



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

LÚCIA PATRÍCIA BEZERRA GOMES DA SILVA

INVESTIGAÇÃO HISTOQUILUMINESCENTE COM LECTINAS E
AValiação DA INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES NA
EXPRESSÃO DE GLICOSILTRANSFERASES EM NEOPLASIAS
PROSTÁTICAS.

Recife – PE
2016

LÚCIA PATRÍCIA BEZERRA GOMES DA SILVA

**Investigação histoquimiluminescente com lectinas e avaliação da influência dos
hormônios esteróides na expressão de glicosiltransferases em neoplasias
prostáticas.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Departamento de Bioquímica, CB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Co-orientador:

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Departamento de Bioquímica, CB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Recife – PE

2016

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Lúcia Patrícia Bezerra Gomes da

Investigação histoquimiluminescente com lectinas e avaliação da influência dos hormônios esteroides na expressão de glicosiltransferases em neoplasias prostáticas / Lúcia Patrícia Bezerra Gomes da Silva. – Recife: O Autor, 2016.

117 f.: il.

Orientadores: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2016.

Inclui referências

- 1. Próstata – Câncer 2. Lectinas I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orient.) II. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (coorient.) III. Título.**

616.67 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-012

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

Parecer da comissão examinadora da defesa de qualificação de doutorado de

Lúcia Patrícia Bezerra Gomes da Silva

INVESTIGAÇÃO HISTOQUIMILUMINESCENTE COM LECTINAS E
AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES NA
EXPRESSÃO DE GLICOSILTRANSFERASES EM NEOPLASIAS PROSTÁTICAS.

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **Lúcia Patrícia Bezerra Gomes da Silva**

APROVADA

Recife, 12 de Agosto de 2016.

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr.
Orientador
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior
Departamento de Patologia
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dra. Jaqueline de Azevêdo Silva
Departamento de Genética
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dra. Dayane Aparecida Gomes
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

AGRADECIMENTOS

A Deus, o meu grande mestre, fonte infinita da mais importante sabedoria, pela força e presença constante, necessária a vida.

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

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

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

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

Às minhas amigas Sinara e Luiza (L₃S) pela parceria, apoio, paciência, compreensão e pelas horas de diversão.

Aos meus amigos do laboratório de Bioquímica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) que fazem parte do grupo Imobilização de Biomoléculas

(IMOBIO): Aurenice, Gabriela Ayres, Mariana Cabrera, Tiago Veras, pelo apoio, amizade e incentivo.

Aos meus amigos do Laboratório de Patologia do LIKA do grupo de pesquisa Biomarcadores no Câncer (BmC): Amanda Albuquerque, Igor, Aline, Spencer, Geilza, Arthur Clark, João Luiz, Juliana Vasconcelos, Juliana Brandão, Carmelita Cavalcanti, Marina Cartaxo, Steffany Ferreira e Bruno Trajano pela recepção e amizade.

A professora Adriana Fontes e seus alunos Paulo Eusébio, Aline Pitt e João Paulo pelo apoio, disponibilidade e ajuda que recebi em seu laboratório.

A professora Dayane Gomes pelo acolhimento em seu laboratório, suporte e momentos de aprendizado.

Aos funcionários do PPGBAS e LIKA, Fábio, Rafael Padilha, Sr. Otaviano, Vera, Ilma, Conceição, Moisés e Edson, pelo apoio e assistência oferecida em todos os momentos.

A FACEPE pelo suporte financeiro.

RESUMO

O câncer está associado a alterações na glicosilação de glicoproteínas e glicolipídios de superfície celular que podem afetar as interações entre esses glicanos de superfície celular e lectinas endógenas determinando o potencial metastático do tumor. Este trabalho teve como objetivo avaliar o glicofenótipo de tecidos de próstata normal, Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) adenocarcinoma próstatico (AP) e investigar se estrógeno regula a glicosilação alterada no câncer da próstata andrógeno refratário usando as linhagens DU-145 e PC-3. As lectinas *Concanavalin A* (Con A), *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-I) e *Peanut* agglutinin (PNA) foram conjugadas ao éster de acridina (EA-lectinas). As amostras de tecido foram incubadas com lectinas-EA e a quimiluminescência do complexo lectina-tecido-EA foi expressa em unidades relativas de luz (URL). Tecidos transformados demonstraram uma expressão estatisticamente significativa inferior de α -D-glucose / manose e Gal- β (1-3) -GalNAc que os tecidos normais. No entanto, uma maior expressão de α -L-fucose foi observada em AP em relação a tecidos normais e a BHP. Observou-se uma diminuição da expressão dos valores de URL por inibição da interação entre tecidos e lectinas-AE utilizando os seus carboidratos específicos. A relação entre URL e a área de tecido mostrou uma correlação linear para todos lectinas-AE em ambos os tecidos transformados. Nos estudos *in vitro* utilizando linhagens de câncer de próstata andrógeno refratário, DU-145 e PC-3 tratadas com estradiol ou estradiol associado à fulvestranto, foi observado na linhagem PC-3 aumento de expressão de CMP-Neu5Ac: GalNAc-R α -2,6-sialiltransferase (ST6GALNAc-I) quando exposta a estradiol e uma diminuição de expressão na presença do antagonista fulvestranto. Esse comportamento não foi observado na linhagem DU-145. O receptor de estrógeno ER α apresentou diminuição de expressão em células PC-3 tratadas com fulvestranto, não sendo observada diferença de expressão do receptor de estrógeno β em nenhuma das linhagens. Lectin blotting usando as lectinas VVA (*Vicia Villosa* Lectin) e SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) possibilitou identificar a sialilação do antígeno Tn nas células PC-3 tratadas com estradiol, bem como a expressão do antígeno Tn não sialilado na linhagem DU-145 nas mesmas condições de tratamento. A capacidade de migração de células PC-3 tratadas com estradiol, estradiol combinado a fulvestranto e estradiol combinado a SNA foi avaliada através do ensaio migração (cicatrização de ferida), sendo observado que estradiol induz migração celular enquanto que fulvestranto e SNA reduzem a capacidade migratória. Portanto, podemos inferir que no câncer de próstata há uma alteração na glicosilação e que estrógeno possivelmente pode atuar regulando a expressão de glicosiltransferases responsáveis pela alteração da glicosilação conferindo um potencial metastático tumoral.

Palavras-chave: Hiperplasia Prostática Benigna, Carboidratos, Quimiluminescência, Estrógeno, Lectinas, Câncer de Próstata, ST6GalNAc

ABSTRACT

Cancer is associated with glycosylation alterations in cell-surface glycoproteins and glycolipids that can affect interactions between those glycans and endogenous lectins, determining the metastatic potential of the tumor. This study aimed to evaluate the glycophenotype in normal prostate, benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostatic adenocarcinoma (PCa) tissues and investigate as estrogen regulates the altered glycosylation in prostate cancer androgen refractory using DU-145 and PC-3 cells. *Concanavalin A* (Con A), *Ulex europaeus agglutinin* (UEA-I) and *Peanut* agglutinin (PNA) lectins were conjugated to acridinium ester (lectins-AE). Tissue samples were incubated with lectins-AE. The chemiluminescence of the tissue-lectin-AE complex was expressed in relative light units (RLU). Transformed tissues showed statistical significant lower α -D-glucose/mannose and Gal- β (1-3)-GalNAc expression than normal tissues. However, higher α -L-fucose expression was observed in PCa in relation to normal and BHP tissues. We observed an expressive decreasing of the values of RLU by inhibition of the interaction between tissues and lectins-AE using their specific carbohydrates. The relationship between RLU and tissue area showed a linear correlation for all lectin-AE in both transformed tissues. *In vitro* studies using DU-145 and PC-3 androgen-refractory cell lines treated with estradiol or estradiol associated to fulvestrant was observed in PC-3 cell line increased α 2,6-sialyltransferase (ST6GALNAc-I) expression when exposed to estradiol and decreased of expression in presence of the fulvestrant antagonist. This behavior was not observed in DU -145 cells. The estrogen receptor ER α presented decreased expression in PC-3 cells treated with fulvestrant, not seen difference in estrogen receptor β expression in any of the cells lines. Through lectin blotting using the VVA lectins (*Lectin Vicia villosa*) and SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) was identified sialylation Tn antigen (sTn) in PC-3 cells treated with estradiol as well as the Tn antigen in DU-145 under the same conditions of treatment. Migration capacity of the PC-3 cells treated with estradiol, fulvestrant and SNA was measured by wound-healing assay (n=2). We observed that estradiol induced cell migration while fulvestrant (ICI) and SNA lectin reduced migration capacity into the wounds. Representative image of the cell cultures with scratches at 24 h are shown. Therefore, we can infer that there is change in glycosylation in prostate cancer and that estrogen can act regulating the expression of glycosyltransferase responsible for the glycosylation altered conferring tumor metastatic potential.

Keywords: Benign Prostatic Hyperplasia, Carbohydrates, Chemiluminescence, Estrogen, Lectins, Prostate Cancer, ST6GalNAc.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

- Figura 1** Esquema que demonstra mecanismos de ação direto e indireto do estrógeno ativando os receptores nuclear e ligando diretamente ao elemento de resposta a estrógeno ou ativando fatores transcrpcionais como, Fos/Jun, STAT, ATF-2/Jun, SP1 E NFk- β que ligam-se a seus sítios de ligação na região promotora de genes alvo. E o receptor de estrógeno de membrana, cuja ativação resulta na fosforilação e ativação de fatores transcrpcionais como, AP-1, Sp1, Elk1, CREB. 29
- Figura 2** Receptores de estrógeno: (A) ER α e (B) ER β e suas respectivas isoformas produtos de processamento alternativo. DLD, Domínio de ligação ao DNA; DLL, domínio de ligação ao ligante; TADDI, isoformas cerebral com deleção na junção entre os éxons 3 e 4; MB1, isoformas encontrada no cérebro que tem deleção parcial do éxon1; ER α 36é uma proteína de 36 kDa formada pela deleção de ambos AF1 e AF2; ER α e ER β seguido do símbolo delta (Δ) são isoformas que apresentam deleções de éxon. 32
- Figura 3** Representação esquemática das comuns classes de glicoconjugados expressos em células humanas. Proteínas podem ser glicosiladas pela ligação covalente de sacarídeos ao esqueleto polipeptídico via N-glicosilação (ligado a resíduos de asparagina) ou O-glicosilação (ligado a resíduo de serina/treonina). 37
- Figura 4** Participação dos glicanos no desenvolvimento e progressão do câncer, estando envolvidos nas etapas de dissociação, invasão, proliferação, crescimento, migração e metástase de células tumorais. 40
- Figura 5** Vias de biossíntese de antígenos O-glicanos truncados. Em destaque a ação da enzima ST6GalNAc-I responsável pela síntese de antígeno sTn. 42

Figura 6	Interações entre diversos tipos celulares através do reconhecimento entre lectinas-carboidratos.	45
Figura 7	Mecanismo quimiluminescente do éster de Acridina.	51
Figura 8	Reação de conjugação da proteína ($\text{NH}_2 - \text{R}$) ao Éster de Acridina N-hidroxisuccinimida,	52

Capítulo I

- ConA-AE (A), PNA-AE (B), UEA-AE (C) purification profile from a Sephadex G-25 column (10 × 1 cm). Elution was carried out with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2. Fractions (aliquots of 1 mL) were collected for protein 280 nm ($\square$), chemiluminescence ($\circ$) and hemagglutinating activity ($\bullet$) assays.
- Scheme of the chemiluminescent lectin histochemistry. Paraffin section (8 μ m) of biopsies being cut, transferred to glass slide, deparaffinized, rehydrated, treated with trypsin, washed with PBS, incubated with lectins-AE and again washed with PBS. Afterwards the squared-shaped area of tissue section being cut and transferred to a polypropylene test tub and, finally, the chemiluminescence measured and expressed as relative light unit (RLU). A duplicate of the deparaffinized and rehydrated tissue sample was hematoxylin eosin stained for transformed tissue identification.
- Chemiluminescence in normal prostate tissues (n=5), benign prostatic hyperplasia (n=49) and prostate adenocarcinoma (n=50), using the conjugate ConA-AE, PNA-AE and UEA-AE. Different letters indicate statistically significant. All measurements are mean $\pm$ SD of triplicate.
- Lectin binding inhibition assay in prostate tissues diagnostic as benign prostatic hyperplasia (n= 5) and prostate adenocarcinoma (n=5). The conjugate ConA-AE, PNA-AE and UEA-AE were inhibited using, respectively, methyl- α -D-mannopyranoside, D-galactose and D-fucose. All measurements are mean $\pm$ SD of triplicate.
- Relationship between RLU and area (0.125 to 1.0 cm²) of prostate tissue diagnosed as benign hyperplasia prostatic and adenocarcinoma prostate by using Con A-AE (A), PNA-AE (B) and UEA-AE (C) conjugates. All measurements are mean $\pm$ SD of triplicate.
- Figure 1** 81
- Figure 2** 82
- Figure 3** 83
- Figure 4** 83
- Figure 5** 84

Capítulo II

- Cell viability measured by the MTT assay after 4 days of E₂ treatment. PC-3 cells were submitted to treatment with E₂ (10^{-6} - 10^{-11}) by 24, 48, 72, 96h and was observed different cell viability in relation time and concentration of the E₂. Experiment performed in duplicate.. **94**
- Figure 1**
- Cell viability though MTT assay. DU-145 prostate cancer cells were submitted to treatment with E₂ (10^{-6} - 10^{-11}) in time 24, 48, 72, 96h and presented different viability only in relation the factor time. Experiment performed in duplicate. **95**
- Figure 2**
- Analyze of the expression of the ST6GalNac enzyme and estrogen receptor in PC-3 cells treated with estradiol and estradiol plus fulvestrant. In PC-3 cells, increase the expression the ST6GalNacI was significant statistically when treated with E₂ and decreased when treated to E₂ + fulvestrant at time 24 and 48h. The expression the ER- α was down-regulated when treated with E₂ + fulvestrant at time 24 and 48h while that ER β no significant difference observed in same conditions and time ($p < 0.05$). Experiment performed in duplicate. **96**
- Figure 3**
- Expression of the ST6GalNac I and ER- β in DU-145 cell no demonstrated statistically significant differences ($p < 0.5$) between treatment. Experiment performed in duplicate. . **97**
- Figure 4**
- Expression profile of the ligands (Tn and sTn antigens) recognize to SNA and VVA in PC-3 and DU-145 cells treated with estradiol 10^{-6} M and estradiol (10^{-6} M) plus antagonist fulvestrant (10×10^{-6} M) during 24 and 48 horas. Experiment performed in duplicate. **198**
- Figure 5**
- Migration capacity of the PC-3 cells treated with E₂ (10^{-6}), E₂ (10^{-6}) plus antagonist fulvestrant (10×10^{-6} M) and E₂ (10^{-6}) plus SNA were measured by wound-healing assay ($n=2$). We observed that estradiol induced cell migration while fulvestrant and SNA lectin reduced **99**
- Figure 6**

migration capacity into the wounds. Representative image of the cell cultures with scratches at 24 h are shown. The wound is marked by dotted lines. Percentages of filled wound area are presented lower.

Capítulo II

Table 1	PC-3 cells treated with E2 (10^{-6} - 10^{-11}) analyzed through of the MTT assay demonstrated statistical differences significant in relation time and concentration of the E2	111
Table 2	Cell viability after 4 days of E ₂ treatment. In DU-145 cells was observed statistical differences significant in relation time of the exposition.	111

LISTA DE ABREVIACÕES

ADT	Terapia de privação androgênica
AS	Ácidos siálicos
Con A	Concanavalina A
DMAE-NHS	N-hydroxysuccinamide-activated dimethyl acridinium ester
E₁	Estrona
E₂	17 β -estradiol
E₃	Estriol
ER	Receptor de estrógeno
EA	Éster de acridina
Fuc	Fucose
GnRH	Hormônio de liberação de gonadotropina
Glc	Glicose
Gal	Galactose
GlcNAc	N-acetil-D-glicosamina
GalNAc	N-acetil-D-galactosamina
Man	Manose
NeuNAc	Ácidos neuramínicos
PC	Câncer de próstata
PNA	<i>Peanut agglutinin</i>

PVDF	Polivinilideno difluoride
PSA	Antígeno próstatico específico
QL	Quimiluminescência
SNA	<i>Sambucus nigra</i> agglutinin
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i> agglutinin
URL	unidade relativa de luz
VVA	<i>Vicia Villosa</i> agglutinin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Câncer de próstata.....	21
2.2 Câncer de próstata andrógeno refratário.....	22
2.3 Estrógeno e suas implicações no Câncer de Próstata.....	26
2.4 Glicosilação.....	35
2.5 Lectinas e sua capacidade de reconhecer carboidratos.....	43
2.6 Quimiluminescência.....	49
3. JUSTIFICATIVA.....	54
4 OBJETIVO.....	55
4.1 Geral.....	55
4.2 Específico.....	55
5. REFERÊNCIAS.....	56
CAPÍTULO 1.....	77
CAPÍTULO 2.....	88
8. PERSPECTIVAS.....	112
9. CONCLUSÕES.....	113
10. PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO.....	115

1. INTRODUÇÃO

Segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer), o câncer de próstata é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais prevalente entre os homens, representando cerca de 10% do total de câncer. No Brasil, o câncer de próstata é o segundo mais comum entre os homens (atrás apenas do câncer de pele não-melanoma). Além disso, estatísticas válidas para os anos de 2016/2017 apontam uma incidência de cerca de 61.200 novos casos para o Brasil e para o estado de Pernambuco estima-se 2.750 novos casos de câncer prostático.

Historicamente, os estrógenos têm sido usados pra tratar o câncer de próstata (BURNS-COX *et al.*, 2002). O 17 β -estradiol (E_2) previne indiretamente a progressão de câncer de próstata através de feedback negativo na liberação hipotalâmica do hormônio de liberação de gonadotropina (GnRH), que leva a diminuição da concentração sérica de andrógeno (testosterona e diidrotestosterona), caracterizando um efeito semelhante a castração, sendo portanto, efetivos contra câncer de próstata dependente de andrógeno (HARKONEN; MAKELA, 2004).

No entanto, por mecanismos de ação direta no tecido prostático, o estrógeno pode estar envolvidos no desenvolvimento inicial e proliferação celular no câncer de próstata (BOSLAND, 2005; RISBRIDGER; BIANCO; ELLEM, 2003; SINGH, MATANHELIA, MARTIN, 2008)

O estrógeno exerce seus efeitos regulatórios na expressão gênica através da ligação à seus receptores, os quais na presença do ligante, atuam como fatores transcrpcionais interagindo com sítios específicos no DNA, os Elementos Responsivo à

Estrógeno (ERE), ou interagindo com fatores transcricionais como AP-1, SP1 NF-Kb, induzindo ou inibindo a expressão de genes alvos (BJORNSTROM; SJOBERG, 2005).

A glicosilação é um fenômeno comumente associado com transformação maligna, invasão e metástase de células do câncer, de modo que, quase todos os tipos de células malignas demonstram alterações em seus padrões de glicosilação quando comparadas as suas contrapartes normais (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Embora muitos fatores contribuam para a glicosilação aberrante no câncer, um dos mecanismos mais importante são a expressão de glicosiltransferases e glicosidases, de modo que, alteração na expressão dessas enzimas resulta na síntese cadeias glicídicas alteradas (ramificadas ou truncadas) (MEANY; CHAN, 2011).

Estudos tem sugerido que antiestrógenos inibem efetivamente o desenvolvimento e progressão de câncer de próstata experimental e clínico (STEINER, RAGHOW, 2003; HO, 2004), porém as regulações gênicas resultantes da ação desses fármacos continuam desconhecidos, sugerindo que identificar vias de regulação do estrógeno seja alvo de estudos nessa neoplasia.

No presente trabalho foram avaliados o perfil de glicanos em câncer de próstata comparado à Hiperplasia Prostática Benigna e tecidos normais, utilizando lectinas conjugadas a éster de acridina, bem como foram realizados estudos *in vitro* onde foram avaliados a influência do estrógeno na glicosilação aberrante em linhagens de câncer de próstata andrógeno refratário.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer de Próstata

O Câncer de próstata (CaP), ou adenocarcinoma de próstata, é o tipo de câncer mais comumente diagnosticado, cerca de 27% do total de cânceres, e a segunda maior causa de morte em homens nos Estados Unidos (SIEGEL *et al*, 2014). A alta incidência do câncer de próstata deve-se provavelmente, a maior expectativa de vida dos homens (GRONBERG, 2003) e pelo aperfeiçoamento e acesso a técnicas de triagem diagnósticas, especialmente, a análise do antígeno prostático específico (HANKEY *et al.*, 1999).

Para os pacientes com câncer de próstata localizado, o tratamento curativo inclui prostatectomia radical e/ou radiação como um meio de destruir as células do tumor que estiverem localizados dentro da cápsula prostática (TAPLIN *et al.*, 2001; NELSON *et al.*, 2003).

Aqueles pacientes com câncer de próstata localmente avançado, câncer de próstata metastático e doença bioquimicamente recorrente após falha dos tratamentos localizados, o tratamento consiste na terapia de privação de andrógeno (orquiectomia ou análogo do hormônio de liberação de gonadotrofinas (GnRH) e antagonista do receptor de andrógeno), que na maioria dos pacientes produz boa resposta evidenciada pelo declínio do biomarcador PSA (prostate-specific antigen) em torno de 90% dos pacientes (HARRIS *et al.*, 2009).

No entanto, depois de um tempo médio de 2-3 anos, a doença progride, tornando-se resistentes à manipulação hormonal e os tumores progridem rapidamente para um crescimento independente de andrógeno (MARQUES *et al.*, 2010).

Diante desse quadro, inicia-se a segunda linha de tratamento hormonal que visa inibir qualquer síntese de andrógeno, utiliza-se o dietilestilbestrol (DES), um análogo do estrógeno, suplementando a terapia anti-andrógeno de primeira linha, que mostrou ser efetivo na supressão do eixo hipotálamo-hipófise e consequente redução nos níveis de testosterona (BURNS-COX *et al*, 2002). Devido às complicações cardíacas associadas com a administração de altas doses de DES, seu uso foi limitado a baixas doses.

Em homens, a produção extra testicular de andrógeno ocorre no tecido adiposo (90%) e na glândula adrenal (10%) e podendo, portanto ser fonte de hormônio para manter a progressão tumoral, por isso, adota-se inibidores da síntese de andrógeno adrenal, o cetoconazol e com maior eficiência, o acetato de abiraterona são inibidores seletivo da citocromo P450 17 A (CYP17 A) α -hidroxilase e da enzima citocromo 17,20 (C17,20)-liase, que são críticas para a biossíntese de andrógeno (HASHMAN; TAPLIN, 2013).

Esta abordagem terapêutica aumenta o tempo de sobrevivência de cerca de 4 meses, além de aumentar o tempo de progressão de PSA e foi relativamente bem tolerado pelos pacientes que tinham falhas quimioterápicas (EFSTATHIOU *et al.*, 2012) Porém a progressão tumoral persiste apesar das recentes abordagens, caracterizando-o como câncer de próstata Andrógeno refratário.

2.2 Câncer de Próstata Andrógeno Refratário

Independentemente dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer de próstata andrógeno refratário, o receptor de andrógeno (RA) é considerado a proteína chave envolvida na maioria dos casos e é crítica para promover crescimento das células do câncer de próstata.

O receptor de andrógeno é uma fosfoproteína 110 kDa e um dos receptores nucleares da superfamília de fatores de transcrição ativados por testosterona, porém é mais sensível a ação da diidrotestosterona produzida no epitélio prostático pela ação da enzima 5 α redutase, obtendo assim as respostas biológicas necessárias ao tecido (LAMB; WEIGEL; MARCELL, 2001; DEHM; TINDALL, 2006).

O receptor de andrógeno é expresso em inicialmente todas as células de câncer de próstata e o desenvolvimento do câncer de próstata, bem como a progressão tumoral em algumas circunstâncias parece depender da função desse receptor (TAPLIN; BALK, 2004; SCHER; SAWYERS, 2005).

O desenvolvimento do câncer de próstata andrógeno refratário ou independente de andrógeno foi inicialmente proposto em cinco teorias por Feldman & Feldman (2001) e essas são amplamente consideradas atualmente, são elas:

1- A hipersensibilidade de RA: em estado químico castrado induzido por terapia de privação de andrógeno, tem sido observado maior expressão gênica e protéica do receptor de andrógeno, em modelos *in vitro* e *in vivo*, justificado pela amplificação do gene do receptor de andrógeno em aproximadamente 25-30% dos tumores andrógeno, não sendo identificada amplificação em nenhum cancer de próstata não tratado, sugerindo que essa amplificação é decorrente da terapia de privação androgênica (KOIVISTO P. *et al.*, 1997).

O aumento da expressão de RA sensibiliza a célula do câncer de próstata em níveis baixos de andrógeno possibilitando a sobrevivência e proliferação dessas em ambiente com níveis mínimos de andrógeno, como ocorre na terapia de privação androgênica (WALTERING *et al.*, 2009).

2- Hipótese de RA promíscuo: Mutações em RA é certamente outra maneira de células de câncer de próstata proliferarem independente de andrógeno. Mutações em

RA têm sido identificadas em 10-20 % dos pacientes com tumores andrógeno refratários, reforçando a hipótese de que câncer de próstata progride na ausência do efeito de estrógeno.

Essa mutação ocorre no domínio de ligação ao ligante comprometendo a especificidade desse receptor ao ligante, a capacidade de ligação ao andrógeno, possibilitando que outros hormônios que não seja testosterona, tais como estrógeno e progestinas, atuam como um agonista de RA mutado (MARCELLI *et al.*, 2000).

Por outro lado, alterações epigenéticas como hipermetilação de RA resultam em perda de expressão de AR em 20-30% dos cânceres de próstata andrógeno refratário, inclusive as duas linhagens altamente estudadas DU-145 e PC-3, não expressam RA, sugerindo que mecanismos alternativos independentes de andrógeno levam ao desenvolvimento de câncer de próstata andrógeno refratário (HOBISCH *et al.*, 1996).

3- A hipótese “outlaw” de RA: o câncer de próstata cresce independente de hormônios através PTEN mutada ou funcionalmente inativa, consiste em uma proteína pró-apoptótica que inibe a cascata de sinalização da Akt, que desempenha papel chave no controle da apoptose e proliferação em câncer de próstata (SUM *et al.*, 2003; LI *et al.*, 1997).

. 4- A hipótese de desvio de RA: no câncer de próstata andrógeno dependente, durante a terapia de privação de andrógeno as vias apoptóticas estão ativadas, assim a superexpressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, exclusiva do câncer refratário é uma importante via para burlar a morte celular programada na ausência de sinalização por AR, ajudando a células do câncer de próstata a bloqueiar a apoptose (COLOMBEL *et al.*, 1993).

5- A hipótese de células Lurker: células de câncer de próstata independentes de andrógenos existem entre as células-tronco epiteliais mesmo em estado dependente

de andrógeno, assim, após a terapia de privação do andrógeno, essas células permanecem ativas e multiplicando, mantendo a progressão tumoral.

Além disso, a eficácia temporária na inibição da progressão tumoral resultante da inibição da síntese de andrógeno da adrenal revela que o câncer de próstata andrógeno refratário pode ser mantido por mecanismos que ultrapassam as teorias acima descritas. Um mecanismo que recentemente ganhou muita atenção e suporte é a ativação de esteroidogêneses intratumoral, resultando em aumento de testosterona que pode manter a via androgênica (ARMANDARI *et al.*, 2014).

Baseado nesse fato, foi observado que células de câncer de próstata são capazes de produzir o próprio andrógeno (testosterona e diidrotestosterona) via esteroidogênese, seja a partir do precursor de andrógeno adrenal (deidroepiandrosterona –DHEA) ou síntese *de novo* andrógeno a partir do colesterol (MOSTAGEL, *et al.*, 2012).

Montgomery e colaboradores (2008), observaram aumento da expressão dos genes que codificam as enzimas necessárias para a síntese de andrógeno a partir do colesterol como as citocromos (CYP11A, CYP17A) e 3 β -hidroesteróide desidrogenase (3 β HSD)1 em câncer de próstata andrógeno refratária quando comparadas com tumor primário, demonstrando a capacidade desse tumor em produzir andrógeno continuamente. Além disso, observou-se que a alta expressão de CYP17A foi significativamente correlacionado com altos níveis de colesterol sérico (MOSTAGEL *et al.*, 2012).

Após a terapia de privação de andrógeno, foi observado aumento na produção de testosterona intratumoral (de 0,07-1,34 para 0,74-1,44) e comportamento inverso em relação a diidrotestosterona (de 4,6—6,4 para 1,0-1,9) (TITUS *et al.*, 2005; NISHIYAMA *et al.*, 2007).

Associado a esses dados a enzima aromatase (CYP19) é cerca de 30 vezes mais expressa em tecidos de câncer de próstata metastático quando comparado a tumores primários, possibilitando que testosterona local seja metabolizada à estrógeno intratumoral (ELLEM *et al.*, 2004) sendo portanto, níveis de estrógeno teciduais mais importantes que níveis de estrógeno circulante na promoção da carcinogênese prostática e progressão.

Diante desse contexto, pode-se inferir o envolvimento do estrógeno no desenvolvimento normal da próstata, no desenvolvimento do câncer de próstata andrógeno sensível e no câncer de próstata andrógeno refratário.

2.3 Estrógenos e suas implicações no câncer de próstata

Os estrógenos são compostos esteroides que ocorrem naturalmente sobre a forma de 17β estradiol (E_2), estrona (E_1) e estriol (E_3), obtidos a partir da testosterona, progesterona e androstenediona, respectivamente, pela ação da enzima aromatase, sendo o 17β estradiol (E_2) o principal hormônio estrogênico (MARINO; GALLUZO; ASCENZI, 2006).

Em indivíduos do sexo masculino, o estradiol é produzido em baixas concentrações (35ng/mL), cerca de um quinto da quantidade sintetizada em mulheres não grávidas. O 17β estradiol (E_2) é sintetizado nas células de Sertoli e nas células de Leydig através da ação da enzima aromatase que converte de forma irreversível testosterona em estradiol (HESS, 2003; CARREAU *et al.*, 2003). A enzima aromatase também está presente em regiões do sistema nervoso central, tecido ósseo, tecido adiposo e próstata (SIMPSON; DAVIS, 2001).

A ação do estrógeno é mediada através da interação entre o hormônio e os receptores de estrógeno (ERs), que induzem respostas biológicas celulares através de

diferentes mecanismos. No mecanismo de ação “clássico”, o estrógeno se difunde para dentro da célula, se liga ao receptor, promovendo mudança conformacional, dimerização de REs e ligação de forma direta do complexo estrógeno-RE aos ERE.

Os EREs podem ser agrupados em sequência palíndromo perfeito e imperfeito, de modo que a sequência imperfeita difere da sequência consenso (5`GGTCAAnnnTGACC3` ou 3`CCAGTnnnACTGG5`) de um ou mais nucleotídeos (GRUBER *et al.*, 2004). No entanto, no genoma humano, a maioria dos genes alvo de estrógeno não contém um ERE palíndromo em sua região promotora, mas tem EREs não palíndromos através do qual a regulação do estrógeno é efetiva (ANOLIK, 1995).

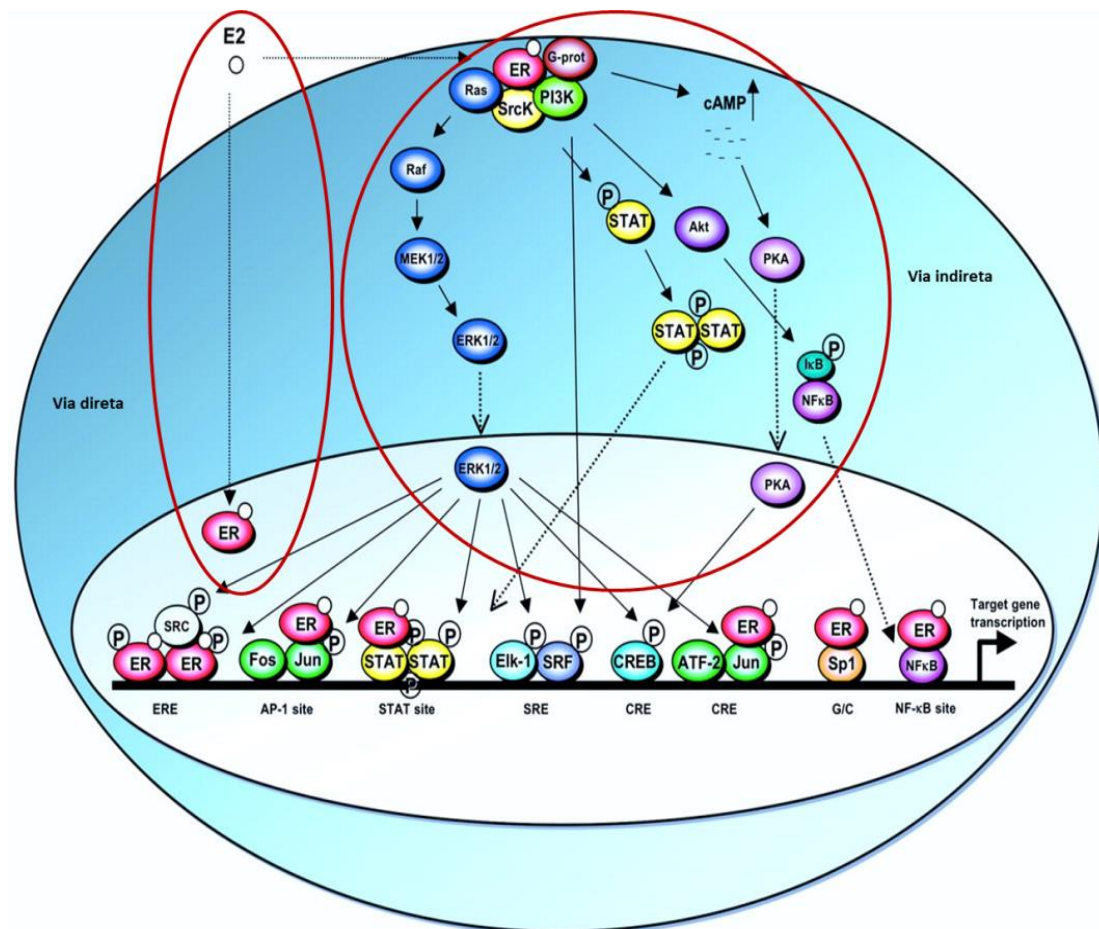
Além disso, tem sido frequentemente identificado sequências semelhantes a EREs na região regulatória de genes alvo de estrógeno denominadas de unidades de resposta ao estrógeno (URE). Uma sequência URE compreende um elemento palindrômico imperfeito ou mesmo a metade de um ERE, as vezes separados por centenas de pares de bases que por um mecanismo de sinergismo transcricional desses elementos separados ocorre indução dos efeitos do estrógeno no gene alvo (BEEKMAN *et al.*, 1991) .

Além desse mecanismo de regulação da expressão gênica, o complexo estrógeno-receptor de estrógeno pode ativar a transcrição de genes interagindo com fatores transcricionais (Figura 1) como, a proteína Fos e Jun, STAT, ATF-2/c-Jun, Sp1 e NF-Kb agindo em sítios específicos nas região promotora de genes alvos ativando ou inibir a transcrição de genes alvo (BJORNSTROM; SJOBERG, 2005).

Ambos os processos resultam no recrutamento de proteínas correguladoras (co-ativadoras ou correpressoras) da transcrição gênica para promover a resposta fisiológica (através do aumento ou diminuição dos níveis de mRNA), esse processo ocorre dentro de poucas horas (DERO; KORACK, 2006).

Outro mecanismo de ação de estrógeno denominado “indireto ou não genômico” ocorre através do receptor de estrógeno acoplado a proteína G (REPG) localizado na membrana plasmática, cuja ativação resulta na ativação de cascatas de proteínas cinases, levando a fosforilação de fatores de transcrição alvo, como Jun, STATs, CREB (DERO; KORACK, 2006; BJORNSTROM; SJOBERG, 2005).

Figura 1: Esquema que demonstra mecanismos de ação direto e indireto do estrógeno ativando os receptores nuclear e ligando diretamente ao elemento de resposta a estrógeno ou ativando fatores transcripcionais como, Fos/Jun, STAT, ATF-2/Jun, SP1 e NFκ-β que ligam-se a seus sítios de ligação na região promotora de genes alvo. E o receptor de estrógeno de membrana, cuja ativação resulta na fosforilação e ativação de fatores transcripcionais como, AP-1, Sp1, Elk1, CREB. **Fonte:** adaptado de Bjornstrom; Sjorberg, 2005



O estrógeno medeia suas respostas através de interação com receptores clássicos, o receptor de estrógeno α (ER α) e o receptor de estrógeno β (ER β). O ER α e o ER β são codificados por genes diferentes, *Esr1* e *Esr2*, respectivamente, que são encontrados em diferentes cromossomos. O gene do ER α está localizado no cromossomo 6 (6q25.1) e codifica uma proteína de 595 aminoácidos, enquanto que o gene do ER β está

localizado no cromossomo 14 (14q22-24) e codifica uma proteína de 530 aminoácidos (MENASCE *et al.*, 1993; ENMARK *et al.*, 1997; OGAWA *et al.*, 1998).

A estrutura do receptor nuclear é característico e bem conservado, consistindo em um domínio de transativação N-terminal variável, um domínio de ligação ao DNA e um domínio de ligação ao ligante C-terminal. A ligação ao hormônio induz uma mudança conformacional, com liberação da proteína de choque térmico, expondo o domínio de ligação ao DNA, promovendo a dimerização e ativação o receptor (EVANS, 1988; PIKE; BRZOZOWSKI; HUBBARD, 2000).

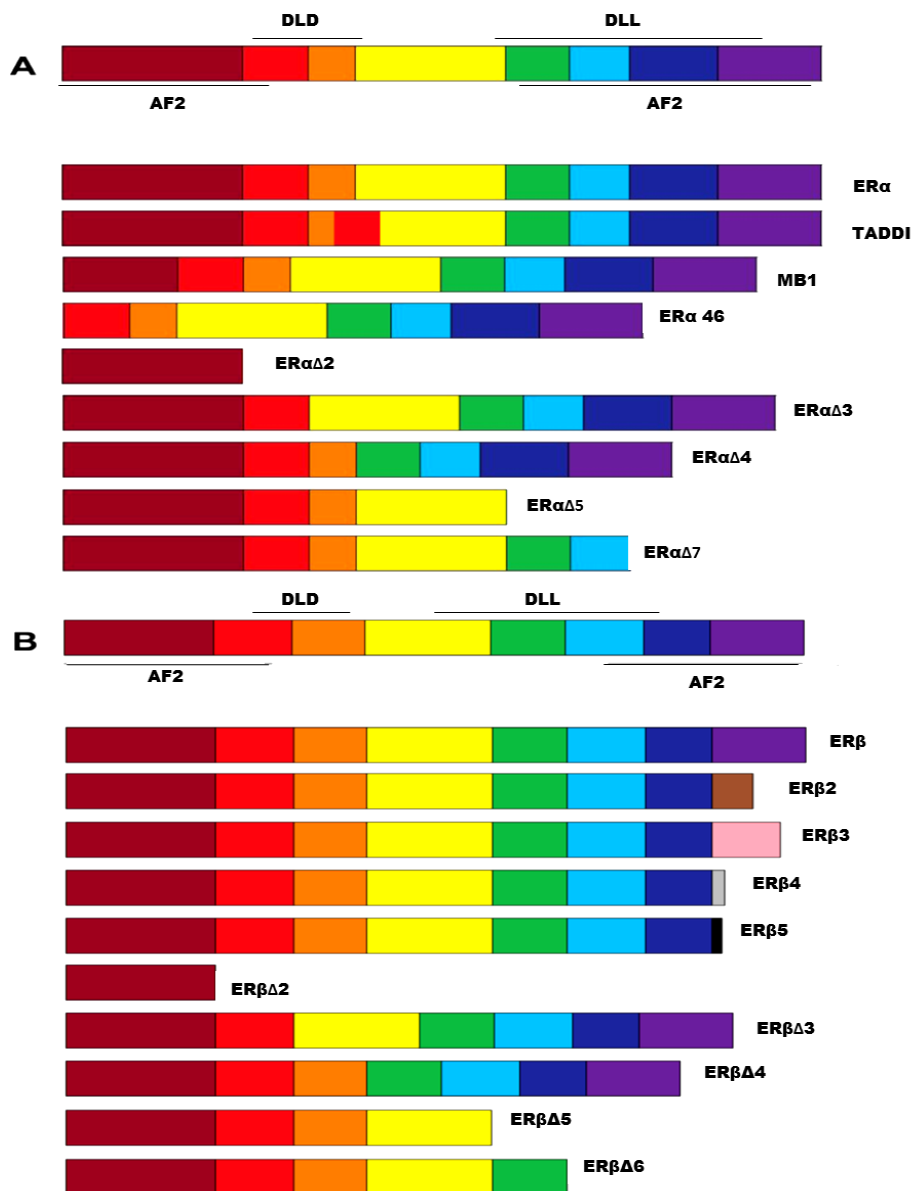
Embora ambos tenham afinidades semelhantes de ligação com o 17 β -estradiol, os domínios de ligação ao ligante desses receptores são diferentes, por isso, outras substâncias como fitoestrógenos e moduladores seletivos de receptores de estrógeno (MSREs), podem regular seletivamente ER α e ER β . Associado a isso, o domínio de ligação ao DNA é bastante diferente, justificando as diferentes afinidades por diferentes elementos de respostas, e isso resulta em diferentes efeitos transcricionais em um mesmo sítio (NELSON *et al.*, 1999; KULAKOSKY *et al.*, 2002).

Ambos receptores de estrógeno possuem isoformas com vários processamentos alternativos de pré-mRNA (*splicing*) que permite que um número limitado de genes codifique muitos produtos (Figura2). A maioria dos processamentos alternativos dos receptores ER α e ER β são gerados por duplicação de éxons, inserção de material genético adicional ou mutações somáticas que levam a códon finalizadores alterados e/ou inclusão de material intrônico (PINK *et al.*, 1996; MURPHY *et al.*, 1996).

Existe um conjunto crescente de evidências de que alguns processamentos alternativos desempenham um papel importante em ambos os contextos, manutenção da fisiologia normal e influencia a susceptibilidade para doenças. Comparando com o receptor selvagem, alguns processamentos alternativos variantes diferem na ação que

eles medeiam como consequência da falta de, ou diferente configuração de vários domínios do receptor. Essas isoformas de receptores podem, portanto falhar na ligação ao ligante, falhar na translocação para o núcleo, falhar na dimerização, falhar na ligação ao elemento de resposta ou na estimulação de fatores transcricionais, além de promover falha no sistema como um todo devido a competição com o receptor selvagem pelo ligante (PFEFFER *et al*, 1993; BOLLIG *et al.*, 2000; INOUE *et al.*, 2000; PRICE *et al*, 2001; TREECK *et al.*, 2007);

Figura 2: Receptores de estrógeno: (A) ER α e (B) ER β e suas respectivas isoformas produtos de processamento alternativo. DLD, Domínio de ligação ao DNA; DLL, domínio de ligação ao ligante; TADDI, isoformas cerebral com deleção na junção entre os éxons 3 e 4; MB1, isoformas encontrada no cérebro que tem deleção parcial do éxon1; ER α 36 é uma proteína de 36 kDa formada pela deleção de ambos AF1 e AF2; ER α e ER β seguido do símbolo delta (Δ) são isoformas que apresentam deleções de éxon. **Fonte:** adaptado de TAYLOR; MARTIN-HIRSCH; MARTIN, 2010.



Estudos revelam a influência do estrógeno sobre o desenvolvimento de cânceres em órgãos hormônios responsivos como o de mama, endométrio, ovário, útero e

tireóide. Em humanos e modelos animais, tem sido comprovado a ação de estrógeno em sinergismo com andrógeno como fator etiológico de doenças da próstata, participando no desenvolvimento de processos hiperplásicos e neoplásicos prostáticos via receptores, como hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata (HO; LEUNG; CHUNG, 2006).

Por outro lado, a castração química resultante da inibição da síntese de andrógeno através de estrógeno (17 β -estradiol (E_2) e dietilestilbestrol via feedback negativo na liberação hipotalâmica de GnRH previne indiretamente o desenvolvimento e progressão de câncer de próstata. Sendo assim, o estrógeno provavelmente possui um duplo comportamento em relação ao câncer de próstata (HARKONEN; MAKELA, 2004).

Ratos NBL (estirpe de consanguíneos) submetidos a tratamento com níveis fisiológicos normais de testosterona apenas e testosterona combinado com estrógeno demonstraram uma incidência de câncer de próstata de 35-40% quando tratados com andrógeno para 90-100% no tratamento hormonal combinado, indicando que estrógeno desempenha papel crítico na carcinogênese da próstata (BOSLAND; FORD; HORTON, 1995)

Diferenças étnicas e geográfica nos níveis de estrógeno fornece uma provável explicação para a disparidade na prevalência de câncer de próstata entre várias populações em todo o mundo. Em um estudo com 1413 homens foi observado que diferentemente do que se postulava sobre diferença étnicas e níveis hormonais, a concentração de testosterona não diferiu notavelmente entre homens brancos e negros, no entanto, homens negros, onde câncer de próstata é mais incidente, apresentam altos níveis de estradiol. Além disso, a relação E_2 total/ Testosterona total foi maior em homens negros que em outros grupos étnicos (ROHRMANN *et al.*, 2007).

O efeito do estradiol em linhagens celulares de próstata parece ser dependente do tipo de receptor de estrógeno expresso, observando-se que os compartimentos de secreção e diferenciação (células luminais e basais) expressam altos níveis de ER β , enquanto que o ER α é restrito ao compartimento estromal, porém em altos graus de neoplasia prostática ER α está expresso em ambos os compartimentos (IMAMOV *et al.*, 2005)

A ação de estrógeno via ER α é capaz de induzir três diferentes e distintas patologias na próstata: 1- Proliferação aberrante da camada basal do epitélio prostático observada em camundongos β ERKO e ausente em α ERKO (RISBRIDGER *et al.*, 2001).

2- Inflamação, estudos onde camundongos selvagens, β ERKO e α ERKO são expostos a estrogenização, foi observado que apenas os dois primeiros desenvolveram inflamação (ELLEM *et al.*, 2009).

3- Câncer de próstata, o papel do estrógeno e ER α no desenvolvimento do câncer é suportada pela emergente e progressiva expressão de ER α especificamente dentro do tumor de alto grau, com evidente expressão nos tumores andrógenos refratário e metástases (RICKE *et al.*, 2008).

Apesar desses efeitos adversos do estrógeno na próstata via ER α , existem evidências substanciais para sugerir que estrógeno também apresenta efeitos benéficos na próstata. Esses efeitos são mediados através de ER β 1 e consistem em atividade anti-proliferativa, anti-inflamatória e anti-carcinogênica.

Pravenotti e colaboradores (2005) relataram que em linhagens de células prostáticas o 17 β - estradiol estimula proliferação na presença de ER α , mas inibe proliferação, quando essa forma heterodímeros com ER β 1. Assim, observa-se que o

receptor de estrógeno ER β parece atuar como regulador da sinalização estrogênica, apresentando um papel protetor contra a proliferação descontrolada de células.

Estudos revelam que no tecido prostático há expressão das isoformas ER β -2, ER β -4 e ER β -5, que formam heterodímeros com ER α e com ER β -1, podendo modular a atividade biológica desses receptores, interferindo na sua afinidade de ligação ao ligante, na capacidade de ligação ao DNA, no recrutamento de coativadores e correpressores de transcrição. Porém pouco se sabe sobre os efeitos da expressão gênica dessas isoformas do receptor de estrógeno no tecido prostático (FUJIMURA *et al.*, 2001).

Nakajima e colaboradores (2013) demonstraram que o estradiol promove degradação do fator transcricional KLF-5 diminuindo a expressão da proteína pró-apoptótica FOXO- 1, promovendo crescimento tumoral em xenoenxerto de linhagens de câncer de próstata andrógeno refratário (DU-145) e comportamento inverso é observado quando tratado com o antagonista fulvestranto.

Recente estudo revelou que o antagonista fulvestranto atua super-regulando o microRNA hsa-miR765, que apresenta forte atividade anti- câncer de próstata via receptor de estrógeno β , inibindo crescimento de migração e invasão em células DU-145 (LEUNG *et al.*, 2014).

Além disso, em modelos pré-clínicos, fulvestranto tem demonstrado características de uma promissora terapia para câncer de próstata, porém os mecanismos que estão envolvidos nesses benefícios ainda não estão bem esclarecidos (CHADHA *et al.*, 2008; GASENT BLESÁ *et al.*, 2010)

2.4 Glicosilação

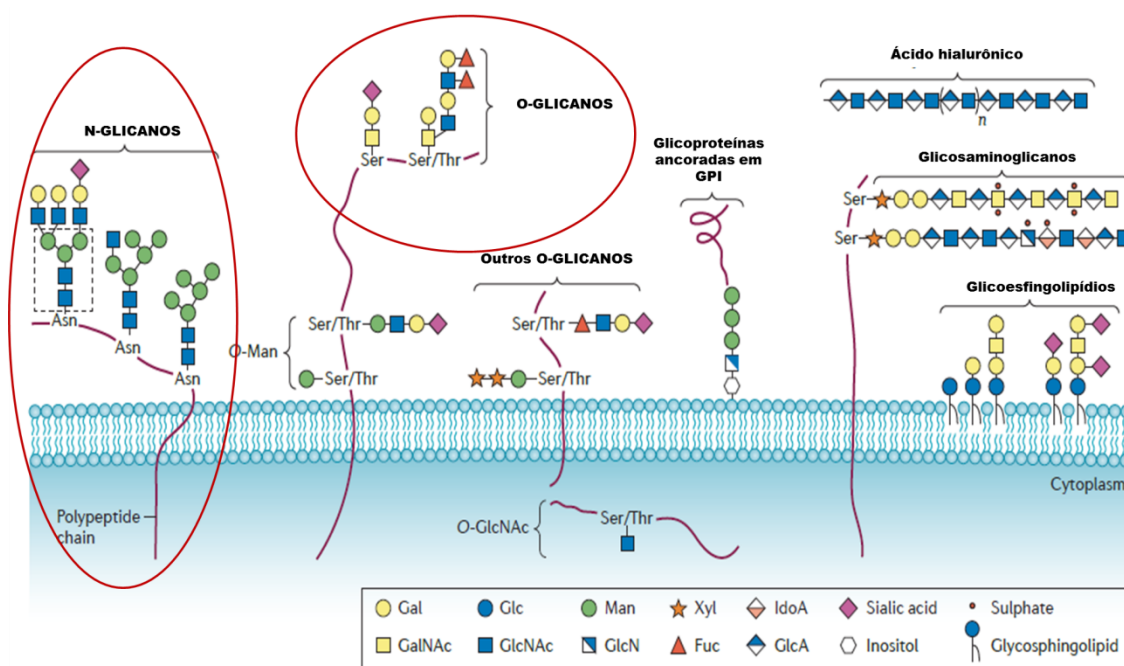
Os carboidratos são as moléculas orgânicas mais abundantes encontradas na natureza, e quase todos os organismos podem sintetizar e metabolizá-los. A complexa

heterogeneidade dos hidratos de carbono em sistemas vivos é o resultado direto de várias características, como a capacidade de formar ligações glicosídicas entre os resíduos de açúcar, característica estrutural dessa molécula, tipos de ligação anomérica, a posição e a ausência ou presença de ramificação (MODY; JOSHI; CHANEY, 1995).

Os glicanos são encontrados em vários tipos de biomoléculas que podem ser classificadas em diferentes famílias de glicocojugados: glicoproteínas, glicoesfingolípídios, proteoglicanos e glicosilfosfatoinositol (Figura 3).

A maioria dos carboidratos em glicoconjugados são oligo ou polissacarídeos constituídos de cadeias lineares ou ramificadas de açúcar, estando os sete monossacarídeos manose (Man), fucose (Fuc), galactose (Gal), glicose (Glc), N-acetilgalactosamina (GalNAC), N-cetilglicosamina (GlcNAc) e ácido siálico (NeuAc) em diferentes combinações, dando origem a alta variabilidade dos glicoconjugados, e assim a um alto número de modificações possíveis de proteínas e lipídios com diferentes propriedades e funções (LAZAR *et al.*, 2011).

Figura 3: Representação esquemática das comuns classes de glicoconjugados expressos em células humanas. Proteínas podem ser glicosiladas pela ligação covalente de sacarídeos ao esqueleto polipeptídico via N-glicosilação (ligado a resíduos de asparagina) ou O-glicosilação (ligado a resíduo de serina/treonina). **Fonte:** Adaptado de PINHO; REIS, 2015.



A sequência da proteína é completamente codificada pelo genoma, no entanto, a diversidade da proteína pode ser alcançada por diferentes estruturas da fração glicídica, que depende da sequência ou do tipo de glicanos ligado. A apropriada ou acurada biossíntese de açúcar ou glicanos ocorre no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi e depende da ação de enzimas altamente específicas, denominadas as glicosidases e glicosiltransferases, as quais atuam removendo um ou mais monossacarídeos dos glicanos e readicionando novos monossacarídeos conforme a via enzimática a que os glicoconjugados estão sujeitos dependendo de células ou tecidos onde ocorram (FUKUDA e BAO, 2008; GAO, *et al.*, 2008; OHTSUBO e MARTH, 2006).

Devido à diversidade estrutural dos glicoconjugados, os glicanos atuam como moléculas de armazenamento de informação, sendo atribuído a eles significado funcional, de modo que muitas informações biológicas podem residir nas estruturas de glicanos complexos, devido ao enorme potencial de codificação que está muito além do potencial de codificação dos aminoácidos ou nucleotídeos. Este potencial é baseado não apenas na variação da sequência de monossacarídeos nas cadeias oligossacarídicas, mas também sobre a possibilidade de modificação pós-transcricional dos açúcares (JANKOVIC; KOSANOVI; MILUTINOV, 2008).

2.4.1 Papel da glicosilação na biologia do câncer

Em virtude de sua localização periférica e a sua capacidade de interagir com proteínas e modular a atividade destas na interface célula-célula e célula-meio extracelular, epítomos de oligossacarídeos em proteínas e lipídios exercem importantes funções tais como, desenvolvimento embrionário normal, diferenciação e crescimento celular, morte celular (apoptose), inibição por contato, reconhecimento célula-célula, interação patógeno-hospedeiro, reconhecimento imunológico e desenvolvimento de doenças como o câncer (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

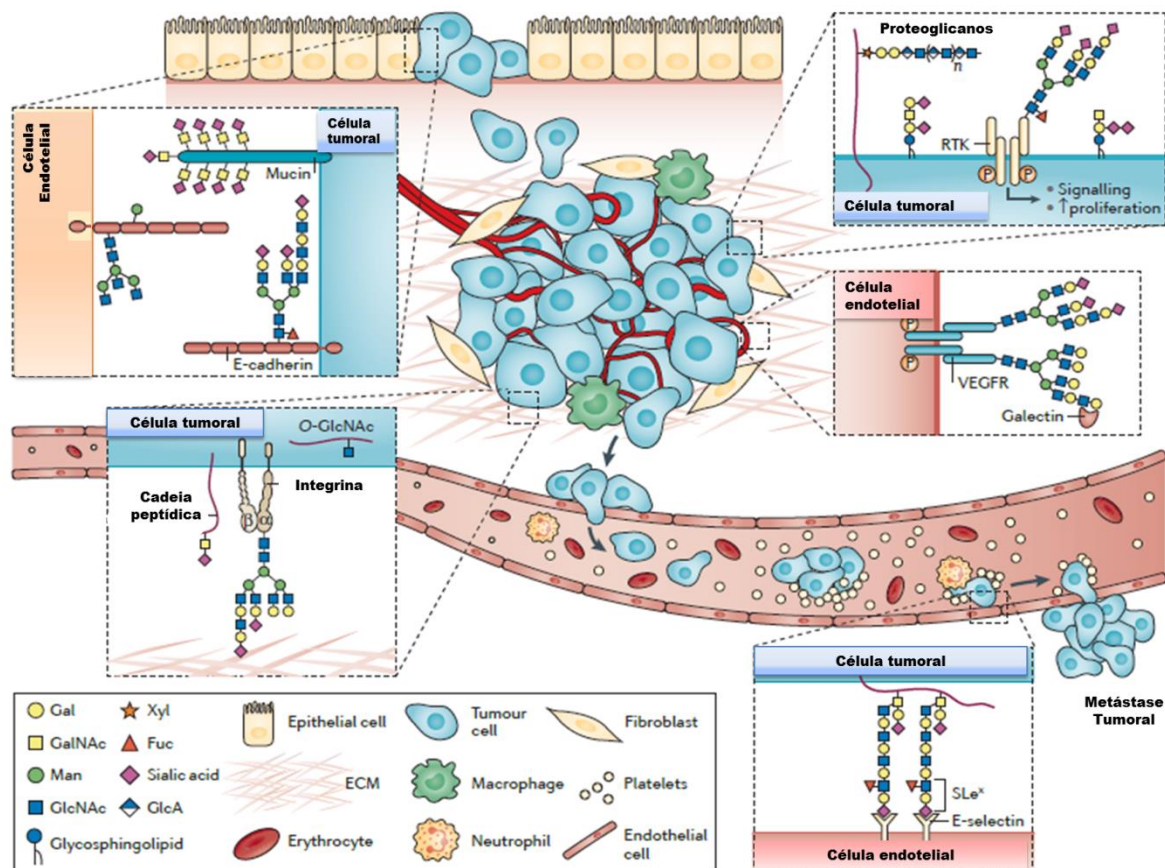
A glicosilação aberrante desempenha um papel fundamental nas etapas de desenvolvimento e progressão tumoral interferindo em vias intracelulares importantes como via de morte por apoptose e como epítomos de superfície atuam inibindo as interações célula- célula (MUNKLEY; ELLIOTT, 2016).

Embora muitos fatores contribuam para a glicosilação aberrante no câncer, tais como, a disponibilidade e localização de nucleotídeos doadores de açúcar, um dos mecanismos primários parece ser a expressão diferencial de glicosiltransferases e

glicosidases envolvidas na síntese e catabolismo dos glicanos, respectivamente. Por esta razão, alterações na expressão dessas enzimas pode desencadear uma cascata de eventos envolvidos na transformação oncogênica das células (MEANY; CHAN, 2011; BLOME *et al.*, 2009).

Os glicanos modificados têm a capacidade de interferir na interação carboidratos-proteínas receptoras ou lectinas e, portanto, inibem o reconhecimento célula-célula e os processos de adesão, que desempenham papel importante no crescimento e progressão do câncer (Figura 4), incluindo eventos como: proliferação celular, dissociação da célula do tumor e invasão local, angiogênese, adesão a plaquetas (evasão do sistema imune), adesão ao endotélio, extravasão e metástase (FUSTER; ESKO, 2005; PINHO; REIS, 2015).

Figura 4: Participação dos glicanos no desenvolvimento e progressão do câncer, estando envolvidos nas etapas de dissociação, invasão, proliferação, crescimento, migração e metástase de células tumorais. **Fonte:** adaptado de PINHO; REIS, 2015.



A glicosilação de proteínas pode ser dividida em dois tipos, incluindo O- e N-glicosilação e elas respondem de maneira diferente na tumorigênese e na progressão tumoral

2.4.2 O- glicosilação e biossíntese de antígenos Tn e sTn

A O-glicosilação consiste na adição covalente de carboidratos à hidroxila (-OH) em resíduos de aminoácidos serina (Ser) ou treonina (Tre), onde a N-acetilgalactosaminiltransferase ou polipeptídeo GalNAc transferase é a primeira enzima a atuar nessa via transferindo GalNAc para o resíduo de esqueleto peptídico de uma

proteína para formar a estrutura, GalNAc α 1-O-Ser/Thr, denominada antígeno Thomsen-nouveau (Tn).

O antígeno Tn atua como o precursor para todas as estruturas core da O-glicosilação. As enzimas β 1,3-galactosiltransferase e β 1,3-N-acetilglicosaminiltransferase utilizam o antígeno Tn como um substrato para produzir o core 1 e core 3, respectivamente. Os core 1 e 3 podem ser mais ramificados através das enzimas β 1,6-N-acetilglicosaminiltransferase 1 e β 1,6-N-acetilglicosaminiltransferase 2 para formar O-glicanos complexos correspondentes aos cores 2 e 4, respectivamente. (VAVASSEUR, *et al.*, 1995).

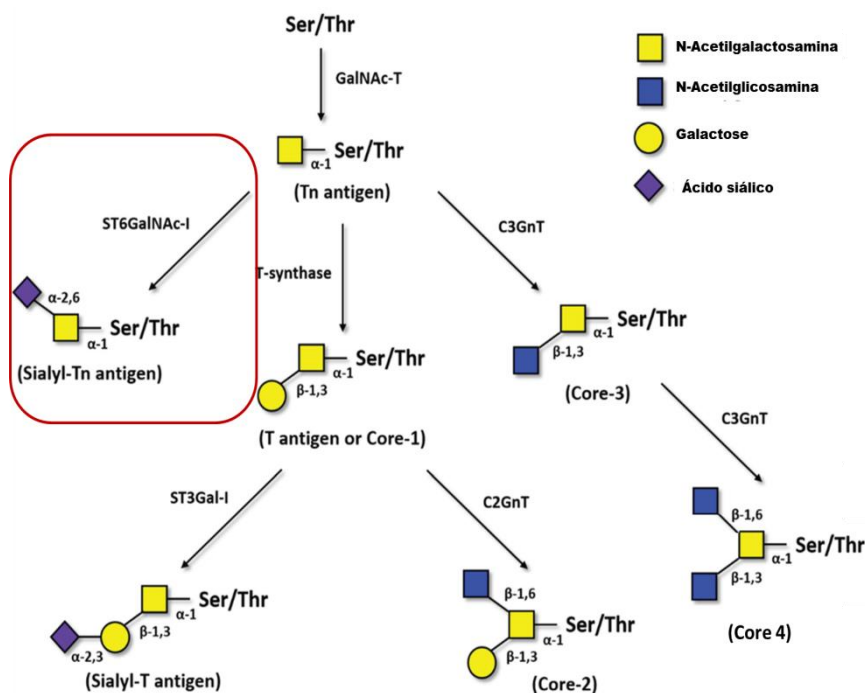
Além das rotas acima descritas, o antígeno Tn pode ser substrato de enzimas que transfere ácido siálico. As sialiltransferases humanas são uma família de pelo menos 20 proteínas glicosiltransferases normalmente, ligadas à membrana do Complexo de Golgi, mas também podem ser solúveis ou ligadas à membrana citoplasmática e cada uma catalisa um tipo de ligação e tem uma especificidade própria para com o substrato (GROSS *et al.*, 1996; HARDUIN-LEPERS *et al.*, 2001; CABRAL *et al.*, 2010).

As sialittransferases catalisam a transferência de um resíduo de ácido siálico proveniente do ácido N-acetilneuramínico citidina monofosfato (CMP-Neu 5Ac) para a unidade aceptora na posição terminal da cadeia oligossacarídica de glicoproteínas e glicolipídios (MARCOS *et al.*, 2004).

A sialilação do antígeno Tn (O-GalNAc) pode ser realizada por dois membros da família de sialiltransferases, são elas, α 2,6-sialiltransferase I (ST6GalNAc) I e α 2,6-sialiltransferase II (ST6GalNAc II), formando o antígeno sTn (Neu5Ac $_2$ -6GalNAc $_1$ -Ser/Thr). No entanto, estudos utilizando células transfectadas por cada uma dessas enzimas tem demonstrado que no contexto celular, apenas ST6GalNAc-I é capaz de

sintetizar o antígeno sialil-Tn (Neu5Ac α 2-6GalNAc-O-Ser/Tre) conforme demonstrado na figura 5 (SEWELL et al, 2006).

Figura 5: Vias de biossíntese de antígenos O-glicanos truncados. Em destaque a ação da enzima ST6GalNAc-I responsável pela síntese de antígeno sTn. **Fonte:** LIMA, 2014



O aumento na expressão de sialil-Tn tem sido associado com diminuição de adesão e aumento de migração de células de câncer de mama (CAZET, A. *et al.*, 2010). Além disso, em câncer gástrico (MARCOS *et al.*, 2011), ovários (VAN ELSEEN *et al.*, 2010), mama (KIM *et al.*, 2002) e pancreático a superexpressão de ST6GalNAc-I leva ao aumento da expressão do antígeno sialil-Tn, onde o constitui com marcador de pobre prognóstico.

Em câncer de próstata, um estudo onde foi avaliado a expressão gênica e proteica das enzimas envolvidas na glicosilação, utilizando linhagem de próstata normal imortalizada (RWPE), linhagem de câncer de próstata andrógeno refratário derivada de

metástase óssea (PC-3) e a linhagem de câncer de próstata andrógeno refratário derivada de metástase cerebral (DU-145) foi observado que a expressão de ST6GalNAc-I e antígeno sTn foi maior nas condições malignas, e entre elas foi maior na linhagem PC-3 (GAO, 2012).

Embora o estudo anterior seja realizado com linhagem de células provenientes de metástase, observa-se a manutenção das características do primário quando esses dados são corroborados com análise imunohistoquímica de adenocarcinoma prostático. Além de ser observado que a expressão de antígenos sTn está diretamente associado a progressão tumoral, uma vez que antígenos sTn foram mais expressos na condição maligna quando comparada a hiperplásica benigna e a neoplasia intraepitelial prostática (GARBAR; MASEAUX; WESPES, 2008).

A mucina 1 (MUC1), uma glicoproteína de membrana rica em resíduos de serina e treonina passíveis de serem o-glicosilados inclusive antígeno sTn também é altamente expressa nas linhagens de câncer de próstata andrógeno refratário PC-3 e Du-145 (SINGH *et al.*, 2006).

O aumento de expressão de mucinas-sTn foi detectado in câncer de próstata e está diretamente relacionada com grau patológico e nível de antígeno prostático específico sendo correlacionado com pior prognóstico (ARAI *et al.*, 2005).

2.5 Lectinas e sua capacidade em reconhecer carboidratos

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

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

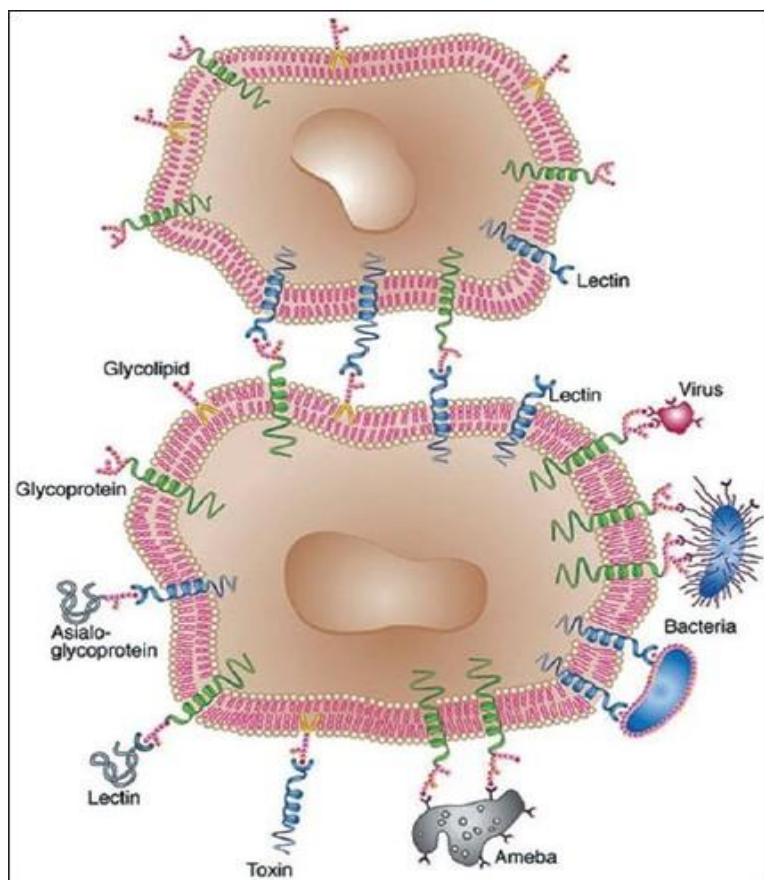
A ênfase que é dada quanto à origem não imune das lectinas serve para distingui-las de anticorpos anti-carboidratos que aglutina células. Enquanto os anticorpos são estruturalmente similares, as lectinas diferem entre si quanto à composição aminoacídica, requerimento de metais, peso molecular e estrutura tridimensional. Além disso, as lectinas estão presentes em organismos que não possuem sistema imune, como plantas e bactérias (GABIUS, 2001).

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

Várias lectinas endógenas animais são importantes em diversos processos biológicos fundamentais, tais como controle de qualidade de proteínas secretadas, reconhecimento célula-célula, interações células-matriz extracelular fertilização de gametas, desenvolvimento embrionário, crescimento celular, diferenciação celular, sinalização celular, apoptose, imunomodulação, inflamação, adesão e motilidade celular, e reconhecimento patógeno-hospedeiro (Figura 6). Muitas lectinas existem na superfície das células imunes e células endoteliais que revestem a vasculatura, como proteínas da matrix extracelular ou como moléculas de adesão solúveis tais como, proteínas

ligadoras de manose ou lectinas ligadoras de galactose (galectinas), que podem se ligar aos glicanos presentes nas células do tumor (SHARON; LIS, 1998; FUSTER; ESKO, 2005).

Figura 6: Vias de interação entre glicanos de superfície celular com lectinas endógenas, promovendo adesão célula a célula, bem como patógenos-hospedeiro. **Fonte:** Kappor *et al.*, 2014



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

A *Concanavalina A* (Con A) é uma lectina vegetal obtida das sementes de *Canavalia ensiformes*, é o membro mais bem conhecido das lectinas de leguminosas devido as inúmeras aplicações biológicas. Ela reconhece e se liga especificamente à resíduos de α -D-glicose/manose de carboidratos complexos, exibindo alta afinidade por oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolipídios de superfície celular. A estrutura molecular é apresentada como um tetrâmero acima de pH 7 e um dímero abaixo de pH 6, com cada monômero de Con A apresentando peso molecular de 26 KDa e um sítio de ligação à carboidratos (CHATTERJEE; MANDAL, 2005).

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

A lectina *Ulex europaeus* agglutinin-I (UEA-I) é uma metalo-glicoproteína que reconhece especificamente resíduos de α -L-fucose e oligossacarídeos que contêm fucose, como por exemplo, α -L-fuc(1 $\rightarrow$ 2) β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 4) β -D-GlcNAc. A organização estrutural quaternária dimérica da lectina UEA-I, bem como as estruturas terciárias das subunidades monoméricas são semelhantes as que ocorrem entre as lectinas de leguminosas. Todavia, algumas diferenças estruturais monoméricas são observadas, estas incluem substituição dos resíduos de alanina que atuam no sítio de ligação aos glicanos específicos comuns às demais lectinas, por treonina nos monômeros de UEA,

cada um deles possuem dois íons metálicos, um de cálcio e outro de mangânes e, além disso, frações oligossacarídicas estão N-ligadas nos resíduos de aminoácido 23 e 111 na sequência proteica (AUDETTE; VANDONSELAAR; DELBAERE, 2000).

A lectina *Vicia villosa* agglutinin (VVA) é uma glicoproteína obtida de sementes da *vicia villosa* que reconhece preferencialmente terminal α ou β ligados a N-acetilgalactosamina, especificamente a um resíduo único de N-acetilgalactosamina ligado a serina ou treonina em um polipeptídeo, denominado antígeno Tn. Sua estrutura tetramérica consiste na combinação de subunidades A e B, porém a alta similaridade na composição de aminoácidos dessas subunidades resultam em lectinas compostas de ambas subunidades A ou B, sugerindo que a *vicia villosa* pode conter isolectinas (TOLLEFSEN, KORNEFELD R., 1983).

A *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) é uma lectina obtida da árvore *sambucus nigra*, tem especificidade de ligação pela sequência sacarídica NeuAc (α 2,6) Gal/GalNAc, ou seja reconhece resíduos de ácido siálico na posição α 2,6 (LÓPEZ-MORALES et al., 2010).

2.5.1 Aplicações

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

Estudos utilizando diferentes lectinas imobilizadas em microesferas de agarose frente linhagens celulares de cólon humanos, nas condições normais e neoplásicas, foram observados que as lectinas reconheciam mais as células de linhagem tumoral e

que essa ligação resultará num maior efeito biológico promovendo assim um efeito inibitório da proliferação da linhagem de células do câncer em relação à linhagem normal (PETROSSIAN; WELTY, 2007).

Essa característica das lectinas em reconhecer carboidratos de superfície de células tumorais, tem reforçado o uso dessas como moléculas transportadoras que podem ser conjugados com as drogas quimioterápicas e entregar os agentes anti-câncer diretamente no local da doença, além disso, como algumas lectinas são mitogênicas, ela pode potencializar a eficácia da droga em sinergia (OPPENHEIMER; ALVAREZ; NNOLI, 2008).

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

A capacidade das lectinas em reconhecer e ligar-se a glicanos específicos, associado à mudança no perfil de expressão de carboidratos de superfície nas células tumorais, permite que as lectinas sejam utilizadas na caracterização e diferenciação de tecidos normais e transformados, sendo uma técnica sensível, estável e de fácil manipulação, contribuindo com informações sobre o desenvolvimento, estágios de diferenciação, grau de malignidade e potencial do tecido em desenvolver metástase a partir do estabelecimento de perfil de carboidratos do tecido estudado.

A revelação do reconhecimento do perfil de glicosilação tecidual através de lectinas tem sido realizada utilizando vários tipos de substâncias reveladoras, tais como os reveladores cromógenos cujas lectinas estão conjugadas a peroxidase ou biotina, as quais foram utilizadas na investigação de carcinoma ductal infiltrante (BELTRÃO *et al.*, 1998), meningioma (BELTRÃO, *et al.*, 2003), câncer de pele (MELO-JÚNIOR, *et*

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

2.6 Quimiluminescência

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

Os primeiros relatos a cerca do fenômeno quimiluminescente foram descritos em 1877, quando Radziszewski sintetizou a lofina e observou que a mesma emitia luz verde ao reagir com o oxigênio na presença de uma base forte, e em 1887, quando Eder sintetizou o pirogalol. No entanto, a definição do termo quimiluminescência foi descrito

pela primeira vez por Eilhand Wiedeman no ano de 1888 (GARCIA-CAMPAÑA; BAEYENS, 2000).

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

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

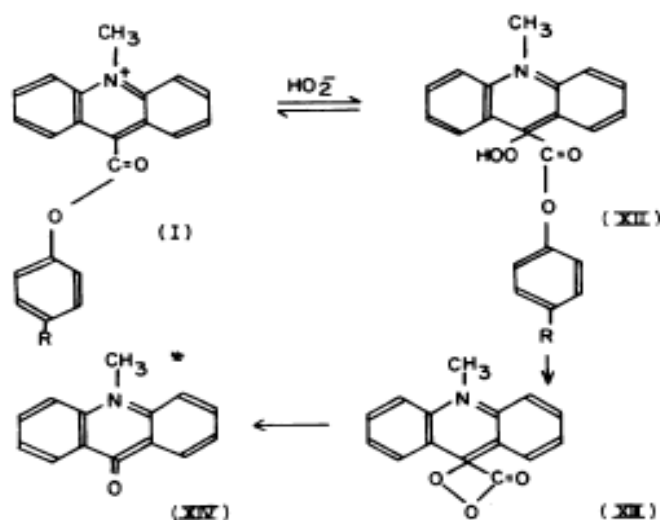
Embora o luminol tenha sido um dos primeiros compostos a ser descritos juntamente com o isoluminol e seus derivados, como marcadores de proteínas, eles apresentam desvantagens a serem consideradas, como a diminuição do quantum de luz quando acoplado às proteínas e o requerimento de um catalisador na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

Sais de acridina podem ser estimulados a produzir luz em presença de solução alcalina de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na ausência de catalisador. Tais compostos incluem os derivados de acridina, que são moléculas que possuem um nitrogênio

quaternário central e uma ramificação no carbono 9 onde está inserido um radical fenil instável (WEEKS *et al.*, 1983).

Diferente do luminol e isoluminol, os esteres de acridina possuem o seu mecanismo de ação totalmente esclarecido em condição aquosa, de modo que a reação quimiluminescente do éster de acridina, observada na figura 7, é realizada em solução alcalina de peróxido de hidrogênio, o qual é dissociado para formar sua base conjugada, o ânion hidroxiperoxil (HO_2^-), que ataca a estrutura do anel da acridina clivando múltiplas ligações, resultando em um rearranjo intermolecular formando o intermediário dioxetano, e a sua decomposição resulta na síntese de uma molécula excitada, a N-metilacridona, que retorna a seu estado energético basal com emissão de luz a cerca de 430nm, a qual é registrada por detectores de fótons, luminômetros (GARCIA-CAMPAÑA *et al.*, 2003).

Figura 7: Mecanismo quimiluminescente do éster de Acridina. **Fonte:** WOODHEAD e WEEKS, 1985.

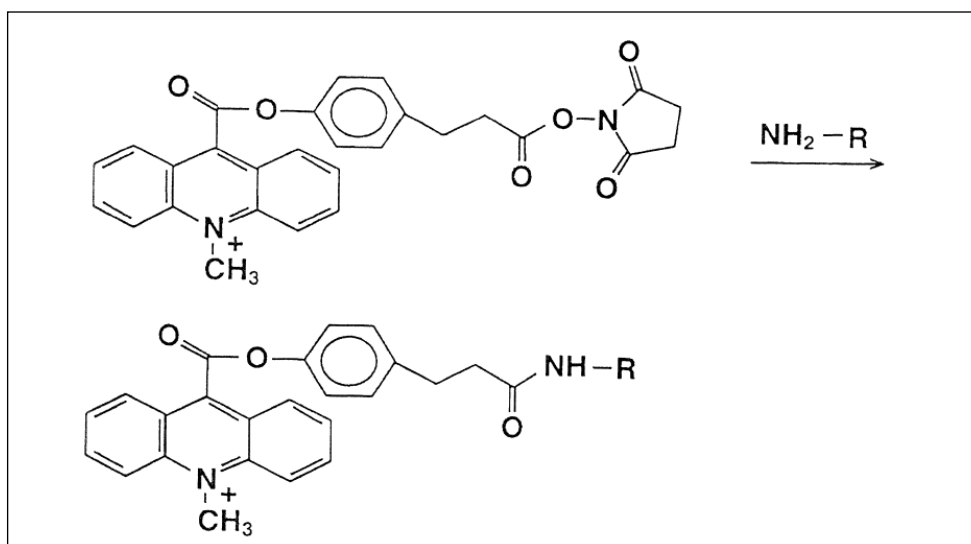


O éster de acridina foi introduzido em imunoenaios a partir da necessidade de substituir os marcadores radioisótopos que estavam se tornando poucos populares

devido à sua curta meia vida, ao perigo potencial à saúde e aos problemas quanto aos dejetos gerados (WEEKS *et al.*,1986). Sendo considerado um eficaz marcador para biomacromoléculas recebeu um grande interesse como base para o desenvolvimento de ensaios quimioluminescentes de alta performance usando moléculas marcadas com essa substância (YANG *et al.*, 2002)

A aplicação dos ésteres de acridina em imunoenaios quimioluminecentes foi realizada pela primeira vez por Weeks *et al.*,1983, na preparação de anticorpos mono- ou policlonal marcado contra a alfa 1- fetoproteína, onde foi observado que o marcador reagia sob condições brandas com aminas alifáticas primárias e secundárias, sendo portanto capaz de marcar proteínas (Figura 8) e além disso foi demonstrado que este composto tinha alta sensibilidade de detecção, igual ou superior ao I^{125} .

Figura 8: Reação de conjugação da proteína ($NH_2 - R$) ao Éster de Acridina N-hidroxisuccinimida. **Fonte:** GARCIA-CAMPAÑA *et al.*, 2003.



O uso da quimiluminescência tem sido extensivamente pesquisado por décadas, e uma ampla gama de métodos quimioluminescentes têm sido amplamente aplicados

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

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

3 JUSTIFICATIVA

A identificação de biomoléculas com potencial para serem biomarcadores que revele características biológicas ou que seja capaz de predizer prognóstico em uma doença com comportamento heterogêneo como o câncer, é alvo de investigação na comunidade científica. Este estudo se postula a investigar o perfil de glicosilação em tecidos hiperplásico prostático e câncer de próstata utilizando sondas sintetizadas a partir da conjugação de lectinas ao éster de acridina. Prosseguindo essa investigação buscaremos corroborar os resultados obtidos inicialmente, avaliando *in vitro* se os hormônios esteroides, especialmente, estrógeno podem atuar regulando a expressão de glicosiltransferases em linhagens de câncer de próstata refratário (DU-145 e PC-3), e como isso pode afetar a síntese de cadeias de glicanos alteradas no câncer de próstata, bem como se podem está atreladas a progressão tumoral.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar o perfil de expressão de resíduos de carboidratos em tecidos prostáticos humanos em condições normais, hiperplásica (Hiperplasia Prostática Benigna) e neoplásica (Adenocarcinoma Prostático) e investigar os efeitos do 17 β -estradiol frente aos aspectos glicobiológicos em células de câncer de próstata hormônio refratário (linhagens DU-145 e PC-3).

4.4 Específicos

- Desenvolver os conjugados lectinas (Con A, PNA e UEA-I) éster de acridina;
- Marcar os tecidos prostáticos em condições normais, hiperplásicas e neoplásicas com os conjugados e quantificar por quimiluminescência os grupos;
- Correlacionar a intensidade de emissão de fótons (RLU) com as condições neoplásicas e sua subsequente expressão de resíduos de carboidratos;
- Avaliar *in vitro* a expressão proteica da glicosiltransferase ST6GalNAc, os receptores de estrógenos subtipos α e β , em linhagens de câncer de próstata andrógeno refratária (DU-145 e PC-3) na presença de estradiol (10^{-6} M) e estradiol (10^{-6} M) + fulvestranto (10×10^{-6} M);
- Avaliar a expressão de glicanos correspondentes em linhagens de câncer de próstata andrógeno refratária na presença de estradiol (10^{-6} M) e estradiol (10^{-6} M) + fulvestranto (10×10^{-6} M);
- Avaliar a influência da glicosilação no comportamento celular, através de ensaio de migração.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANOLIK, J.H.; KLINGE, C.R.; HILF, R.; BAMBARA, R.A. Cooperative binding of estrogen receptor to DNA depends on spacing of binding sites, flanking sequence, and ligand. **Biochemistry**. v.34, p.2511–2520, 1995.

ARAI, T.; FUJITA, K.; FUJIME, M.; IRIMURA, T. Expression of sialylated MUC1 in prostate cancer: relationship to clinical stage and prognosis. **International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association**. 12:654-661, 2005.

ARENAS, M.I.; ROMO, E.; GASPAR, I.; BETHENCOURT, F.R.; SÁNCHEZ-CHAPADO, M.; FRAILE, B.; PANIAQUA, R. A lectin histochemistry comparative study in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma. **Glicoconj J**. v.16, p.375-382, 1999.

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

ARMANDARI, I.; HAMID, A. R.; VERHAEGH, G.; SCHALKEN, J.; Intratumoral steroidogenesis in castration-resistant prostate cancer: A target for therapy. **Prostate Int**. v. 2, p. 105-113, 2014.

BEEKMAN, J.M.; WIJNHOLDS, J.; SCHIPPERS, I.J.; POT, W.; GRUBER, M.; AB, G. Regulatory elements and DNA-binding proteins mediating transcription from the chicken very-low-density apolipoprotein II gene. **Nucleic Acids Res**. v.19, p.5371–5377, 1991.

BELTRÃO, E.I.C.; CORREIA, M.T.; COELHO, L.C. Biding evaluation de isoform Cratylia mollis lectin to human mammary tissues. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 74, p. 125-134, 1998.

BELTRÃO, E.I.C.; CABRAL, T.; FIGUEIREDO-SILVA, J.; COELHO, L.; CARVALHO JUNIOR, L.B. Infiltrating ductal carcinoma: a lectin histochemistry study. Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, n.46, p.32-35, 2001.

BELTRÃO, E.I.C. MEDEIROS, P.L.; RODRIGUES O.G.; FIGUEIREDO-SILVA, J.; VALENÇA, M.M.; COELHO, L.C.; CARVALHO JÚNIOR, L.B. Parkia pendula lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. **Eur J Histochem**, n.47, p. 139-42, 2003.

BJORNSTROM, L.; SJOBERG, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: Convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. **Mol Endocrinol**, v. 19, p.833-842, 2005.

BLOME, B.; VAN, S.C.; CALLEWAERT, N.; VAN, V. H. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. **J Hepatol**, v.50, p. 592-603, 2009.

BOLLIG, A.; MIKSICEK, R.J. An estrogen receptor- α splicing variant mediates both positive and negative effects on gene transcription. **Mol. Endocrinol.** v.14 p.634–649, 2000.

BOSLAND, M.C.; FORD, H.; HORTON, L. Induction at high incidence of ductal prostate adenocarcinoma in NBL/Cr and Sprague-Dawley Hsd:SD rats treated with a combination of testosterone and estradiol-17 beta or diethyltulbestrol. **Carcinogenesis**, v.16, p. 1311-17, 1995.

BOSLAND M.C. The Role of Estrogens in Prostate Carcinogenesis: A Rationale for Chemoprevention. **Rev. Urol.** 7 (suppl. 3), 2005.

BRUSTEIN, V.P.; CAVALCANTI, C.L.B.; MELO-JUNIOR, M. R.; CORREIA, T.S.; BELTRÃO, E. I. C.; CARVALHO-JÚNIOR, L. B. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. **Appl Biochem Biotechnol**, 2011.

BURNS-COX, N.L.; BASKETTER, V.; HUGGINS, B.; HOLMES, S. Randomised trial comparing diethylstilboestrol and flutamide in the treatment of hormone relapsed prostate cancer. **Int J Urol**. v. 9, p. 431-434, 2002.

CABRAL, M.G. Human dendritic cells contain cell surface sialyltransferase activity. **Immunology Letters**, v.131, p. 89–96, 2010.

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

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

CAMPOS, L.M.; CAVALCANTI, C.L.L.; LIMA-FILHO, J.L.; CARVALHO-JÚNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I. Acridinium Ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. **Biomarkers**, n. 11, p. 480 – 484, 2006.

CHADHA, M.K.; ASHRAF, U.; LAWRENCE, D.; TIAN, L.; LEVINE, E.; SILIMAN, C.; ESCOTT, P.; PAYNE, V.; TRUMP, D. L. Phase II study of fulvestrant (Faslodex) in castration resistant prostate cancer. **Prostate**. v. 68, p.1461–1466, 2008.

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

CARREAU, S.; LAMBARD, S.; DELALANDE, C.; DENIS-GALERAUD, I.; BILINSKA, B.; BOURQUIBA, S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. **Reprod. Biol. Endocrinol**, v. 1, p.35, 2003.

CAZET, A.; JULIEN, S.; BOBOWSKI, M.; KRZEWISKI-RECCHI, M. A.; HARDUIN-LEPERS, A.; GROUX-DEGROOTE, S.; DELANNOY, P. Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. **Carbohydr. Res.**, v. 345, p. 1377-1383, 2010.

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

COBO, E.R.; CAMPERO, C.M.; GIMENO, E.J.; BARBEITO, C.G. Lectin binding patterns and immunohistochemical antigen detection in the genitalia of *Tritrichomonas foetus*-infected heifers. *J. Comp. Path*, V.131, 127–134, 2004.

COLOMBEL M; SYMMANS, F.; GIL, S.; O`TOOLE, K. M.; CHOPIN, D.; BENSON, M.; OLSSON, C. A.; KORSMEYER, S.; BUTTYAN, R. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1–2 in hormone-refractory human prostate cancers. **Am J Pathol** .v.143, p.390–400, 1993.

DEHM, S.M.; TINDALL, D.J. Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, p. 333–344, 2006.

DERO, B.J.; KORACK, K.S. Estrogen receptors and human disease. **J. Clin. Invest.** v.116, p. 561-570, 2006.

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

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

EFSTATHIOU E.; TITUS, M.; TSAVACHIDOU, D.; TZELEPI, V.; WEN, S.; HOANG, A.; MOLINA, A.; CHIEFFO, N.; SMITH, L.A.; KARLOU, M.; TRONCOSO, P.; LOGOTHETIS, C.J. Effects of abiraterone acetate on androgen signaling in castrate-resistant prostate cancer in bone. **J Clin Oncol.** v.30, p. 637–643, 2012.

ELLEM, S.J.; SCHIMITT, J.F.; PEDERSEN, J.S.; FRYDENBERG, M.; RISBRIDGER, G.P. Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 89, p.2431–2441, 2004.

ELLEM, S.J.; HONG, W.; POUTENEN, M.; RISBRIDGER, G.P. Increased endogenous estrogen synthesis leads to the sequential induction of prostatic inflammation (prostatitis) and prostatic pre-malignancy, **Am. J. Pathol.** v.3, p.1187–1199, 2009.

ENMARK, E.; PELTO-HUKKO, M.; GRANDIEN, K.; LAGERCRANTZ, J.; LAGERCRANTZ, J.; FRIED, G.; NORDENSKJÖID, M.; GUSTAFSSON, J.A. Human estrogen receptor b-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern, **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.82 p.4258–4265, 1997.

EVANS, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily, **Science**, v. 240 889–895, 1988.

FELDMAN, B.J.; FELDMAN, D. The development of androgen independent prostate cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, p. 34–45, 2001.

FREIRE, M.G.M.; GOMES, V.M.; CORSINI, R.E.; MACHADO, O. L.T.; DE SIMONE, S.G.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Isolation and

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

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

FUJIMURA, T.; TAKAHASHI, S.; URANO, T.; OGAWA, S.; OUCHI, Y.; KITAMURA, T.; MURAMATSU, M.; INOUE, S. Differential expression of estrogen receptor β (ER β) and its C-terminal truncated splice variant ER β cx as prognostic predictors in human prostatic cancer. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 289, p. 692–699, 2001.

FUKUDA, M.; BAO, X. Seeing cellular sialidase transform sugars. **Nature Chemical Biology**, v.4, p. 721-722, 2008.

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

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

GAO, J.Q.; OKADA, N.; MAYUMI, T.; NAKAGAWA, S. Immune cell recruitment and cell-based system for cancer therapy. **Pharmaceutical Research**, v.25, p.752-768, 2008.

GAO, Y. Glycosylation potential of human prostate cancer cell lines. *Glycoconj J.* v. 29, p. 525-537, 2012.

GARBAR, C., MASEAUX, C., WESPES, E. Expression of MUC1 and sialyl-Tn in benign prostatic glands, high-grade prostate intraepithelial neoplasia and malignant prostatic glands: a preliminary study. **Anal. Quant. Cytol. Histol.** v.30, p.71-77, 2008.

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

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

GASENT BLESÁ, J.M.; CANDEL, V.A.; MARCO, M.V.G.; GINER-BOSCH, V.; PULLA, M. P.; CANALES, J.B.L.; Experience with fulvestrant acetate in castration-resistant prostate cancer patients. **Ann Oncol**. v. 21, p. 1131–1132, 2010.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochem.**, v. 113, p. 236-254, 2011.

GRONBERG, H. Prostate cancer epidemiology. **Lancet**. v.361, p. 859-864, 2009.

GROSS, H.J.; MERLING, A.; MOLDENHAUER, G.; SCHWARTZ-ALBIEZ, R. Ecto-sialyltransferase of human B lymphocytes reconstitutes differentiation markers in the presence of exogenous CMP-N-Acetyl neuraminic acid. **Blood**, v.87, p.5113-5126, 1996.

GRUBER, C.J.; GRUBER, D.M.; GRUBER, I.M.; WIESER, F.; HUBER, J.C. Anatomy of the estrogen response element. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. V. 15, p.73-78, 2004.

HANKEY, B. F.; FEUER, E. J.; CLEGG, L. X. Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 91, p. 1017-1024, 1999.

HARDUIN-LEPERS, A.; VALLEJO-RUIZ, V.; KRZEWSKI-RECCHI, M.A.; SAMYN-PETIT, B.; JULIEN, S.; DELANNOY, P. The human sialyltransferase family. **Biochimie**, v.83, p.727–737, 2001.

HÄRKÖNEN P.L.; MÄKELÄ S.I. Role of estrogens in development of prostate cancer. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** v. 92, p. 297–305, 2004.

HARRIS W.P.; MOSTAGHEL, E.A.; NELSON, P.S.; MONTGOMERY, B. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. **Nat. Clin. Pract Urol.** v. 6, p. 76-85, 2009.

HASHMAN, L., TAPLIN, M.E. Abiraterone Acetate: Taregeting Persistent Androgen Dependence in Castration-Resistant Prostate Cancer. **Adv. Ther.** v.30, p. 727-747, 2013.

HATANO K.; MIYAMOTO, Y.; MORI, M.; NIMURA, K.; NAKAI, Y.; NONOMURA, N.; KANEDA, Y. Androgen- regulated transcriptional control of sialyltransferases in prostate cancer cells. **PloS ONE**. v.7, p. e 31234, 2012.

HEIDLASK, J.E.; WILLIAMS, K.W.E.; WHITESIDES, G.M. Nucleoside phosphate sugars: syntheses on practical scales for use as reagents in the enzymatic preparation of oligosaccharides and glycoconjugates. **Accounts of Chemical Research.** v.25, p.307-314, 1992.

HELDLING, N.; PIKE, A.; ANDERSSON, S.; MATTHEWS, J. Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. **Physiol.Rev.**, v. 87, p. 905-931, 2007.

HESS, R. A. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. **Reprod. Biol. Endocrinol**, v. 52, p. 1-14, 2003.

HO, S.M., LEUNG, Y.K., CHUNG, I. Estrogen and antiestrogens as etiological factors and therapeutics for prostate cancer. **Ann.N.Y.Acad. Sci.** v.1089, p. 177-193, 2006.

HO, S.M., ROY, D. Sex hormone-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation in the dorsolateral prostates of Noble rats. **Cancer Lett.** v.84, p.155–162, 1994.

HO, C.K.M.; NANDA, J.; CHAPMAN, K.E.; HABIB, F.K. Oestrogen and benign prostatic hyperplasia: effects on stromal cell proliferation and local formation from androgen. **Journal of Endocrinology**, v.197, p.483–491, 2008.

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

HOBISCH A.; CULIG, Z.; RADMAYR, C.; BARTSCH, G.; KLOCKER, H.; HITTMAIR, A. Androgen receptor status of lymph node metastases from prostate cancer. **Prostate**. v.28, p.129-135, 1996.

HUGGINS C, HODGES CV. Studies on prostatic cancer. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. **Cancer Res.** v.1, p. 294-297, 1941.

IMAMOV, O., SHIM, G.J., WARNER, M. Estrogen receptor beta in health and disease. **Biol. Rep.** v. 73, p, 866-871, 2005.

INGBER, D.E. Can cancer be reserved by engineering the tumor. *Sem. Cancer Biol.* V.18, p.356-364, 2008.

INOUE, S. OGAWA, S.; HORIE, K.; HOSHINO, S.; GOTO, W.; HOSOI, T.; TSUTSUMI, O.; MURAMATSU, M.; OUCHI, Y. An estrogen receptor b isoform that

lacks exon 5 has dominant negative activity on both ERa and ERb. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.279, p.814–819, 2000.

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

JULIEN, S.; LAGADEC, C.; KRZEWINSKI-RECCHI, M.A.; COURTAND, G.; LE BOURHIS, X.; DELANNOY, P. Stable expression of sialyl-Tn antigen in T47-D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.90, p.77–84, 2005.

KHABAZ, M.N.; MCCLURE, J.; MCCLURE, S.; STODDART, R.W.; Glycophenotype of prostatic carcinomas. **Folia Histochem Cytobiol.** p.48, v. 637-645 2010.

KARANTANOS T.; COM P.G.; THOMPSON T.C. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy. Mechanisms of castrate tesistance and novel therapeutic approaches. **Oncogene.** p.1-11, 2003.

KIM S.O.; CHO, H.J.; KANG, J.Y.; KANG, H.K.; YOO, T.K. Inhibition of androgen receptor expression with small interfering RNA enhances cancer cell apoptosis by suppressing survival factors in androgen insensitive, late stage LNCaP cells. **The Scientific World Journal**, 2013.

KIM, G.E.; BAE, H.I.; PARK, H.U.; KUAN, S.F.; CRAWLEY, S.C.; HO, J.J.; KIM, Y.S. Aberrant expression. Of MUC5AC and MUC6 gastric mucins and sialyl Tn antigen in intraepithelial neoplasm of the pancreas. **Gastroenterology.** v.123, p. 1052-1060, 2002.

KOIVISTO P.; KONONEN, J.; PALMBERG, C.; TAMMELA, T.; HYYTINEN, E.; ISOLA, J.; TRAPMAN, J.; CLEUTJENS, K.; NOORDSIJ, A.; VISAKORPI, T.; KALLIONIEMI, O.P. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. **Cancer Res.** v.57, p.314 –9, 1997.

KOPF, E., ZHARHARY, D. Antibody arrays - A emerging tool in cancer proteomics. **Int J Biochem & Cell Biol.** V. 39, p. 1305-1317, 2007.

KOONG, L.Y., WATSON, C.S. Direct estradiol and diethylstilbestrol actions on early-versus-late stage prostate cells cancer. **The prostate.** V. 75, p. 1580-1603, 2014.

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

LAMB, D. J.; WEIGEL, N. L.; MARCELL, M. Androgen receptors and their biology. **Vitamins and Hormones**, v. 62, p. 199–230, 2001.

LEUNG, Y.K.; MAK, P.; HASSAN, S.; HO, S.M. Estrogen receptor ER- β isoforms: a key to understanding ER- β signaling. **Proc. Natl. Acad.Sci.** v.103, p.13162-13167, 2006.

LEUNG, Y.K.; CHAN, Q.K.Y.; NG, C.F.; MA, F.M.T.; TSE, H.M.; TO, K.F.; MARANCHIE, J.; HO, S.M.; LAU, K.M. Hsa-miRNA-765 as a Key Mediator for Inhibiting Growth, Migration and Invasion in Fulvestrant-Treated Prostate Cancer. **Plos One.** v.9, p. e98037, 2014.

LI, J.; YEN, C.; LIAW, D.; PODSYPANINA, K.; BOSE, S.; WANG, S.I.; PUC, J.; MLIAREISIS, C.; RODGERS, L.; McCOMBIE, R.; BIGNER, S.H.; GIOVANELLA, B.C.; ITTMANN, M.; TYCKO, B.; HIBSHOOSH, H.; WIGLER, M.H., PARSONS, R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science (Wash DC).** v. 275, p.1943–1947, 1997

LI, L., HAYNES, M.P., BENDER, J.R. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor a variant (ER46) in human endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, p. 4807–4812, 2003.

LIMA A.L.R.; CAVALCANTI, C.C.B.; SILVA, M.C.C.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; BELTRÃO, E.I.C.; CORREIA, M.T.S. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with Cratylia mollis seed lectin. **J Biomed Biotechnol** 2010: 1-6, 2010.

LIMA, L.F. Sweet and Sour: the impact off differential glycosylation in cancer cells undergoing epithelias-mesenchymal transition. **Frontiers in oncology**. v. 4, p. 1-10, 2014.

LÓPES-MORALES, D.; VELAZQUEZ-MARQUEZ, N.; VALENZUELA, O.; SANTOS-LOPEZ, G.; REYES-LEYVA, J.; VALLEJO-RUIZ, V. Increment de la transcripción de sialiltransferases en muestras de cérvix con neoplasia intraepitelial cervical. **Invest Clin**. v. 50, p. 45-53, 2010.

LOUREIRO, L.R.; CARRASCAL, M.A.; BARBAS, A.; RAMALHO, J.S.; NOVO, C.; DELANNOY, P.; VIDEIRA, P.A. Challenges in antibody development against Tn and Sialyl-Tn antigens. **Biomolecules**. v.5, p.1783-1809, 2015.

LUNARDI A. A co-clinical approach identifies mechanisms and potencial therapies for androgen deprivation resistance in prostate cancer. **Nat. Genet**. v. 45, p. 747-755, 2013.

MARCELLI M.; ITTMANN, M.; MARIANI, S.; SUTHERLAND, R.; NIGAM, R.; MURTHY, L.; ZHAO, Y.; DICONCINI, D.; UXEDDU, E.; ESEN, A.; EASTHAM, J.; WEIGEL, N.L.; LAMB, D. J. Androgen receptor mutations in prostate cancer. **Cancer Res**. v. 60, p.944-949, 2000.

MARCOS, N.T. ; PINHO, S.; GRANDELA, C.; CRUZ, A.; SAMYN-PETITI, B.; HARDUIN-LEPERS, A.; ALMEIDA, R.; SILVA, F.; MORAIS, V.; COSTA, J.; KIHLEBERG, J.; CLAUSEN, H.; REIS, C.A. Role of the human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the synthesis of the cancer-associated sialyl-Tn antigen. **Cancer Research**, v.64, p.7050–7057, 2004.

MARCOS, N.T.; BENNETT E.P.; GOMES, J.; MAGALHÃES, A.; GOMES, C.; DAVID, L.; DAR, I.; JEANNEAU, C.; DEFREES, S.; KRUSTRUP, D.; VOGEL, L.K.; KURE, E.H.; BURCHELL, J.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J.; CLAUSEN, H.; MANDEL, U.; REIS, C.A. ST6GalNAc I controls expression. Of sialyl-tn antigen in gastrointestinal tissues. **Front. Biosci**, v.3, p. 1443-1455, 2011.

MARINO, M.; GALLUZO, P.; ASCENZI, P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. **Current Genomics**. v.7, p. 497-508, 2006.

MARQUES R.B.; DITS N.F.; ERKENS-SCHULZE, S.; WEERDEN, W.M.; JENSTER, G. Bypass mechanisms of the androgen receptor pathway in therapy-resistant prostate cancer cell models. **PloS One**. 5: 1-16, 2010.

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

MEDVEDOVA, L.; KNOPP, J.; FARKAS, R. Steroid regulation of terminal protein glycosyltransferase genes: Molecular and functional homologies within sialyltransferase and fucosyltransferase families. **Endocrine Regulation**. v.37, p.203-210, 2003.

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

MELO-JÚNIOR, M.R.; CAVALCANTI, C.L.B.; PONTES-FILHO, N.T.; CARVALHO-JÚNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potencial marker to biochemical alterations and tumor differential diagnosis. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, p. 455-560, 2006.

MELO-JÚNIOR, M.R.; CAVALCANTI, C.L.B.; PONTES-FILHO, N.T.; CARVALHO-JÚNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Carbohydrates detection in the hepatic egg-granuloma system using lectin histochemistry. **Int J Morphol**, v. 26, p. 967-972, 2008.

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 Journal of Microbiology**, v. 39, p. 238-240, 2008.

MENASCE, L.P.; WHITE, G.R.M.; HARRISON, C.J.; BOYLE, J.M. Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique, **Genomics**, v. 17, p. 263-265, 1993.

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

MONTGOMERY, R.B., MOSTAGHEL, E.A., VESSELA, R.; HESS, D.L., KARLHORN, T.F.; HIGANO, C.S. Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. **Cancer Res.** v. 68, p. 4474-4454, 2008.

MOSTAGEL, E.A., SOLOMON, K.R., PELTON, K., FREEMAN, M.R., MONTGOMERY, R.B. Impact of circulating cholesterol levels on growth and intratumoral androgen concentration of prostate tumors. *PLOS ONE*. v.7, p. e30062, 2012.

MULHOLLAND D.J.; DEDHAR, S.; WU, H.; NELSON, C.C. PTEN and GSK3b: key regulators of progression to androgen-independent prostate cancer. *Oncogene* 25, 329–337, 2006.

MURPHY, L.C., WANG, M., COUTT, A., DOTZLAW, H. Novel mutations in the estrogen receptor messenger RNA in human breast cancers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* v.81, p.1420–1427, 1996.

NAKAJIMA, Y. Estrogen Regulates Tumor Growth Through a Nonclassical Pathway that Includes the Transcription Factors ERb and KLF5. *Science Signaling*, v.4, p. 1-12, 2011.

NANGIA-MAKKER, P.; CONKLIN, J.; HOGAN, V.; RAZ, A. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *Trends in Molecular Medicine*, v. 8, p. 187-192, 2002.

NELSON, C.C.; HENDY, S.C.; SHUKIN, R.J.; CHENG, H.; BRUCHOVSKY, N.; KOOP, B.F.; RENNIE, P.S. Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: evidence for differential steroid receptor response elements. *Mol. Endocrinol.* v.13, p. 2090–2107, 1999.

NIKHIL K.; SHARAN, S.; CHAKRABORTY, A.; ROY, P. Pterostilbene-Isothiocyanate conjugate suppresses growth of prostate cancer cells irrespective of androgen receptor status. *Plos one*. e93335, 2014.

NISHIYAMA, T. The change in the dihydrotestosterone level in the prostate before and after androgen deprivation therapy in connection with prostate cancer aggressiveness using the Gleason score. **J. Urol.** v.178, p. 1282-1288,2007.

OGAWA, S.; INOUE, S.; WATANABE, T.; HIROI, H.; ORIMO, A.; HOSOI, T.; OUCHI, Y.; MURAMATSU, M. The complete primary structure of human estrogen receptor β (ER β) and its heterodimerization with ER α in vivo and in vitro, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** V. 243, p.122–126, 1998.

OHTSUBO, K.; MARTH, J.D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. **Cell**, v.126, p.855-867, 2006.

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

PAULE, B.; TERRY, S.; KHEUANG, L.; SOYEUX, P.; VACHEROT, F.; DE LA TAILLE, A. The NF- κ B/IL-6 pathway in metastatic androgen-independent prostate cancer: new therapeutic approaches? **World J Urol.** 25:477–489, 2007.

PETRESCU, A.J. Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. **Glycobiology** v.14, p.103-114, 2004.

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

PFEFFER, U. Estrogen receptor variant messenger RNA lacking exon 4 in estrogen-responsive human breast cancer cell lines. **Cancer Res.** v.53, p. 741–743, 1993.

PIKE, A.C.W.; BROZOWSKI, A.M.; HUBBARD, R.E. A structural biologist's view of the oestrogen receptor, **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** v.74 p.261–268, 2000.

PINK, J.J. A novel 80 kDa human estrogen receptor containing a duplication of exons 6 and 7. **Nucl. Acids Res.** v. 24 p. 962–969, 1996.

PRAVENOTTI, A.; MORNATI, O.; MORNATI, P. Estrogen receptor beta (ERbeta) and inhibition of prostate cancer cell proliferation: studies on the possible mechanism of action in DU-145 cells. **Mol.Cell.Endocrinol.** v.263, p.46-54, 2007.

PRICE J.R.; BUTLER, C.A.; WEBB, P.; UHT, R.; KUSHNER, P.; HANDA, R.J. A splice variant of estrogen receptor β missing exon 3 displays altered subnuclear localization and capacity for transcriptional activation. **Endocrinology**, v.142, p. 2039–2049, 2001.

PRINS G. S.; Korach K. S. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. **Steroids** v.73, p. 233–244, 2008.

REIS, C.A. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. **J Clin Pathol**, v.63, p.322-29, 2010.

RICKE, W.A.; McPHERSON, S.J.; BIANCO, J.J.; CUNHA, G.R.; WANG, Y.; RISBRIDGER, G.P. Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling, **FASEB J.** v. 5 p.1512–1520, 2008.

RISBRIDGER, G.; WANG, H.; YOUNG, P.; KURITA, T.; WONG, Y.Z.; LUBAHN, D.; GUSTAFSSON, J.A.; CUNHA, G. Evidence that epithelial and

mesenchymal estrogen receptor-alpha mediates effects of estrogen on prostatic epithelium, **Dev. Biol.** v. 2, p. 432–442, 2001.

RISBRIDGER G.P.; BIANCO J.J.; ELLEM S.J.; MCPHERSON S. J. Oestrogens and prostate cancer. **Endocrine-Related Cancer**. v.10, p. 187–191, 2003.

ROHRMANN, S. Serum Estrogen, But Not Testosterone, Levels Differ between Black and White Men in a Nationally Representative Sample of Americans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. V. 92, p. 2519-2525, 2007.

SADI, M. V.; WALSH, P. C.; BARRACK, E. R. Immunohistochemical study of androgen receptors in metastatic prostate cancer: comparison of receptor content and response to hormonal therapy. **Cancer**, v. 67, p. 3057–3064, 1991.

SAMES, K.H.; SCHUMACHER, U.; HALATA, Z.; VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; ASMUS, B.; MOLL, R.; MOLL, I. Proteoglycan and lectin histochemistry of neuroendocrine carcinomas of the ski. **FASEB Journal**, v.15, p. 1072, 2001.

SANTOS, B.S.; FARIAS, P.M.A.; MENEZES, F.D.; FERREIRA, R.C.; JÚNIOR, S.A.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; CARVALHO-JUNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Cds-Cd (OH)₂ core shell quantum dots functionalized with Concanavalin A for recognition of mammary tumors. **Phys Stat Sol**, v. 3, p. 4017-4022, 2006.

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

SCHER, H.I.; SAWYERS, C.L. Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, p. 8253–8261, 2005.

SEWELL, R. The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumorassociated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer. **J. Biol. Chem.** V.281, p.3586–3594, 2006.

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

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

SIMPSON, E.R.; DAVIS, S.R Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis- some new perspectives. **Endocrinology**, v. 142, p. 4589-4594, 2001.

SINGH, A.P.; CHAUHAN, S.C.; BAFINA, S.; JOHANSSON S.L.; SMITH, L.M.; MONIAUX, N.; LIN, M.F.; BATRA, S.K. Aberrant expression of transmembrane mucins, MUC1 e MUC4, in human prostate carcinomas. **The Prostate**. v.66, p. 421-429, 2006.

SINGH P.B.; MATANHELIA S.S. MARTIN F.L. A potential paradox in prostate adenocarcinoma progression: Oestrogen as the initiating driver. **Eur. J. Cancer** v.44, p. 928–936, 2008.

SOBRAL, A.P.; REGO, M.J.; CAVALCANTI, C.L.; CARVALHO JÚNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I. Con A and UEA-I lectin histochemistry of parotid mucoepidermoid carcinoma. **Journal of Oral Science**, v. 52, p.49-54, 2010.

SRINIVAS, V. R.; REDDY, G.B.; AHMAD, N.; SWAMINATHAN, C.P.; MITRA, N.; SUROLIA, A. Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. *Biochim Biophys. Acta* 1527, 102 – 111. 2001.

STEINER M. S.; RAGHOW S. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators reduce prostate cancer risk. **World J. Urol.** v. 21, p. 31–36, 2003.

TAPLIN, M. E.; BALK, S. P. Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence, **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 91, no. 3, pp. 483– 490, 2004.

TAYLOR, S. E.; MARTIN-HIRSCH, P; MARTIN, F. L. Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. **Cancer Letters**, v. 288, p. 133-148, 2010.

TREECK, O. Novel estrogen receptor beta transcript variants identified in human breast cancer cells affect cell growth and apoptosis of COS-1 cells. **Mol. Cell. Endocrinol.** v.264 p.50–60, 2007.

TITUS, M.A., SCHELL, M.J., LIH, F.B., TOMER, K.B., MOHLER, J.L. Testosterone and dihydrotestosterone tissue levels in recurrent prostate cancer. **Clin Cancer Res.** v. 11, p.4653-4657, 2005.

VAN ELSEN, C.H., FRINGS, P.W., BOT, F.J., VAN DE VIJER, K.K., HULS, M.B., MEEK, B., HUPPERETS, P., GERMERAAD, W.T., BOSS, G.M. Expression of aberrant glycosylated mucin-1 in ovarian cancer. **Histopathology.** v 57, p.597-606, 2010.

VAVASSEUR, F. Synthesis of O-glycan core 3: Characterization of UDP-GlcNAc: GalNAc-R _3-N-acetyl- glucosaminyltransferase activity from colonic mucosal tissues and lack of the activity in human cancer cell lines. **Glycobiology.** v.5, p.351–357, **1995.**

VERZE, P.; CAI, T.; LORENZETTI, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. **Nature Review Urology**, 2016. WIN H.Y.; DUNCAN M.A. Role of protein kinase C- α in transformed non-malignant RWPE-1 cells and androgen-independent prostate carcinoma DU-145 cells. **Cell Prolif.** v.42, p.182-194, 2009.

XIAO-JING, M. U.; SHANG-YOU, X.; JIAN-CHAO, W.; YAN-LEI, W.; ZHINING, X. Synthesis and spectroscopic properties of acridinium- 9- sulfonamides. **Chin J Anal Chem**, v.37, p. 970-974, 2009.

YANG, M.; LIU, C.; HU, X.; HE, P.; FANG, Y. Electrochemiluminescence assay for the detection of acridinium esters. **Analítica et Chimica Acta**, v.461, p.141-146, 2002.

WALTERING KK. Increased expression of androgen receptor sensitizes prostate cancer cells to low levels of androgens. **Cancer Res.** v. 69, p.8141–9, 2009.

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

CAPÍTULO 1

Artigo publicado no periódico International Journal of Clinical and Experimental Pathology

Fator de Impacto: 1,891

Qualis Capes: B2

Evaluation of glycophenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay

Lúcia Patrícia Bezerra Gomes Silva¹, Sinara Mônica Vitalino Almeida^{1,2}, Luiza Rayanna Amorim Lima¹, Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti¹, Mariana Montenegro de Melo Lira³, Maria da Paz Carvalho da Silva¹, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão¹, Luiz Bezerra Carvalho Júnior¹

¹Departamento de Bioquímica and Laboratório de *Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)*, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50030 Recife, PE, Brazil.

²Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), Universidade de Pernambuco (UPE), 50100 Garanhuns, PE, Brazil.

³Departamento de Patologia e Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50030 Recife, PE, Brazil.

Int J Clin Exp Pathol 2014;7(7):3800-3808
www.ijcep.com /ISSN:1838-2825/UCEP0000327

Original Article

Evaluation of glyco phenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay

Lúcia Patrícia Bezerra Gomes da Silva¹, Sinara Mônica Vitalino de Almeida^{1,2}, Luiza Rayanna Amorim de Lima¹, Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti³, Mariana Montenegro de Melo Lira³, Maria da Paz Carvalho da Silva¹, Eduardo Isidoro Carneiro Beirão¹, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior¹

¹Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil; ²Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), Universidade de Pernambuco (UPE), Garanhuns, Pernambuco, Brasil; ³Departamento de Patologia e Hospital das clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil

Received March 25, 2014; Accepted May 23, 2014; Epub June 15, 2014; Published July 1, 2014

Abstract: This work aimed to evaluate the glyco phenotype in normal prostate, benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostatic adenocarcinoma (PCa) tissues by a chemiluminescent method. Concanavalin A (Con A), Ulex europaeus agglutinin (UEA-I) and Peanut agglutinin (PNA) lectins were conjugated to acridinium ester (lectins-AE). These conjugates remained capable to recognize their specific carbohydrates. Tissue samples were incubated with lectins-AE. The chemiluminescence of the tissue-lectin-AE complex was expressed in relative light units (RLU). Transformed tissues (0.25 cm² by 8 µm of thickness) showed statistical significant lower α-D-glucose/mannose (BPH: 226,931 ± 17,436; PCa: 239,520 ± 12,398) and Gal-β(1-3)-GalNAc (BPH: 28,754 ± 2,157; PCa: 16,728 ± 1,204) expression than normal tissues (367,566 ± 48,550 and 409,289 ± 22,336, respectively). However, higher α-L-fucose expression was observed in PCa (251,118 ± 14,193) in relation to normal (200,979 ± 21,318) and BHP (169,758 ± 10,264) tissues. It was observed an expressive decreasing of the values of RLU by inhibition of the interaction between tissues and lectins-AE using their specific carbohydrates. The relationship between RLU and tissue area showed a linear correlation for all lectin-AE in both transformed tissues. These results indicated that the used method is an efficient tool for specific, sensitive and quantitative analyses of prostatic glyco phenotype.

Keywords: Chemiluminescence, lectins, carbohydrates, prostatic cancer, benign prostatic hyperplasia

Introduction

Histochemistry has been a powerful tool in cancer diagnosis and many techniques have been reported in order to identify their pathological molecular alterations. Among cell differentiation/dedifferentiation the oligosaccharide composition and distribution in the cell surface glycoconjugates is under intensive analysis [1]. Lectins have been used to characterize the cancer cell glyco phenotype. The most employed visualization of the binding between lectin-carbohydrate in histochemistry is based on enzyme, particularly, peroxidase. The conventional methods and parameters adopted by the analysts in the biopsy analysis are usually based on subjective procedures [2]. It should be advisable to introduce specific and quantita-

tive procedures to assist the morphological analysis.

In our lab, histochemistry chemiluminescence has been proposed replacing enzyme as label by luminescent compound [3-6]. Chemiluminescence has been known to be a powerful analytical technique that exhibits high sensitivity with ultra-sensitive detection limits (atto-mole-septomole), selectivity, development of rapid assays and a broad range of analytical applications [7].

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

Chemiluminescent detection of prostatic glycophenotype

Prostate cancer is the second most frequently diagnosed cancer and the sixth leading cause of cancer death in males [8]. To date, the diagnosis of PCa is based on serum prostate-specific antigen (PSA) testing, digital rectal examination (DRE) and defined by histological examination of prostate core needle biopsies defining the degree of tumor malignancy by the Gleason score [8]. However, this value depends on the analyst. For this reason some methodologies have been tested for helping this widely used technique [10].

In this work the lectins *Concanavalin A* (ConA), *peanut agglutinin* (PNA) and *Ulex europaeus agglutinin* (UEA-I), respectively, specific to α -D-glucose/mannose, Gal- β (1-3)-GalNAc and α -L-fucose, were conjugated to acridinium ester (AE). The derivatives (lectin-AE) were used to evaluate the glycophenotype of prostate tissues (PCa, HBP and normal). Previous reports have used these lectins to evaluate the glycode of prostate tissues but labeling them with peroxidase [11-13]. Thus a comparison could be established between the present procedure and those contributions. Besides these are biological relevant carbohydrate residues among others [1].

Material and methods

Reagents

N-hydroxyuccinimide-activated dimethyl acridinium ester (DMAE-NHS)/1888-1-53-2/Organic Lab was kindly supplied by Dr. H. H. Westall. Con A, PNA, UEA-I, N,N-dimethylformamide, trypsin from porcine pancreas, methyl- α -D-mannoside, D-galactose, α -L-fucose and Sephadex G-25 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Chemiluminescent detection was performed using Siemens Reagent TSH 500T (Siemens Medical Solutions Diagnostics; Malvern, PA; USA) composed of 0.5% H_2O_2 in 0.1 N HNO_3 and 0.25 M NaOH. Xylene and ethanol were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemical reagents used were of analytical grade.

Samples

Prostate fragments diagnosed as BPH (n=48), PCa (n=50) and normal human prostate (n=5) were obtained through paraffin-embedded

biopsies from Tissue Bank of the Clinic Hospital at the Federal University of Pernambuco, Northeastern Brazil. The service pathologists under Dr. Mariana Montenegro de Melo Lira leadership performed the diagnosis of prostatic neoplasms. Patient's ages for BPH and PCa varied between 47 and 88 years (mean 64) and 58 and 84 years (mean 67), respectively. The Health Science Centre Bioethical Board from Federal University of Pernambuco, Brazil CEP/CCS/UFPE No 185/08, approved this study.

Con A, PNA and UEA-I conjugations with acridinium ester (AE)

AE was conjugated to lectins according to [14]. Briefly, lectins (1 mL containing 2 mg of protein) were incubated with 10 μ L of acridinium ester solution (0.2 mg diluted in 400 μ L of N,N-dimethylformamide) for 1 h at 25°C under rotary stirring. The conjugate (lectin-AE) was applied to a column of Sephadex G-25 (10 $\times$ 1 cm), previously equilibrated with 10 mM phosphate buffer, containing 0.15 M NaCl (PBS) pH 7.2, and eluted with this buffer. Aliquots (1 mL) were collected and their protein content was spectrophotometrically determined at 280 nm. Chemiluminescence of the same aliquots was also assayed with solutions of 0.5% H_2O_2 in 0.1 N HNO_3 (50 μ L) and 0.25 M NaOH (50 μ L) using a luminometer Modulus Single Tube 8200-001 (Turner Biosystems, USA). The emission intensity was determined as relative light units (RLU) with a counting time of 5 seconds per sample. After conjugation, Con A-AE and PNA-AE were evaluated regarding the maintenance of its carbohydrate recognition property (hemagglutinating activity) using glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes and human erythrocytes for UEA-I-AE (Beltrão et al., 1998). Fractions corresponding to protein and chemiluminescence peaks were pooled and protein concentration was measured [14].

Lectin histochemistry

Paraffin section (8 μ m) of samples were cut, transferred to glass slides, deparaffinized in xylene (once 5 min, and three-fold 1 min) and rehydrated in graded alcohols (three-fold 100% and once 70% - 1 min each). Slides were treated with 0.1% (w/v) trypsin solution at 37°C for two minutes. Slides were washed (twice, 5 min each time) with PBS. Afterwards tissue slices

Chemiluminescent detection of prostatic glycophenotype

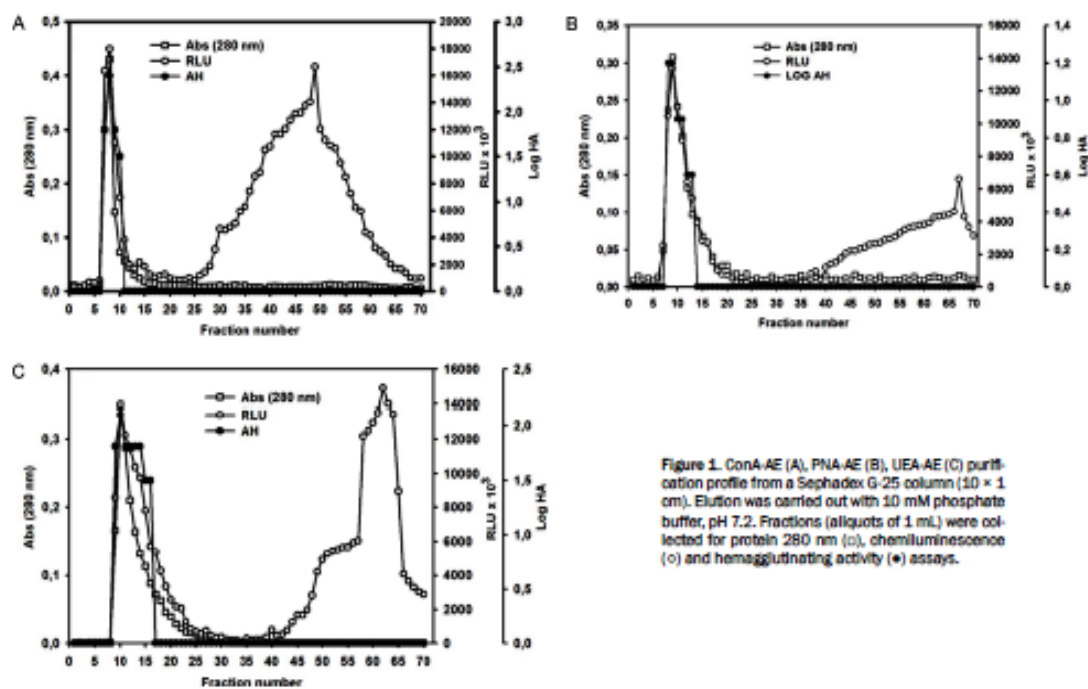


Figure 1. ConA-AE (A), PNA-AE (B), UEA-AE (C) purification profile from a Sephadex G-25 column (10 × 1 cm). Elution was carried out with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2. Fractions (aliquots of 1 mL) were collected for protein 280 nm (○), chemiluminescence (○) and hemagglutinating activity (●) assays.

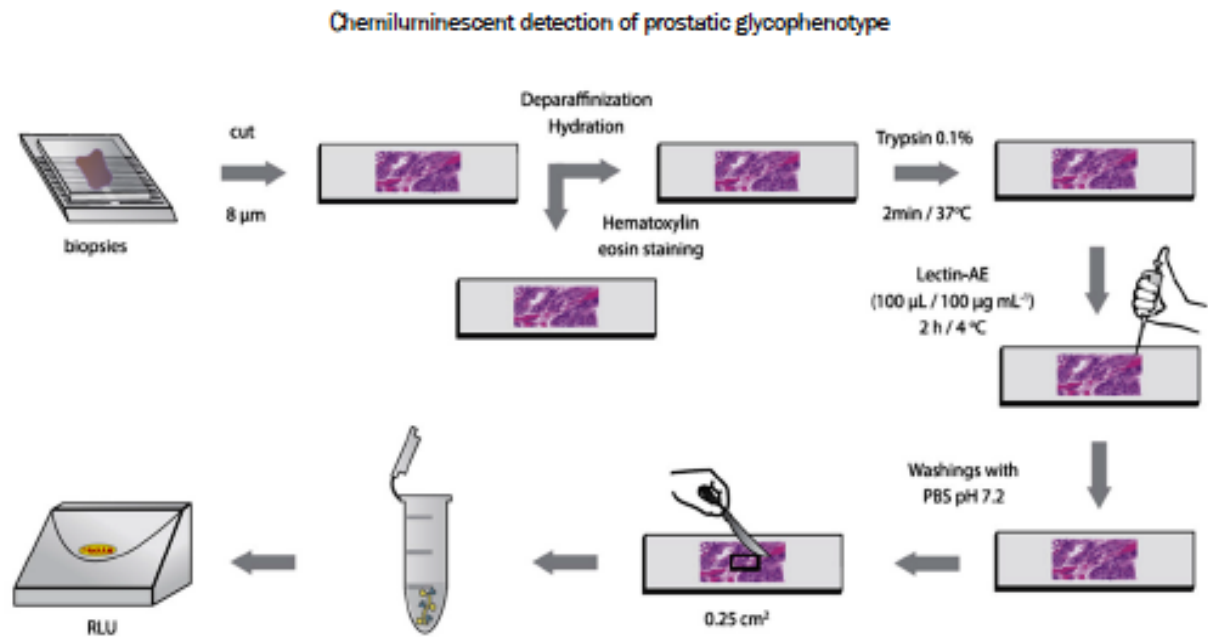


Figure 2. Scheme of the chemiluminescent lectin histochemistry. Paraffin section (8 μm) of biopsies being cut, transferred to glass slide, deparaffinized, rehydrated, treated with trypsin, washed with PBS, incubated with lectins-AE and again washed with PBS. Afterwards the squared-shaped area of tissue section being cut and transferred to a polypropylene test tub and, finally, the chemiluminescence measured and expressed as relative light unit (RLU). A duplicate of the deparaffinized and rehydrated tissue sample was hematoxylin eosin stained for transformed tissue identification.

Chemiluminescent detection of prostatic glycophenotype

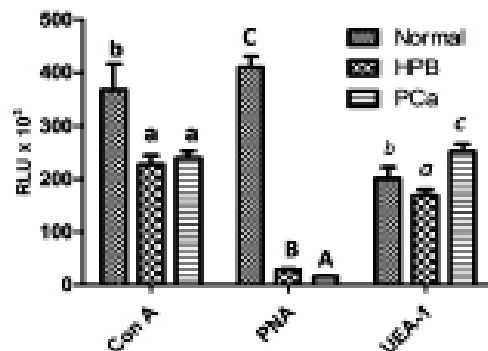


Figure 3. Chemiluminescence in normal prostate tissues (n=5), benign prostatic hyperplasia (n=49) and prostate adenocarcinoma (n=50), using the conjugate ConA-AE, PNA-AE and UEA-AE. Different letters indicate statistically significant. All measurements are mean $\pm$ SD of triplicate.

were incubated with lectins-AE (100 μ L containing 10 μ g of protein) for 2 h at 4°C, followed by washing (three-fold 5 min) with 15 mL of PBS. The area corresponding to tissue section (square-shaped) was defined as 0.25 cm² using a homemade mold. Previous to chemiluminescent assay, slices from the selected paraffin-embedded biopsies were stained with hematoxylin eosin and examined by optic microscopy for localizing the tumor area. Then the tissues were cut with a bistoury, removed from glass slides and transferred to a polypropylene test tub containing 50 μ L of PBS. Finally, RLU from tissue-squared samples were assayed as described above. Triplicate measurements were carried out throughout this study. Lectin binding inhibition assays were accomplished by incubating each lectin solution with 300 mM methyl- α -D-mannoside (Con A), D-galactose (PNA) and α -L-fucose (UEA-I) for 45 min at 25°C prior to their incubation with tissues. The following steps were those described for the binding protocol (after Lectin-AE incubation).

Area versus carbohydrate expression correlation

The profile of carbohydrate expression, revealed by chemiluminescent emission due to specific lectin binding, was also evaluated as a function of tissue area (0.125 to 1.0 cm² using appropriate homemade molds). These different tissue size samples of BPH and PCa were processed similarly as above described (lectin histochem-

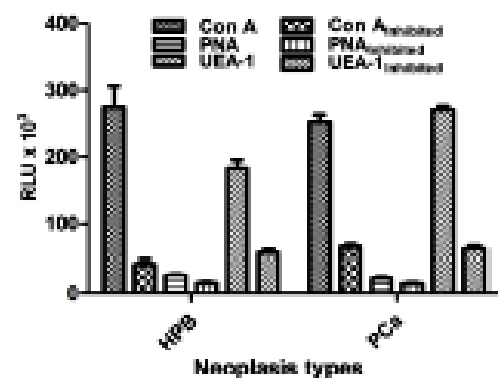


Figure 4. Lectin binding inhibition assay in prostate tissues diagnostic as benign prostatic hyperplasia (n= 5) and prostate adenocarcinoma (n=5). The conjugate ConA-AE, PNA-AE and UEA-AE were inhibited using, respectively, methyl- α -D-mannopyranoside, D-galactose and D-fucose. All measurements are mean $\pm$ SD of triplicate.

istry) using Con A-AE, PNA-AE and UEA I-AE conjugates.

Statistical analysis

The software Origin Pro 8 (Origin Lab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01080 USA) was used for the statistical analysis and data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Obtained data were compared using ANOVA test followed by post-hoc Tukey test for Con A-AE and UEA I-AE results and Kruskal-Wallis followed by post-hoc Conover test for the PNA-AE results ($P < 0.05$).

Results

A typical purification profile of Con A, PNA and UEA-I lectins conjugated to acridinium ester is demonstrated in Figure 1 (A, B and C, respectively). It can be observed that all elution profiles showed absorbance 280 nm (protein) and chemiluminescence peaks around the 10th fraction, indicating that the lectins obtained from these aliquots were conjugated to acridinium ester. The other chemiluminescence peaks without concomitant protein presence corresponded to the free ester. Furthermore, the figure demonstrates that after the process of conjugation and elution all lectin conjugates were still capable to recognize their specific carbohydrates by hemagglutinating activity assay. These results showed that the conjugation did

Chemiluminescent detection of prostatic glycophenotype

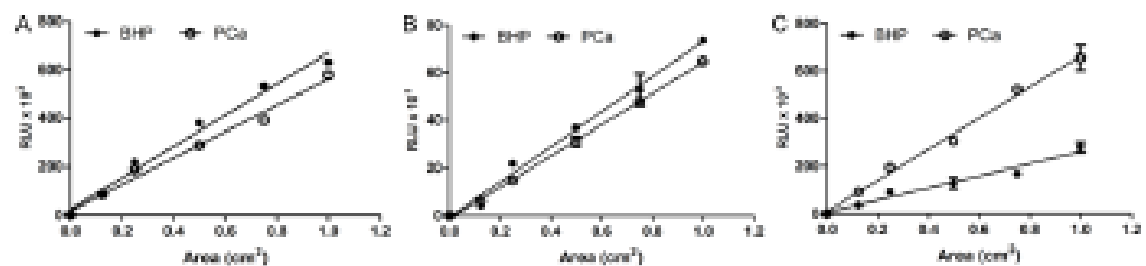


Figure 5. Relationship between RLU and area (0.125 to 1.0 cm²) of prostate tissue diagnosed as benign hyperplasia prostatic and adenocarcinoma prostate by using Con A-AE (A), PNA-AE (B) and UEA-AE (C) conjugates. All measurements are mean $\pm$ SD of triplicate.

not cause lectin structure alterations to interfere their carbohydrate recognition sites.

Figure 2 schematically illustrates this chemiluminescent lectin histochemistry procedure. Con A-AE, PNA-AE and UEA-AE conjugates were used to investigate the glycophenotype in prostatic normal and neoplastic tissues. The finding results are displayed in Figure 3. It was observed a lower expression of α -D-glucose/mannose residues, recognized by Con A-AE, between the BHP ($226,831 \pm 17,438$ RLU) and PCa ($238,520 \pm 12,388$ RLU) tissues and the normal ($387,588 \pm 48,550$ RLU). The transformed prostatic tissues presented an expression of α -D-glucose/mannose significantly lower ($p < 0.05$) when compared to normal prostatic tissues. However the difference between malignant and benign tissues was not statistically significant.

The expression pattern of β -Gal(1-3)-GalNac also decreased in BPH ($28,754 \pm 2,157$ RLU) and PCa ($18,728 \pm 1,204$ RLU) compared to normal tissues ($408,289 \pm 22,338$ RLU). Nevertheless, statistic significant differences were observed among the tissues (BHP and PCa) and between these two conditions and normal tissue.

In relation to α -L-fucose it was observed an increase of the expression in PCa ($251,118 \pm 14,183$ RLU) compared to normal ($200,878 \pm 21,318$ RLU) and BHP ($188,758 \pm 10,284$ RLU) tissues. These differences were statistically significant.

Inhibition assays (Figure 4) was performed using methyl- α -D-mannopyranoside, D-galactose and D-fucose sugars for Con A-EA, PNA-EA and UEA-EA, respectively. It was observed an

expressive decreasing of the RLU values for all inhibited lectins-AE. However, the inhibition of the PNA-AE was relatively lower (from $27,887 \pm 1,849$ to $15,242 \pm 2,738$) in HPB and PCa tissues (from $22,830 \pm 1,118$ to $14,383 \pm 1,881$). These decreases in RLU values suggest that non-specific binding between the lectins-EA and cell surface glycoconjugates played not relevant role.

The relationship between RLU and tissue area showed a linear correlation for all lectins-AE and transformed tissues (Figure 5). These results reveal that the intensity of emitted light is directly proportional to available tissue area as well as to the content of exposed carbohydrate residues.

Discussion

Glycans are involved in several physiological and pathological conditions such as host-pathogen interactions, inflammation, development and malignancy [15]. The cancer is associated with glycoylation alterations in glycoproteins and glycolipids [16]. These changes can affect interactions between tumor cell-surface glycans and endogenous lectins, which may determine the metastatic potential of the tumor cell [17]. Several common structural changes occur in tumor glycans, including increases in the level of truncation and branching of structures as well as an increased expression of unusual terminal sequences [18].

Studies presented evidences suggesting that the glycoylation of proteins was modified in both BPH and prostatic carcinoma [11-13]. However, these reports employed different approaches from this work. Lectins were

Chemiluminescent detection of prostatic glycophenotype

labeled with peroxidase and the stained tissues were arbitrarily quantified by image analysis.

The present study demonstrated that the transformed prostatic tissues presented an expression of α -D-glucose/mannose significantly lower compared to normal prostatic tissues. However the difference between malignant and benign conditions was not statistically significant. These results disagree with those reported by [13], where they noted an increase of α -D-glucose/mannose expression in hyperplastic tissues compared to normal and prostatic adenocarcinoma tissues. Other study, also observed a high expression of glucose/mannose residues in prostatic tissue; however, it was not observed significant differences among the normal, benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma tissues.

The recognition of the pattern of Gal- β (1-3)-GalNac expression obtained by PNA-AE according to this work showed a decreasing in these glycans with the tissue transformation process. The RLU values (Gal- β (1-3)-GalNac expression) presented the following order: normal tissue > BHP > PCa. These results are consistent with those demonstrated by [13], despite the difference of methodologies. However, [11] reported different behavior. They noted that PNA presented a lower staining in normal prostate and benign prostatic hyperplasia, and a stronger staining in prostatic adenocarcinoma. It is worthwhile to call attention to the fact that RLU values for PNA-AE regarding the transformed tissues (BHP and PCa) are the lowest suggesting that Gal- β (1-3)-GalNac expression is dramatically reduced under these conditions. The tissue-lectin-AE complex inhibition by galactose was also not so intense like for the other lectin-AE inhibition studies. The analysis of the transformed prostatic tissues with PNA-AE analysis deserves further studies.

With respect the expression of L-fucose residues identified by UEA-I-AE this work demonstrated the increasing expression in PCa compared to normal tissue. However, this expression decreased in BHP that presented a lower RLU values than PCa and normal tissue. These results corroborate those reported by [11, 12]. The increased expression of L-fucose residues in the malignant condition has also been observed in the carbohydrates fraction of

serum PSA from individuals with prostatic adenocarcinoma [18].

Lectins conjugated to a chromogenic label have been widely adopted as histochemical probes for investigation of glycophenotype from various human normal and malignant tissues [20-24]. The analyses of these stained preparations were either performed through light microscopy by an observer or quantified by several morphometric proposals. Here, chemiluminescent probes (lectins labeled with acridinium ester) provided a simple, specific and efficient tool in the quantitative determination of the tissue glycode as previously reported by [3, 4] for human breast tissue. This procedure is the first report for prostatic transformed tissues.

Here, as reported in these previous works from our lab, it was observed relationship between the light emitted by the chemiluminescent reaction (RLU) and the tissue area. The nature (linear, hyperbolic and other parameters) of this relationship difference allows to study the kinetics between lectins and tissues. Therefore, the quantitative advantage of the use of chemiluminescence to establish the glycophenotype of tissue may add other data to the analysis such as maximum carbohydrate per tissue area and association/dissociation constants.

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

Acknowledgements

Authors thank to FACEPE, CAPES and CNPq (Brazilian Agencies) for financial support as well as Dr. Ian P. G. Amaral for the statistical analy-

Chemiluminescent detection of prostatic glycophenotype

sia. The technical assistance of Mr. Otaviano Tavares Costa is also thanked.

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Kelzo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, CDU, Recife, Pernambuco, Brasil. Tel: +55(81)21268484; Fax: +55(81)21268485; E-mail: lbj@hotlink.com.br

References

- [1] Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB. A glyco-biology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem* 2011; 113: 236-247.
- [2] Velja RKA, Melo-Júnior MR, Araújo-Filho JLS, Lins CAB, Teles N. Avaliação digital comparativa da expressão tecidual da proteína CerbB-2 em mulheres portadoras de doenças tumorais da mama. *J Bras Patol Med Lab* 2009; 45: 131-37.
- [3] Campos LM, Cavalcanti CL, Lima-Filho JL, Beltrão EIC. Acridinium Ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers* 2006; 11: 480-484.
- [4] Brustein VP, Cavalcanti CL, Melo-Júnior MR, Correia MT, Beltrão EIC, Carvalho LB Jr. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. *Appl Biochem Biotechnol* 2011; 166: 268-275.
- [5] Melo Rêgo MJB, Cordeiro MF, Cavalcanti CL, Carvalho LB Jr, Beltrão EIC. Immunohistochemiluminescence detection: A quantitative tool in breast cancer HER-2 status evaluation. *Dis Markers* 2013; 34: 373-377.
- [6] Lima LR, Bezerra MF, Almeida SM, Silva LP, Beltrão EI, Carvalho LB Jr. Glycophenotype Evaluation in Cutaneous Tumors Using Lectins Labeled with Acridinium Ester. *Dis Markers* 2013; 35: 149-154.
- [7] Kricka LJ. Clinical applications of chemiluminescence. *Anal Chim Acta* 2003; 500: 279-286.
- [8] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
- [9] Pal RJ, Maitra NU, Mellon JK, Khan MA. Defining prostate cancer risk before prostate biopsy. *Urol Oncol* 2013; 31: 1408-1418.
- [10] Angelucci A, Pace G, Sanità P, Vicentini C, Bologna M. Tissue print of prostate biopsy: a novel tool in the diagnostic procedure of prostate cancer. *Diagn Pathol* 2011; 6: 34.
- [11] Arenas MI, Rome E, de Gaspar I, de Bethencourt FR, Sánchez-Chapado M, Fraile B, Paniagua R. A lectin histochemistry comparative study in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma. *Gli-cocon J* 1999; 16: 375-382.
- [12] Khabaz MN, McClure J, McClure S, Stoddart RW. Glycophenotype of prostatic carcinomas. *Folia Histochem Cytobiol* 2010; 48: 637-645.
- [13] Lima ALR, Cavalcanti CCB, Silva MCC, Paiva PMG, Coelho LCBB, Beltrão EIC, Correia MTS. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 1-6.
- [14] Weeks J, Sturgess M, Brown RC, Woodhead JS. Immunoassay using acridinium esters. *Methods Enzymol* 1986; 133: 366-387.
- [15] Lowry OH, Nira J, Rosebrough A, Farr L, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- [16] Kim EH, Mirek DE. Glycoproteomics-Based Identification of Cancer Biomarkers. *Int J Proteomics* 2011; 2011: 1-10.
- [17] Reis CA, Osorio H, Gomes C, David L. Alterations in glycosylations as biomarkers for cancer detection. *J Clin Pathol* 2011; 63: 322-329.
- [18] Nangle-Makker P, Conklin J, Raz A. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *Tren Mol Med* 2002; 8: 187-192.
- [19] Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908>.
- [20] Dwek MV, Jenks A, Leatham AJ. A sensitive assay to measure biomarker glycosylation demonstrates increased fucosylation of prostate specific antigen (PSA) in patients with prostate cancer compared with benign prostatic hyperplasia. *Clinica Chimica Acta* 2010; 411: 1935-1939.
- [21] Beltrão EIC, Correia MT, Figueiredo-Silva J, Coelho LC. Binding evaluation of isoform *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Appl Biochem Biotechnol* 1998; 74: 125-134.
- [22] Beltrão EIC, Medeiros PL, Rodrigues OG, Figueiredo-Silva J, Valença MM, Coelho LC, Carvalho LB Jr. *Parika pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. *Eur J Histochem* 2003; 47: 139-142.
- [23] Melo-Junior MR, Araújo-Filho JLS, Patu VIRM, Machado MCFP, Beltrão EIC, Carvalho LBC Jr. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumor differ-

Chemiluminescent detection of prostatic glycophenotype

- ential diagnosis. *J Bras Patol Med Lab* 2006; 42: 455-460.
- [24] Melo-Junior MR, Cavalcanti CLB, Pontes-Filho N, Carvalho LB Jr, Beltrão EC. Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to *Helicobacter pylori*. *Brazilian J Microbiol* 2008; 39: 238-240.
- [25] Sobral AP, Rego MJ, Cavalcanti CL, Carvalho LB Jr, Beltrão EI. Con A and UEA-I lectin histochemical of parotid gland mucosquamous carcinomas. *J Oral Sci* 2010; 52: 49-54.

CAPÍTULO 2

Artigo será submetido a publicação no periódico Glycobiology.

Fator de Impacto: 3,283

Qualis Capes: A2

**ESTROGEN UP-REGULATED ST6GalNAc I EXPRESSION IN PC-3
PROSTATE CANCER CELLS AND MODIFIESTHEIR O-
GLYCOSILATION PATTERN AND ENHANCES THEIR MIGRATION
CAPACITY**

Lúcia Patrícia Bezerra Gomes da Silva¹, Sinara Mônica Vitalino de Almeida^{1,3},
Amanda Pinheiro de Barros Albuquerque¹, Igor Teixeira Cavalcanti¹, Luiza
Rayanna Amorim de Lima¹, Gabriela Ayres Fragoso Nascimento¹, Eduardo Isidoro
Carneiro Beltrão^{1,2}, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior^{1,2*}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50030 Recife, Pernambuco, Brasil.

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50030 Recife, Pernambuco, Brasil.

³Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), Universidade de Pernambuco (UPE), Garanhuns 55290-000, PE, Brasil

Corresponding author. Fone: +55 81 21268484 Fax: +55 81 21268485. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife 50030, Pernambuco, Brasil. E-mail address: lbcj@hotmail.com.br (Luiz B. de Carvalho Junior).

Little title: Estrogen up-regulated ST6GalNAc I expression in PC-3 prostate cancer cells

Keywords

Estrogen; Prostate cancer; ST6GALNAc

Abstract

Aiming to investigate if estrogen regulates glycosylation we used DU-145 and PC-3 cells both originated from Prostate cancer refractory-androgen. In DU-145 and PC-3 cells treated with estradiol and fulvestrant were observed that estradiol regulates sialyltransferase ST6GalNAc I expression in PC-3 cells and the action of the antagonist fulvestrant inhibits this regulation. This behavior was not observed in DU-145 cells. The estrogen receptor ER α had decreased expression in PC-3 cells treated with fulvestrant but no detectable differences were seen in estrogen receptor β expression in both cell lines. Through lectin blotting using the VVA (*Vicia villosa* agglutinin) and SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) lectins were identified sialylation Tn antigen (sTn) in PC-3 cells treated with estradiol as well as the Tn antigen expression in DU-145 under the same conditions of treatment.

Migration capacity of the PC-3 cells treated with estradiol, fulvestrant and SNA was measured by wound-healing assay (n=2). We observed that estradiol induced cell migration while fulvestrant (ICI) and SNA reduced migration capacity into the wounds. Therefore, we may suggest that estrogen can act up-regulating the expression of sialyltransferase ST6GalNAc and the synthesis of the sTn antigen important for tumor progression.

Keywords: Estrogen; Prostate cancer; ST6GALNAc

1- Introduction

Prostate cancer (PC) is the most commonly diagnosed cancer and the second leading cause of cancer death among men in the United States (Siegel *et al.*, 2014). Prostate cancer is diseases with heterogenous behavior that can remain indolent for many years or rapidly present a progression, but, still lacks biomarkers capable of distinguishing between indolent the disease and aggressive disease, the latter with rapidly progression to metastatic disease, which is often lethal (Klotz and Emberton, 2014).

Prostatectomy radical is the treatment strategy to indolent prostate cancer, but is not an interesting option of treatment due some side effects of incontinence and erectile dysfunction. Patients with locally advanced prostate cancer, metastatic prostate cancer, and recurrent disease are treated with androgen-deprivation therapy (ADT) with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogs and anti-androgens (antagonist of androgen receptor local). This therapeutic approach is an effective first-line treatment of prostate cancer, which is often initially effective. However, recurrences of castration-resistant forms of the disease within 2–3 years can subsequently occur, despite continuous hormonal manipulation (Karantanos *et al.*, 2013).

Estrogens, particularly diethylstilbestrol (DES), have been used to treat prostate cancer. Prostate cancer growth prevention has been achieved by using estrogen thought of the action on hypothalamic release of luteinizing hormone-releasing hormone (LRH) that leads low serum androgen concentrations and castration-like effects. Thus, indirectly estrogens are effective against androgen-dependent prostate cancer (Burns-cox *et al.*, 2002).

Paradoxically estrogens might also be involved in the initial development of prostate cancer (Singh *et al.*, 2008), and prostate cancer cell proliferation is directly

regulated by estrogens (Bosland, 2005; Ho, 2004). Studies have suggested that antiestrogens effectively inhibit the development and progression of experimental and clinical prostate cancer (Steiner and Raghov, 2003; Nakajima *et al.*, 2011; Yuet-Kin *et al.*, 2014).

In cells and tissues under hormones tightly regulate these processes and consequently two key enzyme families can play important role: fucosyltransferases and sialyltransferases (Medvedopa *et al.*, 2003). Glycosylation can alter protein function and has a key role in many important biological processes in cancer including cell adhesion, migration, interactions with the cell matrix, immune surveillance, cell signaling and cellular metabolism (Munkley and Elliott, 2016).

The prostate produces many glycoproteins highly O-glycosylated called mucins, either secreted or surface-associated. Besides that, study assessing the gene expression of human prostate cancers shown that mucins 1 (MUC1) is upregulated in subgroups with feature clinicopathological aggressive and increased risk of recurrence (Lapointe *et al.*, 2004).

The O-glycosylation of protein is an abundant and diverse form of post-translacional modification that is initiated by a family of enzyme called polypeptide N-acetilgalactosaminyltransferase (GalNAc-transferases) that catalyze the transfer of GalNAc from UDP- GalNAc to serine and threonine residues (Clausen and Bennett, 1996).

The formation of the sTn antigen can be mediated by expression of the ST6GalNAc1, an enzyme that catalyzes the transfer of a sialic acid molecule in an α -2-6 linkage onto the Tn antigen, resulting in Sia α 2-6-GalNAc1-O-serine/threonine, mutations and loss of heterozygosity of the COSMC gene, that codes a COSMC chaperone protein, used for the correct folding and activity da core 1 beta-3-

galactosyltransferase (C1GALT1) enzyme responsible to catalyzes the common first elongation step of the Tn antigen to produce the core 1 O-glycan structure (T antigen). (Sewell *et al.*, 2006; Ju *et al.*, 2008).

The expression of truncated O-glycans in cancer is perhaps the outcome from several different mechanisms such as glycosyltransferases altered expression, localization or the relocation of o- glycosylation from Golgi apparatus to endoplasmic reticulum stimulates cell migration and invasiveness (Gill *et al.*, 2013).

In prostate cancer, the sTn antigen is detected in high grade prostate carcinomas and the level of sTn-MUC1 have been correlated with worse survival outcomes and higher serum PSA levels in prostate cancer patients (Arai *et al.*, 2005).

In this study, we have addressed the effects of estradiol on the expression of the sialyltransferase ST6GalNAc I enzyme (EC 2.4.99.3 - CMP-Neu5Ac:GalNAc α 2, 6-sialyltransferase: CMP-Neu5Ac: R-GalNAc α 1-O-Ser/Thr α 2, 6-sialyltransferase) in the androgen refractory cell line of prostate cancer (DU-145 e PC-3).

2- Results

A – Cell Viability – PC-3 cells

PC-3 cells treated with E2 at concentrations varying from 10^{-6} to 10^{-11} M during 24, 48, 72, 96h demonstrated different cell viability when considered the factors: time of the exposition in same concentration and differences between concentrations of the E2 (Figure 01), in which statistical differences significant are described in Table 1.

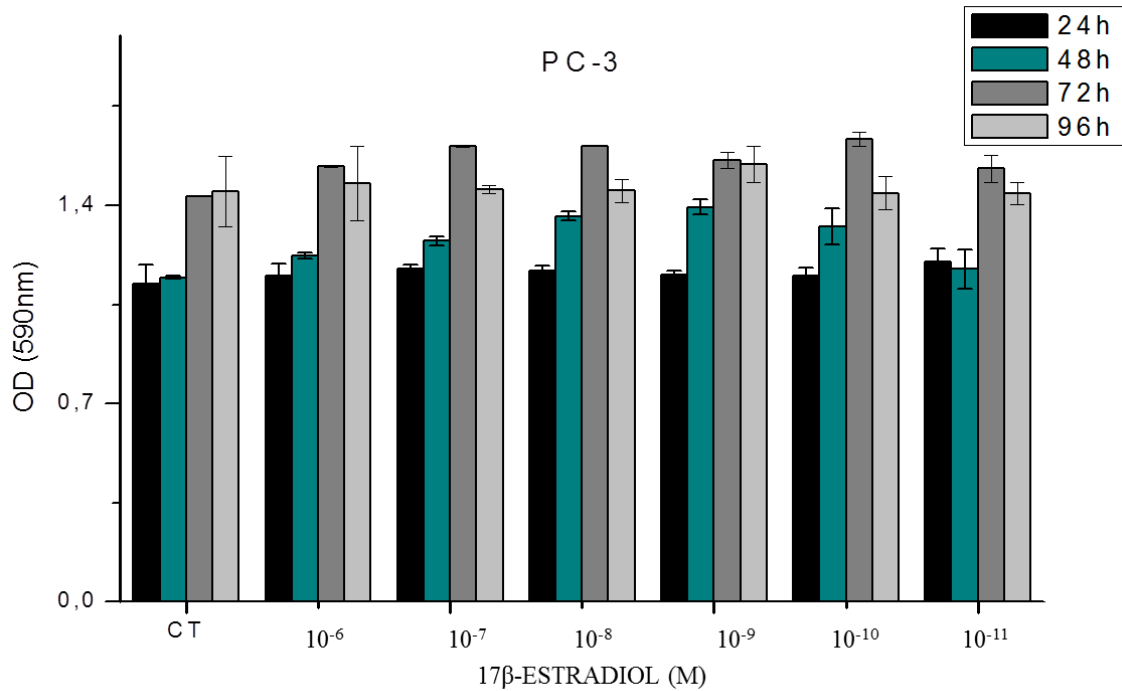


Figure 01: Cell viability measured by the MTT assay after 4 days of E₂ treatment. PC-3 cells were submitted to treatment with E₂ (10⁻⁶-10⁻¹¹) by 24, 48, 72, 96h and was observed different cell viability in relation time and concentration of the E₂. Experiment performed in duplicate.

B – Cell Viability – DU-145cells

DU-145 cells treated with E₂ in concentration range varying (10⁻⁶-10⁻¹¹) for 24, 48, 72 and 96h. Were observed differences dependent-time proliferation, but no change in cell viability when evaluating different concentration of the E₂ (Figure 02).

significant statistical differences are described in Table II.

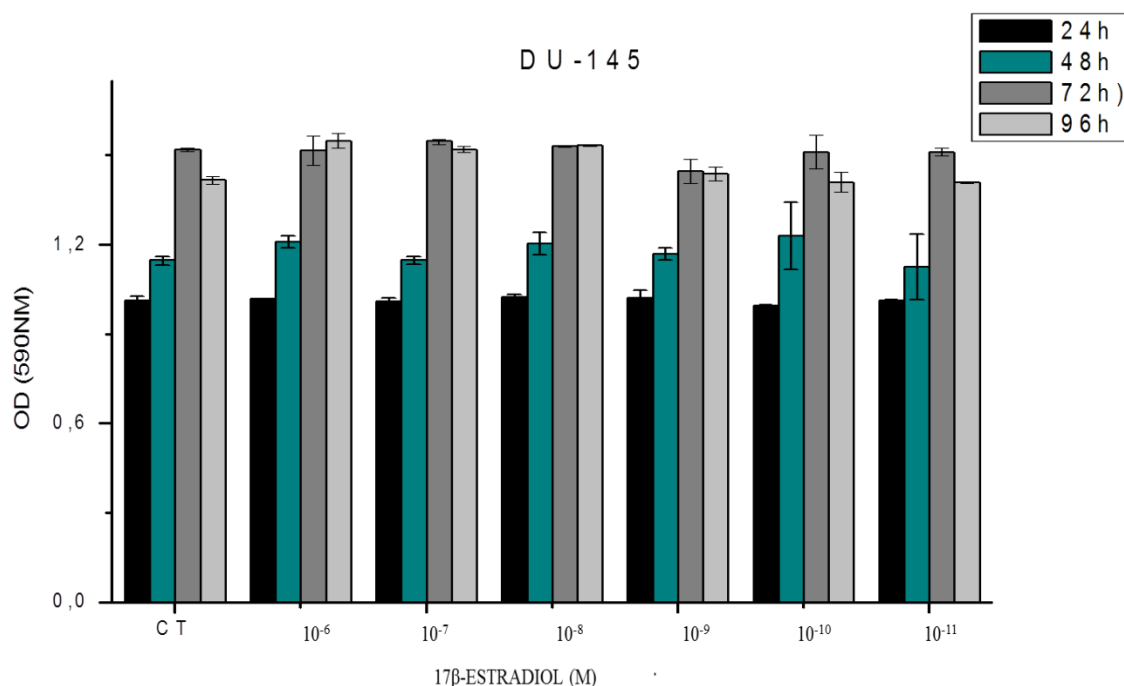


Figure 02: Cell viability through MTT assay. DU-145 prostate cancer cells were submitted to treatment with E2 (10⁻⁶-10⁻¹¹) in time 24, 48, 72, 96h and presented different viability only in relation the factor time. Experiment performed in duplicate.

C- 17β-estradiol modulates the expression of protein ST6GalNac I and ERα in PC-3 cell line.

To analyze the modulation of the ST6GalNac I enzyme by estrogen and estrogen receptor expression in PC-3 cells, were used the western blotting assay. We observed up-expression of the ST6GalNac I enzyme in PC-3 cell when treated with estradiol and down-regulation when treated with estrogen plus antagonist fulvestrant at time 24 and 48 h. Similar behavior was observed in relation to estrogen receptor α, however, there was no change in estrogen receptor β expression (Figure 03).

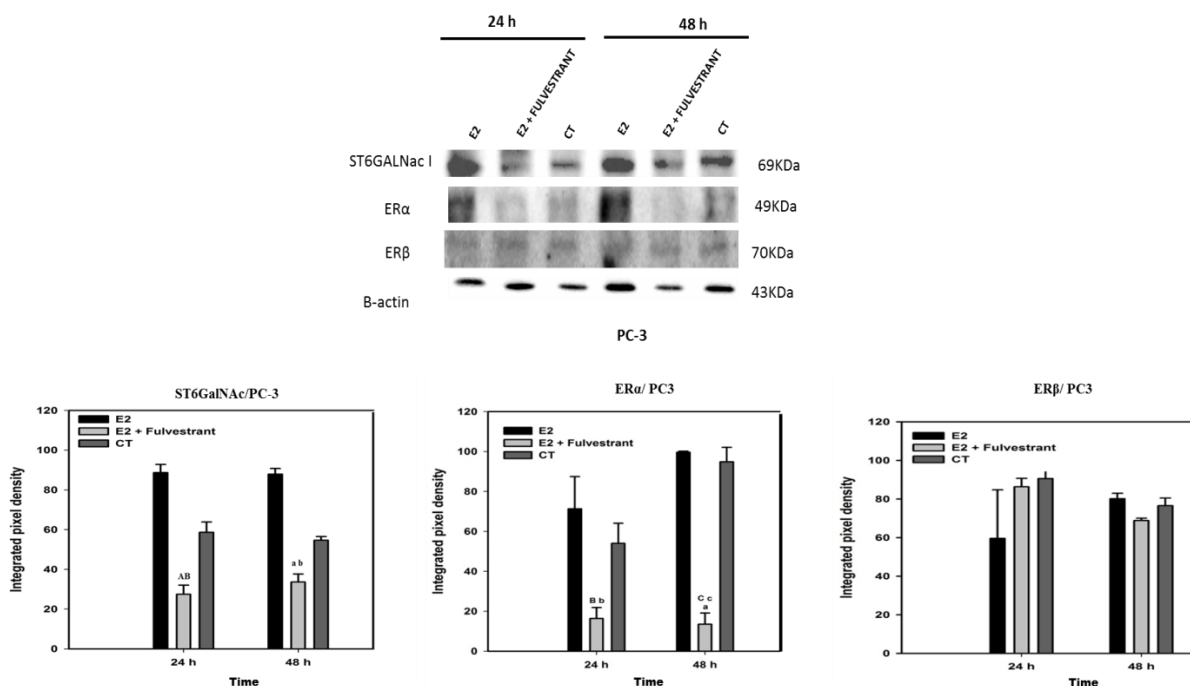


Figure 03: Analyze of the expression of the ST6GalNac enzyme and estrogen receptor in PC-3 cells treated with estradiol and estradiol plus fulvestrant. In PC-3 cells, increase the expression the ST6GalNacI was significant statistically when treated with E2 and decreased when treated to E2 + fulvestrant at time 24 and 48h. The expression the ER- α was down-regulated when treated with E2 + fulvestrant at time 24 and 48h while that ER β no significant difference observed in same conditions and time ($p < 0.05$). Experiment performed in duplicate.

D- Expression of enzyme ST6GalNac I in DU-145 cell line.

DU-145 cells submitted to hormonal treatment did not demonstrate significant difference in the expression of ST6GalNac and estrogen receptor β (Figure 04).

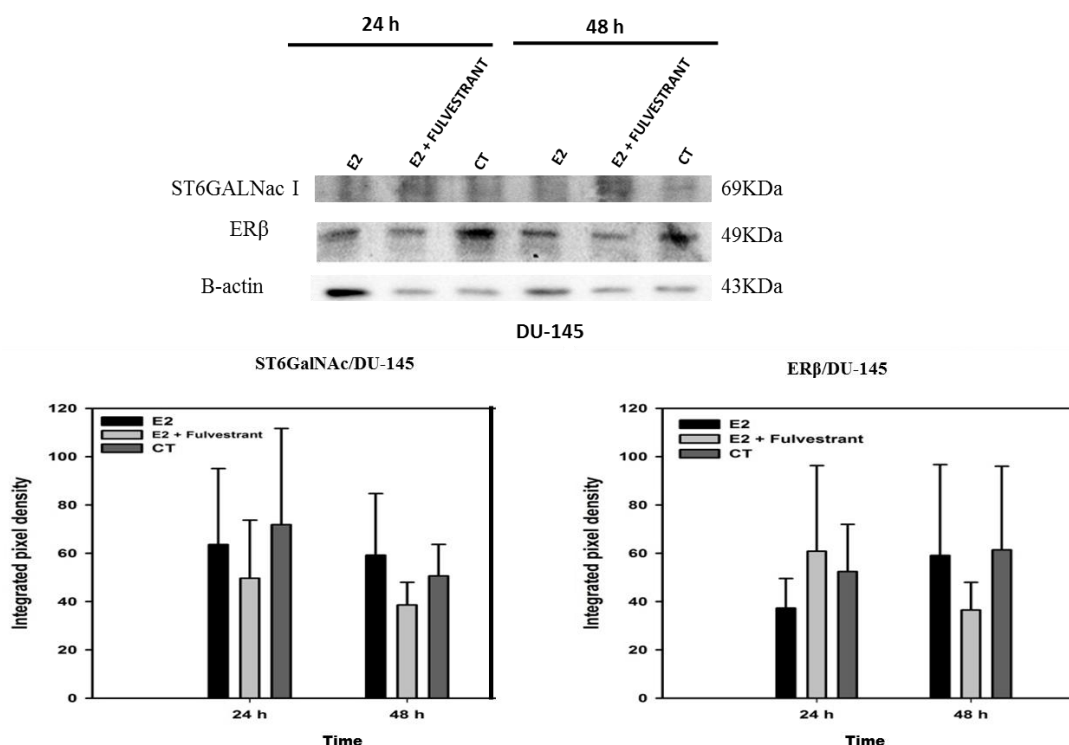


Figure 04: Expression of the ST6GalNac I and ER-β in DU-145 cell no demonstrated statistically significant differences ($p < 0.5$) between treatment. Experiment performed in duplicate.

E- Estradiol induced increased the sialylation of GalNac residues

Given the strong induction of ST6GalNac in response to estrogen exposure in PC-3 cells, we evaluated if the STn antigen was being expressed using SNA specific to Sia $\alpha 2-6$ Gal/GalNac. As observed in figure 05A, in 24 and 48 h, estradiol 10^{-6} M induces up-regulation of sTn antigens while that estradiol 10^{-6} M plus antagonist fulvestrant (10×10^{-6} M) inhibits the expression. To confirm that estradiol induced sialylation of GalNac residues was evaluated using VVA that recognize Tn antigen (GalNac-O linkage) and observe decreased of expression of the Tn antigen (Figure 05 B). DU-145 cells showed the opposite behavior, a higher number of Tn antigens was

recognized by VVA in relation to the number of sTn antigen identified by SNA. (Figure 05 C and D).

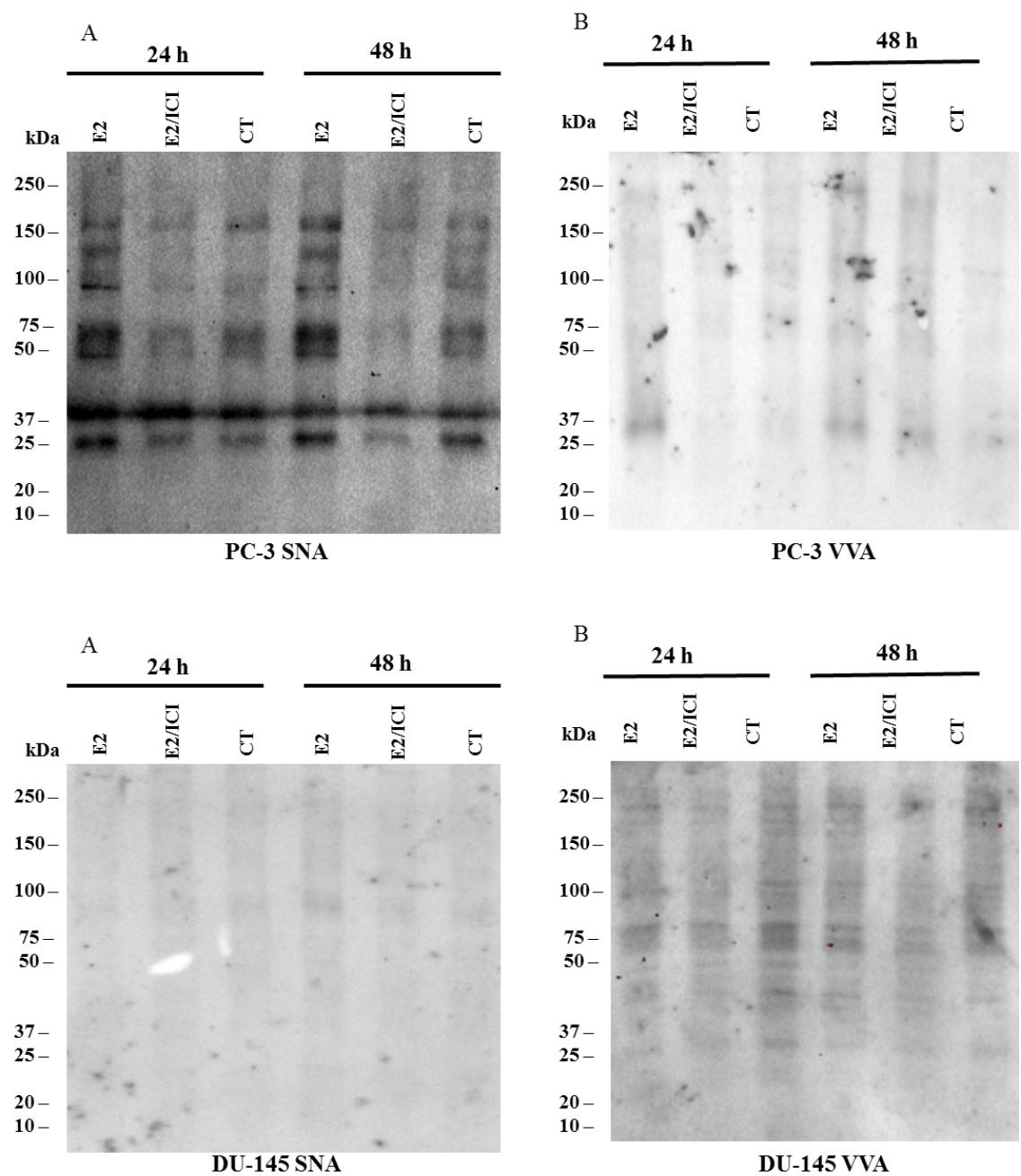


Figure 05: Expression profile of the ligands (Tn and sTn antigens) recognize to SNA and VVA in PC-3 and DU-145 cells treated with estradiol 10^{-6} M and estradiol (10^{-6} M) plus antagonist fulvestrant (10×10^{-6} M) during 24 and 48 horas. Experiment performed in duplicate.

F- Effects of estradiol, fulvestrant and SNA lectin on migration capabilities PC-3 cell.

The migration assay (wound closure) was performed on PC-3 cells treated with estradiol (10^{-6} M), estradiol (10^{-6} M) plus fulvestrant and estradiol (10^{-6} M) plus SNA. Was observed that fulvestrant and SNA reduced the migration capacity into the wounds in PC-3 cell line, 15 and 23%, respectively, whereas PC-3 cell treated whit estradiol were able to fill 47% the wound after 24h (Figure 06).

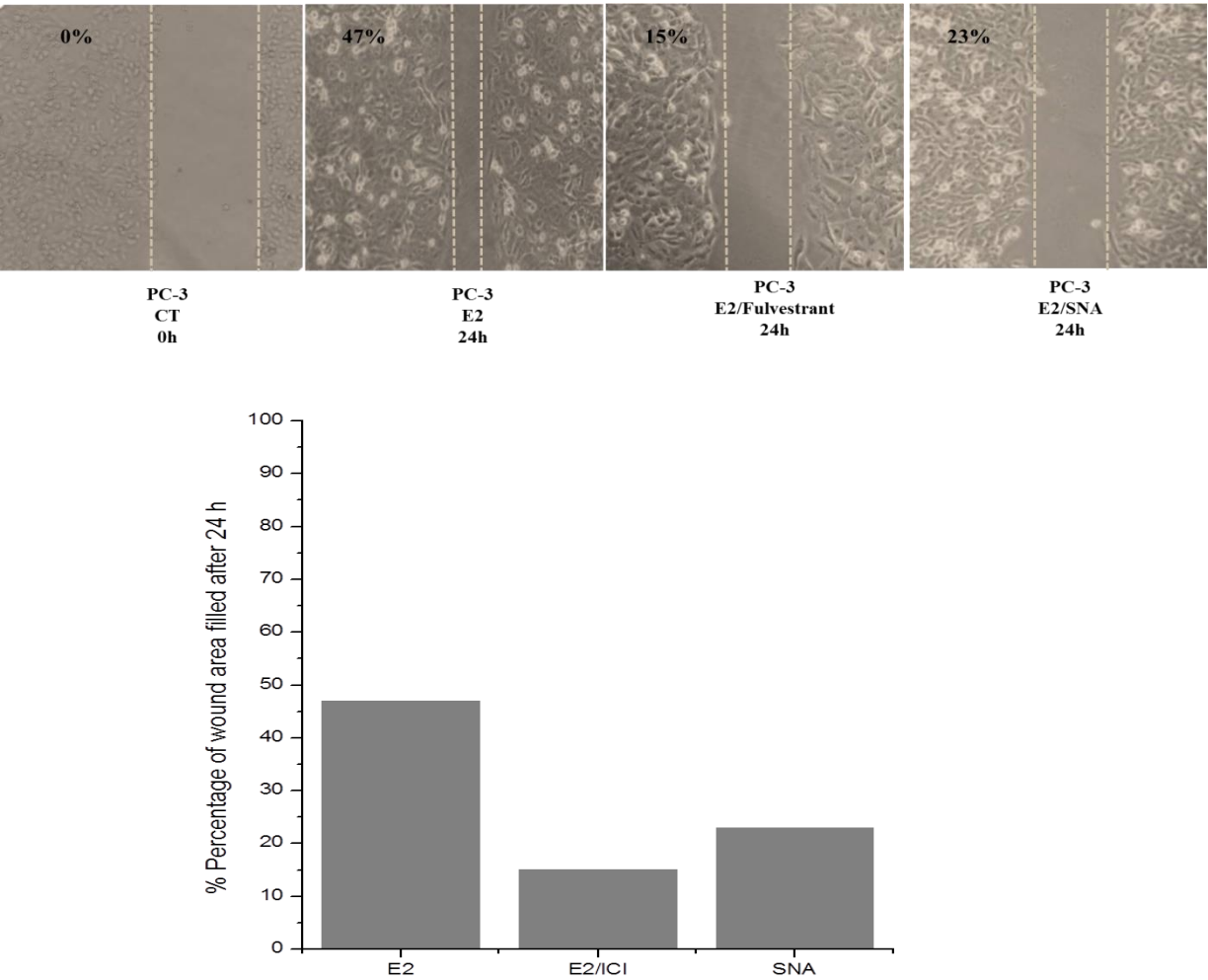


Figure 06: Migration capacity of the PC-3 cells treated with E2 (10^{-6}), E2 (10^{-6}) plus antagonist fulvestrant (10×10^{-6} M) and E2 (10^{-6}) plus SNA were measured by wound-

healing assay (n=2). We observed that estradiol induced cell migration while fulvestrant and SNA lectin reduced migration capacity into the wounds. Representative image of the cell cultures with scratches at 24 h are shown. The wound is marked by dotted lines. Percentages of filled wound area are presented.

3- Discussion

Similar expression to another genes, the genes encoding glycosyltransferase is regulated by both transcription factors and epigenetic mechanisms resulting in a specific set of glycosyltransferases, expressed in tissue or cell, that determine specific types of glycans structures on glycoproteins secreted and membrane bound (Vojta *et al.*, 2016). In cancer cells, the expressions of glycosyltransferases are often misregulated resulting in aberrant glycosylation that directly impact cell growth, cell survival, facilitates tumor-induced immunomodulation and eventual metastasis (Stowell *et al.*, 2015).

The enzyme ST6GalNAC I catalyzes the synthesis of the cancer-associated sialyl –Tn antigens (sTn) which is up-regulated in same cancer types (gastric, breast and prostate) and directly induces oncogenic features of growth, metastasis and poor prognosis in breast and gastric cancer (Radhakrishnan *et al.*, 2014; Marcos *et al.*, 2014; Sewell R *et al.*, 2006; Julien *et al.*, 2006; Ozaki *et al.*, 2012; Munkley *et al.*, 2015).

Here, we have investigated the effect of estradiol in regulation of sialyltransferase ST6GalNac I expression and resultant expression pattern in PC-3 and DU-145 cells. Our results show a decreased ST6GalNac I enzyme expression in PC-3 cell when treated with E2 plus fulvestrant and opposite behavior when exposed to estradiol agonist only. However, DU-145 cells showed no change in ST6GalNac I expression when treated under the same conditions.

The biological role of estrogen is mediated through two different genomic signaling pathways, the direct binding of the estrogen receptor–estrogen complex in the promoter region of the target gene or through transcription factors as, SPI, AP1 and NFκ-β (Bjornstrom & Sjoberg, 2005).

Estrogen is important for the synthesis of glycoproteins through regulation of the glycosyltransferases including galactosyltransferases (Choi *et al.*, 2012) and sialyltransferases (Peyrat *et al.*, 2000). Here, bioinformatics analyses of the ER binding region in enzyme ST6GALNAC (ID – 55808) were performed based on NCBI database, were found two half estrogen response element (ERE) and binding site NFκ-β.

The effect of estradiol on prostate cell lines appears to be dependent on the type expressed estrogen receptors. In prostatic cell the 17β- estradiol stimulates proliferation in the presence of ERα, but inhibits proliferation when forms heterodimers with ERβ-1, being a regulator of estrogenic signaling (Pravenotti *et al.*, 2005).

However, in prostate tissue there is expression of ERβ -2, ERβ -4 and ERβ -5 isoforms, which form heterodimers with ERα and ERβ -1 and may modulate the biological activity of these receptors, interfering in binding affinity to linker, the DNA binding capacity, in the recruitment of transcription coactivators and co-repressors (Fujimura, *et al.*, 2001).

PC-3 cell expressed both estrogen receptors ERα and ERβ, while DU-145 expressed exclusively ERβ. We observed reduced expression of the ERα in PC-3 when treated to ICI-E2 compared to groups controls and estradiol. Thus, we suggest that in PC-3 cell, homodimers to ERα or heterodimers of the ERα with ERβ isoforms act as transcriptional factors up-regulating the expression ST6GalNAc enzyme.

Fulvestrant, a pure estrogen receptor antagonist with no known agonistic action, that acts binds, blocks, and degradation of the ER, resulting in inhibition of estrogen signaling (Curran & Wiseman, 2001). Therefore, down-expression of the ER α in presence of the inhibitor fulvestrant is resultant either of the degradation of receptor or down-regulation of the genic expression.

In DU-145 was not observed altered expression of ER β when exposed to fulvestrant. This behavior is justified by the fact that fulvestrant can act activating estrogen receptor β and promoting transcription of gene anti-tumoral, without promoting degradation of the receptor (Yuet-Kin *et al.*, 2014).

The increase in sTn antigen corroborate with the increased expression of ST6GalNAc I regulated by estradiol in PC-3 cells, identified by the SNA lectin, that is commonly used to recognize the transfer of sialic acid onto the terminal galactose containing N- glycans substrate (Sia α 2-6Gal), but it also recognizes terminal N-acetylgalactosamine residues in O- glycans (Sia α 2-6GalNAc) (Silva *et al.*, 2014).

The migration assay revealed that estradiol up-regulated ST6GalNAc I, resulting in the higher expression of the PC-3 cell migration capability when compared to cells treated with fulvestrant antagonist or SNA lectin. observed that prostate cancer cells expressing ST6GalNAc1 and sTn antigen have decreased expression of the epithelial cell-cell adhesion molecule E-cadherin and increased expression of migration-associated N-cadherin and vimentin proteins (Munkley *et al.*, 2015).

Thus, a larger understanding of how estrogen regulates glycosylation and the role of these glycans in refractory-androgen prostate cancer enable a new approach to this disease using estrogen antagonist or glycans inhibitors.

4- Material and Methods

PC-3 (ER α +/ER β +) cells were a generous gift from Dr. João Ernesto de Carvalho (University São Paulo, Campinas, Brazil), whereas DU-145 (ER α -/ER β +) cells were from the Banco de Células do Rio de Janeiro (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil). Fulvestrant (ICI 182,780) and 17 β -estradiol were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

RPMI-1640 medium, fetal bovine serum (FBS), charcoal-stripped fetal bovine serum, penicillin/streptomycin and trypsin were purchased from Gibco (Life Technologies, Bethesda, USA). Antibody anti human-ER α , ER β , ST6GALNac and β -actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); *Sambucus Nigra agglutinin* (SNA) lectin from Sigma Chemical, Co (ST Louis, USA) and *Vicia Villosa agglutinin* (VVA) lectin from Vector (CA, USA).

Cell Culture and hormonal treatment condition

PC-3 and DU-145 cells were routinely maintained in RPMI medium supplemented with 5% and 10% FBS, respectively, and grown at 37° C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

For the hormonal treatment PC3 and DU-145 cells were cultured (T-75 flasks; 37°C in humidified atmosphere of 5% CO₂) in RPMI-1640 (phenol red absent) supplemented, respectively, with 5% and 10% charcoal-stripped FBS, and 1% penicillin/streptomycin. The next day both cells lines were treated with either 10⁻⁶ M E2 or 10⁻⁶ M E2 plus 10x10⁻⁶ M ICI, prepared in 0.1% ethanol for 24, 48 h. Stock solutions of 10⁻³ M E2 and 10⁻³ M ICI were prepared in 100% ethanol. The controls were performed by cultivating PC-3 and DU-145 cells in the absence of E2 and ICI.

Cell Viability Assay - MTT

PC-3 and DU-145 in RPMI-1640 containing phenol red (100µl containing 0.2 cells) were incubated overnight in wells (96-well plate) and afterwards the media were changed by 100 µl of the following mixture prepared in RPMI-1640 without phenol red: 5% (PC-3) or 10% (DU-145) charcoal-stripped FBS and E2 at concentrations varying from 10^{-6} to 10^{-11} M. The controls were carried out by cultivating PC-3 and DU-145 cells in the absence of E2. After 24, 48, 72 and 96 h 10 µl of MTT (3, [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/ml; Sigma Aldrich (St. Louis, USA) were added to each well including controls and the plates were incubated for 4 h at 37°C. Then 80 µl of the lysis buffer (20% sodium dodecyl sulfate [SDS] in N, N-dimethylformamide) was added to each well and incubated overnight. Cell viability was evaluated by measuring the mitochondrial-dependent conversion of the yellow tetrazolium salt MTT to purple formazan crystals by metabolic active cells. The optical density (proportional to the number of live cells) was assessed at 590 nm in a microtiter plate reader (Biochrom Anthos MultiRead 400), Isogen Life science (PW De Meern, The Netherlands).

Western Blot Analysis

Total protein was extracted from the cells treated with 10^{-6} M E2; 10^{-6} M E2 plus 10×10^{-6} M ICI and ethanol (control) using NP40 Cell lysis buffer (Invitrogen, CA, USA) according to the Manufacturer's instructions and stored at -20°C until assay. The protein concentrations were determined according the Lowry method. Aliquots (60 µg protein) were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using transfer Semidry Bio-Rad (both from Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After blocking the membrane with 3% non-fat dry milk for 2 h at 25°C, under gentle agitation, incubation was followed with primary antibodies anti-goat

against estrogen receptor β (ER β 1:250), ST6GALNac (1:250) and anti-mouse estrogen receptor α (ER α 1:250), β -actin (1:1000) at 4°C overnight. Each membrane was washed three times with TBS-T (50mmol/L Tris-HCL, 150mmol/L NaCl, 0,1%, v/v, Tween-20, pH 7.4). Afterwards, the membrane was incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (1:1000 dilution) for 2 h at 25°C. After washing three times with TBST the protein bands were revealed using Western ECL substrate in chemiDoc Imaging System (both from Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Lectin blotting

The PVDF membranes containing the transferred proteins were obtained as described in western blotting analysis. After blocking then with 3% BSA (Bovine serum albumin) for 2 h at 25°C, under gentle agitation, they were incubated with biotinylated SNA and VVA lectin solution (20 μ g/mL), under agitation at 4°C overnight. The membranes were washed three times with TBST and glycosylation protein profile were revealed using Western ECL substrate in chemiDoc Imaging System (both from Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Wound closure Assay

PC-3 cells (1×10^5) were seeded in 6-well culture plates. After the cells reached 70-80% confluence, a line was scratched in the middle of the well using a pipette tip to create a wound. PC-3 cells were then treated with 10^{-6} M E2 and 10^{-6} M E2 plus 10×10^{-6} M ICI (10uM), prepared in 0.1% ethanol and incubated for 24 h. The images of the denuded area were captures by confocal microscopy as soon as the wound was produced (0 time) and after the hormonal treatments (24 h). For each wound, images were taken in the same field and the distance between the wound edges was analyzed using the ImageJ 1.42 software. The percentage of the wound recovery in respect to the wound area at 0 and 24 h was calculated for each condition (Lau et al., 2010).

Statistical analysis

Levene and Kolmogorov-Smirnov tests were firstly applied to test if the distribution of values followed normal curve and presented unequal variance. Afterwards Turkey test was applied.

5- Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE (APQ-1399-2.08/12) .

6- Abbreviations

ADT - Androgen Deprivation Therapy

C1GALT1 - Core 1 beta-3-galactosyltransferase

E2 - 17 β -estradiol

ER – Estrogen receptor

GnRH - Gonadotropin releasing Hormone

LRH- luteinizing hormone-releasing hormone

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

PC - Prostate Cancer

PVDF - polyvinylidene difluoride

SNA - Sambucus Nigra Lectin

VVA - Vicia Villosa Lectin

FBS – Fetal Bovine Serum

7- References

- Arai T, Fujita K, Fujime M, Irimura T. 2005. Expression of sialylated MUC1 in prostate cancer: relationship to clinical stage and prognosis. *International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association*. 12:654-661.
- Bosland MC. 2005. The Role of Estrogens in Prostate Carcinogenesis: A Rationale for Chemoprevention. *Rev. Urol.* 7 (suppl. 3), S4-S10.
- Curran M, Wiseman I. 2001. Fulvestrant. *Drugs*. 61:807-8013.
- Burns-Cox N, Basketter V, Higgins B, Holmes S. 2002. Prospective randomised trial comparing diethylstilboestrol and flutamide in the treatment of hormone relapsed prostate cancer. *International Journal of Urology*. 9: 431-434.
- Ferreira JÁ, Videira PA, Lima L, Pereira S, Silva M, Carrascal M, Severino PF, Fernandes E, Almeida A, Costa C. 2013. Overexpression of tumour-associated carbohydrate antigen sialyl-Tn in advanced bladder tumours. *Mol. Oncol.* 7:719–731.
- Gill DJ, Tham KM, Chia J, Wang SC, Steentoft C, Clausen H. 2013. Initiation of GalNAc-type O-glycosylation in the endoplasmic reticulum promotes cancer cell invasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:E3152-3161.
- Ho SM. 2004. Estrogen and anti-estrogens: Key mediators of prostate carcinogenesis and new therapeutics candidates. *J. Cell. Biochem.* 91: 491–503.
- Ju T, Lanneau GS, Gautam T, Wang Y, Xia B, Stowell SR, Willard MT, Wang W, Xia JY, Zuna RE. 2008. Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in COSMC. *Cancer Res.* 68: 1636–1646.
- Julien S, Adriaenssens E, Ottenberg K, Furlan A, Courtand G, Vercoutter-Edouart AS. 2006. ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies

their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity. *Glycobiology*. 16:54-64.

Karantanos T, Corn PG, Thompson TC. 2013. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate-resistance and therapeutic approaches. *Oncogene*. 32: 5501-5511.

Klotz L, Emberton M. 2014. Management of low risk prostate cancer-active surveillance and focal therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 11, 324–334.

Lapointe J, Li C, Higgins JP, Van RM, Montgomery K, Ferrari M, Egevad L, Rayford W, Bergerhein U, Ekman P, Delmarzo AM, Tibshirani R, Botstein D, Brown PO, Brooks JD, Pollack JR. 2004. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:811–816.

Lau KM, Chan QK, Pang JC, Li KK, Yeung WW, Chung NY, Lui PC, Tam YS, Li HM, Zhou L, Wang Y, Mao Y, Nq HK. 2010. Minichromosome maintenance proteins 2, 3 and 7 in medulloblastoma: overexpression and involvement in regulation of cell migration and invasion. *Oncogene* 29: 5475-5489.

Marcos NT, Pinho S, Grandela C, Cruz A, Samyn-Petit B, Harduin-Lepers A. 2004. Role of the human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the synthesis of the cancer-associated sialyl-Tn antigen. *Cancer Res*. 64:7050-7057.

Marcos NT, Bennett EP, Gomes J, Magalhaes A, Gomes C, David L, Dar I, Jeanneau C, DeFrees S, Krustup D. 2011. ST6GalNAc-I controls expression of sialyl-Tn antigen in gastrointestinal tissues. *Front. Biosci*. 3:1443–1455.

Medvedova L, Knopp J, Farkas R. 2003. Steroid regulation of terminal protein glycosyltransferase genes: Molecular and functional homologies within sialyltransferase and fucosyltransferase families. *Endocrine Regulation*. 37: 203-210.

Munkley J, Elliott DJ. 2016. Sugars and cell adhesion: the role of ST6GalNAc1 in prostate cancer progression. *Cancer Cell & Microenvironment*. 3: e1174.

Munkley J, Oltean S, Vodak D, Wilson BT, Livermore KE, Zhou Y, Star E, Floros VI, Johannessen B, Knight B. 2015. The androgen receptor controls expression of the cancer-associated sTn antigen and cell adhesion through induction of ST6GalNAc1 in prostate cancer. *Oncotarget*. 6:34358–34374.

Myers RB, Meredith RF, Schlom J, LoBuglio AF, Bueschen AJ, Wheeler RH. 1994. Tumor associated glycoprotein-72 is highly expressed in prostatic adenocarcinomas. *J Urol*. 152:243-246.

Ozaki H, Matsuzaki H, Ando H, Kaji H, Nakanishi H, Ikehara Y. 2012. Enhancement of metastatic ability by ectopic expression of ST6GalNAcI on a gastric cancer cell line in a mouse model. *Clin Exp Metastasis*. 29:229-238.

Peyrat J-P, Recchi M-A, Hebbar M, Pawlowski V, Hornez L, Dong-Lebouhris X, Hondermarck H, Harduin-Lepers A, Delannoy P. 2000. Regulation of Sialyltransferase expression by estradiol and 4-OH-Tamoxifen in the human breast cancer cell MCF-7. *Mol Cell Biol Research Communication*. 3:48-52.

Pinho SS, Reis CA. 2015. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer*. 15:540-555.

Radhakrishnan P, Dabelsteen S, Madsen FB, Francavilla C, Kopp KL, Steentoft C. 2014. Immature truncated O-glycophenotype of cancer directly induces oncogenic features. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111:E4066-4075.

Sean RS, Tongzhong J, Cummings RD. 2015. Protein Glycosylation in cancer. *Annu Rev Pathol*. 10: 473-510.

Sewell R, Backstrom M, Dalziel M, Gschmeissner S, Karlsson H, Noll T. 2006. The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer. *J Biol Chem*. 281:3586-3594.

Siegel R, Jemal MA, Zou Z, Jemal A. 2014. Cancer Statistics. *CA Cancer J CLIN*. 64:9–29.

Silva ML, Gutierrez E, Rodriguez JÁ, Gomes C, David L. 2014. *Biosensors and Bioelectronics*. 57:254-261.

Steiner MS, Raghow S. 2003. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators reduce prostate cancer risk. *World J. Urol*. 21, 31–36.

Singh PB, Matanhelia SS, Martin FL. 2008. A potential paradox in prostate adenocarcinoma progression: Oestrogen as the initiating driver. *Eur. J. Cancer*. 44: 928–936.

Vojta A, Samarzija L, Bockor L, Zoidos V. 2016. Glyco-genes change expression in câncer through aberrante methylation. *Biochim Biophys Acta*. 1860: 1766-17865.

8- Table

PC-3/E2 (MTT Assay)					
CELL VIABILITY x TIME x CONCENTRATION					
	CT	24h	48h	72h	96h
10^{-6}	*	*	Vs. 24h: 0.001	Vs. 24h: 0.001	Vs. 24h: 0.001 Vs. 72h: 0.001
10^{-7}	*	*	Vs. 24h : 0.01	Vs. 24h: 0.001 Vs.48h: 0.001	Vs. 24h: 0.001 Vs. 48h: 0.001 Vs. 72h: 0.01
10^{-8}	*	*	Vs. 24h: 0.01	Vs. 24h: 0.001 Vs. 48h: 0.001	Vs.24h: 0.001 Vs. 72h: 0.001
10^{-9}	*	*	Vs.24h: 0.01	Vs.24h: 0.001 Vs. 48h: 0.001	Vs.24h: 0.001 Vs. 72h: 0.05
10^{-10}	*	*	Vs. 24h: 0.05	Vs. 24h: p 0.01 Vs. 24h: 0.001 Vs.48h: 0.001	Vs. 24h: 0.001 Vs. 48h: 0.001
10^{-11}	*	*	*	Vs. 48h: p 0.01	*
* no significant difference observed.					

Table I: PC-3 cells treated with E2 (10^{-6} - 10^{-11}) analyzed though of the MTT assay demonstrated significant statistical differences in relation to E2 time.

DU-145/E2 (MTT Assay)					
CELL VIABILITY x TIME					
	CT	24h	48h	72h	96h
10^{-6}	*	*	*	Vs.24h: 0.05 Vs.48h: 0.05	Vs. 24h: 0.01 Vs. 48h: 0.05
10^{-7}	*	*	Vs. 24h: 0.01	Vs. 24h: 0.001 Vs. 48 h: 0.001	Vs. 24h: 0.001 Vs. 48h: 0.001
10^{-8}	*	*	Vs. 24h: 0.01	Vs. 24h: 0.001 Vs.48h: 0.001	Vs. 24h: 0.001 Vs. 48h: 0.001
10^{-9}	*	*	*	Vs. 24h: 0.001 Vs.48h: 0.001	Vs. 24h: 0.01 Vs 72h: 0.05
10^{-10}	*	*	Vs.24h: 0.05	Vs. 24h: 0.001 Vs. 48h: 0.001	Vs 24h: 0.001 Vs 72h: 0.001
10^{-11}	*	*	*	*	*
* no significant difference observed.					

Table II: Cell viability after 4 days of E₂ treatment. In DU-145 cells was observed significant statistical differences in relation time of the exposition

8 PERSPECTIVA

Diante dos resultados obtidos, alguns estudos complementares são cabíveis para caracterizar melhor o mecanismo de ação do estradiol proposto no estudo.

Investigar a expressão gênica da ST6GalNac I bem como de outras sialiltransferases envolvidas no processo na síntese de antígenos glicídicos envolvidos na progressão tumoral. Caracterizar o potencial metastático das linhagens de câncer de próstata DU-145 e PC-3 frente estradiol através de ensaio de invasão e por fim avaliar se a vitamina D, um secoesteróide, pode regular a via do estrógeno em câncer de próstata andrógeno refratário, bem como avaliar sua atividade inibidora de progressão de câncer de próstata.

9 CONCLUSÕES

O desenvolvimento da sonda histoquimiluminescente produzida a partir da conjugação das lectinas ao éster de acridina possibilitou a investigação quantitativa da expressão de glicanos em hiperplasia prostática benigna (HPB), câncer de próstata (CP) e próstata normal.

Tecidos transformados demonstraram uma menor expressão de α -D-glucose / manose e Gal- β (1-3) -GalNAc quando comparados à tecidos normais. No entanto, uma maior expressão de α -L-fucose foi observada em CP em relação a tecidos normais e a HPB. Esse perfil glicídico alterado foi analisado em estudos *in vitro* utilizando linhagens de câncer de próstata andrógeno refratário, DU-145 e PC-3 tratadas com estradiol ou estradiol associado à fulvestranto.

Observou-se na linhagem PC-3 aumento de expressão da enzima ST6GALNAc na presença de estradiol e diminuição quando exposta a fulvestranto. Esse comportamento não foi observado na linhagem DU-145.

Também foi observado que ER α apresentou diminuição de expressão em células PC-3 tratadas com fulvestranto, não sendo observada diferença de expressão do receptor de estrógeno β em nenhuma das linhagens.

Utilizando as lectinas VVA (*Vicia villosa* agglutinin) e SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) foi possível confirmar a sialilação do antígeno Tn nas células PC-3 tratadas com estradiol e sua por fulvestranto. Além disso, foi observado que a expressão desse antígeno pode estar associado a capacidade migratória das células tumorais observado pelo ensaio de migração, etapa importante da progressão tumoral.

Assim, podemos concluir que a glicosilação alterada identificada pela sonda histoquimiluminescente pode ser produto da regulação de hormônios esteroides, em especial, o estradiol e que esse perfil glicídico pode está associado ao potencial metastático desse tumor.

10 Produção Científica

Hindawi Publishing Corporation
Disease Markers
Volume 35 (2013), Issue 3, Pages 149–154
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/787130>



Research Article

Glycophenotype Evaluation in Cutaneous Tumors Using Lectins Labeled with Acridinium Ester

Luiza Rayanna Amorim Lima,¹ Matheus Filgueira Bezerra,¹
Sílvia Mônica Vitalino Almeida,^{1,2} Lúcia Patrícia Bezerra Gomes Silva,¹
Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão,^{1,3} and Luiz Bezerra Carvalho Júnior^{1,3}

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50030 Recife, PE, Brazil

² Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), Universidade de Pernambuco (UPE), 50100 Garanhuns, PE, Brazil

³ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50030 Recife, PE, Brazil

Correspondence should be addressed to Luiz Bezerra Carvalho Júnior; lbcj@hotmail.com.br

Received 27 March 2013; Revised 13 June 2013; Accepted 21 June 2013

Academic Editor: Timothy M. Block

Copyright © 2013 Luiza Rayanna Amorim Lima et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Tumor cells show alterations in their glycosylation patterns when compared to normal cells. Lectins can be used to evaluate these glycode changes. Chemiluminescence assay is an effective technique for quantitative analysis of proteins, nucleic acids, and carbohydrates due to its high sensitivity, specificity, and rapid testing. **Objective.** To use histochemiluminescence based on lectin conjugated to acridinium ester (AE) for the investigation of glycophenotype changes in cutaneous tumors. **Methods.** Concanavalin A (Con A), Peanut agglutinin (PNA), *Ulex europaeus* agglutinin-I (UEA-I), and *Maackia amurensis* agglutinin (MAA) were conjugated to acridinium ester. Biopsies of cutaneous tumors and normal skin were incubated with the lectins-AE, and chemiluminescence was quantified and expressed as Relative Light Units (RLU). **Results.** Actinic keratosis (AK), keratoacanthoma (KA), squamous cell carcinoma (SCC), and basal cell carcinoma (BCC) showed lower expression of α -D-glucose/mannose and α -L-fucose residues compared to normal tissue. Cutaneous tumors displayed higher expression of Gal- β (1-3)-GalNAc residues than normal tissue. AK and SCC exhibited higher expression of Neu5Ac- α (2,3)Gal residues than normal epidermis. KA and BCC showed equivalent RLU values compared to normal tissue. **Conclusions.** Lectin histochemiluminescence allowed quantitative assessment of the carbohydrate expression in cutaneous tissues, contributing to eliminate the subjectivity of conventional techniques used in the histopathological diagnosis.

1. Introduction

Nearly all types of malignant cells and many types of diseased tissue cells demonstrate alterations in their glycosylation patterns when compared to their normal counterparts [1]. Alterations in glycosyltransferases expression, sugar nucleotide donors, and disruption of the Golgi contribute to the development of diseases, such as hereditary disorders, immune deficiencies, cardiovascular disease, and cancer [2, 3]. In the tumor environment, underexpression, truncation or altered branching patterns of certain glycans, and/or changes in glycosylation allow neoplasm cells to usurp many

of the events that occur in development such as receptor activation, cell adhesion, and cell motility, which permits tumor cells to invade and spread throughout the organism [4]. The investigation of lectin-carbohydrate interactions is necessary for the understanding of both the glycophenotype and the behavior of the tumor during its differentiation and confirms the hypothesis that biochemical changes in the cell are events that may signal the cell differentiation [5].

Lectins have been used to evaluate the glycophenotype in skin tissues [6–9]. Lectin histochemistry based on colorimetric detection has been used as a supporting tool for differential diagnosis for skin lesions, but this technique only

Int. J. Mol. Sci. **2015**, *16*, 13023–13042; doi:10.3390/ijms160613023

OPEN ACCESS

International Journal of
Molecular Sciences
ISSN 1422-0067
www.mdpi.com/journal/ijms

Article

Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives

Sinara Mônica Vitalino de Almeida ^{1,2,*}, Elizabeth Almeida Lafayette ²,
Lúcia Patrícia Bezerra Gomes da Silva ¹, César Augusto da Cruz Amorim ²,
Tiago Bento de Oliveira ², Ana Lucia Tasca Gois Ruiz ⁴, João Ernesto de Carvalho ^{4,5},
Ricardo Olímpio de Moura ⁶, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão ¹,
Maria do Carmo Alves de Lima ² and Luiz Bezerra de Carvalho Júnior ¹

¹ Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami (LIKA) and Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife 50670-901, PE, Brazil; E-Mails: lucia-patricia@hotmail.com (L.P.B.G.S.); ebeltrao@hotmail.com (E.I.C.B.); lbcej@hotmail.com.br (L.B.C.J.)

² Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), Universidade de Pernambuco (UPE), Garanhuns 55290-000, PE, Brazil

³ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife 50670-901, PE, Brazil; E-Mails: elizabeth.almeidalafayette@gmail.com (E.A.L.); cesar.amorim@gmail.com (C.A.C.A.); tiagobento2006@gmail.com (T.B.O.); nenalima.mariadocarmo@gmail.com (M.C.A.L.)

⁴ Divisão de Farmacologia e Toxicologia, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (DFT/CPQBA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas 13083-970, SP, Brazil; E-Mails: aa_ruiz@hotmail.com (A.L.T.G.R.); carvalho@cpqba.unicamp.br (J.E.C.)

⁵ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas 13083-859, SP, Brazil

⁶ Departamento de Farmácia, Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus Campina Grande 58429-500, PB, Brazil; E-Mail: ricardo.olimpiodemoura@gmail.com

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: sinara.monica@gmail.com; Tel.: +55-81-2126-8484; Fax: +55-81-2126-8485.

Academic Editor: Eric C. Long

Con A conjugated to Europium(III) cryptate as a new histological tool for prostate cancer investigation using confocal microscopy

MJBM Rêgo¹, LPBG Silva¹, JKG Medeiros¹, RCBQ Figueiredo², S Alves-Júnior³, EIC Beltrão^{1,4}

¹Keizo Asami Immunopathology Laboratory, University Federal of Pernambuco, ²Aggeu Magalhães Research Center CPqAM/FIOCRUZ, ³Department of Fundamental Chemistry, University Federal of Pernambuco, and ⁴Department of Biochemistry, University Federal of Pernambuco, Brazil

Accepted September 16, 2013

Abstract

Lectins are carbohydrate recognition proteins that can be used as probes to reveal the glycosylation state of cells. They frequently have been used for diagnostic and prognostic cancer studies. For fluorescence based analysis, lectins commonly are conjugated to fluorescein isothiocyanate (Con A-FITC); however, this molecule loses its fluorescence quickly. We conjugated Europium cryptate to Con A (Con A-cryp-Eu) for use as a histochemical luminescent probe to recognize glucose/mannose residues in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma tissues, and used confocal microscopy instead of commercial Con A-FITC. Tissues were treated with Evans blue to suppress intrinsic tissue fluorescence before incubation with Con A-cryp-Eu or Con A-FITC. Con A-cryp-Eu exhibited hemagglutinating activity. Con A-cryp-Eu showed the same binding pattern as Con A-FITC in prostate stroma and gland cells. Staining was strong in benign prostate hyperplasia and prostate carcinoma tissues. Con A-cryp-Eu probe stained glucose/mannose residues in prostatic carcinoma more intensely than Con A-FITC. Furthermore, staining with Con A-cryp-Eu showed greater fluorescence intensity than Con A-FITC and the emission of Con A-cryp-Eu was more stable than the Con A-FITC for seven days under the same storage conditions. Maintenance of the luminescent properties and the binding pattern of Con A-cryp-Eu favor its use as an auxiliary histochemistry probe for prostatic tissue studies.

Key words: confocal microscopy, Con A-Europium, cryptate, histochemistry, lectin

Confocal microscopy is a powerful technique that is widely used to investigate molecular alterations caused by cancer by providing detailed images of architecture and cellular morphology (Palmieri et al. 2010). Fluorescein isothiocyanate (FITC) is the fluorescein derivative of choice for detecting biomolecules using confocal microscopy mainly due to its large quantum yield of fluorescence (Foster et al. 2004, Samuelsson et al. 2009). FITC has some disadvantages, however, such as pH sensitivity and

photo-bleaching (Waggoner 2006). New fluorescent molecules that have no light sensitivity have been investigated as alternatives including quantum dots and lanthanide (Santos et al. 2006).

Lanthanide cryptates have been used for many studies, mainly due to their luminescent properties (Selvin 2003, Hemmila and Laitala 2005, Handl and Gillies 2005). Their photophysical properties have been known for more than a decade; these cryptates efficiently populate the transmission electron level (⁵D₀ for Europium and ⁵D₄ for terbium) of the metal ion within its structure and they emit by non-radiative processes, which provide high emission in aqueous solutions (Galaup et al. 2002, Martins and Isolani 2005). These properties have been exploited for spectroscopic studies of biological molecules

Correspondence: Eduardo Beltrão, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, UFPE, Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, CDU, Recife, Pernambuco, Brasil 50670-910. E-mail: ebeltrao@hotmail.com
© 2014 The Biological Stain Commission
BioTechnic & Histochemistry 2014, **89**(5): 321–326.

DOI:10.3109/10520295.2013.846479

321

RIGHTS LINK
Copyright Clearance Center