 kDa appeared in prostatic carcinoma, when compared to western blotting of normal tissue and BPH. The moderate stroma staining in PCa it was also observed by Arenas et al [40]. From these findings it is suggested that the development of prostatic carcinoma is associated with an increase in galactose residues at luminal and stromal level and that according to Arenas et al [41] some of these residues are masked by sialic acid and sulfate groups.

The incidence of corpora amylacea in adenocarcinoma was lower than in BPH corroborating with findings from Christian and collaborators [4]. However, they affirmed the presence of such inclusions cannot be used to exclude malignancy.

Biochemically corpora amylacea are composed of amyloid substance, β_2 -microglobulin, with a double content of sugars (glucosamine and galactose) in relation to proteins and sulfur that suggest the presence of glycosaminoglycans [3, 4]. Our results showed that in hyperplastic glands the glycocomponents of corpora amylacea were increased regarding the normal prostate as also observed by Morales et al [3]. The high lectin staining in corpora amylacea of hyperplastic glands with respect to secretory cells is probably due to the accumulation of keratan sulfate after luminal secretion, a component which has been identified in both prostatic secretory cells and corpora amylacea [45].

The origin and function of corpora amylacea has been debated but your function continues unknown. Researches indicate that corpora amylacea have a secretory origin [46, 47, 3]. Since the lectin-binding pattern of secretory cells was correlated both with the luminal secretion and the corpora amylacea in normal and hyperplastic tissue and these patterns were similar [3].

Beyond structural roles in increasing the protein stability, protecting the protein from proteolysis and improving the protein solubility [48], glycosylation promotes also general functional diversity reflected on the high structural possibilities of glycans [49] which can be acting as key events in apoptosis, immuno-modulation, antiproliferative activity in tumours

cells [27]. 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 [27].

CONCLUSIONS

Our results showed that isoforms of *C. mollis* seeds are able to recognize cells and an extra-cellular 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 pathologies histologically related or similar this class of (glycol)proteins can be used as auxiliary tools in cancer diagnosis and prognosis as well as treatment. With that in mind Cramoll 1,4 and 3 seed lectins present themselves as candidate for histochemistry probes for prostate pathologies when compared to commercial lectins as Con-A and PNA.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) for research Grant.

REFERENCES

- [1] Joshua AM, Evans A, Van Der Kwast T, Zielenska M, Meeker AK, Chinnaiyan A, Squire JA. Prostatic preneoplasia and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008; 1785(2):156-81.
- [2] Diokno AC. Bening changes in the prostate with ageing. *British Journal of Urology*. 1998 ; 82 (1): 44 – 46.
- [3] Morales E, Polo LA, Pastor LM, Santamarý L, Calvo A, Zuasti A, Ferrer C. Characterization of corpora amylacea glycoconjugates in normal and hyperplastic glands of human prostate . *Journal of Molecular Histology*. 2005; 36: 235–242
- [4] Christian JD, Lamm TC, Morrow JF, Bostwick DG. Corpora amylacea in adenocarcinoma of the prostate: incidence and histology within needle core biopsies. *Modern Pathology*. 2005; 18: 36–39.
- [5] Balea IA, Illes P, Schober R. Affinity of corpora amylacea for oligonucleotides: Sequence dependency and proteinaceous binding motif. *Neuropathology*. 2006; 26: 277–282.
- [6] Nickel JC. Inflammation and Benign Prostatic Hyperplasia. *Urologics Clinics North America*. 2007; 35:109–115.

- [7] Garnero P. Markers of bone turnover in prostate cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2001; 27: 187–192.
- [8] Bryant RJ, Hamdy FC. Screening for Prostate Cancer: An Update. *European urology*. 2008; 53: 37–44.
- [9] Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2008. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2008. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>.
- [10] Isaacs W, De Marzo A, Nelson WG. Focus on prostate cancer. *Cancer Cell*. 2002; 2.
- [11] Hsing AW, Devesa SS. Trends and patterns of prostate cancer: what do they suggest? *Epidemiologic Reviews*. 2001; 23: 3–13.
- [12] Ohtsubo K, Marth J D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*. 2006; 126: 855 – 867.
- [13] Campbell CT, Sampathkumar S-G, Yarema KJ. Metabolic oligosaccharide engineering: perspectives, applications, and future directions. *Molecular BioSystems*. 2007; 3: 187–194.
- [14] Fukuda M, Hindsgaul O. Molecular and Cellular Glycobiology. Oxford University Press: Oxford 2000.
- [15] Jiménez-Castells C, De La Torre BG, Andreu D, Gutiérrez-Gallego R. Neoglycopeptides: the importance of sugar core conformation in oxime-linked glycoprobes for interaction studies. *Glycoconjugate Journal*. 2008; 25(9):879-87.
- [16] Horlacher T, Seeberger PH. Carbohydrate arrays as tools for research and diagnostics. *Chemical Society Review*. 2008; 37: 1414–1422.
- [17] Raju TS. Analysis of Glycoconjugates. *Analytical Biochemistry*. 2000; 283: 123–124.
- [18] Ambrosi M, Cameron NR, Davis BG. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2005; 3(9):1593-608
- [19] Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 2004; 14: 53-62.
- [20] Nilsson CL. Lectins: Analytical Tools from Nature. Tallahassee, USA:Elsevier. 2007.
- [21] Paiva PMG, Coelho LCBB. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1992; 36: 113-118.
- [22] 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; 5: 261-273.

- [23] Beltrão EIC, Correia MTS, Figuerêdo-Silva J, Coelho LCBB. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1998; 74: 125-134.
- [24] Spicer SS. Advantages of histochemistry for the study of cell biology. *Histochem Journal*. 1993; 25: 531-547.
- [25] Smetana KJr, André S. Mammalian lectin as tool in glycochemistry and histochemistry with relevance for diagnostic procedure. *Methods Molecular Biology*. 2008; 418:171-86.
- [26] Yamamotoa K, Itoc S, Yasukawac F, Konamia Y, Matsumotoa N. Measurement of the carbohydrate-binding specificity of lectins by a multiplexed bead-based flow cytometric assay. *Analytical Biochemistry*. 2005; 336: 28–38.
- [27] Końska G, Wójtowicz U, Pituch-Noworolska A. Possible application of lectins in diagnostics and therapy. Part I. Diagnostic application. *Przegl Lek*. 2008; 65(4):189-94.
- [28] Beltrão EIC, Figuerêdo-Silva J, Coelho, LCBB, Carvalho JR LB. Infiltrating ductal mammary carcinoma: lectin histochemistry study. *Anais Faculdade Medicina Universidade Pernambuco*. 2001; 46: 32-5.
- [29] Campos LM, Cavalcanti CLB, Lima-Filho JL, Carvalho Jr LB. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers*. 2006; 11(5): 480-484.
- [30] Korourian S, Siegel E, Kieber-Emmons T, Monzavi-Karbassi B. Expression analysis of carbohydrate antigens in ductal carcinoma *in situ* of the breast by lectin histochemistry. *BMC Cancer*. 2008; 8:136.
- [31] Remani P, Pillai KR, Haseenabeevi VM, AnKathil R., Bhattathiri VN, Nair MK, Vijayakumar T. Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. *Neoplasma*. 1994; 41(1): 39-42.
- [32] Lalwani, A. K., Carev, T. E., Goldstein, I. J., Peters, B. P. Lectin binding characteristics of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Acta Otolaryngology*. 1996; 116(1): 125-31.
- [33] Laack E, Nikbakht H, Peters A, Kugler C, Jasiewicz Y, Edler L, Kurt D, Hossfeld, Schumacher U. Lectin Histochemistry of Resected Adenocarcinoma of the Lung (Helix pomatia Agglutinin Binding Is an Independent Prognostic Factor) *American Journal of Pathology*. 2002; 160 (3): 1001 – 1008.
- [34] 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: 391—397.

- [35] Nishimura A, Sawada S, Ushiyama I, Yamamoto Y, Nakagawa T, Tanegashima A. et al. Lectin – histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain. *Forensic Science International*. 2000; 113: 265-9.
- [36] Nishi, K., Tanegashima, A., Yamamoto, Y., Ushiyama, I., Ikemoto, K., Yamasaki, S., Nishimura, A., Rand, S., Brinkmann, B. Utilization of lectin-histochemistry in forensic neuropathology: lectin staining provides useful information for postmortem diagnosis in forensic neuropathology. *Legal Medicine*. 2003; 5: 117-131.
- [37] Beltrão EIC; Medeiros PL; Figueredo-Silva J; Valença MM, Coelho LCBB, Carvalho Jr. LB. *Parkia pendula* Lectin as Histochemistry marker for Meningothelial Tumour. *European Journal of Histochemistry*. 2003; 47(2): 139-142.
- [38] Rêgo MJB, Santos LX, Sobral APV, Carvalho-Jr LB, Beltrão EIC. Lectin Histochemistry of Mucoepidermoid Carcinoma. *Oral Oncology Supplement*. 2005; 1(1): 178-179.
- [39] Allsbrook Jr WC, Simms WW. Histochemistry of the prostate. *Human Pathology*. 1992; 23 (3): 297-305.
- [40] Janssen T, Petein M, Van Velthoven R, Van Leer P, Fourmarier M, Vanegas JP, Danguy A, Schulman C, Pasteels JL, Kiss R. Differential histochemical peanut agglutinin stain in benign and malignant human prostate tumors: relationship with prostatic specific antigen immunostain and nuclear DNA content. *Human Pathology*. 1996; 27(12):1341-7.
- [41] Arenas MI, Romo E, de Gaspar I, de Bethencourt FR, 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):375-82.
- [42] Jakob CG, Lewinski K, Kuciel R, Ostrowski W, Lebioda L. Crystal structure of human prostatic acid phosphatase. *Prostate*. 2000; 42: 211–218.
- [43] Carson C, Rittmaster R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology*. 2003; 61: 2–7.
- [44] Souza GA; Oliveira PSL; Trapani S; Santos ACO; Rosa JC; Laure HJ; Faça VM; Correia MTS; Tavares GA; Oliva G; Coelho LCBB; Greene LJ. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. *Glycobiology* 2003; 13(12):961-72.
- [45] Cohen RJ, Holland JW, Redmond SL, McNeal JE, Dawkins HJ. Identification of the glycosaminoglycan keratan sulphate in the prostatic secretory cell. *Prostate*. 2000a; 44: 204–209.

- [46] Cohen RJ, McNeal JE, Edgar SG, Robertson T, Dawkins HJ. Characterization of cytoplasmic secretory granules (PSG), in prostatic epithelium and their transformation-induced loss in dysplasia and adenocarcinoma. *Human Pathology*. 1998; 29: 1488– 1494.
- [47] Cohen RJ, McNeal JE, Redmond SL, Meehan K, Thomas R, Wilce M, Dawkins HJ. (2000b) Luminal contents of benign and malignant prostatic glands: correspondence to altered secretory mechanisms. *Human Pathology*. 2000b; 31: 94–100.
- [48] Rosenfeld R, Bangio H, Gerwig G.J, Rosenberg R, Aloni R, Cohen Y. et al A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2007; 70:415-26.
- [49] Angeloni S, Ridet, JL, Kusy, N, Gao, H, Crevoisier, F, Guinchard, S, et al Glycoprofiling with microarrays of glycoconjugates and lectins. *Glycobiology*. 2005; 15:31-41.

Figure captions**Figure 1:**

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

Figure 2:

Histochemistry of prostatic tissues using Con-A and Cramoll 1,4. (A) Normal prostate stained by Con-A. The epithelium (*arrow*) shows a weak staining while stroma (*asterisk*) is highly stained. (B) Moderate staining by Cramoll 1,4 in the epithelium of normal glands. (C) Hyperplastic glands moderately stained by Con-A. (D) BPH epithelial cells showing a Cramoll 1,4 high staining in apical cytoplasm (*arrowheads*) and membrane (*arrow*). Magnification (A,B) x100; (C,D) x400.

Figure 3:

Histochemistry of PCa using Cramoll 1,4. (A and B) Gleason score 2 and 3 PCa stained with a moderate pattern, respectively. (C) Weak staining for Gleason score 4 PCa. (D) No staining of cells in Gleason score 5 PCa. Magnification (C) x100; (A, B, D) x400.

Figure 4: Statistic analysis of the lectin histochemistry in cells of human normal prostate, benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma with Con-A and Cramoll 1,4 ($p < 0.05$).

Figure 5: Histochemistry of prostatic tissues using PNA and Cramoll 3. (A and B) Normal prostate epithelium and stroma (*asterisks*) show a weak staining for PNA and Cramoll 3, respectively. (C and D) Hyperplastic prostatic glands (*arrows*) were not or were weakly stained by PNA and Cramoll 3, respectively. (E and F) Adenocarcinoma gland lumens (*arrows*) presented a high staining pattern for PNA and Cramoll 3, respectively. Magnification (A,B) and (E,F) x100; (C,D) x400.

Figure 6: Statistic analysis of lectin histochemistry in cells of human normal prostate, benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma with PNA and Cramoll 3 ($p < 0.05$).

Figure 7: Lectin histochemistry of corpora amylacea (*arrows*) in BPH (A to D). In hyperplastic prostatic glands, corpora amylacea show a weak binding with Con-A (A) and do not react with PNA (C), already Cramoll 1,4 (B) and Cramoll 3 (D) reacts moderately and weakly, respectively. Magnification x100.

Figure 1:

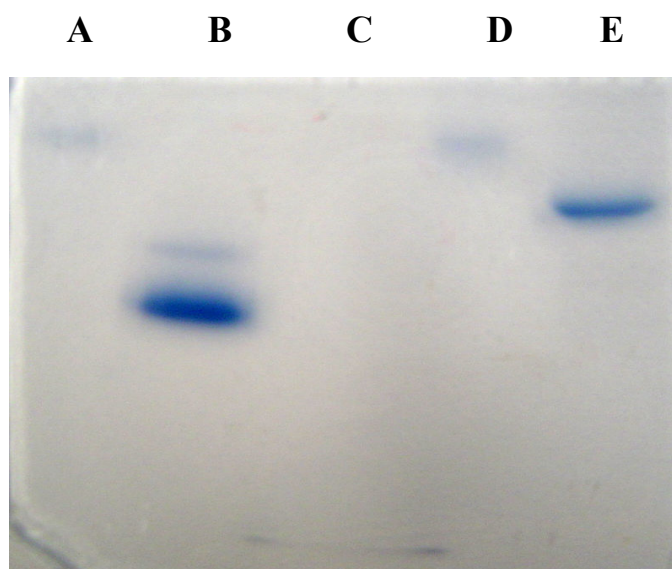


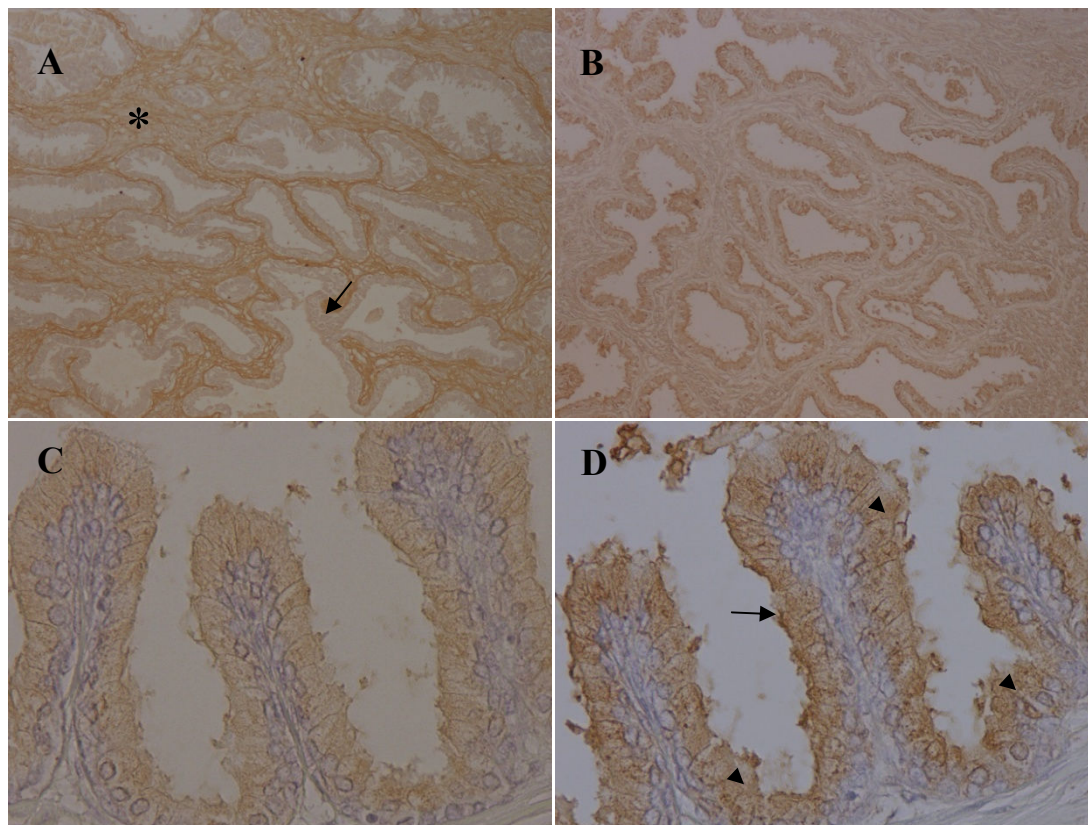
Figure 2:

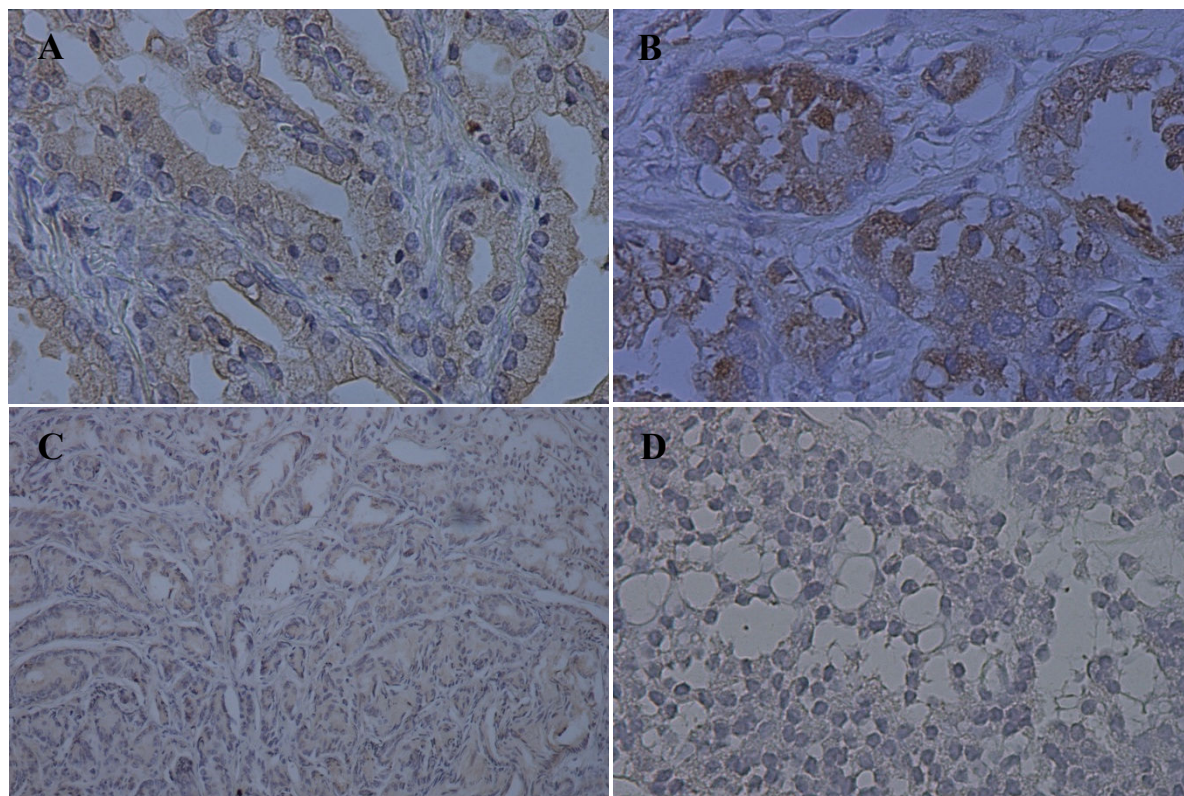
Figure 3:

Figure 4:

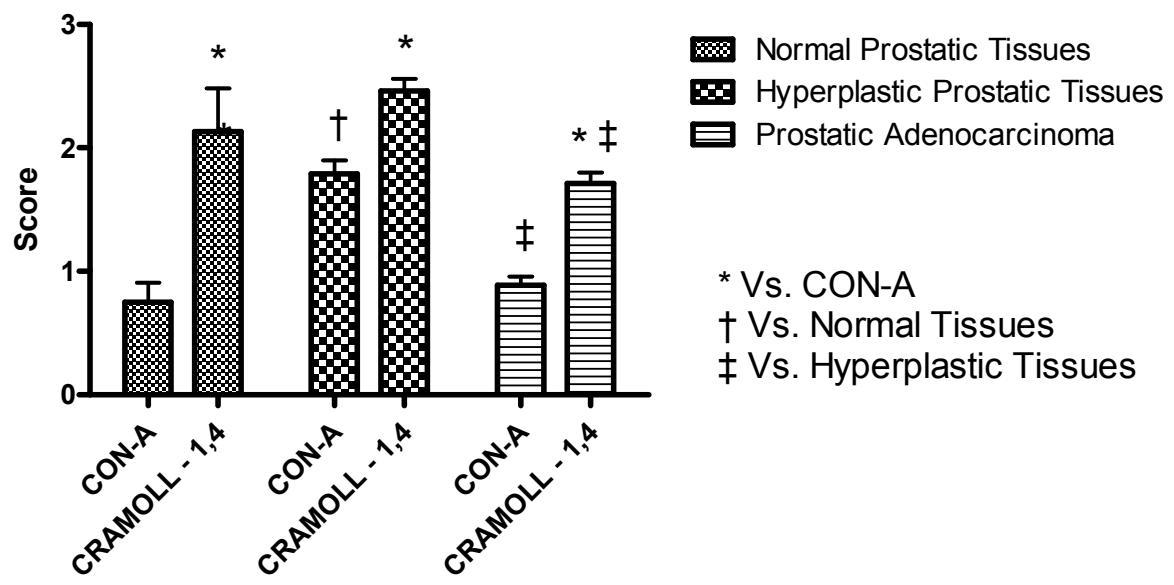


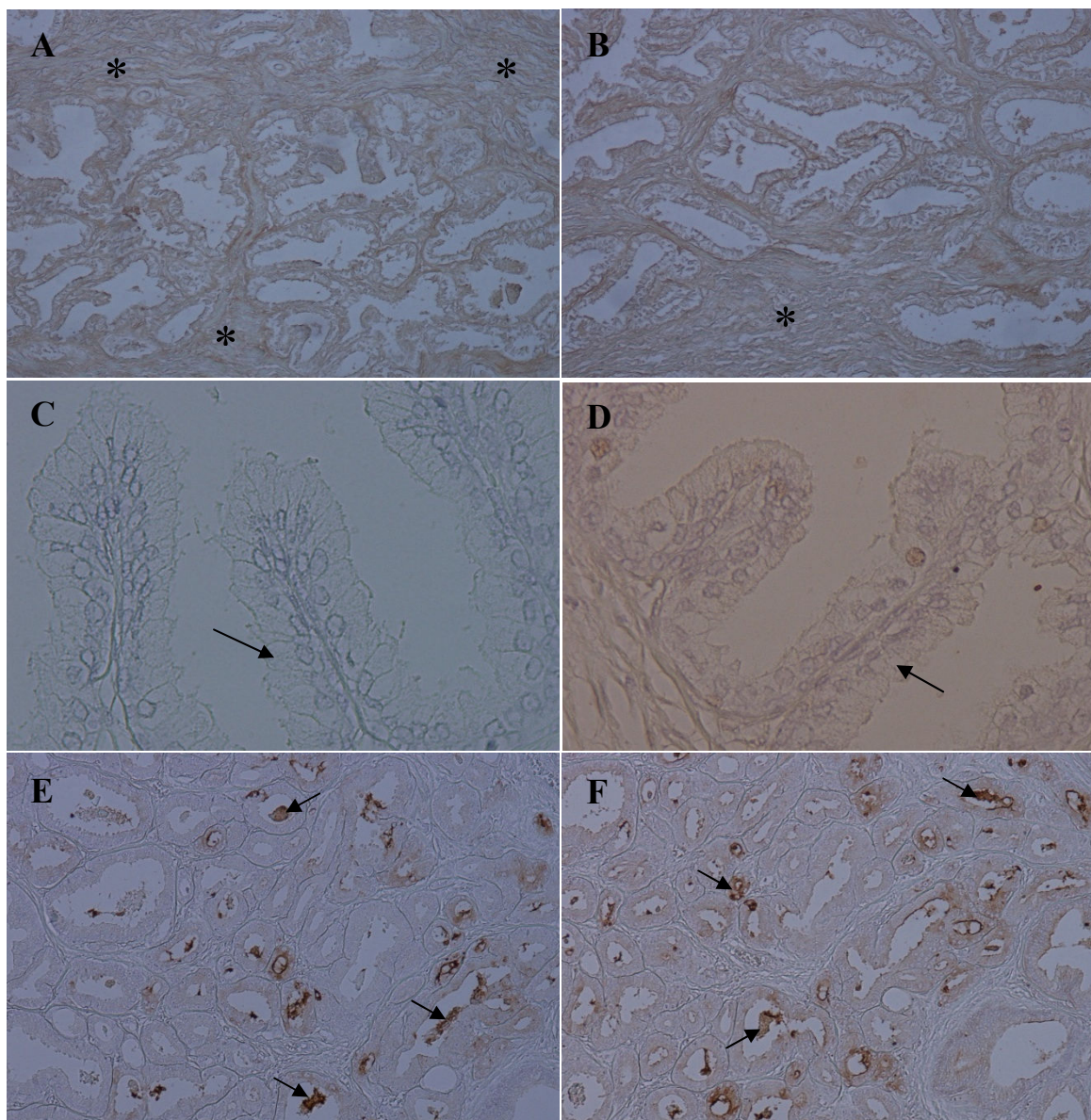
Figure 5:

Figure 6:

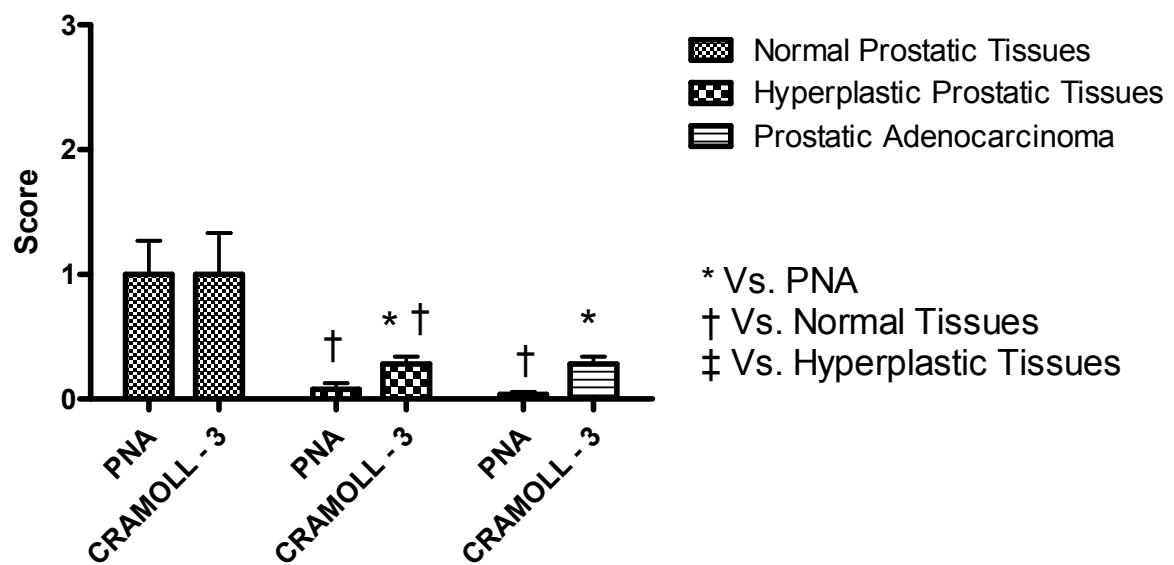
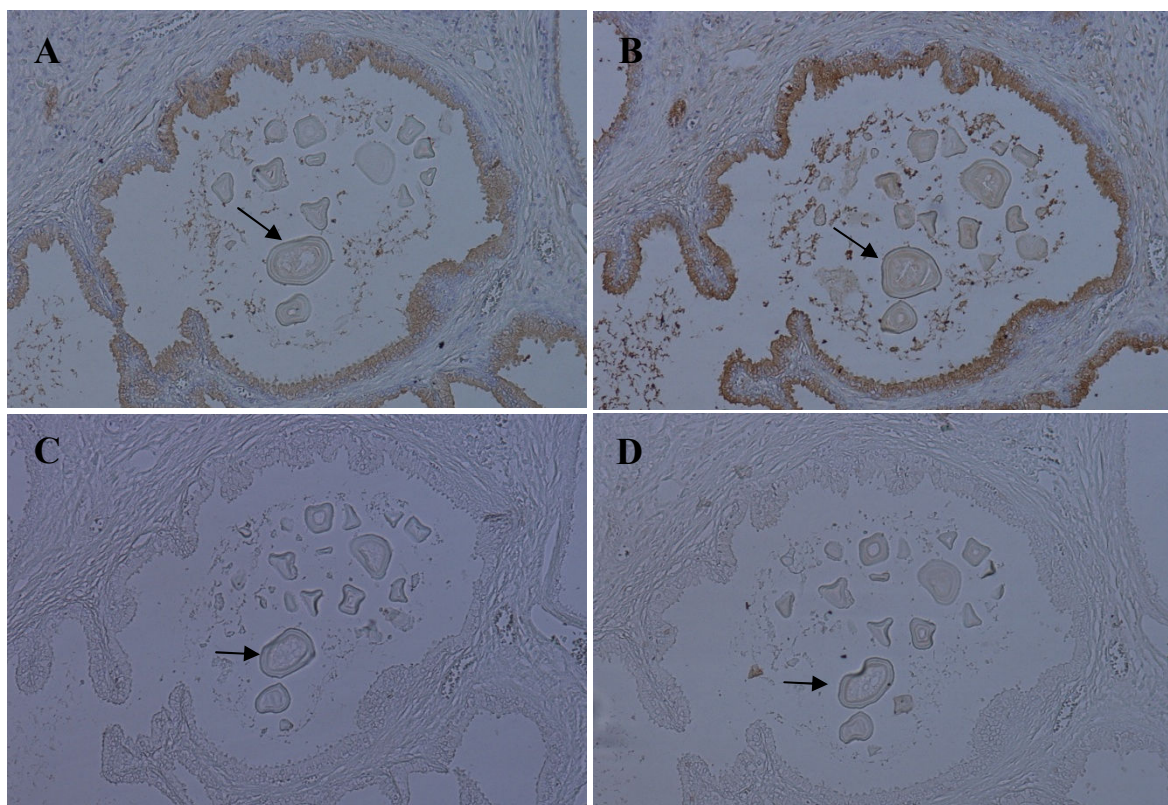


Figure 7:

7. CONCLUSÕES

- Os tecidos prostáticos apresentam diferenças nos padrões de expressão dos carboidratos;
- Lectinas de sementes de *C. mollis* são capazes de reconhecer células e estruturas extracelulares (corpos amiláceos) de tecidos protáticos;
- Cramoll 1,4 e Con-A (15 µg/mL) apresentam diferenças na intensidade de marcação celular, sendo a marcação de Cramoll 1,4 sempre mais forte que a Con-A;
- A marcação é mais forte e homogênea nas células hiperplásicas, principalmente, citoplasma apical e membrana;
- Cramoll 1,4 mostrou-se uma ferramenta auxiliar para caracterizar os graus de diferenciação tumoral no sistema de Gleason;
- PNA e Cramoll 3 (25 µg/mL) apresentam padrões de marcação semelhantes em todos os tecidos. Havendo uma presença forte e evidente de resíduos de galactose no lúmen das células glandulares com adenocarcinoma;
- Confirmou-se a diminuição do aparecimento de corpos amiláceos nos tecidos com câncer em relação à hiperplasia;
- Lectinas de sementes de *C.mollis*, usadas neste trabalho, se apresentam ou igualmente ou mais eficientes que as lectinas comerciais no padrão de reconhecimento às alterações prostáticas e podem ser fortes candidatas a ferramentas em histoquímica para patologias da próstata.

ANEXOS

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.

Lima, Amanda Lucena Rosendo de

Histoquímica com lectinas de sementes de *Cratylia mollis* analisando tecidos prostáticos humanos / Amanda Lucena Rosendo de Lima. – Recife: O Autor, 2009.

87 folhas: fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Bioquímica e Fisiologia, 2009.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Histoquímica 2. Lectinas 3. *Cratylia mollis* 4. Câncer de próstata I Título.

57.086

CDU (2.ED.)

UFPE

572

CDD (22.ed.)

CCB – 2009- 63