



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**HISTOQUÍMICA COM LECTINAS EMPREGANDO CRIPTATOS DE
LANTANÍDEOS CONJUGADOS à Con A COMO MARCADOR LUMINESCENTE
DE TECIDOS DE PRÓSTATA HUMANA**

Mestranda: JANELLE KELLY GUIMARÃES MEDEIROS
Orientador: Prof. Dr. EDUARDO ISIDORO CARNEIRO BELTRÃO
Co-Orientador: Prof. Dr. SEVERINO ALVES JÚNIOR

RECIFE, 2007

JANIELLE KELLY GUIMARÃES MEDEIROS

**HISTOQUÍMICA COM LECTINAS EMPREGANDO CRIPTATOS DE
LANTANÍDEOS CONJUGADOS à Con A COMO MARCADOR LUMINESCENTE
DE TECIDOS DE PRÓSTATA HUMANA**

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

RECIFE, 2007

MEDEIROS, Janielle Kelly Guimarães

Histoquímica com lectinas empregando criptatos de lantanídeos conjugados à Con A como marcador luminescente de tecidos de próstata humana / Janielle Kelly Guimarães Medeiros. – Recife: A Autora, 2007.

45p.: il.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – UFPE. CCB

1. Lectina 2. histoquímica 3. Criptato 4. Bioquímica. 5. Tecidos de próstata I. Título

**577.112
572.6**

**CDU (2ª. Ed.)
CDD (22ª. Ed.)**

**UFPE
CCB – 2007 – 145**

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Janielle Kelly Guimarães Medeiros**, realizada em 28 de fevereiro de 2007, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 17:15 minutos do dia 28 de fevereiro de 2007, foi aberto, na Sala de Aulas do LIKA/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Janielle Kelly Guimarães Medeiros**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, Vice-Coordenadora do Curso supra citado, fez a apresentação da aluna, de seu orientador, o Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, de seu Co-Orientador, Prof. Dr. Severino Alves Júnior, do Depto de Engenharia Química/UFPE, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, na qualidade de Presidente, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, Patrícia Maria Guedes Paiva, os três do Depto. de Bioquímica e a Profa. Dra. Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti, do Depto. de Fisiologia/UPE. Após as apresentações, o Sr. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Histoquímica com lectinas empregando criptatos de lantanídeos conjugados À Con A como marcador luminescente de tecidos de próstata humana"**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, a candidata disporia de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pela aluna para responder às perguntas seria de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 35 (trinta e cinco) minutos. Após a apresentação da mestranda, o Sr. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, a Profa. Dra. Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti, em seguida para a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, e finalmente para o Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, os quais agradecerem o convite, fizeram alguns comentários e sugestões. Ao final de suas respectivas arguições, os referidos professores deram-se por satisfeitos. Em seguida, o Sr. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do LIKA/UFPE. Após alguns comentários, a Banca decidiu por unanimidade conceder a menção **"Aprovada com Distinção"**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 28 de fevereiro de 2007.

Eduardo H. Carneiro Beltrão;
secretário;
Patrícia Maria Guedes Paiva.

Janielle Kelly Guimarães Medeiros

DEDICATÓRIA

Ao meu Senhor Jesus, pela Sua Palavra, Graça, caráter, presença e Amor incondicional em minha vida.

A Janielle, por acreditar e insistir em ser sempre uma vencedora.

À minha família que amo: meus pais, Janilson e Edilene, por investirem e acreditarem na preciosidade da sua filha e aos meus irmãos Rafael e Camillinha, que amo muito. Todos meus primos, tios e tias, que formam a grande família Guimarães e Medeiros, fundamentais, em especial a minha avó, Tetéia.

Aos meus amigos e colegas do mestrado.

Ao meu amigo Guilherme, por todo seu apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me capacitar a galgar mais esse degrau e me apresentar com pessoas maravilhosas durante o período deste mestrado.

A meus pais, **Janilson** e **Edilene**, pelo amor, apoio e incentivo e aos meus irmãos, **Rafael** e **Camilla**.

Ao meu amigo **Márcio Guilherme**, pelo seu amor, companheirismo, exemplo como pessoa e profissional que muito admiro, pelo seu carinho, amizade, caráter e incentivo a crescer sempre.

Ao meu amigo e orientador **Eduardo Beltrão**, pelo seu exemplo como pesquisador que busca constantemente a excelência no que faz e pela sua capacidade de orientar pessoas únicas e “figuras”, e principalmente pela pessoa que é, pela credibilidade e sorriso constante que me ajudou a enxergar a ciência como algo inteligente e prazeroso.

À pesquisadora **Dra. Regina Bressan**, não só pela ajuda fundamental na captura das imagens da microscopia confocal, como também pelo seu apoio, profissionalismo, amizade e pela troca de experiências e confiança inspirada.

Ao meu amigo e companheiro de mestrado, **Igor Teixeira**, pela pessoa grandiosa que é e se mostrou desde os primeiros momentos do mestrado, me ensinando o valor e tamanho que as pessoas têm em si. Obrigada pela sua atenção, amizade, lealdade e companheirismo em momentos alegres e difíceis.

Aos amigos **Elton Menezes** e **Carolina Patriota**, pela amizade, ajuda nos protocolos, e carinho com as lectinas e comigo e aos amigos do LIKA, em especial, ao mestre e amigo, **Jorge Luiz**, o qual admiro como pessoa e profissional, que se mostrou um grande amigo, com seu apoio e contribuição em etapas importantes para a realização deste trabalho.

E por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu especial agradecimento.

RESUMO

Criptatos de lantanídeos são amplamente usados como marcadores luminescentes e lectinas têm sido utilizadas para investigar e caracterizar resíduos de carboidratos em glicoconjugados. Neste trabalho Con A foi conjugada ao criptato de Európio (crip(Eu)) para ser usado como marcador em histoquímica para a identificação de resíduos de glicose/manose em tecido prostático humano transformado (hiperplasia prostática benigna e carcinoma prostático). Os resultados indicaram que a Con A-crip(Eu) apresentou o mesmo padrão de marcação da Con A-FITC para o estroma e células epiteliais de glândulas prostáticas observadas por microscopia confocal de fluorescência. Os tecidos foram previamente incubados com solução de Azul de Evans para supressão da fluorescência intrínseca do tecido depois da incubação com a lectina advinda, confirmando que a fluorescência deve-se ao crip(Eu) ou FITC. A manutenção das propriedades luminescentes e o padrão de marcação da Con A-crip (Eu) quando comparada aos da Con A-FITC, indicaram que o crip(Eu) pode ser utilizado como um marcador histoquímico eficiente para tecido prostático.

Palavras-chave: lectina, criptato, histoquímica, tecidos de próstata.

ABSTRACT

Lanthanides cryptates are largely used as luminescent labels and lectins have been used to investigate and characterize residues of carbohydrates in glycoconjugates. In this work Con A was conjugated to criptate of europium (crip(EU)) to be used in histochemistry to characterize residues of glucose/mannose in transformed human prostate tissues (benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma). Results indicated that Con A-crip (Eu) presented the same binding pattern of Con A-FITC to stroma and gland cells observed under confocal microscopy. Tissues were previously incubated with Evan's Blue to suppress the intrinsic tissue fluorescence prior to lectin incubation confirming the fluorescence via crip(Eu) or FITC. In summary, the maintenance of the luminescent properties and binding pattern of Con A-Crip (Eu) when compared to Con A-FITC, indicates that Crip (Eu) can be used as an efficient histochemistry marker for prostatic tissue.

Key-words: lectin, criptate, histochemistry, prostate tissue.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
1. INTRODUÇÃO	
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1. Histofisiologia da Próstata	12
2.2. Câncer	14
2.3. Câncer de Próstata	17
2.4. Lectinas	20
2.5. Criptatos de lantanídeos	22
2.6. Microscopia de Fluorescência Confocal	25
3. JUSTIFICATIVA	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. OBJETIVO GERAL	27
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5. METODOLOGIA	28
5.1 Conjugação do Criptato de Európio à Concanavalina	28
5.2 Histoquímica com Lectinas (marcação e inibição)	28
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÕES	35
8. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	36
9. ANEXOS	45

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Esquema da morfologia normal da próstata.....	13
Figura 2. Glândulas e estroma do tecido prostático (HE, 100x).....	13
Figura 3. Detalhe das glândulas do tecido normal da próstata (HE, 400x).....	14
Figura 4. Ligantes precursores e criptatos sintetizados.....	24
Figura 5. Microscópio de fluorescência confocal.....	25
Figura 6. Tecido de Hiperplasia Prostática Benigna, marcado com Con A-FITC (400x).....	29
Figura 7. Tecido de Hiperplasia Prostática Benigna, marcado com Con A-Crip(Eu) (400x).....	30
Figura 8. Tecido de Carcinoma da Próstata, marcado com Con A-FITC (400x).....	30
Figura 9. Tecido de Carcinoma da Próstata, marcado com Con A-Crip(Eu) (400x).....	31
Figura 10. Tecido de Carcinoma da Próstata, marcado com Con A-Crip(Eu), inibido com α -D-glicose (300mM). (400x).....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativas para o ano 2006 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, em homens, segundo localização primária.

..... 18

Tabela 2. Especificidade de lectinas de plantas..... 21

1. INTRODUÇÃO

A próstata é a principal glândula sexual masculina responsável pela produção de componentes fundamentais do líquido seminal, envolvidos na reprodução humana, produzido por inúmeras glândulas epiteliais, mergulhadas num estroma de sustentação rico em fibras colágenas e músculo liso (Stevens & Lowe, 2002).

Dentre os distúrbios apresentados pela glândula, o mais severo é o carcinoma de próstata, considerado atualmente um problema de saúde mundial, uma vez que o número de pacientes e óbitos advindos desta patologia vem crescendo assustadoramente nos últimos anos. Fatores de risco como nutrição desbalanceada, idade, raça e fatores genéticos estão relacionados a esta neoplasia (Li *et al.*, 2004).

Em 2006, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontou o carcinoma de próstata como segundo entre a população masculina, perfazendo apenas em Pernambuco 2.060 novos casos em todo Estado e 610 casos na capital, Recife. Em 2006, a incidência de 50,12/100.000 habitantes, acima da média nacional de 47,280/100.000, fez de Pernambuco, o sexto Estado em número de casos de carcinoma prostático.

O diagnóstico do carcinoma atualmente é feito através do teste sanguíneo do Antígeno Específico da Próstata (PSA), toque retal e da ultra-sonografia de próstata, porém nenhum deles é suficientemente capaz de fornecer prognóstico preciso capaz de direcionar com eficiência a conduta terapêutica mais adequada para cada paciente (Kuligowska, 2001). Com o intuito de aumentar o tempo e a qualidade de vida dos pacientes, se fez necessário o desenvolvimento de marcadores tumorais que tragam informações precisas no diagnóstico e prognóstico do carcinoma de próstata. Nesse aspecto, a histoquímica com lectinas se destaca como técnica capaz de caracterizar alterações patobioquímicas teciduais, mapeando com precisão alterações bioquímicas nos glicoconjugados celulares, envolvidos em processos de carcinogênese (Yu *et al.*, 2001).

Nosso trabalho teve como objetivos, avaliar a potencialidade do criptato de Európio conjugado à Concanavalina A para aplicação em histoquímica com lectinas de tecidos de próstata humana, e comparar a eficiência desta marcação em tecidos com Hiperplasia

Próstata Benigna (HPB) e carcinoma de próstata (Cap), com a marcação do conjugado Con A-FITC, usualmente empregada, a partir da análise de imagens histológicas fornecidas pela microscopia confocal de fluorescência. O mapeamento glicoprotéico dos tecidos da próstata mostra-se importante no prognóstico do câncer. Histoquímica com lectinas vem sendo utilizada como método de marcação tumoral útil no mapeamento de glicoconjugados e apresenta-se com um alto valor prognóstico no câncer de próstata, uma vez que o teste do PSA tem seu valor prognóstico limitado (Stenman *et al.*, 2005).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histofisiologia da Próstata

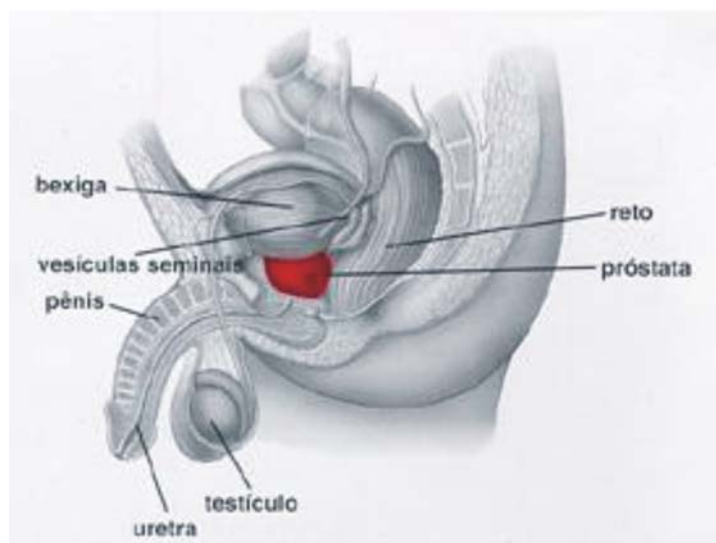
As substâncias produzidas e liberadas pela próstata, vesícula seminal e a glândula bulbo uretral formam o plasma seminal, rico em nutrientes, importantes no metabolismo e no transporte dos espermatozóides, desempenhando um importante papel no processo de fertilização (Manaskova, 2002; Andrade-Rocha, 2005).

A próstata tem a forma de uma castanha, com base voltada para o alto e a ponta voltada para baixo. Ela mede cerca de 3,5cm de comprimento, 4,5cm de largura, 3,0cm de espessura e para 15-20g, circundada por uma delgada cápsula fibrosa. No homem jovem tem consistência firme e elástica.

Formada por dois lobos laterais, direito e esquerdo e um lobo posterior e central “lobo médio”, pode apresentar uma protuberância sobre a bexiga, através do colo vesical. Embriologicamente é constituída de duas partes distintas que se fundiram durante o desenvolvimento fetal, dessa forma existe a *próstata central* e a *próstata periférica*. A próstata central é atravessada pela uretra prostática (canal uretral).

Localizada entre o aparelho urinário e genital, situa-se imediatamente abaixo da bexiga, acima do períneo e em frente ao reto e atrás da sínfise púbica. Atravessada pela uretra prostática (importante na micção e ejaculação) e por canais ejaculatórios (vesículas seminais e ductos deferentes), conforme figura 1. Forma uma base fixa sobre a qual repousa a bexiga e estabiliza os órgãos da bacia (Zerbib, 2003).

A glândula prostática, em contraste às outras glândulas sexuais, está presente em todos os mamíferos participando de forma ativa na função reprodutiva masculina, a partir da secreção de glicoconjugados que criam condições favoráveis à fertilização (Marker *et al.*, 2002; Sakairi *et al.*, 2006). Além disso, a secreção da próstata, contém em especial lisozimas, junto às outras glândulas sexuais protege o trato urinário inferior e o sistema reprodutor masculino de microorganismos patogênicos que penetram pela uretra (Chalabi *et al.*, 2002;).



Fonte: www.centrodeterapias.com.br

Figura 1: Esquema da morfologia normal da próstata

Histologicamente, a próstata é formada por inúmeras glândulas secretoras do fluido prostático, revestidas por uma fina camada de células basais que apresentam núcleos com cromatina condensada e citoplasma claro e uma camada de células epiteliais colunares altas ou cúbicas, com núcleos mais claros (Figura 3). Suas glândulas formam pregas complexas, alojadas no interior de um estroma de sustentação formado por fibroblastos, colágeno e músculo liso (Stevens & Lowe, 2002). (Figura 2).

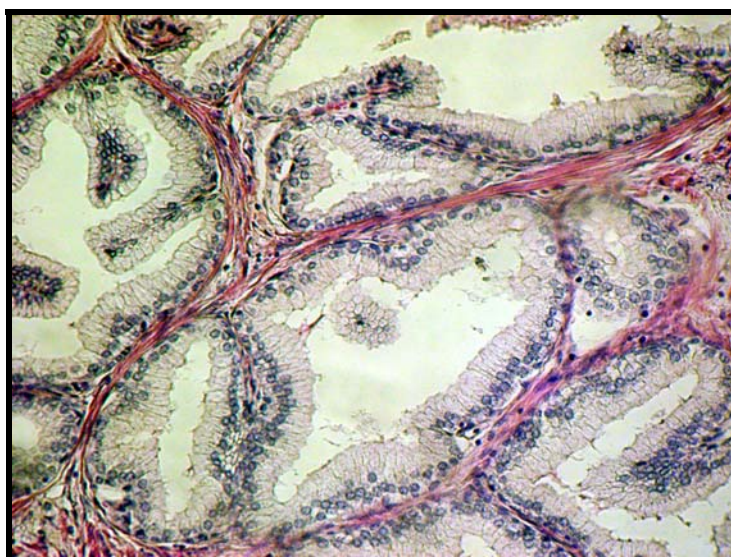


Figura 2: Glândulas e estroma do tecido prostático.
(Hematoxilina Eosina-HE, 100x).



Figura 3: Detalhe de glândula do tecido prostático, evidenciando a disposição uniforme das células epiteliais colunares, juntamente com a disposição basal de seus núcleos, circundadas por uma fina camada de células basais. Ao redor da glândula, o estroma de sustentação (rosa). (HE, 400x).

2.2 Câncer

Neoplasia é uma massa anormal de tecido cujo crescimento excede e não está coordenado ao crescimento dos tecidos normais e que persiste mesmo cessada a causa que a provocou. Carcinogênese ou oncogênese são termos que designam o processo de desenvolvimento de uma neoplasia, desde as alterações mais precoces no DNA, que supostamente ocorrem em uma só célula ou em um pequeno número delas, até a formação de um tumor que pode destruir o organismo hospedeiro (Robbins *et al.*, 2005).

A proliferação, diferenciação e a sobrevivência das células individuais em organismos multicelulares são cuidadosamente reguladas visando à necessidade do

organismo como o todo. O câncer é o resultado da quebra dos mecanismos reguladores que governam o comportamento normal das células. Dessa forma, essa patologia se apresenta como uma doença social celular, resultado da perda dessa regulação, fazendo com que as células passem a se dividir de maneira descontrolada e invadam outros tecidos e órgãos e interferindo em suas funções (Cooper, 2001). A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, iniciando-se a partir de mutações de duas classes de genes: genes supressores de tumor e proto-oncogenes, que têm papel chave no controle de crescimento celular através da expressão de suas proteínas (Chen, 2005; Rivoire *et al.*, 2006).

Proteínas normais codificadas pelos proto-oncogenes desempenham funções iniciais nas células durante o desenvolvimento das neoplasias. Dentre estas moléculas reguladoras do ciclo celular, destacam-se os hormônios, fatores de crescimento e proteínas envolvidas na recepção e tradução de sinais localizados na superfície celular. As células neoplásicas, freqüentemente apresentam anormalidades na resposta celular a fatores de crescimento e seus receptores, proteínas envolvidas nas vias de transdução do sinal hormonal, levando a uma desregulação de vias de sinalização oncogênicas que promovem proliferação, inibem a apoptose e habilitam células cancerosas a disseminarem-se e estimular a angiogênese tumoral (Agawal, 2000).

Estudos demonstram que modificações em importantes genes que resultam em uma alteração significativa no padrão da expressão gênica do tecido normal pode levar ao desenvolvimento do tumor maligno (Brum *et al.*, 2005). Muitas destas mutações são adquiridas durante a evolução do câncer, sendo consideradas como mecanismos de tumorogênese (Porkka *et al.*, 2004).

A carcinogênese e progressão maligna são controladas em parte, através da alteração estroma-epitélio, que promovem a progressão do câncer. Células estromais alteradas associadas a carcinomas afetam profundamente uma cascata de processos, como a iniciação, crescimento, migração, angiogênese, apoptose, invasão e a metástase tumoral (Cunha *et al.*, 2004). Sob o ponto de vista bioquímico, observa-se que as moléculas de superfície, como as de adesão, e vias de transdução dos sinais para o crescimento do tumor apresentam-se alteradas durante a sua progressão (Gua *et al.*, 2006). Chan (2001) demonstra que dentre os diversos fatores que levam ao desenvolvimento do câncer, a alteração na expressão de glicoconjugados é freqüentemente observada em tumores.

As membranas das células são compostas por componentes glicosilados ou não, que atuam como receptores de diferentes componentes, dentre os quais as lectinas, carboidratos, antígenos, anticorpos que regulam ou promovem a interação entre as células. Estes glicoconjugados são proteínas e lipídios ligados a diferentes carboidratos como a glicose, manose, galactose, L-fucose, ácido siálico, N-acetil glicosamina e N-acetil galactosamina, formando as glicoproteínas e glicolipídios, respectivamente (Gabius, 2000). Estes carboidratos apresentam importante função no controle da homeostase de processos fisiológicos e patobioquímicos do organismo (Phipps *et al.*, 2005). A estrutura dessas macromoléculas está relacionada ao estágio de diferenciação e maturação das células (Wróblewski *et al.*, 2001; Jarolim *et al.*, 2002).

Distúrbios qualitativos e/ou quantitativos na glicosilação destes carboidratos estão envolvidos em diversos processos patológicos celulares, como também em tumores, levando a um aumento e/ou diminuição da invasividade e metástase de células neoplásicas, determinante este, importante na progressão do câncer no organismo. Assim, mudanças qualitativas /quantitativas na glicobiologia dos glicoconjugados das membranas celulares são altamente significativas no desenvolvimento e evolução de muitas doenças (Yu *et al.*, 2001).

A importância fisiológica da biologia dos carboidratos emergiu gradualmente devido às informações quanto à interação proteína-carboidrato e carboidrato-carboidrato, em circunstâncias normais e patológicas da célula (Danguy *et al.*, 2001). Esta propriedade de ligação a carboidratos constitui a base da interação célula-célula, célula-estroma e progressão do câncer (Pratima *et al.*; 2002; Califice *et al.*; 2004).

A observação das propriedades morfológicas de tumores possibilita, na grande maioria dos casos, a inferência quanto a seu caráter benigno ou maligno e a previsão de seu comportamento biológico. Algumas vezes, entretanto, tal categorização e previsão não são possíveis, pois um tecido neoplásico pode apresentar tanto características anatômicas que assinalam um caráter não agressivo quanto outras sobre as quais recai uma grande suspeita de malignidade (INCA, 2006).

A histopatologia, realizada a partir da biópsia do tecido tumoral, é essencial no diagnóstico preciso do câncer e usada para classificação do tumor, como benigno ou maligno. A confirmação da prova anatomopatológica é necessária para o planejamento de

tratamento e também um prognóstico adequado (Akimoto *et al.*, 2006). O grau de malignidade do tumor é determinado a partir da análise do tecido e sua relação de semelhança morfológica com o tecido original. Dessa forma existe o tumor benigno, onde o arranjo das células tumorais guarda características do tecido de origem. Possuem um crescimento lento, permitindo a formação de novos vasos para sua nutrição, assim, necrose e degeneração são incomuns nesse tipo de tumor. Já no tumor maligno, comumente chamado de câncer, as células não se assemelham geralmente ao tecido original. Possuem um crescimento rápido, o que resulta muitas vezes em hemorragia dos vasos recém-formados e necrose. Geralmente as células perdem sua aderência entre si e têm com isso sua disseminação pelo organismo facilitada, caracterizando a metástase. Por seu caráter invasivo, o limite entre o tumor e o tecido normal não é preciso implicando numa difícil remoção (Robbins *et al.*, 2005).

O papel dos glicoconjugados expressos nas membranas celulares é ampla no processo da carcinogênese (Chan *et al.*, 2001). Pratima e colaboradores (2002) demonstraram que as células cancerígenas utilizam seus carboidratos modificados de superfície para escapar do reconhecimento do sistema imunológico e migrarem para outros tecidos. Orr e Wang (2004) demonstraram que a interação com glicoconjugados expressos no endotélio microvascular de um órgão alvo representa um passo essencial na metástase do carcinoma da próstata. Estudos demonstraram um padrão muito diferente de glicosilação na expressão de glicoconjugados em tecidos de patologias da próstata, porém, estudos das mudanças de glicosilação celular em estágios pré-malignos da carcinogênese prostática ainda são escassos (Herling *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2001). O conhecimento de alterações bioquímicas específicas que permitam entender a regulação do crescimento celular no carcinoma da próstata é importante no desenvolvimento de novas técnicas auxiliares no diagnóstico desta patologia (Lin, 2002).

2.3 O Câncer de Próstata

O câncer de próstata é, atualmente, um problema de Saúde Mundial. Fatores de risco como nutrição desequilibrada, idade, raça e fatores genéticos estão relacionados a esta neoplasia (Li *et al.*, 2004).

No Brasil, tornou-se um problema de Saúde Pública, uma vez que representa o segundo câncer mais comum em homens, aumentando sua incidência nos últimos anos, devido ao envelhecimento da população. Dentre os tipos de câncer, é o segundo câncer em homens no Brasil, com estimativa de risco de 47,280/100.000 (INCA, 2006). Pernambuco é o sexto Estado em número de casos de carcinoma prostático, perdendo apenas para os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Estimativas do INCA para o ano de 2006 apontaram uma incidência de 50,12/100.000 habitantes, acima da média, com estimativa de incidência de 2.060 novos casos para o Estado de Pernambuco e 610 casos apenas na capital, Recife.

Os três processos patológicos que afetam a próstata com maior frequência são a prostatite, a hiperplasia benigna da próstata (HPB) ou hiperplasia nodular e o adenocarcinoma prostático.

A HBP é a patologia mais comum da próstata e considerada como uma doença da idade, bastante comum em homens acima de 50 anos. Caracterizada pelo aumento considerável da próstata, pela formação de nódulos periuretrais que quando suficientemente grandes, comprimem o canal uretral levando a uma sintomatologia clínica como dificuldade de esvaziamento completo da bexiga e aumento do número micções, acompanhado de esvaziamento incompleto da bexiga. Essa patologia é considerada um problema de Saúde Pública, pois atinge um em cada cinco homens acima de 50 anos e um em cada três homens acima de 80 anos (Zerbib, 2003; Roehrborn, 2005).

Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Traquéia, Brônquio e Pulmão	500	12,08	170	24,13
Estômago	410	9,84	110	14,80
Próstata	2.060	50,12	610	86,55
Cólon e Reto	230	5,71	80	11,64
Esôfago	190	4,58	40	6,20
Leucemias	190	4,57	50	6,76
Cavidade Oral	310	7,41	110	14,42
Pele Melanoma	50	1,31	30	3,99
Outras Localizações	1.500	36,51	580	81,63

Subtotal	5.440	132,40	1.780	250,53
Pele não Melanoma	2.340	57,06	560	78,40
Todas as Neoplasias	7.780	189,24	2.340	329,44

Fonte: INCA (2006)

Tabela 1: Estimativas para o ano 2006 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, em homens, segundo localização primária.

O crescimento e manutenção da próstata são dependentes de hormônios andrógenos, como a testosterona, estando seus níveis intimamente ligados às patologias desse órgão (Zerbib, 2003). Acredita-se que a HBP seja consequência de um desequilíbrio interno da célula glandular, relacionada ao metabolismo dos hormônios andrógenos. A diidrotestosterona (DTH), derivado da testosterona, é mediador final do crescimento da próstata. Pessoas com deficiência específica dessa enzima têm o crescimento da próstata alterado. Mercader (2007) observou que o tratamento de privação de andrógenos na glândula da próstata apresenta sinais como injúria celular e atrofia da glândula após 7 dias de tratamento.

O processo envolvido no desenvolvimento e carcinogênese da próstata é complexo (Wong *et al.*, 2003).

Atualmente, o diagnóstico do câncer de próstata se baseia no toque retal, nos níveis sanguíneos do antígeno prostático específico (PSA) e na ultra-sonografia transretal, utilizada no diagnóstico de lesões malignas da próstata. Porém, nenhum deles é sensível e específico o suficiente para ser usado sozinho na definição da conduta a ser tomada em relação ao paciente (Schenk-Braat *et al.*, 2006).

O PSA, glicoproteína secretada quase exclusivamente por células epiteliais da próstata, é uma ferramenta diagnóstica simples, muito usada no rastreio do câncer de próstata e HBP, porém não é 100% confiável (Santos *et al.*, 2006). Além do que, quando seu nível não aumenta, como é mostrado em um estudo de Spencer e colaboradores (2005), com pacientes que possuíam valores de PSA normal, foi encontrada incidência de 19% de câncer prostático. A taxa alterada de PSA não diferencia entre as mudanças celulares na próstata causadas pelo câncer e as aquelas causadas por mudanças benignas, tal como o HPB. Em consequência, os testes de PSA têm uma taxa elevada de falso-positivo, que podem levar desconfortos psíquico e físico desnecessários ao paciente, como biópsias por agulha e até cirurgias (Bonn, 2002; Peracaula *et al.*, 2003).

A ultra-sonografia transretal da próstata é um método que, apesar de não possuir a sensibilidade e a especificidade que se acreditava ter inicialmente, consegue detectar maior quantidade de tumores e em estágios mais precoces do que os outros métodos e somando o seu uso ao Doppler colorido, há um aumento da sensibilidade do método de triagem do câncer (Kuligowska, 2001). No entanto, Santos e colaboradores (2006), verificaram a limitação da ultra-sonografia para detecção do câncer de próstata. Uma vez que o rastreamento inicial dos pacientes é feito pelos níveis de PSA e toque retal, a ultra-sonografia deveria ter a função de tentar diminuir o número de biópsias desnecessário, sem prejudicar a capacidade de detecção do câncer. No entanto, o caráter inespecífico do aumento do PSA, associado à sensibilidade e especificidade baixas da ultra-sonografia, prejudicou sua utilização como método de rastreio.

2.4 Lectinas

As lectinas são glicoproteínas de origem não imunológica que reconhecem carboidratos específicos, por meio de ao menos, dois sítios de ligação ao carboidrato, domínio de reconhecimento de carboidrato (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 como fungos, animais e plantas (Wang & Ng, 2006).

Lectinas vêm se mostrando como preciosa ferramenta nas pesquisas bioquímicas e biomédicas (Pratima *et al.*, 2002), pela sua estabilidade química, fácil utilização e a sua alta especificidade no reconhecimento de carboidratos distintos, associada à grande disponibilidade deste material na natureza, sendo otimizadas como marcadores de células transformadas (Sames *et al.*, 2001).

Além da aplicação como marcador tumoral, as lectinas são usadas na separação e identificação celular, detecção, isolamento e estudo da estrutura das glicoproteínas (Sharon & Lis, 2004) e recentemente também têm ganhado atenção como segunda geração de bioadesivos na entrega da droga ao tecido alvo (Lehr, 2000).

Baseando-se na sua especificidade, cinco grupos de carboidratos componentes das glicoproteínas e glicolipídios das membranas celulares podem ser identificados: glucose/manose, L-fucose, ácido siálico, N-acetil glicosamina e N-acetil galactosamina/galactose (Sharon & Lis, 2004).

Tabela 2: Especificidade de lectinas de plantas

LECTINA	ESPECIFICIDADE
<i>Canavalia ensiformis</i> (Con A)	α -D-manose/ α -D-glicose
<i>Lens culinaris</i> (LCA)	α -D-manose
<i>Ulex europaeus</i> (UEA-I)	α -L-fucose
<i>Lotus tatragonolobus</i> (LTA)	α -L-fucose
<i>Triticum vulgare</i> (WGA)	N-acetilglicosamina/Ácido siálico
<i>Ricinus communis</i> (RCA-I)	β -D-galactose
<i>Helix pomatia</i> (HPA)	N-acetilgalactosamina
<i>Arthocarpus integrifolia</i> (JCA)	α -D-galactose
<i>Pisum sativum</i> (PSA)	α -D-glicose/ α -D-manose
<i>Dolichos biflorus</i> (DBA)	β -D-galactose
<i>Limax flavus</i> (LFA)	Ácido siálico
<i>Arachis hypogaea</i> (PNA)	N-acetilgalactosamina/D-galactose

Em histoquímica as lectinas, conjugadas à peroxidase, isotiocianato de fluoresceína, éster de acridina e criptato, têm sido intensamente utilizada para caracterização de superfícies celulares como sondas na detecção de mudanças na glicosilação e na expressão de carboidratos, que ocorrem durante a embriogênese, crescimento e doença (Beltrão *et al.*, 2003, 2006). Elas estão envolvidas em vários processos biológicos, e como marcadores histoquímicos, são utilizadas na caracterização e diferenciação de tecidos normais e transformados, sendo uma técnica sensível, estável e de fácil manipulação (Beltrão *et al.*, 2001).

Os carboidratos das membranas celulares desempenham um importante papel de regulação durante o desenvolvimento e homeostase do tecido por mediar sinais celulares (Kulkarni & McCulloch, 1995). Modificação na estrutura dos carboidratos componentes dos receptores das células desestabiliza o sistema que controla a inibição por contato e a proliferação celular, que direciona as células para a transformação neoplásica. Como o padrão de glicosilação alterado é característico da malignidade, algumas lectinas funcionam como marcadores biológicos e também ajudam no mapeamento de neoplasias ou tecidos que apresentem propensão para tal (Arenas *et al.*, 1999). A histoquímica com lectinas contribui com informações sobre o desenvolvimento, estágio de diferenciação, grau de malignidade e potencial do tecido em desenvolver metástases a partir do estabelecimento de perfil de carboidratos do tecido estudado (Brooks, 2000).

Como exemplo de seu emprego como uma ferramenta histopatológica, lectinas tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de várias doenças (Dwek *et al.*, 2001), descrevendo os padrões de ligação dessas proteínas a seções de tecidos humanos transformados, provenientes da mama (Beltrão *et al.*, 1998, 2001; Campos *et al.*, 2006); de cérvix uterino (Remani *et al.*, 1994); do maxilar (Kaneko *et al.*, 2000); de cérebro humano (Nishimura *et al.*, 2000; Beltrão *et al.*, 2003); do baço (Dullman *et al.*, 2000); e metástases em nodos linfáticos (Schumacher *et al.*, 1995). Em tecidos animais destaca-se a investigação de mudanças senis em cérebros de cães, a detecção de oligossacarídeos em embriões de pássaros e o estudo dos corpos lúteos de ratos no término da gestação (Sames *et al.*, 2001).

Estudos anteriores têm demonstrado que o padrão de glicosilação muda entre os diferentes estados patológicos da próstata. Arenas (1999), empregando histoquímica com lectinas, mostrou as principais diferenças de glicosilação entre o CAP e HBP, através de

uma maior marcação com as lectinas PNA, DAS, DBA, SBA, UEA-I e AAA e menor marcação com WGA e HPA. Resíduos de N-acetilgalactosamina foram fortemente expressos na HPB, enquanto no carcinoma da próstata, a expressão de ácido siálico, galactose e resíduos de fucose foi alterada.

2.5 Criptatos de lantanídeos

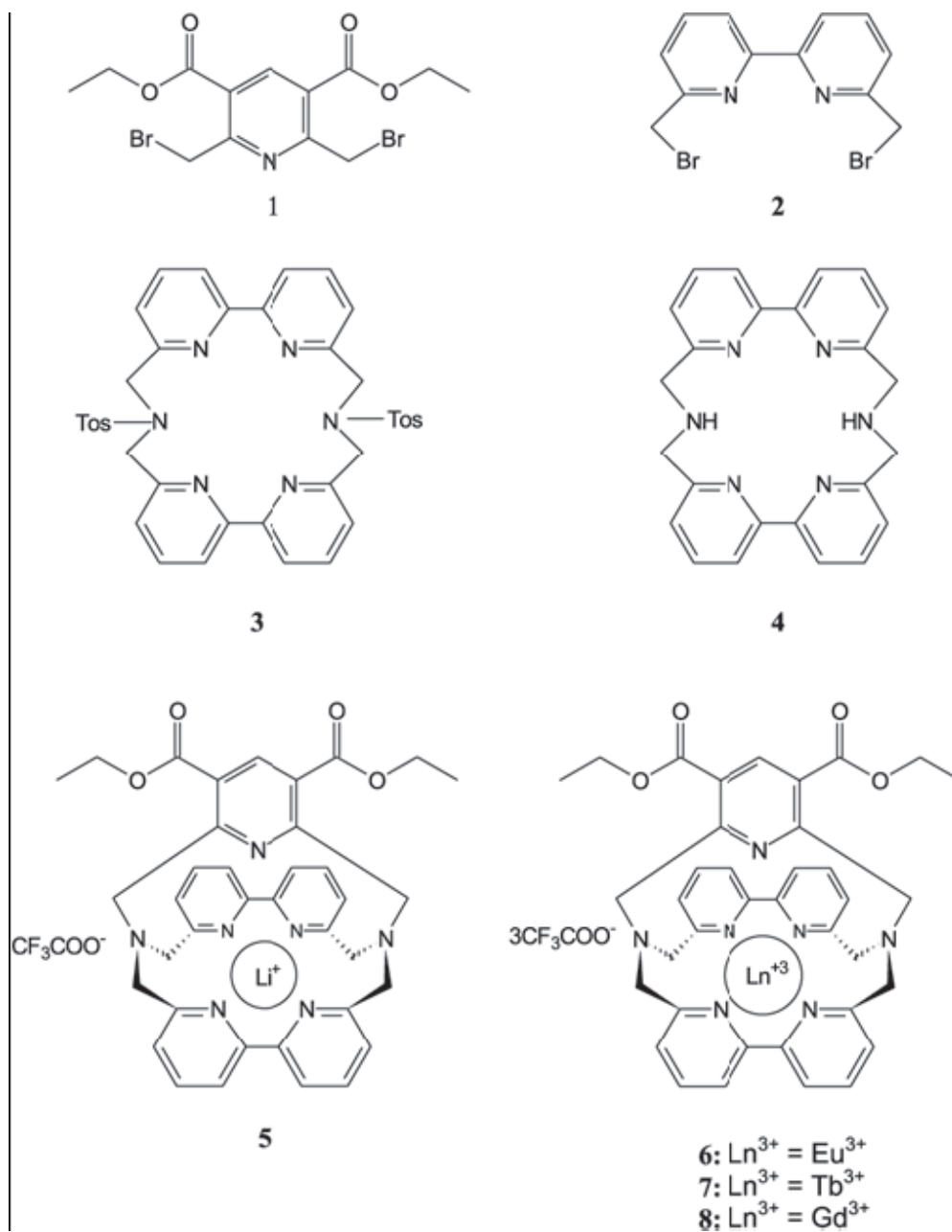
Representam uma nova classe de complexos fluorescentes. São constituídos por complexos de íons lantanídeos que apresentam boas propriedades luminescentes conhecidos como dispositivos moleculares conversores de luz (DMCLs), como exemplos de DMCLs, pode-se citar os complexos de íons lantanídeos Eu(III) e Tb(III) com criptatos (Quiocho, 1986).

Tais dispositivos possuem variadas possibilidades de emprego na área biomédica, testados e utilizados freqüentemente em aplicações médicas e clínicas como radioimunoterapia (Klein, *et al.*, 1988, Parker, 1987, Raicle, 1981), tomografia de emissão de pósitron (Loch, *et al.*, 1981, Partain, *et al.*, 1983), agente de aumento de contraste em imagem de ressonância (Tweedle, *et al.*, 1989, Lauffer, 1987, Kumar, *et al.*, 1993, Taylor, *et al.*, 1986) e marcadores luminescentes em fluoroimunoinsaíes (Lopez, *et al.*, 1993, Mathis, 1993, 1995, Sabbatini, *et al.*, 1995), onde podem como marcadores para sistemas biológicos, como na biologia molecular (Alpha-Bazin *et al.*, 2000). Dentre os compostos macrocíclicos mais estudados pode-se destacar os criptatos de lantanídeos, devido às suas habilidades de coordenação com antígenos ou anticorpos estarem bem estabelecidas (Lopez, *et al.*, 1993, Mathis, 1993, 1995, Sabbatini, *et al.*, 1995).

As primeiras espécies que apresentaram a capacidade de complexar e encapsular cátions surgiram na década de 60, a partir de trabalhos de Jean-Marie Lehn e foram denominadas criptantes, e seus complexos metálicos, criptatos.

A complexação de íons lantanídeos a criptatos gera uma alternativa para aplicação destes complexos com alta eficiência de luminescência, destacando a alta eficiência do criptato de Európio. Os criptatos de lantanídeos são macrociclos tridimensionais que formados pela inclusão de um íon lantanídeo como, por exemplo, o európio III e o térbio III, em sua cavidade intramolecular (Figura 4), que são excitados por um feixe de luz,

emitem fluorescência quando voltam a se estabilizar (Mathis, 1993). Os criptatos de lantanídeos são solúveis em água possuem alta estabilidade termodinâmica e cinética tornando-os fortes candidatos em aplicações em sistemas biológicos (Jones, 2005).



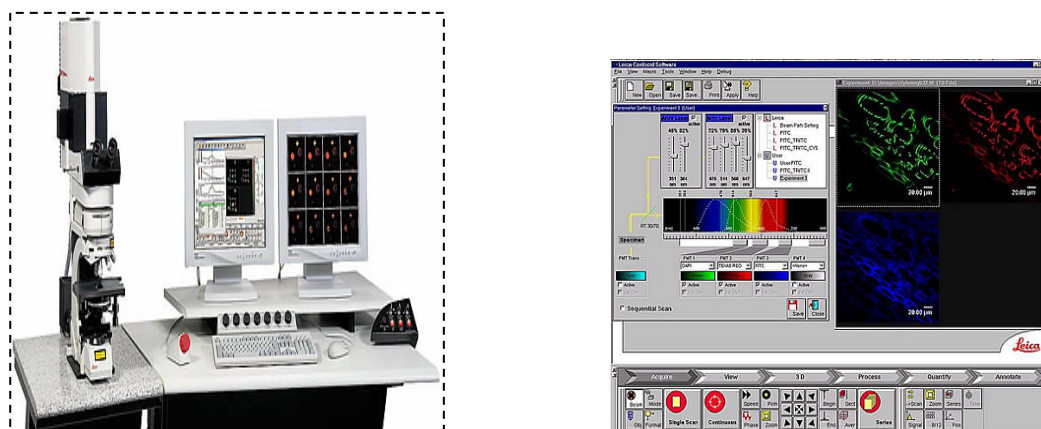
Fonte: *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 5, 709-714, 2004

Figura 4: Ligantes precursores e criptatos sintetizados: novos criptatos de lantanídeos (6-8) a partir de ligantes piridínico (1) e bipyridínicos (2-4), visando suas possíveis aplicações em sistemas biológicos.

2.6 Microscopia confocal de fluorescência

Comercialmente disponível a partir de 1987, a microscopia confocal a laser (Figura 5 e 6) apresenta peculiaridades como permitir a obtenção de imagens de planos focais específicos ou cortes ópticos, que podem ser utilizados para construção de imagens tridimensionais. O microscópio confocal trabalha com imagens digitais, ao contrário das imagens analógicas do microscópio convencional.

Este microscópio trabalha com a óptica de um microscópio de fluorescência, mas utiliza o laser como fonte alimentadora do sistema. Seu funcionamento é complexo, embora a idéia central seja simples. A microscopia confocal conta com o mesmo sistema óptico da fluorescência, mas a iluminação se dá de forma pontual, em não em todo o campo, como ocorre na microscopia de fluorescência comum. Acima da objetiva, há um *pinhole* ou íris, que elimina a luz proveniente de objetos fora do foco, contribuindo para uma imagem mais nítida e mais rica em detalhes. Além disso, dada a sensibilidade de seus detectores fotoelétricos e o controle eletrônico da intensidade dos sinais, as imagens pouco evidenciadas na microscopia de fluorescência podem ser observadas na microscopia confocal (Carvalho & Recco-Pimentel, 2001).



Fonte: Leica-Microsystem

Figura 5: Microscópio de Fluorescência Confocal e Leica Confocal Software (LCS)

3. JUSTIFICATIVA

O conhecimento de alterações bioquímicas específicas que permitam entender a regulação do crescimento celular no carcinoma da próstata é importante no desenvolvimento de novas técnicas auxiliares no diagnóstico desta patologia. Por esse motivo, o diagnóstico de patologias prostáticas necessita de ferramentas de detecção precisas o suficiente para promover sua detecção precoce, permitindo, assim, o tratamento mais adequado, melhorando a sobrevida e qualidade de vida do paciente e diminuindo a morbidade. O desenvolvimento de marcadores biológicos que mapeiem alterações bioquímicas, normais ou patológicas, nos mais diversos sistemas biológicos tem despertado o interesse de pesquisas de compostos sintéticos de fácil aplicação e alta sensibilidade. O criptato de Európio tem mostrado estas características sendo assim de importância para seu estabelecimento como um marcador celular competitivo quanto aos já existentes como o FITC para utilização na microscopia de fluorescência que permite combinar o poder de componentes óticos de alta performance com a aquisição de imagens digitais computadorizadas. Aliado a este aspecto, o fato de Pernambuco ter uma alta incidência de câncer de próstata proporcionou a motivação científica necessária para o desenvolvimento do presente trabalho visando avaliar a avaliação o, potencial do criptato de Európio, como marcador conjugado à Con A utilizado na histoquímica com lectinas para caracterização do perfil de carboidratos de tecidos sadios e transformados de próstata humana.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar a potencialidade do criptato de Európio conjugado à Concanavalina A para aplicação em histoquímica com lectinas de tecidos de próstata humana.

4.2 Específicos

- Conjugar o criptato(Eu) à Concanavalina A;
- Realizar a histoquímica com lectinas em tecidos prostáticos diagnosticados como hiperplasia prostática benigna (HPB) e carcinoma prostático (CAP);
- Analisar e comparar as marcações obtidas de Con A-Crip(Eu) através de medidas espectroscópicas de luminescência com as marcações utilizando-se Con A-FITC.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal , R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem Pharmacol*; 60 (8): 1051-9, 2000.

Andrade-Rocha FT. Physical analysis of ejaculate to evaluate the secretory activity of the seminal vesicles and prostate. *Clin Chem Lab Med*.43(11):1203-10, 2005.

Akimoto T, Katoh H, Kitamoto Y, Shirai K, Shioya M, Nakano T. Anatomy-based inverse optimization in high-dose-rate brachytherapy combined with hypofractionated external beam radiotherapy for localized prostate cancer: comparison of incidence of acute genitourinary toxicity between anatomy-based inverse optimization and geometric optimization. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys*, 1;64(5):1360-6, 2006.

Alpha-Bazin B, Bazin H, Boissy L, Mathis G. Europium cryptate-tethered ribonucleotide for the labeling of RNA and its detection by time-resolved amplification of cryptate emission. *Anal Biochem*. 1;286(1):17-25, 2000.

Arenas *et al.* A lectin histochemistry comparative study in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma. *Glycoconj J*. 16 (7):375-82, 1999.

Bazin H, Trinquet E, Mathis G. Time resolved amplification of cryptate emission: a versatile technology to trace biomolecular interactions. *J Biotechnol*. 82(3):233-50, 2002.

Beltrão, E.I.C.; Amaral, T.; Silva, J.F.; Coelho, L.C.B.B.; Carvalho-Jr, L.B. Infiltrating ductal carcinoma: a lectin histochemistry study. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*, Recife, 46(1): 32-35, 2001.

Beltrão, E.I.C.; Correia, M.T.S; Figueredo-Silva, J; Coelho, L.C.B.B. Binding Evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* Lectin to Human Mammary Tissue. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 74(3): 125-134, 1998.

Beltrão EI, Medeiros PL, Rodrigues OG, Figueredo-Silva J, Valenca MM, Coelho LC, Carvalho LB Jr. Parkia pendula lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. *Eur J Histochem.*;47(2):139-42, 2003.

Bondi AM, Gabrielli MG, Accili D, Sabbieti MG, Menghi G. Confocal evaluation of native and induced lectin binding contributes to discriminate between lingual gland glycomponents in quail. *Histol Histopathol.* 15 (4):1119-25, 2000.

Bonn, D. Predictive value of PSA in prostate cancer is doubtful. *Lancet Oncol.*, 3, 130, 2002.

Brooks, S.A., The involvement of Helix pomatia lectin (HPA) binding N-acetylgalactosamine glycans in cancer progression. *Histology and Histopathology*.V.15(Issue 1), 2000.

Brum, I.S, et al. Molecular biology in the prostate cancer. *Arq. Bras. Endocrinol Metabo.* Vol. 49, nº 05, São Paulo, 2005.

Califice S et al. Galectin-3 and cancer (Review). *Int J Oncol.* 25(4):983-92, 2004.

Campos LM, Cavalcanti CL, Lima-Filho JL, Carvalho LB, Beltrao EI. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker, *Biomarkers*.11(5):480-4, 2006.

Carvalho, H.F. & Recco-Pimentel, S.M. *A Célula 2001*. Edit. Manole, S.P., 287 pp., 2001

Chalabi, S., R. L. Easton, M. S. Patankar, F. A. Lattanzio, J. C. Morrison, M. Panico, H. R. Morris, A. Dell, and G. F. Clark,; The expression of free oligosaccharides in human seminal plasma. *J. Biol. Chem.* 277, 32562–32570, 2002.

Chan, F. L; Choi, H. L. ; Ho, S. M. Analysis of glycoconjugate patterns of normal and hormone-induced dysplastic Noble rat prostates, and an androgen-independent Noble rat prostate tumor, by lectin histochemistry and protein blotting. *The prostate*, v. 46, Issue 1, 2001.

Chen YC, Hunter DJ. Molecular epidemiology of cancer. *CA Cancer J Clin.* 55:45-54, 2005.

Cooper, Geoffrey M. – *A célula- Uma Abordagem Molecular*. 2ª Edição. Editora Artmed. Porto Alegre, 2001.

Cunha, G.R. *et al.* Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 92, 221–236, 2004.

Danguy A. *et al.* Immunohistochemical profile of galectin-8 expression in benign and malignant tumours of epithelial mesenchymatous and adipous origins and of the nervous system. *Histol. Histopathol.* 16(3);861-68, 2001.

Danielsen HE, Kildal W, Subdo J. Digital image analysis in pathology - exemplified in prostatic cancer. *Tidsskr. Nor Laeg.* 120(4): 479-88, 2000.

Dwek MV, Ross HA, Streets AJ, Brooks SA, Adam E, Titcomb A, Woodside JV, Schumacher U, Leatham AJ. Helix pomatia agglutinin lectin-binding oligosaccharides of aggressive breast cancer. *Int J Cancer.* 95(2):79-85, 2001.

Gua Y., *et al.* Phenotypic characterization of telomerase-immortalized primary non-malignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines. *Experimental cell research.* 312:831-843, 2006.

Gabius HJ. Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code. *Naturwissenschaften*. 87(3):108-21. Review, 2000.

Hawkins DM, Trache A, Ellis EA, Stevenson D, Holzenburg A, Meininger GA, Reddy SM. Quantification and confocal imaging of protein specific molecularly imprinted polymers. *Biomacromolecules*.;7(9):2560-4, 2006.

Herling M et al. Glycohistochemical monitoring of chemically induced sarcomas at different stages of tumorigenesis. *In Vivo*. 14(4): 499-506. 2000.

Huang GL, Liu TC, Liu MX, Mei XY. The application of quantum dots as fluorescent label to glycoarray. *Anal Biochem*. 1;340(1):52-6, 2005.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Câncer de próstata/Epidemiologia. Instituto Nacional do Câncer, 2006. Disponível em: URL: <http://www.inca.gov.br> (em dezembro de 2006).

Jarolim, J.E., et al. The constitutive expression of galectin-3 is down regulated in the intestinal epithelia of Crohn's disease patients, and tumour necrosis factor alpha decreases the level of galectin-3 specific mRNA in HCT-8 cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v.14, nº2, 145-52, 2002.

Kivela T. Characterization of galactose-containing glycoconjugates in the human retina: a lectin histochemical study. *Curr Eye Res*. 9(12):1195-209, 1990.

Klein, J. L.; Lechner, P. K.; Callahan, K. M.; Kopher, K. A.; Order S. E.; *Antibody, Immunoconjugates, Radiopharm*, 1, 55, 1988.

Konska G, Guerry M, Caldefie-Chezet F, De Latour M, Guillot J. Study of the expression of Tn antigen in different types of human breast cancer cells using VVA-B4 lectin. *Oncol Rep*.15(2):305-10, 2002.

Kuligowska E, Barish MA, Fenlon HM, Blake M. Predictors of prostate carcinoma: accuracy of gray scale and color Doppler US and serum markers. *Radiology*;220:757-764, 2001.

Kulkarni GV, McCulloch CA. Concanavalin A induced apoptosis in fibroblasts: the role of cell surface carbohydrates in lectin mediated cytotoxicity. *J Cell Physiol.* 165(1):119-33, 1995.

Kumar, K.; Tweedle, M. F.; *Pure Appl. Chem.* 65, 515, 1993.

Lauffer, R. B.; *Chem. Rev.* 87, 901, 1987.

Lerh, C. M. Lectin-mediated drug delivery: the second generation of bioadhesives. *J. Contr. Rel.* 65, 19-29, 2000.

Li., LC., *et al.* DNA methylation in prostate câncer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004.

Lin HM, Pestell RG, Raz A, Kim HR. Galectin-3 enhances cyclin D (1) promoter activity through SP1 and a cAMP responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene* 21:8001-8010, 2002.

Litynska A, Przybylo M, Pohec E, Kremser E, Hoja-Lukowicz D, Sulowska U. Does glycosylation of melanoma cells influence their interactions with fibronectin? *Biochimie.* May;88(5):527-34. Epub 2005 Dec 5, 2006.

Loch, C.; Maziere, B.; Comar, D.; *J. Nucl. Med.* 21, 171, 1981.

Lopez E, Chypre C, Alpha B, Mathis G. Europium(III) trisbipyridine cryptate label for time-resolved fluorescence detection of polymerase chain reaction products fixed on a solid support. *Clin Chem.*39(2):196-201, 1993.

Manaskova P, Rylava H, Ticha M, Jonakova V. Characterization of proteins from boar prostate. *Am J Reprod Immunol.* 48(4):283-90, 2002.

Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol.* 253(2):165-74,2002.

Martti-Latva, H.T.; Mukkala, V-M.; Matachescu, C.; Rodriguez-Ubis, J.C.; Kankare, J.; *Journal of Luminescence*, 75:149, 1997.

Mathis G. Time resolved amplification of cryptate emission: a versatile technology to trace biomolecular interactions. *J Biotechnol.*82(3):233-50, 2002.

Mathis G. Rare earth cryptates and homogeneous fluoroimmunoassays with human sera. *Clin Chem.*39(9):1953-9,1993.

Mathis, G.; *Clin. Chem.* 41, 1391, 1995.

Mercader M., et al., Early effects of pharmacological androgen deprivation in human prostate cancer. *BJU Int.* 99(1): 60-7, 2007.

Nishimura M, Inouye S. Inhibitory effects of carbohydrates on cholesterol esterase biosynthesis in *Streptomyces lavendulae* H646-SY2. *J Biosci Bioeng.*90(5):564-6, 2000.

Orr FW, Wang HH. Tumor cell interactions with the microvasculature: a rate-limiting step in metastasis. *Surg Oncol Clin N Am.* 10(2):357-81, 2001.

Parker, D.; Morphy, J. R.; Karl, J.; Jonathan, C.; *Pure Appl. Chem.* 61, 1637.

Partain, C. L.; James, A. E.; Rollo, F. D.; Price, R. R.; *Nuclear Magnetic Ressonance (NMR) Imaging*, W. B. Saunders, 1983.

Peracaula,R. et al. Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. *Glycobiology.* Vol. 13 no. 6 pp. 457±470, 2003.

Phipps S, Yang THJ, Habib FK, Reuben RL, McNeill SA Measurement of tissue mechanical characteristics to distinguish between benign and malignant prostatic disease. *Urology*. 66: 447–450, 2005.

Porkka, K.P., et al., Molecular Mechanisms of Prostate Cancer. *European Urology*, 45, 683-691, 2004.

Pratima *et al.*, Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *Trends in Molecular Medicine*. Review. Vol. 8.no. 04., 2002.

Przybylo M, Litynska A, Pochec E. Different adhesion and migration properties of human HCV29 non-malignant urothelial and T24 bladder cancer cells: role of glycosylation. *Biochimie*. 87(2):133-42, 2005.

Raicle, M. E.; *Adv. Chem. Ser.* 197, 419, 1981.

Rêgo, MJB, Santos, LX, Carvalho-Junior, LB, Beltrao, EIC, Sobral, APV. Lectin Histochemistry of Mucoepidermoid Carcinoma. *Oral Oncology*, 1(1):178-179, 2005.

Remani, P, Pillai, KR, Haseenabeevi, VM, Ankathil, R, Bhattathiri, VN, Nair, MK, Vijayakumar, T. Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. *Neoplasma*, 41(1):39-42, 1994.

Rivoire, WA et al. Molecular biology of cervical cancer. *Rev. Bras. Saude Mater. Infant.*, Recife, v.6, n.4, 2006.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Bases Patológicas das Doenças*. 7ª Edição. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro-RJ; 338p, 2005.

Roehrborn CG. The development of lonidamine for benign prostatic hyperplasia and other indications. *Rev Urol*. 7 Suppl 7:S12-20, 2005.

Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Manet, I.; Ziessel, R.; Lehn, J. M.; *Med. Biol. Environ.* 23, 101, 1995.

Sabbieti MG, Gabrielli MG, Menghi G, Materazzi G, Marchetti L. Lectin cytochemistry on developing rat submandibular gland primary cultures. *Histol Histopathol.*;19(3):853-61, 2004.

Sakairi, A. et al. Cytochemical Localization of Glycoconjugates in the Secretory Epithelial Cells Lining the Prostate Gland of the Miniature Pig. *Anat. Histol. Embryol.* 35, 162–166. 2006.

Sames, K.H., Schumacher, U.,m Van Damme, E.J.M., Moll, I., Halata, Z., Proteoglycan and lectin histochemistry of neuroendocrine carcinomas of the skin. *FASEB Journal.* 15(5): A1072, 2001.

Santos, V; Milito, M; Marchiori, E. O papel atual da ultra-sonografia transretal da próstata na detecção precoce do câncer prostático *Radiol. Bras.* v.39 n.3 São Paulo, 2006.

Sharon, N. and Lis, H. History of Lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology.* vol. 14, no. 11, pp. 53R-62R, 2004.

Schumacher DW, Hoogenraad JH, Pinkos D, Bucksbaum PH. Programmable cesium Rydberg wave packets. *Phys Rev A.*52(6):4719-4726, 1995.

Schenk-Braat EA., Bangma CH. The search for better markers for prostate cancer than prostate-specific antigen. *Ned Tijdschr Geneesk.* 10;150(23):1286-90, 2006

Spencer JA, Alexander AA, Gomella L, Matteucci T, Goldberg BB. Clinical and US findings in prostate cancer: patients with normal prostate-specific antigen levels. *Radiology*;189: 389-393, 2005.

Stevens, A & Lowe, J. *Histologia Humana*. Editora Manole. 2ª Edição 2002.

Stenman M, Ainola M, Valmu L, Bjartell A, Ma G, Stenman UH, Sorsa T, Luukkainen R, Konttinen YT Trypsin-2 degrades human type II collagen and is expressed and activated in mesenchymally transformed rheumatoid arthritis synovitis tissue. *Am J Pathol (The American journal of pathology)*. Volume: 167 Edição: 4 Páginas: 1119-24, 2005.

Taylor, D. L.; Waggoner, A. S.; Murphy, R. F.; Lanni, F.; Birge, R. R.; *Applications of Fluorescence in Biomedical Sciences*, Eds. A. R. Liss Inc., 1986.

Truong LD, Phung VT, Yoshikawa Y, Mattioli CA. Glycoconjugates in normal human kidney. A histochemical study using 13 biotinylated lectins. *Histochemistry*. 90(1):51-60. 1988.

Tweedle, M. F.; Bünzli, J. C.; Choppin, G. R.; *Lanthanide Probes In Life, Chemical, and Science*, Elsevier, 1989.

Wang, H.X.; Ng, T.B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. *Biochem Biophys Commun*. 342 (1): 349-53, 2006.

Weikkolainen K, Aitio O, Blomqvist M, Natunen J, Helin J. Conjugation of oligosaccharides by reductive amination to amine modified chondroitin oligomer and gamma-cyclodextrin. *Glycoconj J*. 2007.

Wroblewski BM, Siney PD, Fleming PA. Triple taper polished cemented stem in total hip arthroplasty: rationale for the design, surgical technique, and 7 years of clinical experience. *J Arthroplasty*. 16(8 Suppl 1):37-41, 2001.

Wong YC, Wang XH, Ling MT. Prostate development and carcinogenesis. *Int Rev Cytol*.;227:65-130, 2003.

Yoshida M, Cran DG, Pursel VG. Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Mol Reprod Dev.*;36(4):462-8,1993.

Yu LG, *et al.* Oposite effects on human colon cancer cell proliferation of two dietary Thomsen-Friedereich antigen-binding lectins. *J. Cell. Physiol.* 186(2): 282-87, 2001.

Zerbib, Marc. *Próstata. 100 perguntas e respostas*. Editora Larousse, 1ª edição, 2003.

9. ANEXO

Trabalhos apresentados durante o mestrado.

Janielle K.G.Medeiros, Elton M.G. Silva; Carolina B. Patriota; Eduardo I.C. beltrão. Con A conjugated to criptate as luminescent histochemistry marker to human prostate tumour. *VII Reunião Regional Nordeste da sbbq and 3rd International Symposium in Biochemistry and Biotechnology*. Natal-RN. Dez, 2006.

Janielle Medeiros; Elton Menezes; Carolina Patriota; Eduardo Beltrão. Con A conjugated to criptate as luminescent histochemistry marker to human prostate tumour. *II Jornada Científica do LIKA*. Recife-PE. Dez, 2006.