



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

JULIANA LÚCIA DE ALBUQUERQUE VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DO VALOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DO
CARBOIDRATO L-FUCOSE E DAS FUCOSILTRANSFERASES 3
E 6 EM TUMORES PROSTÁTICOS HUMANO**

Recife

2012

JULIANA LÚCIA DE ALBUQUERQUE VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DO VALOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DO
CARBOIDRATO L-FUCOSE E DAS FUCOSILTRANSFERASES 3
E 6 EM TUMORES PROSTÁTICOS HUMANO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Inovação Terapêutica como
requisito para obtenção do título
do Mestre em Inovação
Terapêutica.

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Departamento de Bioquímica - CCB/UFPE

Recife

2012

Vasconcelos, Juliana Lúcia de Albuquerque

Avaliação do valor diagnóstico e prognóstico do carboidrato L-fucose e das fucosiltransferases 3 e 6 em tumores prostáticos humano. – Recife: O Autor, 2012.

69 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

1. Tumores 2. Enzima 3. Próstata- câncer I. Título.

571.978 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-100

Vasconcelos, J.	Avaliação do valor diagnóstico e prognóstico de carboidratos em Carcinoma Prostático Humano		Mestrado PPGIT/UFPE 2012
-----------------	--	--	--------------------------------

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR(A) PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Ângela Maria Isidro Farias

VICE- DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Silvia Regina Arruda de Moraes

**COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profa. Dra. Suely Lins Galdino

**VICE- COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profa. Dra. Ana Cristina de Almeida Fernandes

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: VASCONCELOS, Juliana Lúcia de Albuquerque.

Título: Avaliação do valor diagnóstico e prognóstico de carboidratos em Carcinoma Prostático Humano

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof(a). Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof(a). Dr^a. Paloma Lys de Medeiros

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof(a). Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof(a). Dr^a. Valéria Rego Alves Pereira

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof(a). Dr^a. Maria da Paz Carvalho da Silva

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico, cheia de saudades, à minha amada **mãe Maria Lúcia de Albuquerque Vasconcelos** *“in memoriam”*, por ser hoje e sempre, o grande amor da minha vida, meu orgulho, meu exemplo de força, de amor, de fé, de caráter e de mulher. A ela que era a minha grande incentivadora, que lutava junto comigo para que todos os NOSSOS SONHOS fossem realizados.

AMO PARA SEMPRE!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me abençoar grandemente com seu amor e cuidado em todos os momentos da minha vida.

Agradeço a meu orientador Professor Doutor **Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão**, por ser este homem humano, amigo e de um caráter inigualável, agradeço por todas as oportunidades concedidas e por toda confiança depositada durante esses anos de pesquisa e amizade. E para variar e nunca esquecer... MUITO OBRIGADA!

Agradeço ao meu pai **James Williams Vasconcelos**, por seu amor, cuidado, ajuda e compreensão para que esta etapa da minha vida fosse conquistada. Sem você não estaria aqui, OBRIGADA PAI!

Agradeço ao meu irmão **João Luís de Albuquerque Vasconcelos**, por sua paciência e sua compreensão.

A minha avó **Maria José da Silva Albuquerque**, por seu amor, carinho, exemplo de vida e amizade.

Agradeço ao meu namorado **Luiz Mesquita Neto**, por tão grande amor, amizade, companheirismo, atenção, paciência e cuidado. **Agradeço a você, pois és meu sinônimo de alegria e amor compartilhado.**

Agradeço à todos meus familiares, principalmente a minha tia **Maria Zélia da Silva Albuquerque** "*in memoriam*", por participar do início desta fase e por ser meu grande apoio e incentivadora. SAUDADES!

Agradeço a família Mesquita, **Sr. Luiz, D. Socorro, Lene, Laine, Rogério** por tanto amor, cuidado, atenção e por me apoiarem em tudo. Amo vocês!

Agradeço a família Arcoverde, minha segunda família, pois é meu apoio, meu desabafo, minha alegria. Obrigada **Sr. Lúcio, D. Nininha, Andressa, Raíssa, Melissa e Larissa.**

Agradeço a família Soares: **Tia Martha, Amanda, Micaelly, Wilton, Camilla** por todo amor, apoio e preocupação.

Agradeço a minhas amigas-irmãs: **Karina Monteiro, Natali Monteiro, Silvia Freitas, Thassiane Rebeca, Yolanda Sampaio, Thayana Freire, Rafaelle Custódia, Fabiana Maria, Isana Vicente, Patrícia Gueiros, Patrícia Ximenez** e aos meus amigos irmãos **Jonathas Pedrosa, Diego Guerra, Jurandir Junior, Rafael Ramos, Daniel Arcoverde, Samuel Arcoverde, João Luiz, Thiago Gomes.**

Agradeço a todo o Grupo BmC, **Juliana Brandão, Ana Rosa, Amanda Lucena, Steffany, Luíza, Lúcia, Sinara, João Luiz, Paula, Arthur, Bruno,**

Renato Wanderley, Renato, Gabriela, Moacyr, Petra, Antônio, Henrique, Marina, Eduardo Ramalho. A todos obrigada por toda ajuda, por toda alegria compartilhada, pelos conselhos, pela atenção, pelo carinho, pela AMIZADE. Adoro vocês!

Agradeço a **Carmelita Cavalcanti e Marina Cartaxo**, por toda ajuda, amizade, confiança e apoio. Adoro vocês!

Agradeço a coordenadora do programa de pós-graduação em Inovação Terapêutica, Professora **Suely Galdino**, por toda confiança, apoio e amizade.

Agradeço a **Paulo Germano**, por seu respeito, caráter, amizade e ajuda durante este dois nos de mestrado.

Agradeço **aos colegas** pós-graduando do programa em Inovação Terapêutica por estes dois anos vividos e compartilhados.

Agradeço à Dr^a **Mariana Lira** por ser tão solícita e pela grande ajuda no meu desenvolvimento científico.

Agradeço **as recepcionistas** do setor de Anatomia Patológica, por toda ajuda e paciência colaborando com nossas pesquisas.

Agradeço **a todos os colegas**, funcionários e professores do LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami), pois preenchem minha vida com muito alegria, amizade e ajuda.

A todos que estiveram direta e indiretamente presentes em minha vida e que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Devemos buscar a realização dos nossos sonhos, ou melhor, devemos sempre buscar o melhor caminho para conquistá-los. Hoje sei que o retorno deste caminho, muitas vezes tortuoso, é a vitória e o sentimento de dever cumprido é saber que mais uma etapa de nossas vidas, colocada sabiamente por Deus, foi vencida.

(Autoria própria)

RESUMO

VASCONCELOS, Juliana Lúcia de Albuquerque. Avaliação do valor diagnóstico e prognóstico de carboidratos em Carcinoma Prostático Humano. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Câncer é um conjunto de alterações celulares, que leva a uma divisão celular sem controle, podendo invadir tecidos adjacentes através da circulação sanguínea e do sistema linfático. O Câncer de Próstata (CP) é o segundo tumor mais comum entre a população masculina, e é considerado o câncer da terceira idade. A carcinogênese é um mecanismo complexo no qual ocorre mudanças na expressão de proteínas e glicoconjugados. Glicosilação é mediada por glicosiltransferases, enzimas que tem função de inserir resíduos de carboidratos específicos, e é um dos mais importantes processos biológicos pós-tradução de modificações na estrutura final e função de lipídios e proteínas. As fucosiltransferases (FUT) participam da transferência de resíduos de L-fucose, um sacarídeo associado ao câncer e a processos inflamatórios, da GDP-L-fucose. Neste estudo objetivou-se avaliar a expressão dos genes FUT3 e FUT6 através da Imunohistoquímica em Adenocarcinoma Prostático e Hiperplasia Prostática Benigna correlacionando com o padrão de expressão de L-fucose empregando a histoquímica com as lectinas UEA-I (*Ulex europaeus*) e LTA (*Lotus tetragonolobus*). As enzimas FUT3 e FUT6 apresentaram-se com uma alta expressão tanto no Adenocarcinoma Prostático como na Hiperplasia Benigna Prostática, principalmente a FUT 6. Os resultados da histoquímica com lectinas mostraram uma baixa distribuição/accessibilidade de L-fucose. Sugere-se que, as enzimas FUT3 e FUT6 possam representar potenciais biomarcadores para avaliar alterações benignas e malignas prostáticas refletindo uma variação no perfil de L-fucose nestes tumores que podem estar associados às suas características biológicas.

Palavras-chaves: fucosiltransferases, L-fucose, adenocarcinoma prostático, hiperplasia prostática benigna.

ABSTRACT

VASCONCELOS, Juliana Lúcia de Albuquerque. Evaluation of diagnostic and prognostic value of carbohydrates in human prostate carcinoma. Dissertation. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Cancer is a set of cellular changes, leading to uncontrolled cell division that may invade surrounding tissues via bloodstream and lymphatic system. Prostate Cancer (PC) is the second most common tumor in men and is considered the cancer of the elderly. Carcinogenesis is a complex mechanism in which changes occur in the expression of proteins and glycoconjugates where glycosylation plays key roles since modulates the carbohydrate moieties in glycoconjugates being one of the most important biological processes of post-translational modifications in the final structure and function of lipids and proteins. Fucosyltransferases (FUTs) are enzymes that catalyze the transfer of the L-fucose residues, a saccharide which has been linked to cancer and inflammation features, from GDP-Fuc. This study the objective to evaluate the expression of genes FUT 3 and FUT 6 by immunohistochemistry in Prostatic Adenocarcinoma and Benign Prostatic Hyperplasia and to correlates with the expression pattern of L-fucose using lectin histochemistry with UEA-I (*Ulex europaeus*) and LTA (*Lotus tetragonolobus*). FUT3 and FUT6 showed a high expression in both prostatic tissues, especially FUT6. The results of lectin histochemistry showed a low distribution/accessibility of L-fucose residues. It is suggested that FUT3 and FUT6 may represent potential biomarkers to evaluate benign and malignant alterations in prostate reflecting a variation in the profile of L-fucose residues in these tumors which can be associated to their biological features.

Keywords: fucosyltransferases, L-fucose, prostatic adenocarcinoma, benign prostatic hyperplasia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Localização da glândula prostática.....	22
Figura 2. Divisão Anatômica de Próstata de Adulto.....	23
Figura 3. Epitélio glandular prostático normal, apresentando as células basais e cilíndricas (secretórias) e estromas normal.....	24
Figura 4. Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012/13.....	25
Figura 5. Fases do desenvolvimento do Adenocarcinoma Prostático.....	27
Figura 6. Características do tecido transformado prostático (núcleo aumentado, nucléolo evidente, desorganização celular), quando comparado com células normais.....	27
Figura 7. Ilustração da heterogeneidade dos carboidratos encontrados em glicoproteínas e glicolípídeos da superfície celular.....	31
Figura 8. Esquema demonstrando o processo de glicosilação de proteínas ainda no Retículo Endoplasmático Rugoso.....	32
Figura 9. Biossíntese da GDP-fucose.....	33
Figura 10. Formação molecular dos Antígenos de Lewis.....	35

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AFP: Alfa-fetoproteína

AJCC/UICC: American Joint Committee on Câncer/Internacional Union Against Câncer.

ALG: glicosilação asparagina ligados

Asn: Asparagina

CP: Câncer de Próstata

Fuc: L-fucose

FUT 3: Gene Fucosiltransferase III

FUT 6: Gene Fucosiltransferase VI

FUT: Gene Fucosiltransferase

Gal: galactose

GalNac: N-acetilgalactosamina

GDP-fucose: Guanosina Difosfato-fucose

Glc: glucose

GlcNac: N-acetilgalactosanimina

HPB: Hiperplasia Prostática Benigna

Le^a: Lewis^a

LTA: *Lotus tetragonolobus*

Man: manose

NeuAc: ácido siálico ou neuraminico

PSA: Antígeno Prostático Específico

RER: Retículo Endoplasmático Rugoso

sLe^a: Sialil Lewis^a

sLe^b : Sialil Lewis^b

sLe^x: Sialil Lewis^x

TNM: Estadiamento de acordo com o sistema. Tumor Primário (T), Linfonodos Regionais (N), Metástases à Distância (M).

UEA-I: *Ulex europaeus*

ZC: Zona Central

ZP: Zona periférica

ZT: Zona transicional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. Carcinogênese.....	19
2.2. A Próstata.....	20
2.3. Adenocarcinoma Prostático.....	24
2.4. Hiperplasia Prostática.....	29
2.5. Glicosilação.....	30
2.5.1. L-fucose.....	32
2.5.2 Fucosilação.....	34
2.6. Lectinas.....	35
2.7. Histoquímica com Lectinas.....	37
4. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivo específico.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 Amostras.....	40
4.2 Dados Clínicos.....	40
4.3 Imunohistoquímica.....	40
4.4 Histoquímica com Lectinas.....	41
4.5 Análises Estatísticas.....	41
4.6 Análises Digital de Imagens.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1 Artigo 1	

Expression of FUT3 and FUT6 in Prostatic Adenocarcinoma and Benign Prostatic Hyperplasia and their Glycophenotypic profile of L-fucose.....	42
6. CONCLUSÕES.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
8. ANEXOS	
8.1 Atividades realizadas.....	70
8.1.1 Resumo publicado em Jornal Internaciona.....	70
8.1.2 Apresentação de Trabalho em Congresso.....	70
8.1.3 Participação em Eventos.....	70
8.2 Submissão do artigo: Expression of FUT3 and FUT6 in Prostatic Adenocarcinoma and Benign Prostatic Hyperplasia and their Glycophenotypic profile of L-fucose.....	71
8.3 Carta de aceite de publicação do artigo: Avaliação de Lectinas Conjugadas a Criptatos de Európio (III) em Tecidos Mamários Humanos Empregadas em Histoquímica.....	72

1 INTRODUÇÃO

Câncer é um conjunto de alterações celulares, que leva a uma divisão celular sem controle, podendo invadir tecidos adjacentes através da circulação sanguínea e do sistema linfático (INCA, 2011).

O câncer de próstata é o segundo tumor mais comum entre a população masculina, e mais do que qualquer outro tipo de câncer 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, 2012). Estima-se que na população masculina brasileira o número de casos novos de câncer de próstata no ano de 2012/2013 será de 60.180 novos casos, correspondendo a um risco estimado de 62 novos casos a cada 100 mil homens (INCA, 2012).

Um a cada dez homens, durante a vida, desenvolve câncer de próstata clinicamente evidente. Muitos tumores permanecem assintomáticos durante a vida do indivíduo, levando a um diagnóstico tardio e avançado que evidencia um quadro de disseminação da doença para outros órgãos (metástase) dificultando assim, o tratamento desta doença. O aparecimento de sintomas varia de acordo com cada paciente uma vez que o câncer geralmente surge inicialmente pela periferia da glândula prostática, podendo demorar a haver mudanças na micção. Os sintomas mais relatados pelos pacientes que apresentam um quadro sintomático são: dificuldade para urinar, jato urinário fraco e sensação de não esvaziar a bexiga (TONON; SCHOFFEN, 2009). Em alguns casos o câncer de próstata é diagnosticado apenas em procedimento de necropsia (GONÇALVES; PADOVANI; POPIM, 2008).

A carcinogênese é um mecanismo complexo no qual ocorre mudanças na expressão de proteínas e glicoconjugados (glicoproteínas e glicolipídios) celulares (SHIMMA *et al.*, 2006; KOPF; ZHARHARY, 2007). Estes glicoconjugados apresentam uma alta variação estrutural quanto aos seus carboidratos os quais são expressos diferentemente entre espécies, tecidos e grau de diferenciação celular (HIDARI *et al.*, 2005).

A composição glicídica destas moléculas e sua formação são determinadas pela ativação de um complexo enzimático, atuando especificamente na catálise, adição e modificação molecular de carboidratos (MARKER *et al.*, 2001). Desta forma a glicosilação, conduzida, por exemplo, por glicosiltransferases, é um dos processos biológicos mais importantes na modificação pós-traducional de proteínas e lipídios (MAEDA; NISHIMURA, 2008). A fucosilação é realizada pelas fucosiltransferases, específicas para inserir resíduos de L-fucose nos glicoconjugados. Estudos demonstram o envolvimento destas enzimas na progressão do câncer (MARKER *et al.*, 2001; BARTHEL *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2008) e também no poder metastático de tumores (BARTHEL *et al.*, 2008).

O estudo de carboidratos, livres ou conjugados, pode ser realizado por um grupo de proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, as lectinas, que reconhecem estruturas de carboidratos específicas sendo de distribuição ubíqua na natureza incluindo vertebrados, invertebrados, bactérias e vírus (WANG; LEE; SU, 2009).

O interesse nas lectinas foi intensificado quando se descobriu que elas são sondas bioquímicas para investigação de glicanos de superfície celular, para determinação do seu papel na diferenciação e crescimento celular, nas interações de células com seu ambiente e também numa variedade de processos patológicos (SHARON, 2007). Mudança na identidade sacarídica de células transformadas, benigna e malignamente, tem sido avaliada através da histoquímica com lectinas, além da imunohistoquímica (BELTRÃO *et al.*, 1998, 2001, 2003; CAMPOS *et al.*, 2006), com a possibilidade de se estabelecerem como sondas de diagnóstico e/ou prognóstico para cânceres de mama, estômago, cólon, pulmão, próstata, entre outros (BELTRÃO *et al.*, 1998, 2001; VILA NOVA, 2003; MELO JUNIOR *et al.*, 2004, 2008; SANTOS *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Este trabalho se propõe, através da histoquímica com lectinas e imunohistoquímica, avaliar as alterações no fenótipo de resíduos L-fucose em tumores benignos e malignos prostáticos utilizando as lectinas UEA-I e LTA (ambas específicas para L-fucose) e avaliar a expressão genotípica das fucosiltransferases FUT3 e FUT6.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOGENESE

Câncer, segundo o INCA (2011), refere-se a mais de 100 tipos de doenças das quais as células sofrem inicialmente alterações genéticas, dividindo-se segundo seu próprio controle, podendo conseqüentemente invadir tecidos adjacentes através da circulação sangüínea e do sistema linfático.

Há várias linhas de pesquisa que procuram desvendar o tão complexo mecanismo do desenvolvimento do câncer. Sonnenschein & Soto (2008) descrevem a principal teoria da carcinogênese, a Teoria da Mutação Somática, que defende o surgimento do câncer a partir de uma única célula somática que sofre múltiplas mutações em seu DNA e que essas mutações acontecem no gene que controla o ciclo de proliferação que leva a célula ao estado de quiescência. Os mesmos sugerem uma nova teoria que foca a organização tecidual e que preconiza que o câncer é um problema de organização tecidual, comparado a organogênese que acontece durante o desenvolvimento embrionário e que a proliferação é um estado defeituoso de todas as células (SONNENSCHIN & SOTO, 2008).

Há ainda a Teoria Híbrida resultante da falta de coerência entre as predições da Teoria da Mutação Somática com o aumento do número de experimentos, levando a observação de que não pode haver acomodação em um só pensamento que coloca as alterações a nível nuclear como o caminho único para a carcinogênese. Essa teoria relaciona a Teoria da Mutação Somática com o conceito que o câncer é também fruto pela desorganização tecidual (SONNENSCHIN; SOTO, 2008).

Os processos anormais de desenvolvimento celular e multiplicação estão diretamente ligados ao surgimento do câncer, relacionados às alterações genéticas, que comandam estes parâmetros. Entretanto, o processo da carcinogênese pode também ser examinado e caracterizado mais amplamente no

contexto da perda de controle da homeostase na arquitetura do tecido normal, atipia celular, destruição das camadas de revestimento, mudanças estromais, angiogênese e até metástase, além das alterações genéticas (CUNHA *et al*, 2004). Além dos fatores genéticos, há vertentes de estudos que colocam como principal causa do câncer os distúrbios no metabolismo celular (BENEDETTINI ; NGUYEN ; LODA, 2008 ; FURUTA *et al*, 2010). Silva, Serakides e Cassali (2004) colocam como uma das causas do câncer o descontrole hormonal, que promove a perda da hemostasia celular, pois os hormônios são fatores indutores a carcinogênese promovendo, com uma alteração metabólica, uma predisposição a alterações genéticas.

A carcinogênese é um mecanismo onde ocorrem mudanças na expressão de proteínas e glicoconjugados celulares que proporcionam alterações nas vias de sinalização, havendo mudanças no microambiente tumoral, muitas vezes favorecendo o desenvolvimento do tumor (SHIMMA *et al.*, 2006; KOPF; ZHARHARY, 2007). Estes glicoconjugados apresentam uma alta variação estrutural quanto aos seus carboidratos os quais são expressos diferentemente entre espécies, tecidos e grau de diferenciação (HIDARI *et al.*, 2005).

Provavelmente, a glicosilação é um dos mais importantes aspectos que está relacionado com a modificação da estrutura de carboidratos da superfície celular, isso é demonstrado em vários cânceres e linhagens de células malignas. A apresentação de glicosilação aberrante ocorre, geralmente, precocemente no processo de transformação e é importante para o diagnóstico e tratamento do câncer (POTAPENKO, 2010).

No câncer de próstata a patogênese molecular e a progressão celular permanecem pouco conhecidas. Mecanismos genético-moleculares têm sido implicados na tumorigênese prostática e na evolução da doença (MOTTA *et al*, 2009).

2.2 A PRÓSTATA

A origem da palavra próstata vem do grego “pro – histanai”, “estar à frente”, estrutura que está abaixo da bexiga e à frente do reto (RIZZO; ATTARD; HUDSON, 2005; JOSHUA *et al*, 2008) (Figura 1). É um órgão com função glandular exócrina localizado na região pélvica masculina e pesa aproximadamente 20g (CLOSSET; REITER, 2003; TONON; SCHOFFEN, 2009). A próstata, um órgão de origem glandular, é formada ainda no estágio fetal, de uma protuberância da cavidade epitelial urogenital (de origem endodermal), que é derivado do terminal caudal que fica localizado na região denominada de cloaca, dentro da cavidade mesodermal (CLOSSET; REITER, 2003; CUNHA *et al*, 2004). O desenvolvimento prostático andrógenos e estrógenos, ainda no estágio embrionário, é dado principalmente por hormônios masculinos, que continuam em seu crescimento na idade adulta. Na falta desses hormônios o desenvolvimento prostático não é bem sucedido (PARNES *et al*, 2006).

Os hormônios andrógenos são os mais necessários para o desenvolvimento deste órgão, estimulando o crescimento das glândulas no estágio fetal e neonatal que são os estágios de vida com maior intensidade de desenvolvimento. O efeito dos andrógenos é mediado por receptores de andrógenos que participam das interações mesenquimal-epitelial e estão envolvidos desde cedo nas fases de desenvolvimento prostático (CUNHA *et al*, 2004). A próstata continua em desenvolvimento até a fase adulta do homem e depois mantém o tamanho normal na fase de produção de hormônios. A ação dos hormônios andrógenos além da função de desenvolvimento (proliferação celular), diferenciação, morfogênese e secreção pela glândula prostática já formada, também é alvo para a terapêutica do adenocarcinoma e hiperplasia prostática. O desenvolvimento da próstata também é sensível à ação de hormônios estrógenos, pois receptores α e β de estrógenos estão presente na próstata humana e estão envolvidos na homeostase glandular (CLOSSET; REITER, 2003).

Ainda no período inicial de desenvolvimento, as células secretórias enfileiradas formam as glândulas e ductos prostáticos e são responsáveis pelas secreções glandulares que tem função de produzir um amplo número de compostos tais como fosfatase ácida, desidrogenase, PSA (antígeno específico prostático), prostaglandina, espermina, fibrogenase, aminopeptidase, zinco, citrato, pepsinogênio II e lactoferrina (MARANDOLA *et al*, 2004).

A próstata é um órgão responsável por produzir 40% a 50% dos fluidos que fazem parte do sêmen tendo fundamental importância na fase reprodutora do homem, pois possibilita a proteção e nutrição necessária para a sobrevivência dos espermatozoides (TONON; SCHOFFEN, 2009). Tem forma de um cone invertido, com a base superior adjacente ao assoalho vesical e o ápice póstero-inferior à sínfise púbica, que circunda o colo vesical e a uretra e é desprovido de uma cápsula distinta (BARONI *et al*, 2009, KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). É dividida em quatro zonas (sub-regiões) glandulares: a) Zona Central, b) Zona Periférica, c) Zona Transicional e d) Periuretral (BARONI *et al*, 2009) (Figura 2). A maioria dos casos de hiperplasia acontece na Zona periuretral e/ou transicional e os casos de adenocarcinoma acontecem geralmente na Zona periférica.

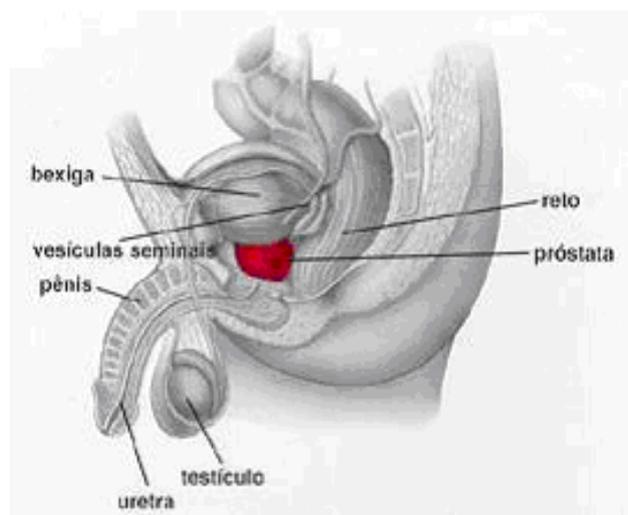


Figura 1: Localização anatômica da glândula prostática. Fonte: INCA, 2011

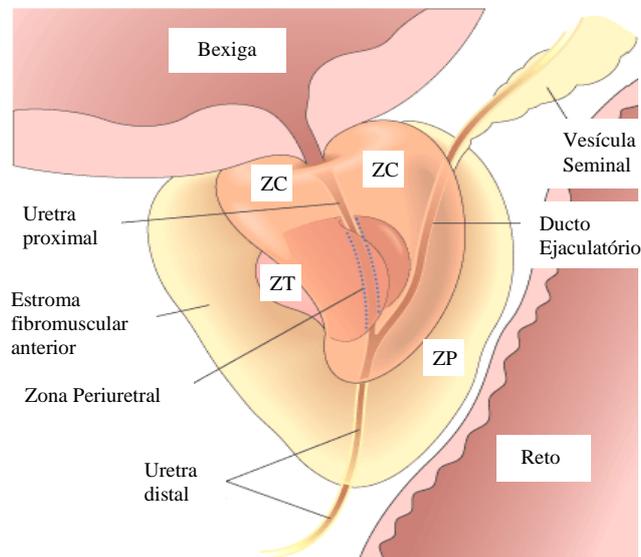


Figura 2: Divisão anatômica da próstata em adulto. A próstata contém as zonas: central (ZC), periférica (ZP), transicional (ZT) e periuretral. Fonte: KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005.

No mínimo três tipos celulares podem ser vistos no epitélio prostático: células basais, luminais (morfologia cilíndricas) e neuroendócrinas. O estroma prostático contém fibroblastos, células musculares, células endoteliais, células nervosas e células sanguíneas (CLOSSET; REITER, 2003; JOSHUA *et al*, 2008) (Figura 3). As células basais são bem menos abundantes, repousam na parte basal das células secretórias e atuam como células de reserva, diferenciando-se em células epiteliais secretoras (SIGNORETTI; LODA, 2007). Sua ausência é um importante indicador de câncer de próstata (JOSHUA *et al*, 2008). As células neuroendócrinas ficam 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; SCHALKEN, 2001; JOSHUA *et al*, 2008).

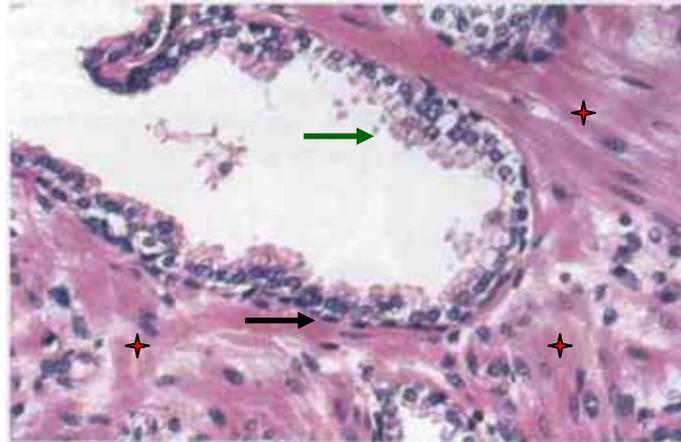


Figura 3. Epitélio glandular prostático normal, apresentando as células basais (seta preta) e cilíndricas (seta verde) e estroma normal (asterísticos). Fonte: KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005.

Há três processos patológicos que afetam a glândula prostática com maior frequência que são: inflamação (prostatite), aumento nodular benigno (hiperplasia) e adenocarcinoma (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

2.3 ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO

O câncer de próstata é o segundo tumor mais comum entre a população masculina, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão e mais do que qualquer outro tipo de câncer 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, 2012), assim havendo aumento da sua incidência a partir do aumento da expectativa de vida das populações.

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima para o ano de 2012/2013 aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, com 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Na população masculina o número de casos novos de câncer de próstata estimado para o Brasil no ano de 2012/2013 será de 60.180 novos casos, correspondendo a um risco estimado de 62 novos casos a cada 100 mil homens

(INCA, 2012). As regiões Sudeste (78/100 mil) e Nordeste (43/100 mil), tem maior incidência de câncer de próstata entre os homens no Brasil. Na região Nordeste, Pernambuco lidera junto à Paraíba, os mais altos índices de incidência deste tumor (Figura 4).

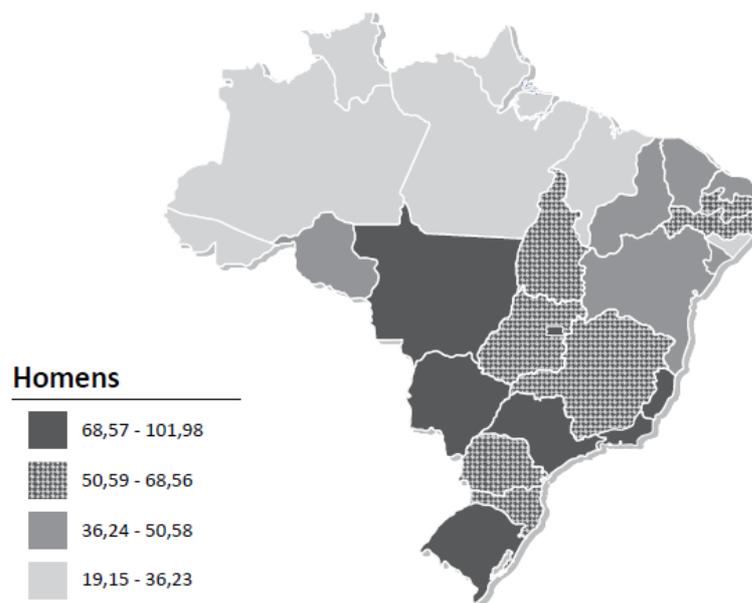


Figura 4. Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012/13, segundo a Unidade de Federação (neoplasia maligna de próstata). Fonte: INCA (2012).

A etiologia do câncer de próstata ainda é bastante discutida, mas fatores como o envelhecimento, metabolismo hormonal, história sexual, exposição a patógenos, exposição a substâncias químicas industriais, estilo de vida, além da associação aos fatores genéticos e ambientais (TONON; SCHOFFEN, 2009; LIMA *et al*, 2010).

Um a cada dez homens poderá desenvolver o CP clinicamente evidente. Muitos tumores permanecem assintomáticos durante a vida do indivíduo, levando a um diagnóstico tardio que pode revelar um quadro de metástase dificultando

assim o tratamento deste paciente (GONÇALVES; PADOVANI; POPIM, 2008). O aparecimento de sintomas varia de acordo com cada paciente uma vez que o câncer geralmente inicia pela periferia da glândula prostática, podendo demorar a haver mudanças ao urinar, assim contribuindo para o diagnóstico tardio da doença (TONON; SCHOFFEN, 2009). Geralmente o câncer de próstata tem afinidade por metástase em tecido ósseo, causando osteólise e formação anormal do osso (TONI *et al*, 2010).

Para o diagnóstico do câncer de próstata são utilizados parâmetros de análise sorológica do PSA (antígeno prostático específico), a ultra-sonografia pélvica, o exame físico de toque retal e a análise histopatológica, além da associação à sintomatologia apresentada por cada paciente. Porém, alguns destes métodos são evitados pela população masculina, levando a dificuldade para o diagnóstico precoce deste tipo de tumor (YOU *et al*, 2010).

O adenocarcinoma prostático é caracterizado histologicamente por alterações celulares e desorganização tecidual (Figura 5). As glândulas apresentam-se menores e com característica geralmente invasiva. Há perda da camada basal celular, aumento no número celular e desorganização celular, aumento do núcleo com visualização do nucléolo, além da observação de pequenos ácinos que infiltram difusamente o estroma com característica cribriforme. O estroma no câncer freqüentemente contém colágeno jovem o qual aparece fracamente eosinofílico e as fibras musculares são, às vezes, rompidas (Figura 6) (MONTIRONI *et al*, 2005).

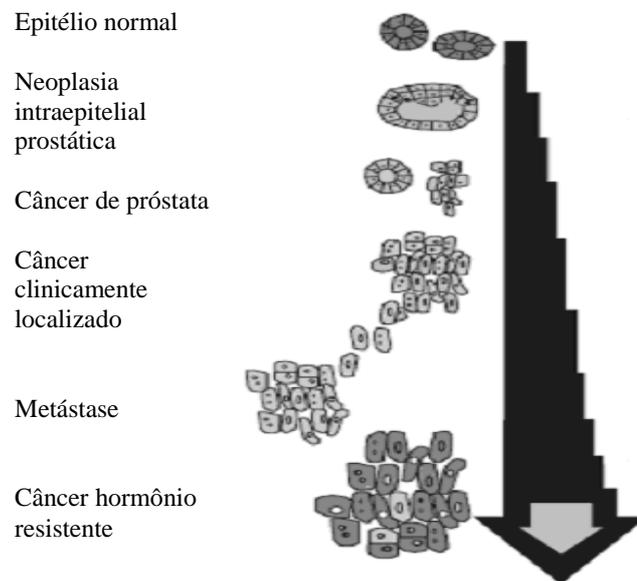


Figura 5. Fases do desenvolvimento do Adenocarcinoma Prostático. Fonte: BOTT, 2003.

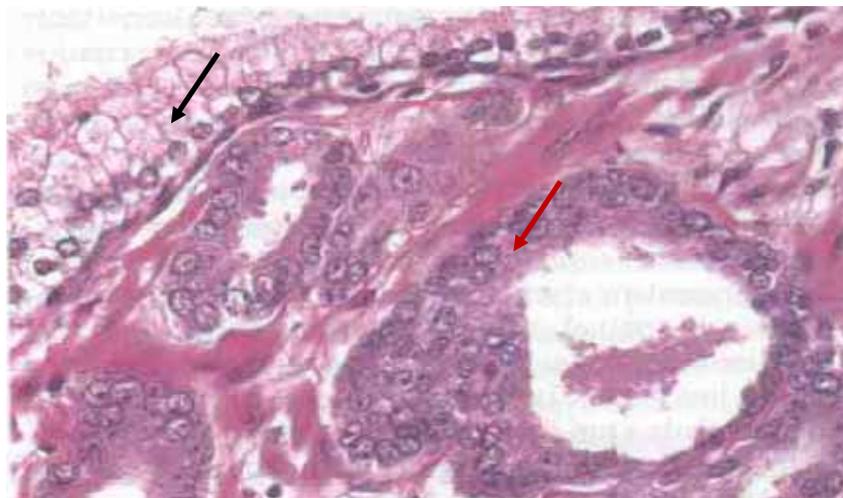


Figura 6. Características do tecido transformado prostático apresentando núcleo aumentado, nucléolo evidente, desorganização celular (seta vermelha) comparado com células normais (seta preta). Fonte: KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005.

Para o diagnóstico histopatológico são utilizados sistemas de graduação histológica. O sistema Gleason é o mais utilizado universalmente, que se baseia no padrão de crescimento em relação ao estroma e na diferenciação glandular e

são desconsiderados nesse sistema os graus de atipia celular. O grau histológico dado pode ser de 1 a 5 de acordo com o arranjo tecidual encontrado. No grau 1 representa tumores mais bem diferenciados com margens precisas e pouco espaço entre os ácinos, sem caráter infiltrativo no estroma ou fusão entre os mesmos; grau 2 há maior distância entre os ácinos, comparado com o grau 1; grau 3 há um grau infiltrativo podendo perceber um arranjo cribriforme; grau 4 fusão entre os ácinos apresentando caráter infiltrativo, apresentando também o arranjo cribriforme e o grau 5 apresenta um arranjo da neoplasia sólido (BILLIS; POMPEO, 2003). Estes graus são associados levando a uma contagem final entre 2 a 10 e é dado pela soma do grau de maior prevalência no tecido estudado e o grau de menor incidência, por exemplo, um tecido que apresenta 90% do grau 3 e 10% de grau 4 a soma é $3+4=7$. Esta contagem de grau ou escore final dá o parâmetro de desenvolvimento do tumor que é classificado como mais bem diferenciado com o gleason entre 2 e 4, grau intermediário com gleason entre 5 a 6, câncer moderadamente diferenciado grau 7 e entra os graus 8 a 10 representa câncer de alto grau (BILLIS; POMPEO, 2003, KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Associado ao sistema Gleason está o Sistema de Estadiamento TMN-2002 proposto pela AJCC/UICC (American Joint Committee on Câncer/ Internacional Union Against Câncer), que é dado também no diagnóstico histopatológico e que dá a noção de origem e dimensão do tumor (BILLIS; POMPEO, 2003). Este sistema descreve a extensão do tumor primário identificado pela letra T, a presença ou não de acometido linfonodal locorregional identificado pela letra N e a presença ou ausência de metástase indificado pela letra M (BILLIS; POMPEO, 2003; BARONI *et al*, 2009). Mesmo havendo uso destes sistemas universais, há três limitações no diagnóstico histopatológico do câncer de próstata. I) As biópsias devem ser realizadas seguindo um padrão cirúrgico a fim de obter as principais regiões que contenham tumor no órgão, II) a escala do sistema Gleason utilizada pelos patologistas é semiquantitativa levando a certa dificuldade para pesquisa de cada célula em cada pedaço do tecido e III) está relacionada com as divergências encontradas no diagnóstico de determinado tecido, a partir da análise de diferentes patologistas (YOU *et al*, 2010).

2.4 HIPERPLASIA PROSTÁTICA

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é a doença mais prevalente entre as alterações prostáticas, acometendo aproximadamente 50% dos homens entre 50 anos de idade e 90% entre os homens com 80 anos de idade. É uma doença de caráter progressivo, com crescimento contínuo, levando ao surgimento de sintomas e ao aumento do risco para complicações ao longo do tempo, como retenção urinária aguda e sintomas que podem levar até mesmo a cirurgia (BRUM; SPRITZER; BRENTANI, 2005).

Esta alteração se origina quase exclusivamente na região interna da glândula prostática, na zona de transição e/ou periuretral. 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 (NICKEL, 2007).

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. O nódulo glandular apresenta-se em forma de agregados de glândulas cisticamente dilatadas, pequenas ou grandes, revestidas por duas camadas, uma interna colunar e outra externa de epitélio cubóide ou plano, repousando sobre uma membrana basal intacta e observa-se um estroma escasso (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

2.5 GLICOSILAÇÃO

Glicosilação é mediada por glicosiltransferases, enzimas que tem função de inserir resíduos de carboidratos específicos, e é um dos mais importantes processos biológicos pós traducional de modificações na estrutura final e função de lipídios e proteínas (MAEDA; NISHIMURA, 2008). Essas modificações

promovem várias influências moleculares, que participam do processo de reconhecimento de patógenos (vírus e bactérias), reconhecimento celular, adesão celular, diferenciação e desenvolvimento embrionário, regulação e outros processos de comunicação celular como os processos inflamatórios e diversas patologias (ROSENFELD *et al*, 2007; MAEDA; NISHIMURA, 2008; VALBUENA *et al.*, 2010) que são dadas de acordo com o tipo celular, etapa de desenvolvimento e diferenciação celular (CAZET *et al.*, 2010). A glicosilação além do papel estrutural aumenta a estabilidade proteica, protege as proteínas da proteólise e é importante para sua solubilidade (ROSENFELD *et al*, 2007). *In vivo* as proteínas são glicosiladas pela ação de uma série de glicosidases e glicosiltransferases, resultando na variabilidade na estrutura de glicanos, variando de acordo com o estado fisiológico de cada indivíduo. Em sistemas *ex vivo*, diferentes linhas celulares e diferentes condições de fermentação podem ainda produzir padrões de glicosilação (ROSENFELD *et al*, 2007).

Os carboidratos em glicoconjugados (glicoproteínas e glicolipídeos), são encontrados fazendo parte de oligo ou polissacarídeos que formam uma cadeia linear ou ramificada de açúcares, composta freqüentemente por Manose (Man), L-fucose (Fuc), galactose (Gal), glicose (Glc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglicosamina (GlcNAc) e ácido siálico (NeuAc) (Figura 7). Estes carboidratos são presentes nos glicoconjugados, porém apresentam diferentes combinações, proporcionando um grande número de glicoconjugados, com diferentes sequências de carboidratos e funções diferentes (VALBUENA *et al.*, 2010).

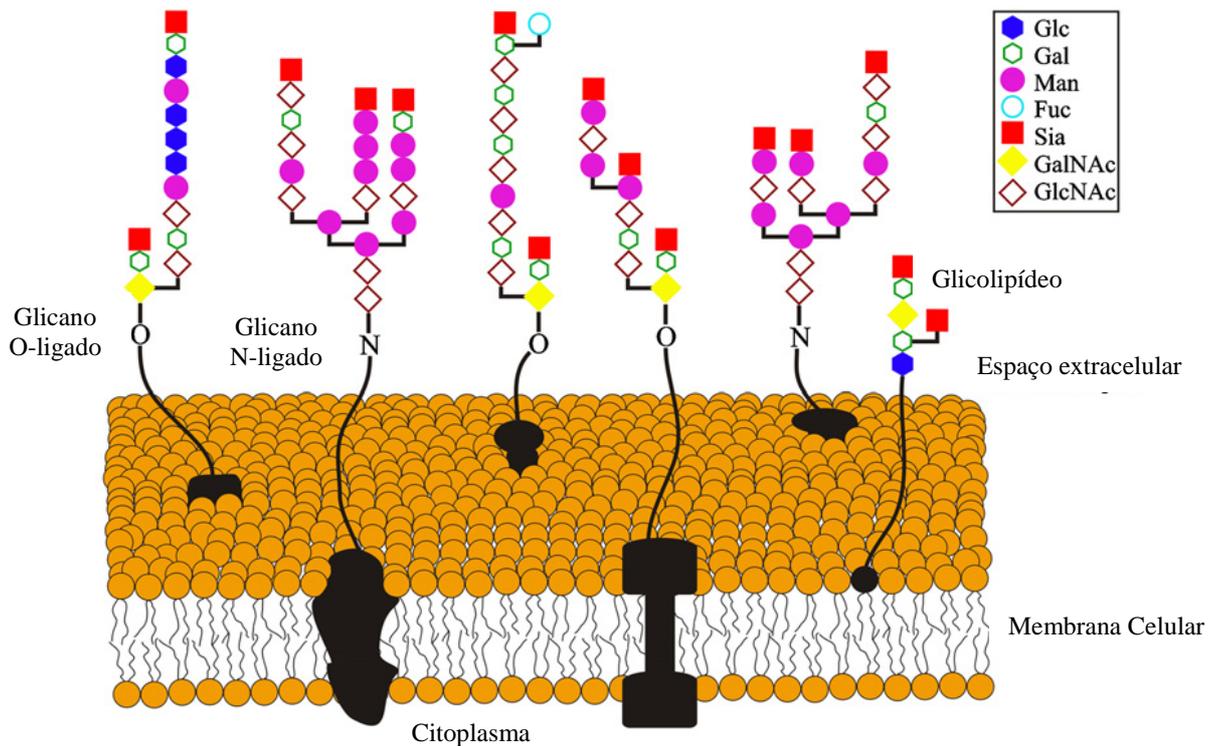


Figura 7. Ilustração da heterogeneidade dos carboidratos encontrados em glicoproteínas e glicolipídeos da superfície celular. Fonte: GHAZARIAN, 2011.

O tipo de ligação mais comum no processo de glicosilação celular é do tipo N-ligado, que apresenta ligações grandes e complexas, contendo várias ramificações (POTAPENKO, 2010). Esta ligação é dada pela ligação do grupo amida livre do carboidrato ao aminoácido asparagina (Asn). A biossíntese de todos os glicoconjugados N-ligados inicia-se na formação de um precursor glicídico na membrana do Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) sendo internalizado, em determinado momento, para o lúmen do RER (Figura 8) para a continuação da inserção dos resíduos de carboidratos, mediados por enzimas transferases codificadas pela família de genes ALG (glicosilação asparagina-ligado). Este processo de glicosilação continua no complexo de Golgi que direciona o glicoconjugado formado para suas funções específicas no organismo humano.

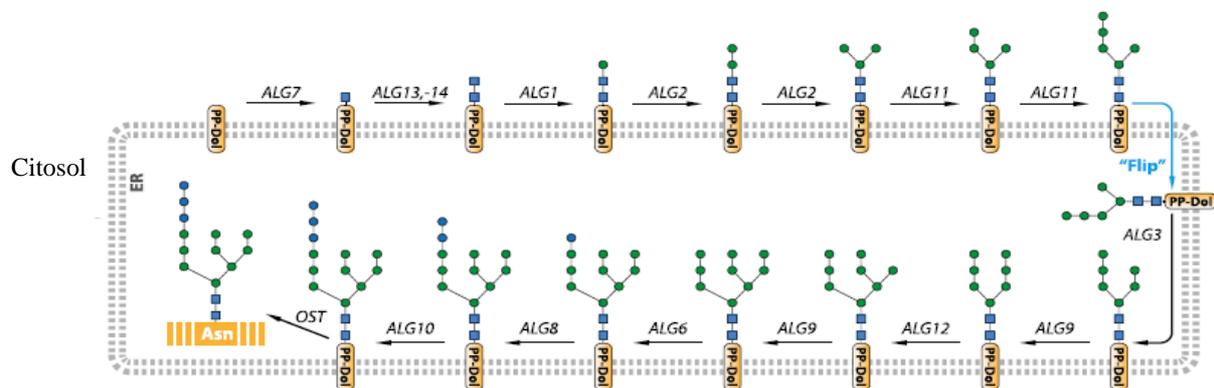


Figura 8. Esquema demonstrando o processo de glicosilação de proteínas ainda no Retículo Endoplasmático Rugoso. Fonte: POTAPENKO, 2010.

A maioria das glicosilações aberrantes frequentemente resulta num encurtamento das cadeias dos glicanos ou uma super-expressão dessas estruturas nas células (GUILLOT 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 (OHTSUBO, MARTH, 2006; JANKOVIC; KOSANOVIC; MILUTINOVIC, 2008). Por isso, esses glicanos têm sido foco de muitas vertentes de investigação, principalmente com a intenção de novas estratégias para prevenção e terapia do câncer, pois algumas células cancerosas utilizam cadeias de carboidratos para escapar do reconhecimento imunológico, além de migrar através da corrente sanguínea. (JANKOVIC; KOSANOVIC; MILUTINOVIC, 2008).

2.5.1 L- FUCOSE

A L-fucose é um monossacarídeo que está sendo associado ao câncer e a processos inflamatórios (SAWA et al, 2006). Na década de 1980, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra antígenos de carboidratos desencadeou pesquisas sobre a glicosilação aberrante e seu envolvimento tumoral. Vários anticorpos foram produzidos para reconhecer glicoproteínas ou

glicolípídeos fucosilados em soros de pacientes com câncer tem sido usados como marcadores tumorais tal como o CA 19.9. A fração L3 da Alfa fetoproteína (AFP), que é fucolisada, também tem sido clinicamente utilizada como marcador tumoral para carcinoma hepatocelular desde 1996 no Japão e em 2005 nos Estados Unidos. Nos últimos anos os avanços nas metodologias para a detecção de alterações glicídicas nas células cancerosas e soros de pacientes com câncer tem impulsionado o desenvolvimento de vários tipos de marcadores tumorais (MORIWAKI; MIYOSHI, 2010).

Para acontecer o mecanismo de fucosilação há necessidade da disponibilidade do carboidrato L-fucose, via seu precursor GDP-fucose, nas organelas celulares participantes deste processo (Figura 9).

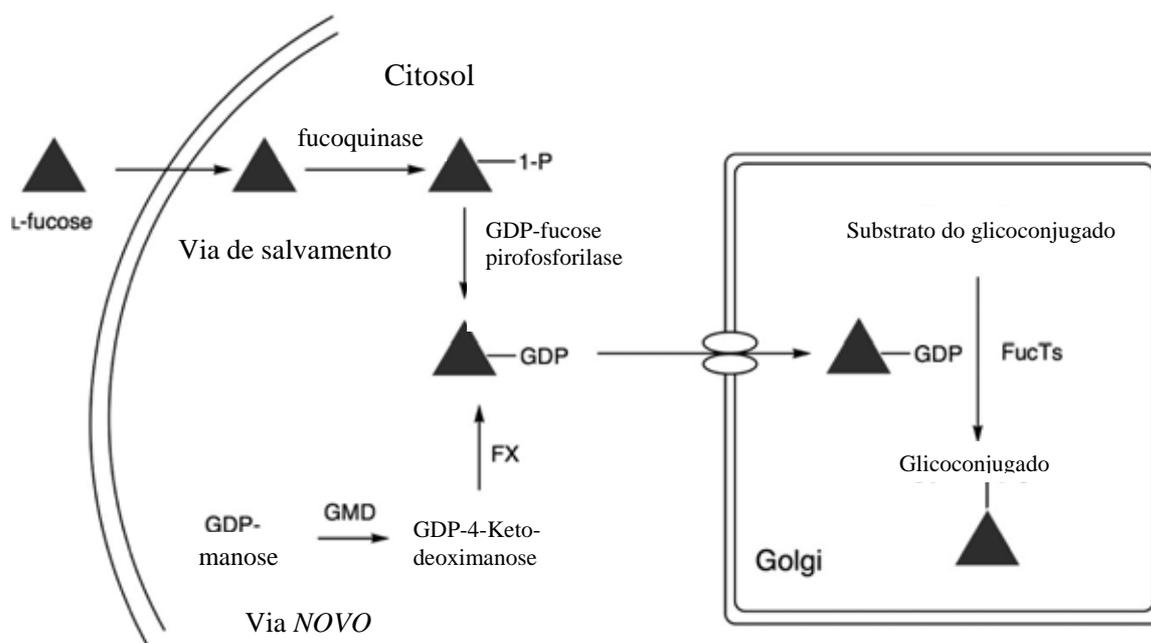


Figura 9. Biossíntese da GDP-fucose: A via *novo* transforma GDP-manose em GDP-fucose via 2 enzimas. A GDP-manose 4,6- dehidratase (GMD) e a GDP-4-Keto-6- deoximanose (FX). A via de salvamento utiliza L-fucose livre no citosol para criar a GDP-fucose pela ação da enzima fucosilase e da fucose pirofosforilase. O GDP-fucose formado é usado pelas fucosiltransferases (FUTs) no complexo de Golgi para catalisar a transferência da L-fucose para os glicoconjugados. Fonte: SAWA et al, 2006.

2.5.2 FUCOSILAÇÃO

Fucosilação é um dos processos que acontecem na glicosilação, realizado pelas enzimas fucosiltransferases, também denominadas FUTs (BARTHEL *et al.*, 2008). É essencial em eventos biológicos especialmente na fertilização, embriogênese, tráfico de linfócitos, resposta imune e em diversas doenças (MAEDA; NISHIMURA, 2008). As fucosiltransferases (FUT) participam da transferência de resíduos de L-fucose da GDP-L-fucose (Guanosina difosfato-L-fucose) com ligações α 1,2-, α 1,3-, α 1,4- e α 1,6-glicosídicas (MAEDA; NISHIMURA, 2008). Já foram identificadas 9 tipos de fucosiltransferases, entre essas 6 fazem a ligação α 1,3 (FUT 3, 4, 5, 6, 7 e 9) com o carboidrato específico (YANG *et al.*, 2007; YIN *et al.*, 2010). Fucosiltransferases atuam frequentemente na etapa final de glicosilação em uma série de glicanos biologicamente importantes como nas estruturas de antígenos de Lewis (sLe^x, sLe^a e sLe^b) (MAEDA; NISHIMURA, 2008). Esses antígenos tem papel na adesão e metástase do câncer de próstata (BARTHEL *et al.*, 2008).

Potapenko (2010) descreve o processo de fucosilação que é controlado através da expressão dos genes FUTs que tem a função de inserir resíduos do carboidrato L-fucose, provenientes do complexo GDP-fucose, fazendo parte da glicosilação, que se inicia no lúmen do retículo endoplasmático, havendo a formação de um arranjo de carboidratos (oligosacarídeos) que normalmente se liga ao nitrogênio da amida do aminoácido asparagina (ligação N-terminal). Assim é encaminhado para o complexo de Golgi para finalizar o processo com a inserção de moléculas de L-fucose na cadeia glicídica. O aumento da expressão do monossacarídeo L-fucose, componente da glicosilação, foi observado durante a tumorigênese e progressão neoplásica em tumores de tireóide, carcinoma ovariano, adenocarcinoma do colón e carcinoma de pulmão (YUAN *et al.*, 2008).

As enzimas FUT3 e FUT6 são da família das α 1,3 fucosiltransferases, que participam da síntese das estruturas de carboidratos Sialyl Lewis X (sLe^x) [NeuAc α 2-3Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc β -R], e da estrutura de carboidrato Le^x,

[Gal β 1-4(Fuc α 1-3) GlcNAc β -R] (MORIWAKI, MIYOSHI, 2010). A enzima FUT 3 também pode exibir atividade como uma enzima da família α 1-4 fucosiltransferase, resultando na síntese do antígeno de Lewis tipo 1 que é: Le^a [Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β -R] e Le^b [(Fuc α 1-2) Gal β 1-3(Fuc α 1-4) GlcNAc β] (YIN, 2010). Esta é formada por 361 resíduos de aminoácidos e tem 2 potenciais sítios de ligação tipo N-glicosilação, além de ser codificada no cromossomo 19p 13. 3. Já a enzima FUT 6 tem 359 resíduos de aminoácidos e tem 5 potenciais sítios de ligação N-glicosilação, esta enzima é codificada também no 19p 13. 3 (VRIES et al, 2001) (Figura 10). Assim, estudos demonstram o envolvimento das fucosiltransferases na progressão do câncer (MARKER *et al.*, 2001; BARTHEL *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2008) e também no poder metastático de tumores e pior prognóstico (BARTHEL *et al.*, 2008; YIN *et al.*, 2010). Também, relacionam a glicoproteína E-selectina, com o poder de invasão e metástase de cânceres quando ligada a glicanos fucolisados presentes em gliconjugados na superfície celular (YIN, 2010).



Figura 10. Formação molecular dos Antígenos de Lewis. A atividade as enzimas FUT 3 e FUT 6 resultana síntese do antígenos Sialyl Lewis X (sLe^x) Lewis X (Le^x). A enzima FUT 3 também sintetiza os antígenos Lewis A (Le^a) e Lewis b (Le^b) .

2.6 LECTINAS

O início dos estudos com as lectinas ocorreu em 1888, quando Stillmark durante sua tese de doutorado observou que extratos de sementes de mamona, *Ricinus communis*, tinham a capacidade de aglutinar eritrócitos (MORENO, 2008).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que reconhecem estruturas de carboidratos livres ou conjugados, tem distribuição ubíqua na natureza incluindo seres vertebrados, invertebrados, bactérias e vírus (WANG; LEE; SU, 2009; MAURYA *et al*, 2010). A principal fonte de lectinas comercialmente disponíveis são as sementes (WANG; LEE; SU, 2009).

O termo lectina refere-se a sua especificidade da reação, provém do latim: “*legere*” que significa selecionado (MAURYA *et al*, 2010). É uma família de proteínas reconhecedora de carboidratos que são classificadas dentro de um número de grupos específicos baseados na afinidade a monossacarídeos e/ou dissacarídeos (ROSENFELD *et al*, 2007).

Algumas das funções já propostas relacionam as lectinas como participantes da proteção das plantas contra microrganismos e insetos fitopatogênicos como também contra animais predadores, além de servirem como mediadoras da simbiose entre as plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio (SHARON; LIS, 2004).

O interesse nas lectinas intensificou-se quando se descobriu que elas são sondas bioquímicas 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). As lectinas também estão sendo estudadas como alvo terapêutico, havendo aplicações em adenocarcinoma de cólon como molécula guia para medicamentos órgão específico (MAURYA *et al*, 2010). As lectinas tem sido usadas como sondas histoquímicas para caracterização de vários tipos celulares em várias etapas da diferenciação e maturação do câncer (LIMA *et al*, 2010). Também tem sido utilizada para detectar alterações de glicoconjugados

associados á hiperplasia, displasia e adenocarcinoma de próstata (LIMA *et al*, 2010).

As lectinas UEA-I (*Ulex europeus* agglutinin) e LTA (*Lotus tetragonolobus* agglutinin) são da família das leguminosas que apresentam entre 220 a 250 resíduos de aminoácidos, tem diferenças em seu sítio de ligação ao carboidrato L-fucose. O sítio de ligação dessas lectinas tem uma região formada por 4 loops que formam uma cavidade na superfície da proteína. Nos loops há três resíduos de aminoácidos bastante conservados (ácido aspártico, asparagina e glicina/arginina) nos quais são responsáveis pela formação de 4 ligação de hidrogênio e que são nessa região que há as mudanças na especificidade das mesmas (MORENO, 2008).

A UEA-I reconhece resíduos de α -L-fucose presente nas células endoteliais, ceratinócitos e células das glândulas ecrínas da pele, tanto no estado normal como durante modificações moleculares que acontecem em diversas patologias, constituindo, portanto, em um bom marcador para evidenciar proliferação ou depleção de tipos celulares específicos (MELO-JUNIOR, 2003).

A LTA também é utilizada como uma ferramenta bioquímica desde os anos 70. Sua especificidade por L-fucose já está bem eluciada, porém a maneira como ocorre essas interações com os oligossacarídeos complexos ainda está sendo pesquisado (MORENO, 2006).

Essas duas lectinas ligam-se especificamente nas regiões α -do carboidrato (L-fucose), porém diferem no número do carbono que há nesta ligação. A UEA-I liga-se ao oligossacarídeo através da ligação α 1,2 (Fuc(α 1,2)Gal(β 1,4)GlcNAc) mas não faz ligação com antígenos Sialil Lewis A (sLe^a) e Sialil Lewis X (sLe^x). LTA, além de fazer ligação α 1,2 liga-se pela ligação α 1,3 (Fuc (α 1,3) GlcNAc dos carboidratos e reconhece o antígeno sLe^x (MORENO, 2006; PAWILOWICZ; HIRNLE; PRASTOWSKA, 2009; VALBUENA *et al*, 2010).

2.7 HISTOQUÍMICA COM LECTINAS

As lectinas podem ser empregadas amplamente no estudo de glicanos através de métodos bioquímicos e histoquímicos (VALBUENA *et al.*, 2010). Em histoquímica, a aplicação das lectinas com diferentes especificidades pode fornecer um sistema de detecção sensível a mudanças na glicosilação e expressão de carboidratos que podem ocorrer durante a embriogênese, crescimento e em diversas doenças como o câncer (SOBRAL *et al.*, 2010). Mudança na identidade sacarídica de células transformadas benigna e malignamente tem sido avaliada através da histoquímica com lectinas (BELTRÃO *et al.*, 1998, 2001, 2003; CAMPOS *et al.* 2006), com a possibilidade de se estabelecerem como sondas de diagnóstico e/ou prognóstico para cânceres de mama, estômago, cólon, pulmão, próstata, entre outros (BELTRÃO *et al.*, 1998, 2001; VILA NOVA, 2003; MELO JUNIOR *et al.*, 2004, 2008; SANTOS *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2009; RÊGO, BELTRÃO, 2009). A histoquímica com lectinas baseia-se na ligação específica da lectina, geralmente conjugada com diferentes compostos, a uma estrutura glicídica expressa na superfície celular.

A maioria dos estudos utilizando histoquímica com lectinas em biópsias cirúrgicas refere-se a tumores derivados de tecidos epiteliais e mesenquimais, todos evidenciam maturação glandular, não somente pelo fato destes tumores serem de grande importância clínica, mas também porque a marcação com lectinas é particularmente satisfatória na investigação de tumores (MELO JUNIOR, 2003). A histoquímica com lectinas também é aplicada em tecidos prostáticos para evidenciar componentes estruturais e alterações no desenvolvimento das glândulas prostáticas de cavalos (PARILLO *et al.*, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a expressão da enzima fucosiltransferase 3 e fucosiltransferase 6 em tumores prostáticos humanos diagnosticados como Adenocarcinoma Prostático e Hiperplásicos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Correlacionar perfis genotípicos diante da expressão das enzimas FUT 3 e FUT 6 com o padrão de expressão de seus carboidratos correspondentes fenotipicamente empregando o método de histoquímica com as lectinas UEA e LTA, ambas específicas para L-fucose;
- Correlacionar os níveis de malignidade (diferenciação morfológica) e o perfil molecular de expressão das fucosiltransferases e L-fucose (genotipicamente e fenotipicamente, respectivamente).
- Analisar e correlacionar os níveis de expressão dos biomarcadores estudados entre o Adenocarcinoma Prostático e Hiperplasia Prostática Benigna.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras – Foram utilizadas biópsias em parafina (40 diagnosticadas como adenocarcinoma prostático e 40 diagnosticadas como hiperplasia prostática benigna) pertencentes aos Arquivos do Setor de Patologia do LIKA e do Setor de Anatomia-patológica do Hospital das Clínicas da UFPE (idade média de armazenamento de 7 anos). As biópsias foram utilizadas após aprovação do Comitê de Bioética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (SISNEP FR – 272931, CEP/CCS/UFPE N° 195/09).

4.2 Dados Clínicos – Foram obtidos os dados clínicos dos pacientes referentes a cada biópsia utilizada nesta pesquisa no Serviço de Arquivamento Médico e Estatística (SAME) do Hospital das Clínicas de Pernambuco. Os dados obtidos foram: idade, gleason, estadiamento tumoral, peso prostático, sintomas clínicos. Como critérios de inclusão só foram utilizados os prontuários que tinham as informações objetos da nossa pesquisa acima citados.

4.3 Imunohistoquímica – Cortes histológicos (4µm) foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100% e 70%). Para remoção de pigmentos formólicos as lâminas foram incubadas em Hidróxido de Amônio a 10% por 10 minutos. Em seguida foi feita a recuperação antigênica em tampão citrato a 10mM em câmara de vapor d'água (*STIMER*) por 30 minutos. Após o resfriamento, os cortes foram incubados com solução 0,3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em metanol por 30 minutos a 25°C seguido de incubação com tampão PBS-BSA 1% por 1 h a 25°C. Em seguida foi realizada a incubação dos tecidos com o anticorpo policlonal anti-FUT 3 (Sigma) e policlonal anti-FUT6 (Sigma) na diluição de 1:200, ambos, por 16 horas à 4°C, seguindo de incubação com o anticorpo secundário (ADVANCE™ HRP LINK - DAKO) e terciário (ADVANCE™ HRP ENZIME - DAKO) por 45 minutos cada à 25°C. A revelação foi feita com DAB (diaminobenzidina) -H₂O₂ e realizada a contracoloração com hematoxilina. Todas as lavagens realizadas entre as etapas descritas foram realizadas com tampão

fosfato de sódio 100mM, pH 7,2 (PBS) suplementado com NaCl 150mM. O controle de marcação foi realizado omitindo-se o anticorpo primário (anti-FUT 3 e anti-FUT6).

4.4 Histoquímica com Lectinas - Cortes histológicos (4 μ m) foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100% e 70%). Em seguida foram tratados com uma solução de Tripsina 0,1% (p/v) a 37°C por 2 minutos e incubados com as lectinas conjugadas a peroxidase (UEA-I e LTA) na concentração de 10 μ g/mL e 30 μ g/mL, respectivamente, por 2 horas a 4°C. A revelação foi realizada com uma solução de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio. Os cortes foram contra colorados com hematoxilina e montados. Todas as lavagens realizadas entre as etapas descritas foram realizadas com tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,2 (PBS) suplementado com NaCl 150mM. A metodologia empregada foi desenvolvida segundo Beltrão *et al.* (2003). O controle da marcação foi realizado com lectinas inibidas por L-fucose (300mM).

4.5 Análises estatísticas

As marcações observadas na Imunohistoquímica e Histoquímica com Lectinas foram analisadas utilizando, testes não paramétricos (Teste Exato de Fischer e Teste de Qui-quadrado) com o nível de significância 95% ($P < 0.05$) usando o programa GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA.

4.6 Análises Digital de Imagens – foi utilizado um sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico Eclipse 50i (Nikon, USA). Foram analisadas três áreas aleatórias (μm^2) de cada tecido. Na histoquímica com lectinas e imunohistoquímica foram utilizados como parâmetro de análise positivo ou negativo.

ARTIGO**EXPRESSION OF FUT3 AND FUT6 IN PROSTATIC ADENOCARCINOMA AND
BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA AND THEIR GLYCOPHENOTIPIC
PROFILE**

- Juliana Lúcia de Albuquerque Vasconcelos
Affiliation: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) –
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
Address: LIKA – UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n CDU – Recife – PE –
Brazil 50670-901
- Steffany de Almeida Ferreira
Affiliation: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) –
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
Address: LIKA – UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n CDU – Recife – PE –
Brazil 50670-901
- Ana Rosa Galdino Bandeira, MS
Affiliation: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) –
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
Address: LIKA – UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n CDU – Recife – PE –
Brazil 50670-901
- Mariana Montenegro de Melo Lira, MD
Affiliation: Departamento de Patologia - Universidade Federal de
Pernambuco (UFPE).
Address: UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n CDU – Recife – PE – Brazil
50670-90

- Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti, MS
Affiliation: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
Address: LIKA – UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n CDU – Recife – PE – Brazil 50670-901

- Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, PhD
Affiliation: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) and Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
Address: LIKA – UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n CDU – Recife – PE – Brazil 50670-901

Corresponding author: juli6296@yahoo.com.br, telephone: +55 81 87689283/ +55 8198015771

Artigo submetido à revista:
Journal of Cancer Research and Clinical Oncology,
Fator de Impacto: 2.485.

ABSTRACT

Purpose: Prostate cancer is the malign disease most diagnostic and the second leading cause the cancer-related death among American men. Glycosylation is a posttranslational process carried out by various glycosyltransferases, such as fucosyltransferases (FUTs) that catalyze the transfer of the L-fucose residues to glycoconjugates. The present study aimed to investigate the expression of FUT3 and FUT6 and to compare with the phenotype profile of L-fucose in Prostatic Adenocarcinoma (PA) and Benign Prostatic Hyperplasia (BPH). **Methods:** FUT3 and FUT6 expressions were evaluated by immunohistochemistry and the profile of L-fucose in cell surface glycoconjugates was developed with lectin histochemistry (UEA-I and LTA). Clinic-pathologic features were also correlated with immune- and lectin histochemistry outcomes. **Results:** FUT3 and FUT6 showed a high expression in both prostatic tissues, especially FUT6. The results of lectin histochemistry showed a low distribution/accessibility of L-fucose residues. **Conclusion:** Results indicates that FUT3 and FUT6 are good biomarkers to evaluate benign and malignant alterations in prostate reflecting a variation in the profile of L-fucose residues in these tumors which can be associated to their biological features.

Keywords: fucosyltransferases, L-fucose, prostatic adenocarcinoma, benign prostatic hyperplasia.

INTRODUCTION

Prostatic Adenocarcinoma (PA) is the malign disease most diagnostic and the second leading cause the cancer-related death among American men (Lima et al, 2010). It is also considered an elderly cancer and estimates for the year 2012/2013 approximately 518,510 new cases of cancer, including cases of melanoma skin, with 257,870 new cases for males and 260,640 for females. In the male population the number of new cases of prostate cancer was estimated for Brazil in the year 2012/2013 will be 60,180 new cases, corresponding to an estimated risk of 62 new cases per 100 000 men (INCA, 2012).

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is the most prevalent disease among prostate changes, affecting approximately 50% of men between 50 years and 90% among men with 80 years. It is a progressive disease, with continuous growth, leading to the emergence of symptoms and increased risk for complications over time, such as acute urinary retention and symptoms that may lead to even surgery (Brum, Spritzer, Brentani, 2005).

Glycosylation is a biochemistry process conducted by various glycosyltransferases being one of the most versatile and abundant co- and posttranslational modifications of proteins (Maeda and Nishimura, 2008). Fucosylation is one process of glycosylation of proteins, which takes place during embryogenesis, development, cell adhesion, apoptosis and diseases. It is mediated by fucosyltransferases (FUTs) and their regulations occur during developmental or pathological processes (Barthel et al. 2009).

FUTs catalyze the transfer of the L-fucose residues from GDP-L-fucose (GDP-Fuc) metabolites to various acceptors via an α 1,2-, α 1,3-, α 1,4- e α 1,6-linkage (Maeda e Nishimura, 2008). Nine fucosyltransferases had been identified and among them six catalyze α 1,3 linkage, they are FUT 3, 4, 5, 6, 7 and 9 (Yang et al. 2007; Yin et al. 2010). Fucosyltransferases act often in the final stage of glycosylation in a variety of glycans with biological importance (Vries et al. 2001; Maeda and Nishimura, 2008; Moriwaki and Miyoshi, 2010). FUT3 and FUT6 are involved in the synthesis of sialyl Lewis X (sLe^x) structure [NeuAc α 2-3Gal β 1-4

(Fuc α 1-3) GlcNAc β -R], and Le^x structure, [Gal β 1-4(Fuc α 1-3) GlcNAc β -R] (Moriwaki and Miyoshi, 2010). FUT3 can also exhibit α 1-4 fucosyltransferase activity, resulting in the synthesis of type 1 Lewis antigens such as Le^a [Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β -R], Le^b [(Fuc α 1-2) Gal β 1-3(Fuc α 1-4) GlcNAc β] (Yin et al. 2010).

L-fucose has been found to be overexpressed during tumorigenesis and neoplastic progression in thyroid carcinoma, ovarian carcinoma, colorectal adenocarcinoma, breast cancer and brain metastasis from lung carcinoma (Yuan et al. 2008). The increased expression of L-fucose on tumor cells is not only a phenotypic marker of transformation (mainly of malignancy) but it is also known to participate in tumor progression, both directly and indirectly (Yuan et al. 2008). Studies demonstrate the involvement of expression of the fucosyltransferases in the progression of some cancers (Marker et al. 2001; Barthel et al. 2008; Chang et al. 2008; Carvalho et al. 2010; Potapenko et al. 2010) and also in metastasis and poor prognosis for prostate cancer through the interaction of Lewis antigens, formed by L-fucose residues, with the E-selectin to the vascular endothelium (Barthel et al. 2008).

In the present study, we investigated the expression of FUT3 and FUT6 and compared with the phenotype profile of L-fucose in prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia, beyond the correlation with their clinic-pathological features and prognosis.

MATERIAIS AND METHODS

Tissue samples

Ninety paraffin embedded the prostatic adenocarcinoma (PA) and benign prostatic hyperplasia (BPH) samples from patients who were histologically and clinically diagnosed at the Clinical Hospital the Pernambuco, in the Federal University of Pernambuco, Brazil, between 2007 and 2009. Samples were used under approval of the Bioethics Committee of the Health Sciences Center at UFPE (SISNEP FR – 272931, CEP/CHS/UFPE N° 195/09). After analysis of inclusion criteria it was used 40 paraffin embedded of PA and 40 BPH samples. Diagnosis of each case was confirmed by independent pathologists.

Immunohistochemistry (IHC)

Tissue slices (4µm) from formalin-fixed, paraffin-embedded biopsies were deparaffinized in xylene and hydrated in graded ethanol (70-100%). Samples were treated with a 10% ammonium hydroxide solution for 10 min prior to antigen retrieval that was performed with a in citrate buffer (pH 6.0) in STIMER for 30 min. Endogenous peroxidase was blocked with 1:1 hydrogen peroxide in methanol for 30 min at 25°C. Slices were incubated with rabbit polyclonal antibody anti-FUT3 (1:200, Sigma-Aldrich, USA) and polyclonal antibody anti-FUT6 (1:200, Sigma-Aldrich, USA) overnight at 4°C. After washing with 100mM sodium phosphate buffer pH 7.2, supplemented with 150mM NaCl (PBS) sections were incubated with secondary antibody (ADVANCE TM HRP LINK – DAKO, USA) for 45 min, followed by the tertiary antibody (ADVANCE TM HRP ENZIME – DAKO, USA) for 45 min both at 25°C. 3,3'-Diaminobenzidine (DAKO, USA) was used as the final chromogen, and hematoxylin was used for counter-staining. All washes between the steps were performed with PBS. Reaction control was developed without the primary antibodies (anti-FUT3 and anti-FUT6). Any staining, weak or intense, was considered as positive when occurred in at least 20% of cells.

Lectin Histochemistry

Biopsies (4 μm) were cut, adhered to albumin-treated slides, deparaffinized in xylol and hydrated in graded ethanol (100%–70%). Slices were treated with 0.1% (w/v) trypsin solution for 2 minutes at 37°C and afterwards with 0.3% (v/v) methanolic hydrogen peroxide solution for 15 minutes at 25°C. Sections were incubated with HRP-conjugated lectins (UEA-I-HRP, LTA-HRP), at 10 and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, for 2 hours at 4°C. Slices were washed (twice for 5 min) with 100mM sodium phosphate buffer (PBS) pH 7.2, containing 0.15M NaCl, after each step. Lectin staining was visualized with 3, 3-diaminobenzidine- (DAB-) hydrogen peroxide in PBS for 4 minutes at 25°C [11]. Thereafter, tissues were rinsed in distilled water, counterstained with hematoxylin, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylol, and mounted. Inhibition lectin-carbohydrate binding controls were performed using L-fucose at a final concentration of 300mM. The rest of the protocol was as described above. Any staining, weak or intense, was considered as positive when occurred in at least 20% of cells.

Light Microscopy

Tissue sections were examined using an optical microscope (Nikon Eclipse 50i, USA). Staining was determined as the pattern observed in at least 20% of cells with cytoplasm or membrane staining. For image acquisition, an Image Analyses System (*software* NIS—Elements F version 2.30—Nikon, USA) was used.

Statistical analysis

Staining was analyzed by nonparametric tests (Fisher's exact test and Qui-square test) with a significance level of 95% ($p < 0.05$) using GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA.

RESULTS

Immunohistochemistry

The expression of FUT3 and FUT6 in PA and BPH was observed in the cytoplasm with localization consistent with the Golgi apparatus. IHC stainings are shown in Figures 1 and 2. The correlation between FUT3 and FUT6 in PA and BPH is shown in Table 1.

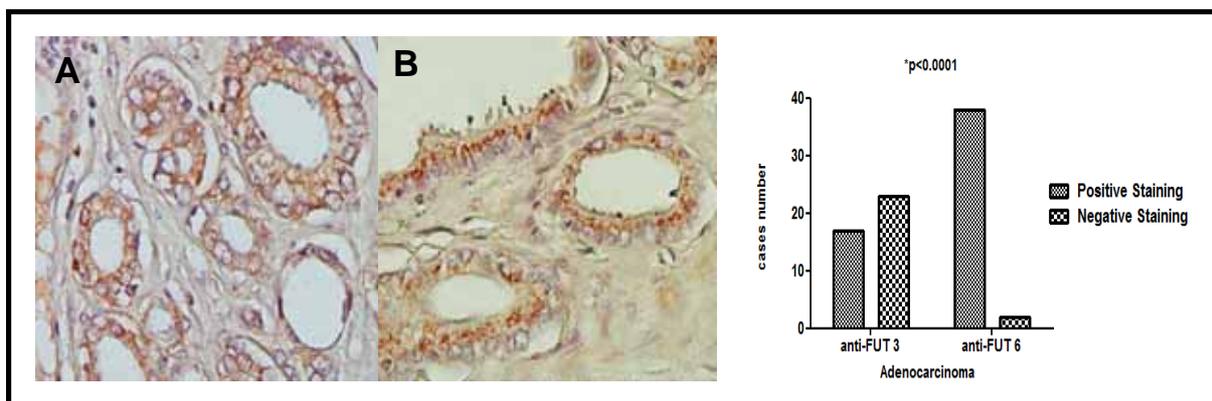


Figure 1: (A) IHC of FUT3 in glandular epithelium in PA (Magnification x400); (B) IHC of FUT6 glandular epithelium in PA (Magnification x400). * Analyzed by Fisher's exact test.

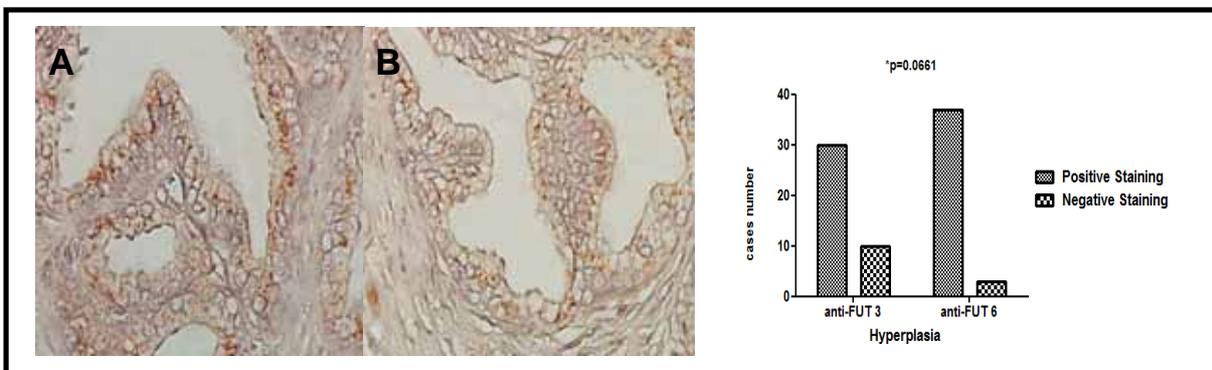


Figure 2: (A) IHC of FUT3 in glandular epithelium in BPH (Magnification x400); (B) IHC of FUT6 glandular epithelium in BPH (Magnification x400). * Analyzed by Fisher's exact test.

Table 1. Correlation between the expression of FUT3 and FUT6 in Prostatic Adenocarcinoma (PA) and Benign Prostatic Hyperplasia (BPH)

Type	<i>n</i>	FUT3		<i>p</i> *	FUT6		<i>p</i> *
		+	-		+	-	
PA	40	18	22	0.01	38	2	1.000
BPH	40	30	10		37	3	

* $p < 0.05$, Analyzed by Fisher's exact test

IHC of FUT3 and FUT6 was correlated with clinic-pathologic features (age, tumor aggressiveness, Gleason classification, T classification, N classification and distant metastasis status) - Table 2. Furthermore, we did not find correlation between immunohistochemistry and pre-operative PSA.

Table 2. Correlation between the clinic-pathologic features and expression of FUT3 and FUT6.

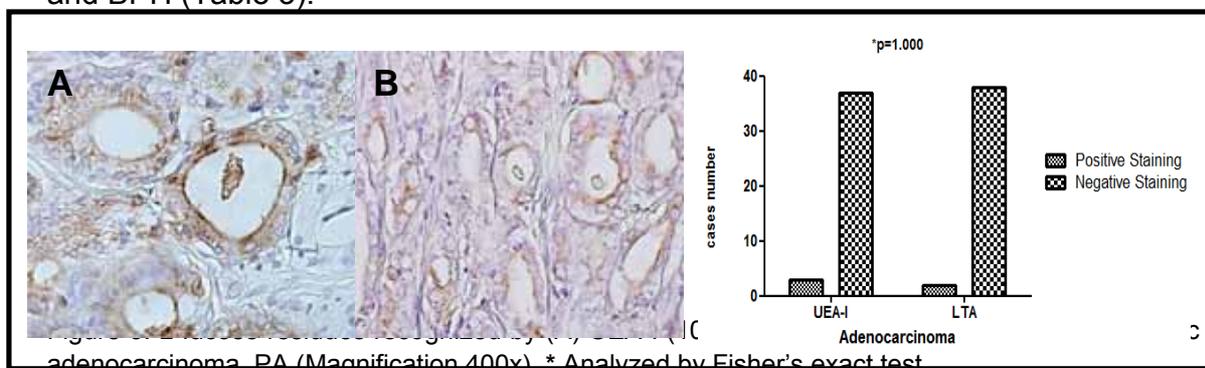
Variable	Total	FUT3		<i>p</i>	FUT6		<i>p</i>
		+	-		+	-	
Age (years)							
≥ 70	12	03	09	0.165	11	01	0.515
< 70	28	15	13		27	01	
Gleason							
6-7	37	17	20	1.000	35	02	1.000
8-9	03	01	02		03	00	
T Classification							
T2	29	12	17	0.497	27	02	1.000
T3	11	06	05		10	01	
N Classification							
NO	28	14	14	0.777	26	02	1.000
NX	12	04	08		11	01	
Distant Metastasis							
MX	35	17	18		33	02	

* $p < 0.05$, Analyzed by Fisher's exact test

Legend: T2 (tumor limited to the prostate), T3 (tumor has spread beyond the prostate capsule), NX (regional lymph nodes cannot be evaluated), NO (absence of metastases in regional lymph nodes), MX (presence of distant metastasis cannot be evaluated).

Lectins Histochemistry

L-fucose residues in PA (Figure 3) and in BPH (Figure 4) were evidenced in the cytoplasm. There was no significant correlation between UEA-I and LTA in PA and BPH (Table 3).



adenocarcinoma, PA (Magnification 400x). * Analyzed by Fisher's exact test.

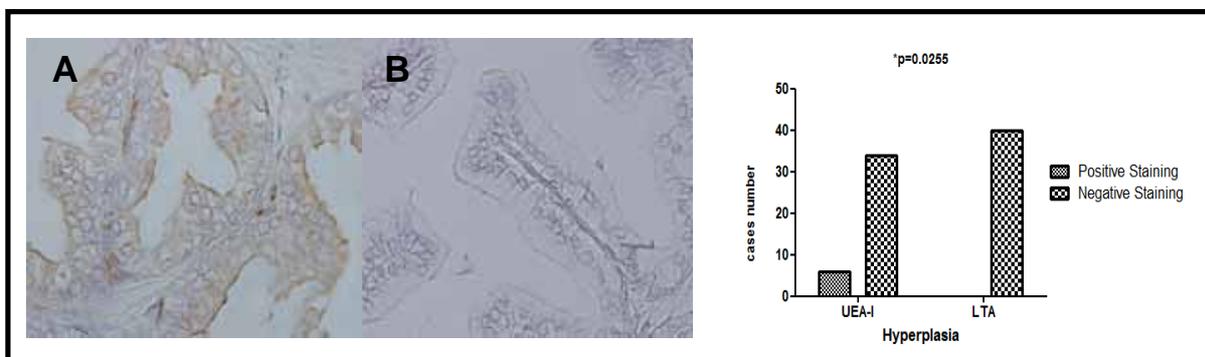


Figure 4. L-fucose residues recognized by (A) UEA-I (10µg/mL) staining and (B) LTA (30µg/mL) no staining in benign prostatic hyperplasia, BPH (Magnification 400x).

Table 3. UEA-I and LTA staining pattern in Prostatic Adenocarcinoma (PA) and Benign Prostatic Hyperplasia (BPH)

Type	n	UEA-I		p*	LTA		p*
		+	-		+	-	
PA	40	03	37	0.263	02	38	0.493
BPH	40	06	34		00	40	

* p<0.05, Analyzed by Fisher's exact test

The correlation of the expression of FUT3 and FUT6 and the L-fucose profile in PA and in BPH are presented in Figure 5.

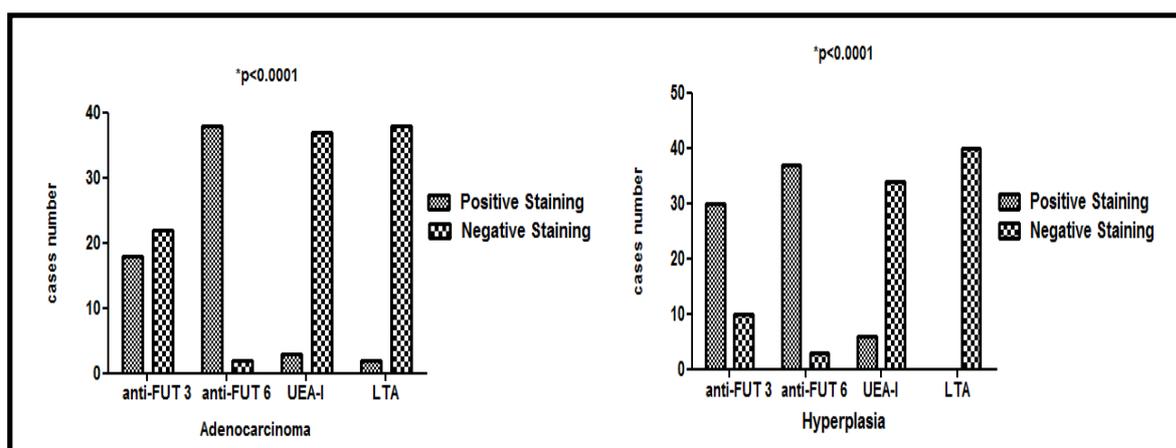


Figure 5. Correlation between FUT3 and FUT6 expression and L-fucose profile in AP and BPH (Qui-square test, *p<0.05).

DISCUSSION

Carbohydrates on the cell surface glycoconjugates play important roles in neoplastic cell proliferation, invasiveness and metastasis. Alteration of glycoconjugate components is seen in different cancer cells and it is known to correlate with the carcinogenesis (Yang et al. 2007). Proteins are glycosylated by the actions of a series of glycosidases and glycosyltransferases resulting in a range of glycan structures that may vary according to the physiological status of the individual (Rosenfeld et al. 2007).

Oncologic diagnosis currently uses techniques to assess the molecular characteristics of tumor tissue, including immunohistochemistry (IHC), fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and quantitative real-time PCR. IHC methods have several advantages including the capability to measure biomarker expression in small numbers of tumor cells among a large normal cell population (Stern et al. 2010). In our study, FUT3 and FUT6 expression, two types of glycosyltransferases, were analyzed in Prostatic Adenocarcinoma (PA) and Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) using IHC.

Our results showed an overexpression of FUT3 and FUT6 in PA ($p < 0.0001$); and in BPH FUT 6 ($p = 0.0661$) was the only one overexpressed. Carvalho et al. (2010), observed the overexpression of these glycosyltransferases in cells of gastrointestinal carcinoma while Stern et al (2010) observed a similar pattern of expression in colorectal cancer tissues. The latter used IHC assays in formalin-fixed, paraffin-embedded biopsies as our study.

The analysis of FUT3 and FUT6 mRNAs in PA showed that the expression of these two genes are involved in the metastasis feature, induction of synthesis the Sialyl Lewis^x antigens, induction of E-selectin-mediated adhesion and cell trafficking (Barthel et al. 2008, Barthel et al. 2009). Our results reinforce these observations using IHC instead of cDNA a technique that if used in formalin-fixed paraffin-embedded tissues can undergo difficulties regarding the integrity of mRNAs. Yin et al (2010) observed that FUT3 is highly expressed by multiple cancer cell lines including the prostate cancer cell line MDA PCa2b.

Our lectin histochemistry showed that UEA-I and LTA were not specific for PA ($p=1.000$) while for BPH only UEA-I was positive. Such result indicates that UEA-I is a candidate for histochemistry probe for BPH. The negative staining for LTA can be explained by not accessibility or not insertion of L-fucose residues in BPH. Lectin histochemistry has been used in various tissues with different lectins to become a detection system to show changes in glycosylation (Sobral et al. 2010). A study with metastatic prostatic carcinomas using lectins showed that carcinomas of different metastatic potential express different glycol moieties in cell surface glycoconjugates (Chan et al. 2001), as in our laboratory used the lectins not commercialized Cramoll 3 and Cramoll 1,4 in human tissues diagnosed with BPH and AP (Lima et al. 2010).

The UEA-I and LTA lectins, in our results, show no as promising probes in prostate cancer as *Vicia Villosa lectin* (VVA - recognizes α - or β -linked terminal N-acetylgalactosamine residues), *Soybean Agglutinin lectin* (SBA – recognizes α - and β -N-acetylgalactosamine and galactopyranosyl residues) and *Helix pomatia agglutinin lectin* (HPA – recognizes α -N-acetyl-galactosamine residues - HPA) showed by Sherwani et al (2003). Study shows that high expression of L-fucose was observed in thyroid carcinomas, ovarian cancer, lung cancer, mammary adenocarcinoma and colorectal adenocarcinoma (Yuan et al. 2008).

The differences in staining using lectins with the same specificity may be motivated by the differences in binding affinity for the carbohydrate residue recognized by homologous lectin (Sampaio, 2006). UEA-I and LTA are belong to legume family that have 220 to 250 amino acid residues, and show differences in their carbohydrate recognition domain (CRD) for L-fucose. The CRD of these lectins form a cavity on the surface of the protein determined by four loops of amino acids residues in which three of them are very conserved (aspartic acid, asparagine, and glycine/arginine). These amino acids residues participate of four hydrogen bonds being involved in changes in sugar specificity (Moreno, 2008). UEA-I and LTA recognizes L-fucose and bind specifically to it but they differ in the number of carbons in L-fucose participating in hydrogen bonds that stabilizes the L-fucose-lectin binding. UEA-I need to find L-fucose residues belonging to

oligosaccharides carrying α 1,2 (Fuc(α 1,2)Gal(β 1,4)GlcNAc) residues. But UEA-I do not bind L-fucose in Sialyl Lewis A (sLe^a) and Sialyl Lewis X (sLe^x) antigens. On the other hand LTA that recognizes L-fucose in α 1,2 binding also recognizes it in α 1,3(Fuc(α 1,3)GlcNAc) binding, then, sLex antigens (Moreno, 2006; Pawilowicz et al. 2009 ; Valbuena et al. 2010).

Our study showed the different expression of FUT3 and FUT6 and the L-fucose residue. FUT3 e FUT6 catalyze the transfer of L-fucose in α 1,3-linkage and UEA-I recognizes carbohydrates inserted with α 1,2-linkage while LTA recognizes it and the type with α 1,3-linkage. But the results showed that the lectin LTA did not show any kind of marking. Changes in carbohydrate binding between homologous lectins can be evaluated taking account the availability of carbohydrates, in this case L-fucose. This availability can be altered when there is any deficiency in *de novo* via of the synthesis of the carbohydrate that leads to a virtually complete deficiency of cellular global fucosylation, including α 1-2, 1-3/4, 1-6, and O-linkage. Also, there may be a process of GMDS gene deletion, that encodes the enzyme GDP-mannose 4,6 dehydratase which participates in the biosynthesis of L-fucose resulting in an almost complete deficiency of fucosylation. In this context defucosylation through genetic mutation in certain types of advanced cancer would lead or be involved in the escape from NK-cell mediated tumor surveillance and the acquisition of more malignant characteristics (Moriwaki and Miyoshi, 2010).

Nearly all types of malignant cells and cells of many types of diseased tissues demonstrate alterations in their glycosylation patterns when compared to their normal counter-part. Alterations in glycosylation are often a result of altered activities of glycosidases that cleave saccharide molecules in glycoconjugates, as is evident in the specific and preferential display of certain glycoconjugates on cancer cells (Ghazarian et al. 2011).

In summary, data showed that FUT3 and FUT6 are expressed in AP and BPH, especially FUT6, proposing that these enzymes are promising good biomarkers for prostate alterations. However, the expression of these enzymes is not significant when correlated with clinic-pathologic features in cases of PA and

BPH. Furthermore, our results suggest that the expression of L-fucose was low, suggesting that the recognition availability (spatial localization) of this carbohydrate is changed or that glycosidases are highly activated. Nowadays further studies have been carried out to verify these findings and to try to elucidate the role of FUT3 and FUT6 and L-fucose in the carcinogenesis and maintenance and development of prostatic tumors.

Conflict of interest: There are no conflicts of interest to declare.

Acknowledgment

Authors thank Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for research grants.

REFERENCES

Barthel SR, Gavino JD, Wiese GK et al (2008) Analysis of glycosyltransferase expression in metastatic prostate cancer cells capable of rolling activity on microvascular endothelial (E)-selectin. *Glycobiol* 18:806-817

Barthel SR, Wiese GK, Cho J et al (2009) Alpha 1,3 fucosyltransferases are master regulators of prostate cancer cell trafficking. *PNAS* 106:19491-19496

Brum IS, Spritzer PM, Brentani MM (2005). *Biologia Molecular das Neoplasias de Próstata*. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 49:797-804

Carvalho AS, Lepers H, Magalhães A et al (2010) Differential expression of α -2,3-sialyltransferases and α -1,3/4-fucosyltransferases regulates the levels of sialyl Lewis a and sialyl Lewis x in gastrointestinal carcinoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 42: 80–89

Chan FL, Choi HL, HO SM (2001) Analysis of Glycoconjugate Patterns of Normal and Hormone-Induced Dysplastic Noble Rat Prostates, and an Androgen Independent Noble Rat Prostate Tumor, by Lectin Histochemistry and Protein Blotting. *The Prostate* 46:21-32

Chang WW, Lee CH, Lee P et al (2008) Expression of Globo H and SSEA3 in breast cancer stem cells and the involvement of fucosyltransferases 1 and 2 in Globo H synthesis. *PNAS* 105:11667–11672

Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB (2011) A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *acta histochemica* 113: 236–247

Inca (2012) Estimate 2012: incidence of cancer in Brazil, National Cancer Institute. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>. Accessed 08 Jan 2012

Lima ALR, Cavalcanti CCB, Silva MCC et al (2010) Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with *Cratylia mollis* Seed lectin. *J Biomed Biotechnol* 2010: 1-6

Maeda T, Nishimura SI (2008) FRET-Based Direct and Continuous Monitoring of Human Fucosyltransferases Activity: An Efficient synthesis of Versatile GDP-I-Fucose Derivatives from Abundant d-Galactose. *Chem Eur J* 14:478 – 487

Marker PC, Stephan JP, Lee J et al (2001) Fucosyltransferase1 and H-Type Complex Carbohydrates Modulate Epithelial Cell Proliferation during Prostatic Branching Morphogenesis. *Dev Biol* 233: 95–108

Moreno FBMB (2008) Estudos estruturais de uma lectina presente em sementes de *Lotus tetragonolobus*. Thesis. University of São Paulo.

Moreno FBMB, Martil DE, Cavada BS et al (2006) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an anti-H(O) lectin from Lotus. *Acta Cryst* 62: 680–683

Moriwaki K, Miyoshi E (2010) Fucosylation and gastrointestinal cancer. *World J Hepatol* 2: 151-161

Pawilowicz MO, Hirnle L, Prastowska IK (2009) The expression of fucose isoforms of amniotic and plasma alpha-1-acid glycoprotein derived from 2nd and 3rd trimester normal pregnancies. *Clin Biochem* 42:1517-1523

Potapenko IO, Haakensen VD, Luders T et al (2010) Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Mol Oncol* 4: 98-118

Rosenfeld R, Bangio H, Gerwig GJ et al (2007) A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation. *J Biochem Biophys Methods* 70: 415-126

Sampaio KH (2006) Superfície ovocitária e desenvolvimento inicial de quatro espécies de peixe de interesse comercial da Bacia de Rio São Francisco. Dissertation, University of Minas Gerais

Sherwani AF, Mohmood S, Khan F et al (2003) Characterization of lectins and their specificity in carcinoma an appraisal. *Indian J Clin Biochem* 18: 169-180

Sobral APV, Rêgo MJBM, Cavalcanti CLB et al (2010) Con A and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. *J Oral Sci* 52: 49-54

Stern HM, Padilha M, Wagner K et al (2010) Drozitumab GALNT14 and FUT3/6 in Clinical Trials of Dulanermin and Development of Immunohistochemistry Assays to Assess. *Clin Cancer Res* 16:1587-1596

Valbuena G, Madrid JF, Hernández F, Sáez F (2010) Identification of fucosylated glycoconjugates in *Xenopus laevis* testis by lectin histochemistry. *Histochem. Cell Biol* 1: 215-225

Vries T, Knegtel RMA, Holmes EM, Macher BA (2001) Fucosyltransferases: structure/ function studies *Glycobiol* 11:119R-128R

Yang X, Zhang Z, Jia S et al (2007) Overexpression of fucosyltransferase IV in A431 cell line increases cell proliferation. *Intern J Biochem Cell Biology* 39:1722–1730

Yin X, Kuldeepsinh R, Ponmudi V, King MR (2010) Knockdown of fucosyltransferase III disrupts the adhesion of circulating cancer cells to E-selectin without affecting hematopoietic cell adhesion. *Carbohydr Research* 345: 2334-2342

Yuan K, Listinsky CM, Singh RK et al (2008) Cell Surface Associated Alpha-L-Fucose Moieties Modulate Human Breast Cancer Neoplastic Progression. *Pathol Oncol Res* 14:145–156

6 CONCLUSÕES

- As enzimas FUT3 e FUT6 apresentaram expressão significativa no adenocarcinoma e hiperplasia protastica e podem ser considerados como biomarcadores promissores para diagnósticos de alterações em tecido prostático;
- Como parâmetro de avaliação de prognóstico a expressão dessas enzimas não se apresentou significante no adenocarcinoma prostático;
- A baixa expressão de L-fucose correlacionada com a alta expressão as enzimas FUT 3 e FUT 6 pode estar relacionada com a ação das glicosidades, além de mudanças que podem acontecer na biossíntese/disponibilidade de L-fucose.
- Ainda assim, a histoquímica com lectinas foi capaz de revelar diferenças na identificação do carboidrato L-fucose em tecidos humanos prostático diagnosticados com Adenocarcinoma Prostático e Hiperplasia Prostática Benigna;

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARONI, R.H., NOVIS, M.I., CAIADO, A.H.M., CERRI, L.M.O., LEITE, C.C., CERRI, G.G. Ressonância magnética da próstata: uma visão geral para o radiologista. **Radiol Bras**, Brasil, v. 42, n. 3, p. 185-192, 2009.

BARTHEL, S. R., GAVINO, J. D., WIESE, G. K., JAYNES, J.M., SIDDIQUI, J., DIMITROFF, C.J. Analysis of glycosyltransferase expression in metastatic prostate cancer cells capable of rolling activity on microvascular endothelial (E)-selectin. **Glycobiol**, Nova Zelândia, v. 18, p. 806-817, 2008.

BELTRÃO, E.I.C., AMARAL, T., SILVA, J.S., COELHO, L.C.B.B., CARVALHO JUNIOR, L.B. Infiltrating ductal carcinoma: a lectin histochemistry study. **Anais Fac Méd Univ Fed Pernambuco**, Brasil, v. 46, p.32-35, 2001.

BELTRÃO, E.I.C., CORREIA, M.T.S., FIGUEIREDO-SILVA, J., COELHO, L.C.B.B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Appl Biochem Biotechnol**, Estados Unidos, v. 74, p.125-134, 1998.

BELTRÃO, E.I.C., MEDEIROS, P.L., RODRIGUES, O.G., SILVA, J.S., VALENÇA, M.M., COELHO, L.C.B.B.B, CARVALHO JUNIOR, L.B. Parkia pendula lectin as histochemistry marker for meningothelial tumores. **Eur J Histochem**, Itália, v.27, p.139-142, 2003.

BENEDETTINI, E., NGUYEN, P., LODA, M. The pathogenesis of prostate cancer: from molecular to metabolic alterations. **Diag Histopat**, Estados Unidos, v. 14, p. 195-201, 2008.

BILLIS, A., POMPEO, A.C.L. Adenocarcinoma da Próstata. **International Braz J Urol**. Brasil, v. 29, p. 27-34, 2003.

BOTT, S.R.J., WILLIAMSON, M., KIRBY, R.S. Genetic Changes and Their Prognostic Significance in Prostate Cancer. **Prostate Cancer: Scien and Clin Pract.** Chapter 11. p. 105, 2003.

BRUM, I.S., SPRITZER, P.M., BRENTANI, M.M. Biologia Molecular das Neoplasias de Próstata. **Arq Bras Endocrinol Metab**, Brasil, v. 49, n. 5, p. 797-804, 2005.

CAMPOS, L.M., CAVALCANTI, C. L. B., LIMA-FILHO, J. L. , CARVALHO, L. B. C. and BELTRÃO, E. I. C. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. **Biomark.**, London, v.11, p. 480-484, 2006.

CAZET, A., JULIEN, S., BOBOWSKI, M., BURCHELL, J., DELANNOY, P. Tumor-associated carbohydrate antigens in breast cancer. **Breast Cancer Research**, Estados Unidos, v. 204, n. 12, p. 1-13, 2010.

CHANG, W.W, LEE, C. H., LEE, P., LIN, J., HSU, C. W., HUNG, J. T., LIN, J. J., YU, J.C., SHAO, L, YU, J., WONG, C. H. and YU, A. L. Expression of Globo H and SSEA3 in breast cancer stem cells and the involvement of fucosyltransferases 1 and 2 in Globo H synthesis. **PNAS**, Estados Unidos, v. 105, n. 33, p. 11667–11672, 2008.

CLOSSET, J., REITER, E. **Prostate**. Handbook of Cell Signaling. Ed: Elsevier Science (USA), v. 3, cap. 347, 2003.

CUNHA, G.R., RICKE, W., THOMSON, A., MARKER, P., RISBRIDGER, G., HAYWARD, S. W., WANG, Y.Z., DONJACOUR A.D., KURITA, T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **J Steroid Biochem Mol Biol**, Inglaterra, v. 94, p. 221-236, 2004.

FURUTA, E., OKUDA, H., KOBAYASHI, A., WATABE, K. Metabolic genes in cancer: Their roles in tumor progression and clinical implications. **Biochimica et Biophysica Acta**, Estados Unidos, v. 1805, p. 141–152, 2010.

GHAZARIAN, H., IDONI, B., OPPENHEIMER, S.B. A glycobiochemistry review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics **Acta histochemica**. v. 113, p. 236–247, 2011.

GONÇALVES, I. R., PADOVANI, C., POPIM, R.C. Caracterização epidemiológica e demográfica de homens com câncer de próstata. **Cien Saude Colet**, Brasil, v. 4, n. 13, p. 1337-1342, 2008.

GUILLOT, J., GUERRV, M., KONSKA, G., CALDEFIE-CHEZET, F., DE LATOUR, M., PENNAULT-LIORCA, F. Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas. **Bull Cancer**. França, v. 91, p.141-58, 2004.

HIDARI, I.P.J.K, HORIE, N., MURATA, T, MIYAMOTO, D., SUZUKI, T., USUI, T. and SUZUKI, Y. Purification and characterization of a soluble recombinant human ST6Gal I functionally expressed in *Escherichia coli*. **Glycoconj J**, Estados Unidos, v. 22, p.1-11, 2005.

INCA. Câncer. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br>> . Acesso em 06 março de 2011.

INCA. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, 2012.

JANKOVIC, M., KOSANOVIC, M., MILUTONOVIC, B. Glycans as a target in the detection of reproductive tract cancers. **J Molecular Biol**, Estados Unidos, v. 27, p. 17-29, 2008.

JOSHUA, A.M.; EVANS, A.; VAN DER KWAST, T.; ZIELENSKA, M.; MEEKER, A.K.; CHINNAIYAN, A.; SQUIRE, J.A. Prostatic preneoplasia and beyond. **Biochim Bioph Acta**, Holanda, v. 1785, p.156-81, 2008.

KOPF, E. & ZHARHARY, D. Antibody arrays- An emerging tool in cancer proteomics. **Intern J Biochem Cell Biol**. Londres, v. 39, p. 1305- 1317, 2007.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7^a ed. São Paulo: Elsevier, 2005.

LIMA, A.L.R., CAVALCANTI, C.C.B., SILVA, M.C.C., PAIVA, P.M.G., COELHO, L.C.B.B., BELTRÃO, CORREIA, M.T.S. Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with *Cratylia mollis* Seed lectin. **J Biomed Biotechnol**, Estados Unidos, v. 2010, p. 1-6, 2010.

MAEDA, T., NISHIMURA, S.I. FRET-Based Direct and Continuous Monitoring of Human Fucosyltransferases Activity: An Efficient synthesis of Versatile GDP-I-Fucose Derivatives from Abundant d-Galactose. **Chem Eur J** Alemanha, v. 14, p.478 – 487, 2008.

MARANDOLA, P., BONGHI, A., JALLOUS, H., BOMBARDELLI, E., MORAZZONI, P., GERARDINI, M., TISCIONE, D., AALBERGAT, F. Molecular Biology and the Staging of Prostate Cancer. **Ann N Y Acad Sci**. Estados Unidos, v. 1028, p. 294–312, 2004.

MARKER, J.P., STEPLAN, J. P., LEE, J., BALD, L., MATHER, J. P., CUNHA, G.R. Fucosyltransferase1 and H-Type Complex Carbohydrates Modulate Epithelial Cell Proliferation during Prostatic Branching Morphogenesis. **Develop Biol**, Estados Unidos, v. 233, p. 95–108, 2001.

MAURYA, S. D., AGGARWAL, S., DHAKAR, R.C., TILAK, V.K., PRAJAPATI, S.K. Targeted delivery of drug to the colon with lectins and neoglycoconjugates: a review. **Inter J Pharmaceut Scienc Biotechnol**. India, v. 1, n. 4, p. 178-194, 2010.

MELO-JÚNIOR, M. R.; CAVALCANTI, C. L. B.; PONTES-FILHO, N. T.; CARVALHO JÚNIOR, L. B.; BELTRÃO, E. I. C. Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to *Helicobacter pylori*. **Brazilian J Microbiol**, Brasil, v. 39, p. 238-240, 2008.

MELO-JÚNIOR, M. R; TELLES, A. M. S.; ALBUQUERQUE, F.E. B. ; PONTES-FILHO, N. T. ; CARVALHO JR., LUIZ B. ; BELTRÃO, E. I. C. Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. **J Brasil Patol Medic Laborat**, Brasil, v. 40, p. 123-125, 2004.

MELO-JUNIOR, M.R. **Histoquímica e análise digital e imagens em neoplasias cutâneas**. Dissertação de Mestrado. Recife, 2003.

MONTIRONI, R., VELA-NAVARRETE, R., LOPEZ BELTRAN, A., MAZZUCHELLI, R., BONO, A. Review - Prostate Cancer. **Update on Path Prostate Biop Cancer**, 2005.

MORENO, F.B.M.B. **Estudos estruturais de uma lectina presente em sementes de *Lotus tetragonulobus***. Tese de Doutorado. São Paulo, 2008.

MORENO, F.B.M.B., MARTIL, D.E., CAVADA, B.S., AZEVEDO JUNIOR, W. F. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an anti-H(O) lectin from Lotus. **Acta Cryst.** , p. 680–683, 2006.

MORIWAKI, K., MIYOSHI, E., Fucosylation and gastrointestinal cancer. **World J Hepatol**. v. 2, p. 151-161, 2010.

MOTTA, V. P., MALAFAIA, O., RIBAS-JUNIOR J. M., CZECHKO, N. G., RIBAS, C. A. P. M., CUENCA, R.M.C. Expressão da CASPASE-3 e CD-34 no adenocarcinoma de próstata CASPASE-3 and CD-34 expression in prostate adenocarcinoma. **Rev Col Bras Cir**, Brasil, v. 36, p. 223-229, 2009.

NICKEL, J.C. Inflammation and Benign Prostatic Hyperplasia. **Urol Clin North Am**. Estados Unidos, v. 35, p. 109–115, 2007.

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

OLIVEIRA. C., TEIXEIRA, J. A., SCHMITT, F., DOMINGUES, L. A comparative study of recombinant and native frutalin binding to human prostate tissues. **BMC Biotechnol**, InglaterraPorto, v. 8, p. 1-7, 2009.

PARILLO, F., MANCUSO, R., VULLO, C., CATONE, G. Expression of prostate glycoconjugates in the stallion and castrated horse. **Reprod Dom Anim**, Estados Unidos, v. 10, p. 1439-1531, 2009.

PARNES, H., HOQUE, A., ES, D., TAYLOR, P., LIPPMAN, S. **Prostate Cancer**. Nutritional Oncology, Ed: Elsevier, cap. 20, p. 377-392, 2006.

PAWILOWICZ, M.O., HIRNLE,L., PRASTOWSKA, I.K. The expression of fucose isoforms of amniotic and plasma alpha-1-acid glycoprotein derived from 2nd and 3rd trimester normal pregnancies. **Clin Biochem**. Estados Unidos, v. 42, p. 1517-1523, 2009.

POTAPENKO, I.O., HAAKENSEN, V.D., LUDERS, T., HELLAND, A., BUKHOLM, I., SORLIE, T., KRISTENSEN, V.N., LINGJOERDE, O.C., BORRESEN-DALE, A.L.

Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. **Mol Oncol**, Holanda, v. 4, p. 98-118, 2010.

RÊGO, M.J.B.M., BELTRÃO, E.I.C. Avaliação do glicocódigo do carcinoma ductal mamário e sua correlação com dados clínicos e histopatológicos. **Rev Bras Ginecol e Obst** (Impresso), v. 31, p. 626-626, 2009.

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

ROSENFELD, R., BANGIO, H., GERWIG, G.J., ROSENBERG, R., ALONI, R., COHEN, Y., AMOR, Y., PLASCHKES, I., KAMERLING, J. P., MAYA, R.B.Y. A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation. **J Biochem Biophys Methods**, Holanda, v. 70, p. 415-126, 2007.

SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; MENEZES, F. D.; FERREIRA, R. C.; JÚNIOR, S. A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; CARVALHO, L. B.; BELTRÃO, E. I. C. CdS-Cd(OH)₂ core shell quantum dots functionalized with concanavalin A lectin for recognition of mammary tumor. **Physica Status Solidi A Appl Res**, Estados Unidos, v. 3, p. 4017-4022, 2006.

SAWA, M., HSU, T.L., LTOH, T., SUGIYAMA, M., HANSON, S.R., VOGT, P.K., WONG, C.H. Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans in vivo. **PNAS**, v. 103, p. 12371–12376, 2006.

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

SHARON, N.; Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **J Biol Chem**, Estados Unidos, v. 282, p. 2753-2764, 2007.

SHIMMA, Y.I., SAITO, F., OSAWA, F. and IGAMI, Y. Construction of a Library of Human Glycosyltransferases Immobilized in the Cell Wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environm Microbiol**, Estados Unidos, v. 72, p. 7003-7012, 2006.

SIGNORETTI, S., LODA, M. Prostate stem cells: From development to cancer. **Semin Cancer Biol**. Inglaterra, v.17, p.219–224, 2007.

SILVA, A. E., SERAKIDES, R., CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Cienc Rural**, Brasil, v. 34, p. 625-633, 2004.

SOBRAL, A. P. V., REGO, M.J.B.M., CAVALCANTI, C.L.B., CARVALHO, L.B..J., BELTRÃO, E.I.C. Con A and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepiidermoid carcinoma. **J of Oral Scien**, Japão, v. 52, p. 49-54, 2010.

SONNENSCHNEIN, C., SOTO, A.M. Theories of Carcinogenesis: an emerging perspective. **Semin Cancer Biol**, Inglaterra, v. 18, p. 372-377, 2008.

TONI, I., FLAMINI, E., MERCATALI, L., SACANNA, E., SERRA, P., AMADORI, D. Pathogenesis of Osteoblastic Bone Metástases From Prostate Cancer. **Cancer**, Estados Unidos, v.1, p. 1-13, 2010.

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

VALBUENA, G., MADRID, J. F., HERNÁNDEZ, F., SÁEZ, F. Identification of fucosylated glycoconjugates in *Xenopus laevis* testis by lectin histochemistry. **Histochem. Cell Biol**, Alemanha, v. 1, p. 215-225, 2010.

VAN LEENDERS, G.J.L.H., SCHALKEN, J.A. Stem cell differentiation within the human prostate epithelium: implications for prostate carcinogenesis. **BJU Int**. Inglaterra, v. 88, p. 35- 42, 2001.

VILA NOVA, S. P. **Novos macrociclos de lantanídeos: marcadores fotônicos projetados para aplicações biotecnológicas**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003. Tese (Doutorado em Química). p. 94.

VRIES, T., KNEGTEL, R.M.A., HOLMES, E.M., MACHER, B.A. Fucosyltransferases:structure/ function studies. **Glycobiol.** v. 11, p.119R-128R, 2001.

WANG, T. H., LEE, M. H., SU, N. W.; Screening of lectins by an enzyme-linked adsorbent assay. **Food Chemistry**, Estados Unidos, v. 113, p. 1218-1225, 2009.

WERNER, B., CAMPOS, A.C., NADJI, M., TORRES, L.F.B. Practical use of immunohistochemistry in surgical pathology. **J Bras Patol Med Lab.** v. 41, p. 353-64, 2009.

YANG X., ZHANG, Z, JIA, S. LIU, Y., WANG, X.,YAN, Q. Overexpression of fucosyltransferase IV in A431 cell line increases cell proliferation. **Intern. J. Biochem. Cell Biology**, Estados Unidos, v. 39, p. 1722–1730, 2007.

YIN, X., KULDEEPSINH, R., PONMUDI, V., KING, M.R. Knockdown of fucosyltransferase III disrupts the adhesion of circulating cancer cells to E-selectin without affecting hematopoietic cell adhesion. **Carbohydr Research**, Estados Unidos,v. 345, p. 2334-2342, 2010.

YOU, J., COZZI, P., WALSH, B., WILLCOX, M., KEARSLEY, J., RUSSEL, P., LI, Y. Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression. **Crit Rev Oncol Hematol**, Holanda, v. 73, p. 10-22, 2010.

YUAN, K., LISTINSKY, C.M., SINGH, R.K., LISTINSKY, J.J., SIEGAL, G.P. Cell Surface Associated Alpha-L-Fucose Moieties Modulate Human Breast Cancer Neoplastic Progression. **Pathol Oncol Res**, Holanda, v. 14, p. 145–156, 2008.

8 ANEXOS

8.1 ATIVIDADES REALIZADAS (2010)

8.1.1 Resumo publicado em Jornal Internacional

VASCONCELOS, J.L.A.; BRANDÃO, J.M.; LIMA, A.L.R.; CAVALCANTI, C.L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Trypsin x neuraminidase: comparative study for analysis biochemistry of Lewy bodies in Parkinson disease. In: III Encontro de Patologia Investigativa e XIII Jornada Internacional de Patologia do Hospital AC Camargo, 2010, São Paulo. **Applied Cancer Research** Supplement. São Paulo, 2010. v. 1. p. S36-S36.

8.1.2 Apresentação de Trabalho em Congresso

1- Título: CRATYLIA MOLLIS SEED ISOLECTINS AS HISTOCHEMISTRY PROBES FOR HUMAN CERVIX TISSUES. Evento: XXXIX Encontro da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Foz do Iguaçu – Paraná, 2010.

8.1.3 Participação em Eventos

- 1- V Curso de Biologia Molecular, realizado pelo HEMOPE no período de 26 a 30 de julho de 2010-Recife.
- 2- III Encontro de Patologia Investigativa e XIII Jornada Internacional de Patologia do Hospital AC Camargo, São Paulo, no período de 4 a 7 de agosto de 2010.
- 3- Treinamento prático e teórico para utilização e aplicações do equipamento Rotor-Gene Q (Quiagen), em 25 e 26 de outubro de 2010 no INCQS - Rio de Janeiro.
- 4- Palestrante na II Semana de Análises Clínicas da Escola Almirante Soares Dutra. Título da palestra: HPV: Diagnóstico Molecular e Vacinas, apresentada em 19 de novembro de 2010.
- 5- 1st Brazilian-German Meeting of Plant Systems Biology and Bioenergy, no dia 25 de novembro de 2010.