

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIO RIBEIRO DE MELO-JUNIOR

**IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPOS EM COMPÓSITO DE
POLISILOXANO-ÁLCOOL POLIVINÍLICO PARA USO EM
IMUNODIAGNÓSTICO**



Recife, 2006

MARIO RIBEIRO DE MELO-JUNIOR

**IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPOS EM COMPÓSITO DE
POLISILOXANO-ÁLCOOL POLIVINÍLICO PARA USO EM
IMUNODIAGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de concentração - Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Luiz Bezerra de Carvalho Junior, M.D., Ph.D.

Co-orientadores:

Prof. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, Ph.D.

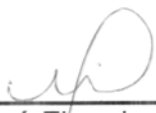
Prof. Nicodemos Teles de Pontes-Filho, M.D., Ph.D.

**Tese: Imobilização de anticorpos em compósito de Polisiloxano-Álcool
polivinílico para uso em imunodiagnóstico**

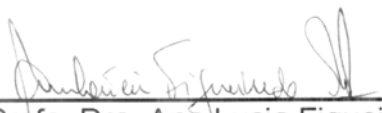
Doutorando: Mario Ribeiro de Melo-Junior

Data da defesa: 01 de Dezembro de 2006

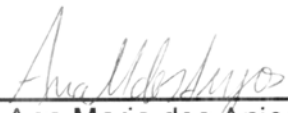
Banca Examinadora:



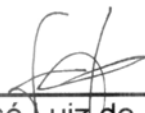
Prof. Dr. José Figueiredo da Silva
Universidade Estadual do Piauí (UESPI)
Faculdade de Ciências Médicas (FACIME)



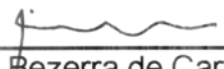
Profa. Dra. Ana Lucia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)



Profa. Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)



Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)



Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

Em agradecimento

A você amigo(a), só tenho a agradecer... Hoje tenho a certeza de que sem sua ajuda, paciência e compreensão... Tudo seria mais difícil !!!

Um trabalho de tese é um labor que não se completa sozinho... E mais do que nunca tenho a certeza disso.

Com você aprendi muito, e me sinto extremamente honrado de ter convivido verdadeiramente com pessoas de bem, como você.

Muito Obrigado !!!

M.R. Melo-Junior

SUMÁRIO

	Pág
RESUMO	6
INTRODUÇÃO	7
REVISÃO DA LITERATURA	9
A ARTE DA IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	9
Compostos híbridos orgânico/inorgânico	12
A experiência do grupo de pesquisas “Proteínas Imobilizadas”	17
DOENÇAS TUMORAIS DA PRÓSTATA	22
MARCADORES TUMORAIS	26
Proteínas S100	27
Galectinas	30
MOTIVAÇÃO CIENTÍFICA	34
MODELOS EXPERIMENTAIS	35
OBJETIVOS	36
RESULTADOS	37
CAPÍTULO I - <i>Polysiloxane-Polivinil Alcohol discs as support for antibody immobilization: Ultra-structural and Physical-chemical characterization.</i>	37
CAPÍTULO II - <i>Detection of S100 Protein from prostatic cancer patients using anti-S100 Protein antibody immobilized on POS-PVA discs.</i>	44
CAPÍTULO III - <i>Immobilization of anti-Galectin-3 onto POS-PVA discs used in ELISA for tumor prostatic diseases.</i>	51
CAPÍTULO IV - <i>POS-PVA (Polysiloxane-Polyvinyl Alcohol) discs: A new compatible polymer for immobilization of immunologic biomolecules</i>	73
CONCLUSÕES	79
PERSPECTIVAS	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXOS	93

RESUMO

Buscou-se neste trabalho a síntese de um polímero a base de Polisiloxano (POS)-Glutaraldeído-Álcool polivinílico (PVA), mediante o processo sol-gel, sendo obtidos discos com diâmetro médio de 4,0 mm² que foram utilizados como suporte sólido para imobilização de anticorpos. Inicialmente, através de microscopia eletrônica, foi feita a caracterização ultra-estrutural dos discos antes e depois das etapas de imobilização, bem como foram realizados testes da análise química elementar e espectro infravermelho dos discos. O anticorpo monoclonal anti-Proteína S100 humana foi covalentemente fixada à rede semi-interpenetrada de POS-PVA e utilizado em ensaios imunoenzimáticos tipo ELISA para avaliar a capacidade de detecção da proteína S100 contida no soro de pacientes portadores de adenocarcinoma prostático e indivíduos sadios. Os discos de POS-PVA fixaram até 92,8% de anticorpo oferecido (7,72 µg de anticorpo/disco). Os melhores valores de anticorpo anti-Proteína S100 imobilizado e diluição do soro foram 10 µg e 1:400, respectivamente. Foi realizada a leitura da densidade ótica dos imunoenaios para proteína S100 sérica obtendo-se a partir dos soros dos pacientes com adenocarcinoma prostático ($0,425 \pm 0,042$) valores significativamente menores ($p < 0,05$) quando comparados àqueles encontrados nos soros dos indivíduos sadios ($1,034 \pm 0,124$). O anticorpo anti-Galectina-3 também foi imobilizado e avaliada a capacidade de reconhecer a proteína sérica. Semelhante aos resultados da proteína S100, também ocorreu um decréscimo significativo no soro de pacientes portadores de câncer de próstata. Também foi realizado um estudo imunohistoquímico a partir de fragmentos de tecido prostático utilizando o mesmo anticorpo a fim de comparar os resultados da expressão tecidual da proteína com aqueles valores séricos obtidos pelo teste ELISA com os discos de POS-PVA. Pode-se verificar uma nítida diferença entre os níveis teciduais e sorológicos da Proteína S100, constatando-se que o método sorológico é mais sensível e menos invasivo para avaliar os níveis desta proteína entre diferentes doenças tumorais da próstata. Conclui-se então, que a rede semi-interpenetrada de POS-PVA, aliado à sua fácil síntese e baixo custo, presta-se como modelo de suporte para a imobilização covalente de anticorpos e a partir disso pode ser utilizado no desenvolvimento de imunossensores para diferentes tipos de doenças.

Palavras-Chave: Polímero, anticorpos, imobilização

INTRODUÇÃO

Atualmente, os imunoensaios são as técnicas analíticas predominantes em testes diagnósticos e também representam uma das tecnologias de mais rápido crescimento para a análise de biomoléculas (Borrebaeck, 2000). Eles são capazes de operar em uma ampla faixa de concentração dinâmica, utilizar diferentes fluidos biológicos (sangue, urina, saliva, etc.) e empregar vários formatos distintos (ELISA, ensaios fluorimétricos, radiométricos, biossensores de ondas, imobilização de biomoléculas, dentre outros) para fornecer ensaios sensíveis, baratos e específicos (Ronald & Stimson, 1998; Qoronfleh et al., 2003).

Imunoensaios podem ser definidos como métodos de análise que se baseia na detecção e quantificação da reação antígeno-anticorpo (Morgan et al., 1996), sendo o reconhecimento do antígeno pelo anticorpo o ponto crucial deste tipo de fenômeno, resultando na formação de um complexo-imune com grande especificidade (Bilitewski, 2006).

Uma das técnicas bastante difundida é a imobilização de proteínas de interface imunológica, como antígenos e anticorpos (Shmanai et al., 2001). Entretanto, inexistiu um método universal ou um suporte ideal para a imobilização de todos os tipos de biomoléculas o que tem levado ao desenvolvimento de uma vasta gama de métodos para imobilizar reagentes biológicos (Ingersoll & Bright 1997; Mateo et al., 2000). Para esse fim, têm sido propostos diferentes suportes sólidos para o aprisionamento dessas moléculas e manutenção da sua atividade biológica (Kanno et al., 2000; Volle et al., 2003; Lee et al., 2006).

O grupo de pesquisas “Proteínas Imobilizadas”, lotado na Universidade Federal de Pernambuco, tem desde a década de 80, se dedicado ao desenvolvimento de novos suportes sólidos para a imobilização de enzimas e antígenos. Tendo desta forma, contribuído com novas ferramentas biotecnológicas para o estudo de doenças metabólicas e parasitárias (CNPq-DGP, 2006).

Várias proteínas tumor-específicas ou proteínas correlatas tem atraído o interesse de bioquímicos, imunologistas e patologistas, devido à sua influência nos processos de modulação da adesão celular, diferenciação e carcinogênese. E

desta forma, têm sido implicadas como fatores-chave nos mecanismos de formação de uma variedade de tumores (Danguy et al., 2002; Mason et al., 2002).

Evidências recentes apontam no sentido de estimular estudos que visem proceder ao mapeamento de proteínas séricas, como a proteína S100, Ki-67, p-53, galectinas, citocinas e moléculas de adesão, como a PECAM-1 em indivíduos portadores de neoplasias, o que tornou este tipo de abordagem metodológica, uma das principais ferramentas para se elucidar diversos aspectos do processo de carcinogênese em humanos (Rak & Yu, 2004; Perschbacher et al., 2004).

Na presente proposta de trabalho, pretende-se utilizar o polímero à base de Polisiloxano-Álcool polivinílico (POS-PVA), na forma de discos, como suporte sólido para imobilização de anticorpos, através de método ELISA, no mapeamento das proteínas no soro de pacientes com doenças tumorais prostáticas e comparar os resultados do imunoensaio com aqueles obtidos na imunohistoquímica, com a expressão destas mesmas proteínas presentes nos tecidos de próstata.

A Arte da Imobilização de Biomoléculas

A importância da imobilização de biomoléculas é evidenciada pelo fato de muitos bioprocessos comerciais se basearem em catalisadores imobilizados, por exemplo, para a produção de antibióticos, além de uma ampla variedade de produtos farmacêuticos e métodos laboratoriais de análise clínica auxiliares no diagnóstico de diversos processos patológicos (Gill & Ballesteros 2000; Shmanai et al., 2001; Torrance et al., 2006).

Os mais diferentes tipos de biomoléculas têm sido imobilizados e testados em diversos sistemas de análise, principalmente em suportes poliméricos, conforme indicado na **tabela 1**.

Tabela 1. Diferentes tipos de biomoléculas imobilizadas em suportes sólidos a base de silicatos e compostos polivinílicos.

Biomolécula	Modelo/suporte	Referência
Enzimas	Lipase-Polyvinil formal	Chen & Hwang, 2003;
	Lipase-PEG	Soares et al., 2003
DNA/RNA	Oligonucleotídeos-Silica-Agarose	Afanassiev et al., 2000;
	Oligonucleotídeos-3-mercaptopropil-silano	Rogers et al., 1999
Aminoácidos	Gly-Arg-Gly-Asp-Tyr-Silicato	Massia & Hubbell, 1999;
	Oligopetídeos- Glicofase de vidro	Bain & Hoffman, 2002
Anticorpos	Anti-peroxidase-Epoxi silicato	Fuentes et al., 2005;
	Anti-proteína G-Resina de fluocarbono	Tanaka et al., 2006

Os anticorpos têm sido utilizados há mais de cinquenta anos como reagentes diagnósticos, mas, sob as condições atuais, os imunoensaios se originaram com o trabalho de Yarlow & Berson, publicado em 1959. Neste trabalho, os autores utilizaram anticorpos anti-insulina para dosar os níveis deste hormônio em plasma sanguíneo. Para tanto, eram utilizados derivados radioisotópicos (^3H , ^{125}I) como marcadores para evidenciar a reação antígeno-anticorpo (Ronald & Stimson, 1998). Durante a década seguinte não houve grandes mudanças nas tecnologias empregadas, apesar dos progressos alcançados nas técnicas de marcação, nos métodos de separação de marcadores livres e ligados, e na produção de anticorpos.

Contudo, cada vez mais as interações imunológicas antígeno-anticorpo têm sido utilizadas para determinar concentrações de moléculas de interesse biotecnológico, médico e farmacêutico (Butler, 1996; Lu et al., 1996).

Segundo dados da literatura, Sarkar e Mandal (1985) foram os primeiros a desenvolver imunoensaios a partir de anticorpos imobilizados em suportes apropriadamente construídos para o aprisionamento desta biomolécula. A partir de então, diversas técnicas e aprimoramentos têm sido testados a fim de melhorar este tipo de modelo de ensaio (Shmanay et al., 2001; Qoronfleh et al., 2003; Reiter et al., 2004; Bilitewski, 2006).

Muitos estudos têm comparado métodos de imobilização de anticorpos em diferentes suportes para o desenvolvimento de biosensores. Dentre os métodos consagrados, os mais testados são a adsorção físico-química e atração covalente (Butler et al., 1993; Mateo et al., 2000; Taylor et al., 2005; López-Gallego et al., 2005; Betancor et al., 2006; Lee et al., 2006).

É sabido que o sucesso da imobilização de uma molécula biologicamente ativa requer uma boa acessibilidade estérica para manutenção da capacidade ligante da molécula permanecer ativa (Kumar et al., 2004; Masson et al., 2005). Além disso, também é fundamental que a superfície de escolha para aprisionar a molécula a ser imobilizada seja de tal forma inerte para que se evite a adsorção de outras moléculas que poderão causar interferência no sinal emitido pelo biosensor (Benhar et al., 2001; Ziegler & Torrance, 2002; Bradbury & Marks, 2004; Torrance et al., 2006).

A imobilização de anticorpos em suportes sólidos é uma etapa essencial para os processos de análise dos imunoensaios. Para se explorar a seletividade e a afinidade dos anticorpos, são necessárias manter sua atividade biológica intacta sendo necessário uma mínima orientação das regiões “Fab”, mantendo-as livres para que ocorra a interação com o antígeno de interesse (Tanaka et al., 2006).

Por outro lado, o desenvolvimento dos imunoensaios inclui a necessidade de aperfeiçoamento da robustez, simplicidade, custo, sensibilidade, precisão ou simplesmente a necessidade de evitar o uso das patentes existentes (Ronald & Stimson, 1998). A insatisfação em relação a vários aspectos do atual desempenho dos imunoensaios (velocidade, sensibilidade, confiabilidade, preço e automação), necessariamente levará ao contínuo desenvolvimento de novos marcadores e estratégias de ensaio (Kricka, 1994; Fuentes et al., 2005).

Os imunoensaios compreendem, portanto, uma variedade de técnicas para a detecção e quantificação da interação antígeno-anticorpo, com um grande número de arranjos dos diferentes marcadores e sistemas de detecção disponíveis (Ronald & Stimson, 1998).

Os imunoensaios heterogêneos são assim denominados por consistirem de duas fases, sendo uma sólida e a outra fluida (Butler, 2000). Neste tipo de ensaio, uma ou mais etapas de separação são necessárias para remover o excesso de reagente não utilizado (Rongen et al., 1997).

Um interessante modelo de imunoensaio utilizando anticorpos imobilizados foi primeiro proposto pelo trabalho de Butler e colaboradores em 1993, representando um marco importante para os trabalhos subsequentes utilizando o sistema “suporte-anticorpo-antígeno-anticorpo marcado”. Nesses ensaios tipo “sandwich”, utiliza-se idealmente dois anticorpos, gerados contra dois epitopos do antígeno diferentes e espacialmente separados (Ronald & Stimson, 1998). O anticorpo de captura é imobilizado em um suporte sólido e a amostra é adicionada; o antígeno presente na amostra se ligará ao anticorpo imobilizado; toda amostra não fixada é removida e o antígeno capturado é detectado pela adição de um segundo anticorpo marcado (**Figura 1**).



Figura 1 – Esquema de ensaio tipo “sandwich”. - suporte sólido; - anticorpo de captura; - segundo anticorpo marcado ; - antígeno.

Daí então, diversos suportes têm sido construídos e testados a fim de aumentar a eficiência das moléculas ou células imobilizadas. A formação de redes (semi)interpenetradas a partir de compostos híbridos a através da tecnologia sol-gel, configura-se atualmente uma das técnicas mais utilizadas (Chen & Hwang, 2003; Fuentes et al., 2005).

Compostos híbridos orgânico/inorgânicos

Devido a descoberta de Braun e colaboradores (1990), uma nova classe de materiais apropriados para a imobilização de biomoléculas surgiu, onde uma proteína pode ser aprisionada em uma matriz sol-gel vítrea, sem perda de sua atividade biológica. Esse material inorgânico é particularmente atrativo para a fabricação de biosensores por ser quimicamente inerte, apresentar rigidez física, e alta estabilidade térmica e fotoquímica, além de absorver quantidades mínimas de água ou solventes orgânicos. Entretanto, a molhabilidade de alguns materiais vítreos não é alta e depende dos monômeros utilizados. Sabe-se atualmente que matrizes tanto altamente hidrofóbicas como completamente hidrofílicas não são adequadas para aplicações em sensores.

Vários trabalhos estão descritos na literatura utilizando materiais híbridos como as redes poliméricas interpenetradas (IPNs) compostas de alginato, agar, gelatina, polivinilpirrolidona, álcool polivinílico e polietilenoglicol, com silicatos e siloxanos, para o encapsulamento de proteínas (Gill, 2001). As IPNs são tipos específicos de blendas poliméricas consistindo de dois ou mais polímeros entrelaçados sem nenhuma ligação covalente ou enxerto entre eles (Azevedo et al. 1999). As IPNs de polímeros orgânicos e silicatos/siloxanos apresentam

estabilidade química e mecânica significativamente aumentadas e grande biocompatibilidade quando comparadas aos seus componentes isoladamente (Gill & Ballesteros, 2000).

Além das IPNs, também são bastante testadas as chamadas Redes Semi-interpenetradas (SIPNs). As redes semi-interpenetradas ou pseudo-interpenetradas são copolímeros formados por um ou mais componentes da rede formando estruturas lineares, que não estabelecem interações químicas muito fortes entre os demais componentes, podendo ser retirados da rede (polímero) sem desestruturar os demais componentes (Turner, 2000; Bilitewski, 2006).

O processo mais prático e rápido de construção das IPNs e SIPNs tem sido a tecnologia sol-gel, que desde sua concepção, no início do século XX, tem se mostrado notadamente versátil na fabricação de matrizes de óxidos metálicos, sílica e organosiloxanos, de porosidade definida, na forma de monolitos, fibras, particulados e filmes finos ou espessos. Este tipo de material tem encontrado amplo uso nas áreas de óptica, sensores, catalisadores e revestimentos (Gill & Ballesteros, 2000; Cunha et al., 2006).

Vidros (silicatos) podem ser preparados pelo processo sol-gel alcóxido. Esta técnica envolve reações de hidrólise de precursores monoméricos (alcóxidos metálicos) a baixa temperatura com subsequente condensação dos hidróxiderivados (**Figura 2**) e posterior secagem, maturação e sinterização (Kim et al., 2001, Oréfice et al., 2001, Barros et al., 2002).

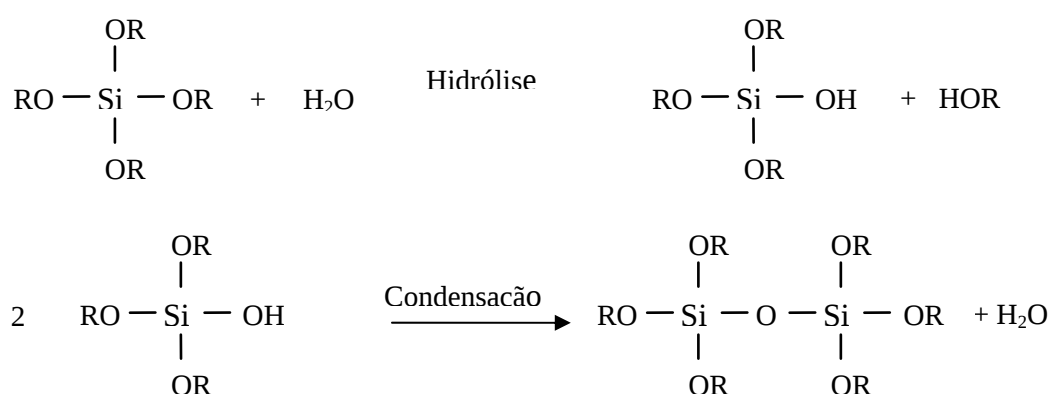


Figura 2 - Hidrólise e policondensação de alquilsilicato (R- grupamento alquila).

Além da baixa temperatura utilizada, homogeneidade e baixa concentração de impurezas são outras vantagens deste processo (Boonstra & Baken 1989). Uma característica muito importante da polimerização sol-gel é que sais, complexos metálicos e corantes orgânicos podem ser incorporados antes da formação do hidrogel, fornecendo um sol-gel dopado. A capacidade de formar vidros inorgânicos dopados sob condições aquosas e temperatura ambiente levou à possibilidade de estender este tipo de processo ao encapsulamento de biomoléculas (Gill & Ballesteros, 2000; Bilitewski, 2006).

Inúmeros trabalhos têm sido publicados utilizando esta técnica em aplicações diversas, como por exemplo: revestimento reativo (filmes e tintas) incluindo pronase ou α -quimotripsina (Kim *et al.* 2001); biossensor de fibra óptica contendo albumina de soro humano ligada a um marcador fluorescente (Flora & Brennan, 1999); tirosinase imobilizada em sensor amperométrico (Wang *et al.* 2000); imunossensor para detecção de imunoglobulina anti-IgG (Fuentes *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2006).

A utilização de compostos híbridos em substituição aos vidros simples permite aliar as qualidades do processo sol-gel às características dos componentes inorgânico e orgânico. Pontos favoráveis da matriz vítrea incluem: inércia química, baixa absorção de água ou solventes orgânicos e boa estabilidade térmica e fotoquímica (Barros *et al.* 2002). Entretanto, suportes obtidos apenas a partir de precursores inorgânicos podem apresentar valores muito elevados de hidrofobicidade, ou ainda serem friáveis, possuírem porosidade limitada e funcionalidade química pouco flexível (Gill & Ballesteros 2000). A adição de compostos orgânicos visa agregar características que estão ausentes e que são necessárias à finalidade a que se destina o suporte (Chen & Hwang, 2003).

O álcool polivinílico (PVA) é um polímero orgânico biocompatível que pode ser moldado sob diversas formas (filmes, grânulos, fibras, discos, etc) e cuja rota de síntese mais comum é a alcoólise do poli(acetato de vinila) (Azevedo *et al.*, 1999, Shottner, 2001). Sua molécula é formada por uma longa cadeia de átomos de carbono unidos por meio de ligações simples e que apresentam hidroxilas que se repetem alternadamente ao longo da cadeia, conforme a estrutura a seguir (**Figura 3**).

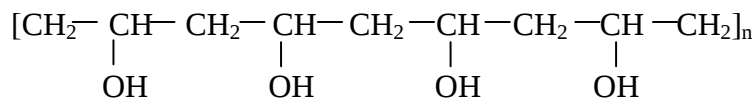


Figura 3 – Representação esquemática da estrutura do álcool polivinílico.

O uso do PVA na imobilização de proteínas têm sido amplamente descrito em sistemas que incluem desde células (Ting & Sun 2000) a enzimas (Taylor et al., 2005) e antígenos (Carvalho Jr et al. 1996; Araújo et al. 1998; Barbosa et al. 2000; Barros et al., 2002; Coelho et al., 2002; Coelho et al., 2003). Por outro lado, este polímero tem sido utilizado também para evitar adsorção indesejada de proteínas, com aplicação especialmente em sistemas cromatográficos (Barrett et al. 2001). Em relação a outros materiais poliméricos, o PVA é considerado um material de baixo custo, com alta estabilidade, durabilidade e resistência mecânica (Ting & Sun, 2000; Chen et al., 2003).

O processo sol-gel significa basicamente a síntese de uma estrutura inorgânica por uma reação química em solução, a baixa temperatura (Schmidt, 1997). O processo sol-gel alcóxido é um método eficiente de preparação de vidro (silicato) pela hidrólise de precursores alquilsilanos e pela subsequente condensação dos silanóis formados, seguida dos processos de secagem e sinterização (**Figura 4**).

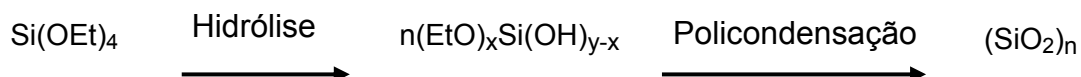


Figura 4 - Hidrólise e policondensação do tetraetoxisilano.

As vantagens dessa técnica são a homogeneidade, pureza dos géis e a temperatura de sinterização relativamente baixa. Tais vantagens são importantes na preparação de produtos monolíticos, filmes finos e fibras óticas. O conhecimento dos efeitos dos vários parâmetros envolvidos nas reações químicas das diversas etapas do processo sol-gel leva a um melhor controle do processo e, conseqüentemente, a uma melhor reprodutibilidade do produto final (Kim et al., 2001; Lei et al., 2004).

A técnica sol-gel também é um excelente método para preparar materiais híbridos. A baixa temperatura de síntese permite a incorporação de espécies orgânicas ou inorgânicas em matrizes rígidas de óxido de silício sem haver degradação. O composto resultante combina as propriedades químicas e físicas da nova espécie com uma excelente estabilidade química, óptica e térmica da matriz vítrea (Barros et al., 2002; Coelho et al., 2002; Coelho et al., 2003).

Os compostos híbridos orgânico/inorgânicos derivados do processo sol-gel são materiais que podem ser desenvolvidos para uma vasta gama de aplicações. A diversidade estrutural é alcançada através da variação da proporção relativa entre os conteúdos orgânico e inorgânico, do nível de complexidade estrutural do componente orgânico e sua natureza química, da composição química da molécula inorgânica precursora. Conseqüentemente, a matriz sintética oferece a possibilidade de obtenção de um composto com múltiplos componentes, desenhado especificamente para uma determinada aplicação (Barros et al., 2001).

Dentre os métodos para detecção das moléculas imobilizadas, o ELISA ainda é, atualmente, o mais utilizado. Assim, esta técnica utiliza uma matriz sólida onde ocorre a fixação de imunoreagentes, facilitando a separação dos reagentes não ligados do imunocomplexo, e o “gerador do sinal” ou “reporter” é uma enzima ou substância fluorescente (Butler, 2000; Coelho et al., 2001; Torrance et al., 2006).

Inúmeros testes têm sido desenvolvidos utilizando esta técnica ou suas variações para diversas aplicações como, por exemplo, em monitoramento ambiental e detecção de pesticidas (Kramer et al., 2001; Magalhães et al., 2001; Moreno et al., 2001), indústria alimentícia (Abad et al., 2001; Pallini et al., 2001), veterinária (Klausen et al., 2001; Soutullo et al., 2001) e para o diagnóstico de diversas patologias humanas (Vidal et al., 2005; Róldan et al., 2006).

A Experiência do Grupo de Pesquisas “Proteínas Imobilizadas”

Em 1970, iniciava-se no Depto. de Bioquímica da UFPE, sob a liderança do Prof. William Macdonald Ledingham da Universidade de Saint Andrews, Escócia, uma linha de pesquisa sobre enzimas imobilizadas.

Em 1975, a iniciativa ganhava reforço com o retorno de Luiz Bezerra de Carvalho Junior, ao concluir o seu doutoramento na mesma universidade escocesa, sob a orientação do Prof. Ledingham. Posteriormente, alunos do Prof. Luiz de Carvalho se doutoraram em universidades britânicas e se somaram ao esforço. Paralelamente, novas fontes de obtenção de enzimas de interesse comercial eram investigadas.

Em 1986, com a criação do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Órgão Suplementar da UFPE voltado aos estudos da imunopatologia das doenças tropicais, a imobilização de antígenos/anticorpos foi incorporada aos interesses do Grupo. Recentemente, as lectinas passaram a ser outra classe de proteínas imobilizadas como decorrência da interação com o Grupo denominado “Química de Proteínas” do Departamento de Bioquímica da UFPE. Outros professores têm-se incorporado ao grupo, provindos da UFPE (Departamento de Química Fundamental) e de outras instituições (Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, Departamento de Patologia da UPE, Departamento de Ciências Fisiológicas da UFG e Departamento de Bioquímica da UFRN).

Sua produção científica pode ser resumida nos mais de 200 trabalhos publicados (55% nos últimos 05 anos); nas 60 teses de Mestrado e 14 de Doutorado; nas 02 patentes (privilégio) e nos 02 prêmios por inventos, contribuindo para a proposição de: 1) novas fontes de enzimas; 2) novos suportes sólidos e métodos para imobilização de proteínas; 3) síntese de fármacos por enzimas e células imobilizadas; 4) biossensores para determinação de glicose, Vitamina C, sacarose etc. e 5) imunossensores para o diagnóstico de doenças tropicais (CNPQ-DGP, 2006).

Nos últimos anos, diversos trabalhos envolvendo a construção de novos suportes sólidos têm sido publicados pelos grupos de pesquisa do Laboratório de

Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, conforme descrito na **tabela 2** abaixo:

Tabela 1. Suportes sólidos propostos para imobilização de biomoléculas, desenvolvidos pelo grupo de pesquisa “Proteínas Imobilizadas”.

Suporte	Biomolécula imobilizada	Referência
Dacron	Glicose oxidase	Carvalho Jr <i>et al.</i> 1986
	a-amilase	Carvalho Jr <i>et al.</i> 1987
	Ascorbato oxidase	Carvalho Jr <i>et al.</i> 1989
	Amiloglicosidase	Oliveira <i>et al.</i> 1989
	Antígeno (F1A) de <i>Yersinia pestis</i>	Montenegro <i>et al.</i> 1991; 1993
	Xantina oxidase	Babosa <i>et al.</i> 1995
	Antígeno (SWAP) de <i>Schistosoma mansoni</i>	Montenegro <i>et al.</i> 1999
Grânulos de gel de poliacrilamida	Glicose oxidase	Carvalho Jr <i>et al.</i> 1986
	a-amilase	Carvalho Jr <i>et al.</i> 1987
	Adenosina fosfato desaminase	Carvalho Jr <i>et al.</i> 1988
	Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Figueiredo <i>et al.</i> 1991; Oliveira <i>et al.</i> 1994
Dacron ferromagnético	Amiloglicosidase Albumina do soro humano	Carneiro leão <i>et al.</i> , 1991; 1994; Pinheiro <i>et al.</i> , 1999
Gliptal	Amiloglicosidase	Jordão <i>et al.</i> , 1996
Álcool polivinílico (PVA) e Glutaraldeído	Antígeno (F1A) de <i>Yersinia pestis</i> Xantina oxidase, a-amilase, amiloglicosidase, antígeno (SWAP) de <i>Schistosoma mansoni</i>	Carvalho <i>et al.</i> , 1996; Araújo <i>et al.</i> , 1996; Araújo <i>et al.</i> , 1997a, b; Araújo <i>et al.</i> , 1998
Polianilina e silicone	Xantina oxidase	Nadrusz <i>et al.</i> , 1996
Papel de filtro plastificado com PVA-Glut	Antígeno (F1A) de <i>Yersinia pestis</i>	Barbosa <i>et al.</i> , 2000
Polianilina e Dacron		Coelho <i>et al.</i> , 2001

Continuação

Suporte	Biomolécula imobilizada	Referência
Xylofucogluronan-Carbodiimida	Gentamicina	Araújo et al., 2004
Exopolissacarídeo celulósico de <i>Zoogloea sp.</i>	Tripsina	Cavalcante et al., 2006
Discos de POS-PVA	Antígeno (F1A) de <i>Yersinia pestis</i>	Coêlho et al., 2002
	Antígeno (SWAP) de <i>Schistosoma mansoni</i>	
	Antígeno (F1A) de <i>Yersinia pestis</i>	Barros et al., 2002
	Antígeno recombinante de <i>Toxocara canis</i>	Coelho et al., 2003
	Anticorpo monoclonal anti-Proteína S100	Melo-junior et al., 2006
	Anticorpo policlonal anti-Galectina-1 humana	Melo-junior et al., 2006

Em nosso laboratório, uma rede polimérica de PVA-glutaraldeído foi sintetizada e utilizada como matriz sólida no desenvolvimento de ensaios biológicos (Araújo et al., 1997). A síntese do PVA-glutaraldeído baseia-se em uma reação de acetalização, que ocorre entre o PVA e o glutaraldeído, sob catálise ácida (**Figura 5**).

Na primeira etapa da reação ocorre o ataque nucleofílico da hidroxila do PVA ao grupo carbonila do glutaraldeído, formando o hemiacetal. Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico de uma hidroxila vizinha a anterior da cadeia polimérica, ao carbono da estrutura hemiacetalica, com eliminação de água, formando deste modo o acetal.

O segundo grupamento carbonila livre do glutaraldeído pode então reagir com uma outra molécula de PVA, formando uma rede polimérica. Mas em concentrações estequiometricamente não balanceadas de PVA e glutaraldeído,

podem ocorrer grupos carbonila livres que, por sua vez, poderão formar ligações covalentes com grupamentos amino de biomoléculas como, por exemplo, proteínas (Araújo et al., 1997).

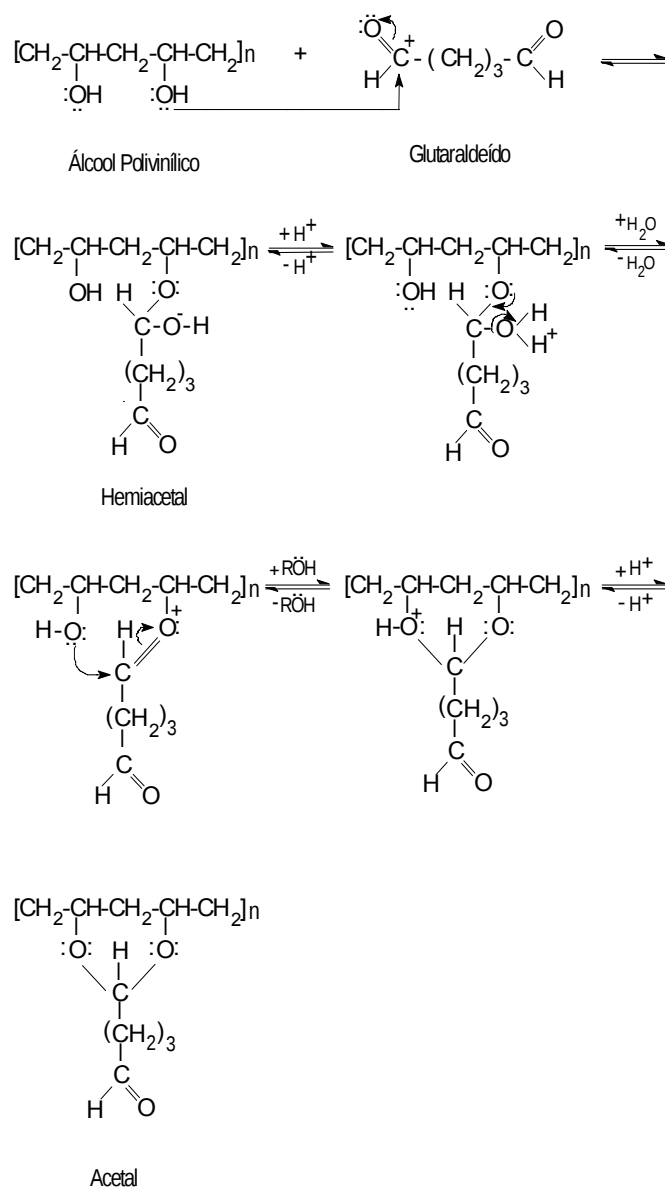


Figura 5 - Reação de acetalização do PVA-glutaraldeído.

Visando obter um microambiente biocompatível e uma superfície mais adequada à imobilização covalente de proteínas, Barros e colaboradores (2002) realizaram estudo no qual o composto POS/PVA foi obtido por processo sol-gel. Após o preparo do suporte, um braço químico foi introduzido pela adição de moléculas de glutaraldeído via catálise ácida.

Barbosa e colaboradores (2000b) propuseram o papel de filtro plastificado com PVA-glutaraldeído para a imobilização de antígeno de *Yersinia pestis* e conseguiram detectar, por ELISA, anticorpos específicos em soro de coelhos imunizados.

Em outro estudo, visando obter um microambiente compatível e uma superfície mais adequada à imobilização de proteínas, Barros e colaboradores (2002) obtiveram o composto híbrido POS/PVA pelo processo sol-gel. Após o preparo do suporte e a adição de um braço químico (glutaraldeído) via catálise ácida, a fração protéica pode ser então fixada covalentemente. Pérolas de POS/PVA, com antígenos de *Y. pestis* imobilizados em sua superfície, foram também utilizadas como matriz sólida em ELISA para a detecção de IgG anti-*Y. Pestis* (Barros et al., 2002). Por fim, utilizando-se a mesma metodologia para este suporte, Coelho e colaboradores (2003) imobilizaram com sucesso um antígeno recombinante de *Toxocara canis*, para o diagnóstico sorológico da toxocaríase.

Apoiando-se nos bons resultados obtidos, até então, para a utilização dos POS-PVA para imobilização de antígenos, iniciou-se o desenvolvimento de experimentos buscando testar o mesmo suporte para imobilização de anticorpos para a detecção de proteínas relacionadas aos processos decorrentes das doenças tumorais da próstata.

DOENÇAS TUMORAIS DA PRÓSTATA

O controle da divisão e da diferenciação celular é feito por um sistema integrado e complexo, que mantém a população celular dentro de limites fisiológicos. Qualquer alteração nesse sistema resulta em distúrbios tanto do crescimento da diferenciação ou ambos ao mesmo tempo. Dentro desse contexto, a próstata pode ser acometida por dois principais distúrbios tumorais: hiperplasia prostática benigna (HPB) e câncer de próstata (Robbins et al., 2005).

Em função de suas altas taxas de incidência e mortalidade, lesões tumorais como a hiperplasia prostática benigna e neoplasias de próstata representam um sério problema de saúde pública no Brasil (INCA, 2006).

Os tumores benignos não-neoplásicos, por exemplo, o HPB é de crescimento lento, expansivo e bem tolerado pelo organismo do hospedeiro, entretanto, com uma alta incidência. Suas células se dispõem de forma harmônica em relação ao estroma além de serem raramente sujeitos a processos degenerativos importantes como necrose ou hemorragia (Mora et al., 2001; Clarke, 2004).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2006 apontam que ocorrerão 472.050 casos novos de câncer. O tipo mais incidente, à exceção de pele não-melanoma, será o de próstata (47.280 mil) no sexo masculino. Estes valores correspondem a um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil pessoas acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INCA - Instituto Nacional do Câncer, 2006).

A HPB é conhecida como a mais comum entre os tumores benignos, é também, a responsável pela maioria dos sintomas urinários que acometem homens com idade superior a 50 anos e por 20 a 30% das prostatectomias radicais nos indivíduos que vivem até 80 anos (Phipps et al., 2005).

As primeiras alterações iniciam-se por volta dos 35 anos de idade e consistem em nódulos microscópicos no estroma que surgem ao redor das

glândulas periuretrais. Esses nódulos podem ser compostos tanto de elementos glandulares quanto fibromusculares ou podem ser mistos (Narayan et al., 1995).

A macroscopia os nódulos hiperplásicos são facilmente visualizados, pois comprimem o restante do tecido prostático. O HPB pode ocorrer sob três formas histopatológicas distintas: Glandular (podendo causar aumento do PSA); Intersticial, e Focal (adenoma). Microscopicamente, a nodularidade pode ser devida à proliferação ou dilatação glandular ou por crescimento do estroma fibromuscular, que passa a representar mais de 70% o peso da glândula (Postma & Schröder, 2005).

O câncer de próstata é o mais freqüente em todas as regiões do Brasil entre o total de tumores, exceto pele não melanoma, com risco estimado de 68/100.000 na região Sul, 63/100.000 na região Sudeste, 46/100.000 na região Centro-Oeste, 34/100.000 na região Nordeste e, 22/100.000 na região Norte (INCA, 2006).

O grande número de trabalhos relacionados a esta neoplasia é justificado pela alta incidência desta doença, que representa cerca de 40% dos tumores que acometem os homens, bem como pela necessidade de compreender melhor a etiologia dessa malignidade, tão complexa e heterogênea (Turkeri et al., 2004; Akimoto et al., 2006).

Embora a incidência desse câncer seja elevada, existe um número muito maior de casos dessa doença, que ocorrem sem que haja sintomas clínicos. Vários pacientes morrem de doenças concomitantes, antes da manifestação clínica do câncer de próstata, já os pacientes que o manifestam, provavelmente, iniciaram a carcinogênese mais jovens ou apresentaram crescimento tumoral mais acelerado (Postma et al., 2005).

Na maioria dos casos, o tumor apresenta um crescimento lento, de longo tempo de duplicação, levando cerca de 15 anos para atingir 1 cm³ e independe do crescimento normal da glândula, o que faz com que alterações miccionais possam inexistir. Por este motivo, o exame periódico deve ser realizado, mesmo que não existam sintomas, para que o câncer possa ser detectado precocemente, com maiores chances de tratamento e cura (Raja et al., 2006).

Durante o processo de carcinogênese, a próstata é palco de uma série de transformações bioquímicas, como por exemplo, a síntese de proteínas tumor-específicas. Uma dessas proteínas é o antígeno específico da próstata (prostate specific antigen, PSA), secretado no sangue e freqüentemente com concentração aumentada no soro de pacientes com tumores malignos. Informação esta que pode ser usada para diagnóstico e controle de tratamento do tumor (Phillips et al., 2005).

Mudanças morfológicas súbitas e alterações moleculares vêm sendo descritas em tecidos de próstata com HPB e casos confirmados de câncer de próstata (Montironi et al., 2000).

O desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna é caracterizado pelo aumento da expressão de alguns marcadores biológicos que possuem influência no potencial proliferativo das células displásicas (Myers et al., 1996). Por exemplo, a fosfatase ácida da próstata humana (PACP) pode diminuir o crescimento de células cancerígenas, com isso a diminuição de sua expressão pode estar envolvida na progressão do câncer de próstata (Lin et al., 2002).

Dentre os diversos distúrbios celulares que resultam em neoplasias, alterações na expressão de proteínas são freqüentemente observadas em tumores. Apesar disso, estudos a cerca das mudanças no perfil proteico em determinados estágios da carcinogênese prostática são escassos (Chan et al., 2001). Desta forma, o conhecimento da regulação da proliferação celular através de alterações bioquímicas específicas ao câncer de próstata é de grande importância para o desenvolvimento de novas soluções (Danguy et al., 2002).

Estudos com extratos de tumores realizados por Hirschfeld & Thonsen na década 30 foram os primeiros a demonstrar alterações bioquímicas nas células tumorais. No que se refere às funções bioquímicas as moléculas de adesão e as vias de transdução dos sinais para o crescimento são bastante alteradas durante a progressão tumoral (Gua et al., 2006).

As proteínas normais codificadas pelos proto-oncogenes (genes que regulam a proliferação celular) desempenham funções iniciais nas células durante o desenvolvimento das neoplasias. Dentre estas moléculas, destacam-se os

fatores de crescimento, proteínas envolvidas na recepção e tradução de sinais localizados na superfície celular (Robbins et al., 2005).

Os diferentes tipos de biomoléculas na superfície celular apresentam uma importante função no controle de vários processos fisiológicos e patobioquímicos no organismo (Phipps et al., 2005). Mudanças quantitativas e/ou qualitativas nos componentes lipídicos e protéicos das membranas e organelas celulares também são evidentes durante o desenvolvimento dos processos patológicos (Astoul et al., 2000; Shekhar et al., 2004).

Modificações no perfil protéico são agora modelos universais em células cancerosas e certamente processos investigativos baseados no monitoramento das proteínas relacionadas aos tumores são instrumentos bem conhecidos no estudo da progressão tumoral (Yonemura et al., 2000). Como as células normais durante a embriogênese, as células tumorais também sofrem ativação e rápido crescimento, aderem a uma variedade de outros tipos de células e invadem tecidos principalmente devido a mudanças no perfil de transcrição e tradução celular (Rosa et al., 2005).

A investigação das interações de proteínas específicas favorece o entendimento sobre a origem histogenética e comportamento dos tumores durante seu desenvolvimento (Herling et al., 2000).

Transformações celulares são freqüentemente acompanhadas por um aumento geral no tamanho das proteínas, carboidratos e glicolipídeos do metabolismo. Com o advento das tecnologias de marcadores tumorais e anticorpos monoclonais, descobriram-se que muitos dos fatores "tumor-específicos", como por exemplo anticorpos, reconhecem os epítomos dessas estruturas o que aumenta o interesse sobre essas mudanças bioquímicas específicas (Borrebaeck, 2000; Angenendt, 2005).

MARCADORES TUMORAIS

Poucas medidas na medicina diagnóstica tiveram tanto impacto em anos recentes quanto a introdução, nas práticas de laboratório clínico, dos imunoensaios para determinação de proteínas relacionadas a tumores, também classificadas como marcadores tumorais (Pradal et al., 2004).

O desenvolvimento e a introdução de tais exames, preocupação típica de países onde as condições de assistência à saúde e prevenção das doenças, asseguraram maior expectativa de vida a população e conseqüentemente maior incidência de doenças neoplásicas, veio contribuir de maneira intensa e decisiva para intervenção clínico-cirúrgica nos portadores de distúrbios tumorais (Pradal et al., 2004).

Marcadores tumorais são macromoléculas, geralmente proteínas, cujo aparecimento e alterações em sua concentração estão relacionadas de certa forma com a gênese e o crescimento de células cancerosas nos indivíduos (Ustun & Ceber, 2004).

Segundo Mora e colaboradores (2001) podem ser classificados em três tipos: celulares ou teciduais, séricos ou plasmáticos e genéticos. Os marcadores teciduais são antígenos localizados nas membranas celulares, tais como as moléculas de adesão (PECAMs e ICAMs) ou antígenos de citodiferenciação (CDs); Os marcadores genéticos são representados por seqüências de genes e proteínas por eles codificadas, super-expressas em situações de desenvolvimento tumoral, como por exemplo a proteína *c-Erb-2*.

Os marcadores tumorais ou séricos são substâncias que podem ser detectadas em concentrações diferentes daquelas encontradas nas condições normais no sangue, urina ou tecidos, tais como alfa-fetoproteína (AFP) relacionada a tumores de fígado ou galectinas-1 e -3 que são envolvidas no desenvolvimento de neoplasias da tireóide (Rabinovich, 1999; Rabinovich et al., 2002; Pradal et al., 2004).

Atualmente, cerca de 200 substâncias são descritas como marcadores tumorais, entretanto, poucas conseguem manter-se como tal. Frutos de investigação sobre as alterações bioquímicas da célula tumoral, sua purificação, identificação química e testes de aplicabilidade clínica, podem levar muitos anos (Pradal et al., 2004).

Teoricamente, para que uma substância possa ser aceita e persistir como um marcador tumoral, deveria apresentar alta especificidade (não ser detectada em outras doenças), alta sensibilidade (ser detectada muito precocemente), ser órgão-específica e apresentar paralelismo com o desenvolvimento tumoral (Diamandis et al., 2000).

Contudo, após anos de pesquisas têm-se observado exatamente o contrário. Atualmente os melhores marcadores tumorais são aquelas biomoléculas relacionados a processos fisiológicos da célula normal que durante a progressão tumoral tem seus níveis de expressão aumentados ou reduzidos drasticamente. Como exemplos desses potenciais marcadores podemos citar a proteína S100, citoqueratina, Ki-67, p-53, Proteína C-reativa, galectinas, auto-anticorpos, citocinas e moléculas de adesão (Mason et al., 2002; Harpio, Einarsson, 2004).

Desta forma, cada vez mais tem se buscado investigar, através de diversas ferramentas de análise, as alterações no comportamento dessas proteínas a fim de se estabelecer para cada tipo de tumor um padrão de expressão específico que caracterize os níveis de agressividade, chances de recidiva e potencial de metastatização (Ustun, Ceber, 2004).

Proteínas S100

Conforme relatam Lins e colaboradores (2003), a proteína S-100 é uma proteína ácida ligada ao cálcio, descrita inicialmente como uma proteína específica do tecido neural (**Figura 6**). A sua denominação deriva do fato dela ser solúvel numa solução de sulfato de amônia a 100% em pH neutro. Posteriormente, foi descrita em outras células não neurais como condrócitos, adipócitos, melanócitos,

músculo cardíaco e esquelético, células epiteliais e células glandulares (Marenholz et al., 2004; Hermani et al., 2006).

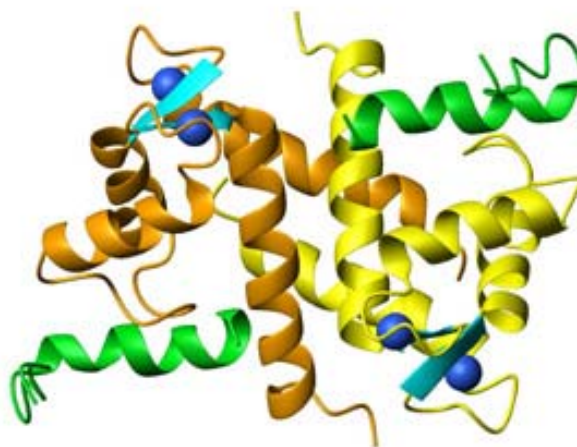


Figura 6. Modelo molecular de uma proteína S100.

A família de proteínas S100 exibe um padrão original de expressão tecido-específico. E atualmente se sabe que os dois membros originais desta família, as proteínas S100A1 e S100B originam todos os demais subtipos conhecidos (Marenholz et al., 2004).

Uma família multigênica composta de 20 proteínas ligantes ao Ca^{2+} , com baixo peso molecular (9-13 KDa) que são expressas diferencialmente em um grande número tipos celulares. Os membros desta família de proteínas também são ligantes ao Zn^{2+} ou Cu^{2+} numa variedade de atividades intracelulares tais como, a fosforilação proteica, ativação enzimática, organização estrutural de membranas, proliferação e diferenciação celular (inclusive transformação neoplásica) e inflamação (Donato, 2001; Harpio & Einarsson, 2004, Hermani et al., 2006).

Alguns membros da família podem ter atuação extracelular, podendo funcionar como proteínas moduladoras do cálcio intra e extracelular através da interação com outras proteínas-alvo celulares (Zimmer et al., 1995). Essas proteínas S100 livres são secretadas no espaço extracelular e exercem efeitos tróficos ou tóxicos dependendo de sua concentração, além disso, evidências

recentes (Kanamori et al., 2004) indicam que elas estão envolvidas na quimiotaxia de leucócitos e ativação dos macrófagos durante a resposta dos tecidos ao dano.

Os estudos da expressão destas proteínas demonstraram que há uma mistura complexa de mecanismos transcricionais e postranscricionais que regulam a expressão dos diferentes membros da família S100. Estudos adicionais sobre as funções e padrões de expressão destas proteínas em tecidos humanos fornecerão informações importantes a respeito do papel das proteínas S100, que muitas vezes demonstram estar com a expressão alterada durante o desenvolvimento e evolução de muitas doenças (Marenholz et al., 2004).

Recentemente, a proteína S100 tem atraído considerável interesse devido a sua expressão diferenciada em pacientes com neoplasia quando comparados a indivíduos saudáveis (Ilg et al., 1996; Heizmann, 2002). Assim, diversos estudos sorológicos têm sido efetuados no intuito de estabelecer os padrões de comportamento desta proteína nos diferentes tipos de tumores existentes (Gupta et al., 2003).

Estudos realizados em pacientes com tumor de próstata (Gupta et al., 2003) e com outros tipos de neoplasias (Yonemura et al., 2000; Feng et al., 2001), indicam que a diminuição da expressão desta proteína está fortemente com o aumento da agressividade biológica dos tumores.

A proteína S100 foi encontrada em apenas 9,3% de 75 casos de carcinoma prostático e ausente em todas os 30 dos casos de hiperplasia prostática benigna, refletindo uma mudança no status funcional das células neoplásicas, o que pode ter um significado prognóstico importante (Constatinides et al., 2000). Em outros trabalhos, a expressão elevada da proteína S100A foi observada em tecido epitelial de próstata humana normal, enquanto que foi constatada uma ausência completa de expressão desta mesma proteína em diversos casos de carcinoma prostático (Heizmann, 2002; Gupta et al., 2003).

Galectinas

As galectinas são proteínas da crescente família das lectinas animais (lectinas endógenas), envolvidas em diversos processos biológicos, tais como interações com glicoconjugados contendo galactose, controle do ciclo celular, proliferação celular, resposta imune, apoptose e nos processos neoplásicos (Liu et al., 2002).

A estrutura molecular das galectinas geralmente consiste de cerca de 130 aminoácidos, altamente conservados, bem como uma região de reconhecimento a carboidratos (CRD – carbohydrate recognition domains) interagindo, particularmente, com estruturas de β -galactosídeos (Barondes et al., 1994; Cao et al., 2002) (**Figura 7**).

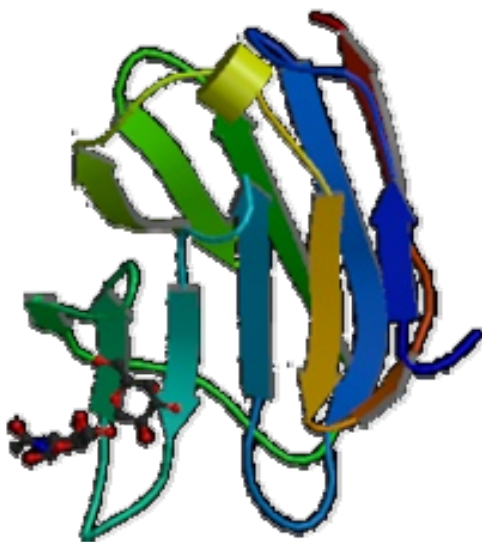


Figura 7. Estrutura molecular da galectina-3.

Dentre os 14 isotipos de galectinas identificados em mamíferos, a galectina-3, é uma das mais estudadas, sendo uma proteína monomérica de 30 Kda indicada como um potencial marcador tumoral de malignidade nas neoplasias prostáticas (Califice et al., 2004a e b). Além disso, as expressões teciduais e plasmáticas da Galectina-3 vêm também sendo relacionadas ao surgimento de

tumores e metástases em diferentes órgãos (Ochieng et al., 1998; Inufusa et al., 2001; Christoph et al., 2004).

Alterações no padrão de expressão tecidual da galectina-3 vêm sendo confirmadas na progressão maligna de diversos tipos de câncer (**Tabela 2**).

Tabela 2. Perfis de expressão tecidual da galectina-3 em lesões tumorais.

Tecido/Órgão	Padrão de expressão	Referência
Estômago	Aumentado	Miyazaki et al., 2002
Linfonodos		Miyazaki et al., 2002
Tireóide		Faggiano et al., 2003; Rosa et al., 2005
Cabeça e Pescoço		Gillenwater et al., 1996
Língua		Honjo et al., 2000
Hepatocelular		Hsu et al., 1992; Chung et al., 2002
Cólon		Ellerhorst et al., 1999; Califice et al., 2004a
Próstata		
Glândulas salivares	Reduzido	Xu et al., 2000
Mama		Shekhar et al., 2004
Ovário		Van den Brule et al., 2004
Próstata		Ellerhorst et al., 1999; Pacis et al., 2000
Útero		Van den Brule et al., 2000
Células basais da pele		Van den Brule et al., 1995
Epiderme		Castronovo et al., 1991
Metástases do fígado		Mollenhauer et al., 2003
Pâncreas		Inufusa et al., 2001
Adenocarcinoma		Inufusa et al., 2001

Cada galectina apresenta um padrão específico e sua expressão é normalmente regulada durante o desenvolvimento das diversas células e tecidos. Na maioria das vezes as galectinas são encontradas no citoplasma celular, algumas são secretadas e interagem com proteínas da superfície celular regulando a adesão entre as células e destas entre a matriz extracelular (Hughes, 2001; Martinez et al., 2004).

As Galectinas vêm sendo largamente utilizadas como ferramenta imunohistoquímica. Alterações na expressão das galectinas são frequentemente observadas em várias células tumorais durante seu desenvolvimento, crescimento, diferenciação, metástase, apoptose, “splicing” do RNA e funções imunoreguladoras (Rabnovich et al., 2002; Eloa et al., 2005). Estudos recentes demonstraram que a expressão citoplasmática, e a não expressão nuclear da galectina-3 nas células neoplásicas da próstata está associada à progressão do tumor (Van der Brule et al., 2000; Califice et al. 2004a).

Uma série de evidências experimentais e clínicas vêm reforçando as correlações entre a expressão das galectinas e as neoplasias. Estudos recentes demonstram que a expressão de galectinas é relevante na progressão de neoplasias em certos tumores malignos, indicando as galectinas como potenciais marcadores tumorais (Pacis et al., 2000; Califice et al., 2004b).

As galectinas podem ser encontradas no citoplasma, núcleo, superfície membranas e matriz extracelular. A presença das galectinas fora das células é uma consequência da expressão protéica por vias não-clássicas, como por exemplo, a falta de seqüências de sinais para inserção no retículo endoplasmático (Dumic et al., 2006). E de acordo com Cooper (2002), as galectinas encontradas no citoplasma e matriz extracelular não possuem peptídeos de sinal envolvidos no controle da secreção proteica.

Há evidências de que as galectinas podem ter funções intra e extracelulares distintas. Em neoplasias da próstata, as experiências demonstram que a galectina 3 poderia participar das interações entre as células tumorais e a matriz extracelular, particularmente com a laminina e fibronectina. Sugerindo a correlação destas proteínas na formação de êmbolos tumorais e disseminação das células durante as metástases da próstata (Ellerhorst et al., 1999; Cooper, 2002).

Desde os trabalhos iniciais que demonstravam que mais de 90% de lesões tireoidianas malignas expressavam galectina-3, principalmente em carcinomas folicular e papilífero, surgiram fortes evidências de que a galectina-3 poderia ser um marcador de malignidade neste tipo de neoplasia (Xu et al., 1995; Nascimento et al., 2001; Faggiano et al., 2003). Outros trabalhos investigaram a presença

destas proteínas em tumores de cólon, tireóide, mama, estômago (Miyazaki et al., 2002), próstata e em metástases do fígado (Inufusa et al., 2001).

Apesar de alguns trabalhos utilizarem metodologias semelhantes, ainda existem diversos resultados contraditórios quanto ao aumento ou redução do padrão de expressão da Galectina-3 no câncer próstata o que parece depender do estágio de progressão tumoral, grau de invasividade e potencialidade de metástase (Van den Brule et al., 2000; Danguy et al., 2002; Dunic et al., 2006).

A investigação das interações de proteínas específicas com o meio intra e extracelular favorece o entendimento sobre a origem histogenética e comportamento dos tumores durante sua progressão (Herling et al., 2000); o que confirma a hipótese de que a diferenciação bioquímica de uma célula é um sinal que pode preceder sua morfo-diferenciação (Salzman et al., 1998). A glicosilação e expressão de glicoconjugados são geralmente alteradas nas células tumorais em comparação com sua contraparte normal (Lytinska et al., 2001). Além disso, estudos sobre os tipos de proteínas expressas pelos diversos tipos histológicos de doenças tumorais prostáticas são escassos (Chan et al., 2001).

Assim compreender os complexos mecanismos que resultam nas patologias da próstata, como por exemplo, os elementos presentes na superfície das células prostáticas têm sido estudados através de imunohistoquímica com marcadores tumorais, técnica esta que pode auxiliar na detecção, o estadiamento, o prognóstico e o tratamento dessas patologias prostáticas, principalmente o câncer (Califice et al., 2004a).

Apesar da grande evolução biotecnológica, ainda não dispomos de instrumentos ideais para o estudo de distúrbios orgânicos multi-fatoriais como o câncer, fazendo-se necessário então o desenvolvimento de uma série de métodos que auxiliem no esclarecimento de muitos processos patobioquímicos ainda obscuros durante o processo de carcinogênese.

Na presente proposta de trabalho, pretende-se dar continuidade à linha de pesquisa desenvolvida no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), envolvendo a imobilização de anticorpos, utilizando-se a rede semi-interpenetrada de polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) como matriz sólida no desenvolvimento de ensaios imunodiagnósticos para a sondagem de proteínas relacionadas a doenças neoplásicas em soros de pacientes, bem como comparar esses resultados sorológicos com aqueles obtidos para os mesmos biomarcadores (anticorpos) através da imunohistoquímica de amostras teciduais dos tumores.

MODELOS EXPERIMENTAIS

Como modelos de doenças tumorais para este estudo, foram utilizados os seguintes tecidos e soros provenientes de pacientes portadores de:

- Adenocarcinoma Prostático (AP);
- Hiperplasia Prostática Benigna (HPB);

Os anticorpos-teste para imobilização com o suporte de POS-PVA são descritos a seguir:

- Anticorpo monoclonal IgG Anti-Proteína S-100 (Dako Z0311 Lot 129);
- Anticorpo monoclonal IgG Anti-Galectina-3 (Novocastra Clone 25C1).

OBJETIVOS

Geral

Investigar um novo suporte sólido à base de Polisiloxano e Álcool polivinílico (POS-PVA) na imobilização de anticorpos para aplicação em imunoensaios de pacientes portadores de lesões tumorais da próstata.

Específicos

- Imobilizar anticorpos (anti-proteína S-100 e anti-Galectina-3) em discos de POS-PVA;
- Proceder à análise ultra-estrutural e físico-química dos discos de POS-PVA antes e após a imobilização;
- Avaliar o “shelf-life” dos discos de POS-PVA, quanto à capacidade de imobilização, até seis meses após a síntese do polímero;
- Padronizar o ELISA utilizando os discos de POS-PVA, para a análise de proteínas séricas em pacientes portadores de lesões tumorais de próstata;
- Proceder a estudo imunohistoquímico com os anticorpos (anti-proteína S-100 e anti-Galectina 3) em tecidos de pacientes portadores de tumores prostáticos;
- Comparar os resultados da expressão de proteínas no soro, através do ELISA com POS-PVA com a expressão tecidual, através da análise imunohistoquímica.

CONCLUSÕES

- A análise ultra-estrutural demonstrou não haver alterações importantes na superfície de imobilização, após as etapas de ativação do suporte com glutaraldeído e subsequente imobilização de anticorpos;
- Os testes de “shelf life” para aferir a capacidade de imobilização dos discos de POS-PVA demonstraram uma perda de apenas 20% após seis meses da síntese do compósito; quando armazenado em tampão fosfato a 4° C;
- A análise elementar e espectro infravermelho dos discos comprovaram a fixação dos anticorpos ao suporte, através da indicação de presença de componentes protéicos na matriz após a imobilização;
- A rede semi-interpenetrada de POS-PVA, aliada à sua fácil síntese e baixo custo, presta-se como modelo de suporte para a imobilização covalente dos anticorpos anti-proteína S100 e anti-Galectina-3;
- O estudo imunohistoquímico comparativo demonstrou o mesmo padrão de expressão das proteínas S100 e Galectina-3 nos tecidos prostáticos com resultados semelhantes àqueles obtidos nas análises sorológicas para as mesmas proteínas;
- O modelo de imunoensaio tipo ELISA utilizando os discos de POS-PVA foi eficiente para o estudo das proteínas S100 e galectina-3 séricas de pacientes portadores de doenças tumorais de próstata.

PERSPECTIVAS

- Realizar ensaios, utilizando o sistema ELISA-POS-PVA, em lesões pré-cancerosas de próstata, como por exemplo, neoplasias intraepiteliais prostáticas (PIN);
- Proceder à imobilização do anticorpo c-erb-2 para investigação dos níveis plasmáticos da proteína-alvo em pacientes portadores de neoplasias da mama (*Estudo em fase de experimentos*);
- Estabelecer estratégias metodológicas para a imobilização orientada de anticorpos em suportes sólidos;
- Imobilizar neste suporte outros tipos de imunoglobulinas (IgM, IgE) e testar a atividade imunológica destas biomoléculas em outras doenças;
- Estabelecer um padrão de expressão para outros marcadores tumorais prostáticos, em lesões bem diferenciadas (Gleason 5 ou 6), moderadamente (Gleason 7) e pouco diferenciadas (Gleason 8 ou 9);
- Substituir a marcação dos anticorpos com peroxidase pelo Éster de acridina e estabelecer métodos quimiluminescentes utilizando esse suporte;
- Comparar a funcionalidade dos anticorpos frente a diferentes suportes já desenvolvidos pelo grupo de pesquisas “Proteínas imobilizadas”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad A, Manclus JJ, Moreno MJ, Montoya A (2001) Determination of thiabendazole in fruit juices by a new monoclonal enzyme immunoassay. *J. AOAC Int.* 84: 156-161.
- Afanassiev V, Hanemann V, Wölfl S (2000) Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film. *Nucleic Acids Res.* 28(12): E66-68.
- Akimoto T, Katoh H, Kitamoto Y, Shirai K, Shioya M, Nakano T (2006) 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. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 64(5): 1360-1366.
- Amaral IPG, Carneiro-da-Cunha MG, Carvalho Jr LB, Bezerra RS (2006) Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. *Proc. Biochem.* 41: 1213-1216.
- Angenendt P (2005) Progress in protein and antibody microarray technology. *DDT.* 10(7): 503-511.
- Araujo AM, Barbosa GHTS, Diniz JRP, Malagueño E, Azevedo WM & Carvalho Jr LB (1997) Polyvinyl alcohol glutaraldehyde as Solid-phase in ELISA for Schistosomiasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 39: 155-158.
- Araujo AM, Neves Jr MT, Azevedo WM, Oliveira GG, Ferreira Jr. DL, Coelho RAL, Figueiredo EAP, Carvalho Jr LB (1996) Polyvinyl alcohol-glutaraldehyde network as a support for protein immobilisation. *Biotechnol. Tech.* 112: 67-72.
- Araújo AM, Petribú ATS, Barbosa GHTS, Diniz JRP, Almeida AMP, Carvalho Jr LB (1998) Rapid-ELISA for plague. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 91: 195-198.
- Araújo PM, Oliveira GB, Carvalho Jr LB, Silva MPC (2004) Sulfated fucan as support for antibiotic immobilization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37(3): 301-305.
- Astoul CH, Peumans WJ, van Damme EJ (2000) Accessibility of the high-mannose glycans of glycoprotein gp120 from human immunodeficiency virus type 1 probed by in vitro interaction with mannose-binding lectins. *Biochem. Biophys. Commun.* 274(2): 455-460.
- Azevedo WM, Souza JM, Melo JV (1999) Semi-interpenetrating polymer networks based on polyaniline and polyvinyl alcohol-glutaraldehyde. *Synthetic Metals.* 100: 241-248.
- Bain JR, Hoffman AS (2002) Glycophase glass revisited: protein adsorption and cell growth on glass surfaces bearing immobilized glycerol monosaccharides. *Biomaterials.* 23(16): 3347-57.
- Barbosa AD, De Barros FSM, Callou EQ, Almeida AMP, Araujo AM, Azevedo WM, Carvalho Jr LB (2000) Cellulose acetate as solid phase in ELISA for plague. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95: 95-96.

Barbosa GHTS, Santana EM, Almeida AMP, Araujo AM, Fatibello O, Carvalho Jr LB (2000a) The use of filter paper plasticized with polyvinyl alcohol-glutaraldehyde in ELISA. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33: 823-827.

Barbosa RMN, Oliveira EA, Melo EHM, Nadruz Jr W, Carvalho Jr LB (1995) Action of Immobilized xanthine oxidase on purines. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28: 291-295.

Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, Leffler H, Liu FT, Lotan R, Mercurio AM, Monsigny M, Pillai S, Poirer F, Raz A, Rigby PWJ, Rini JM, Wang JL (1994) Galectins a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell.* 76: 597–598.

Barrett DA, Hartshorne MS, Hussain MA, Shaw PN, Davies MC (2001) Resistance to nonspecific protein adsorption by poly(vinyl alcohol) thin films adsorbed to a poly(styrene) support matrix studied using surface plasmon resonance. *Anal. Chem.* 73: 5232-5239.

Barros AEL, Almeida AMP, Azevedo WM, Carvalho Jr LB (2002) Polysiloxane/PVA-glutaraldehyde hybrid composite as solid phase hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35: 459-463.

Benhar I, Eshkenazi I, Neufeld T, Rishpon J (2001) Recombinant single chain antibodies in bioelectrochemical sensors. *Talanta.* 55: 899-907.

Betancor L, López-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Mateo GDC, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM (2006) Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enz. Microbiol. Tech.* 39: 877-882.

Bilitewski U (2006) Protein-sensing assay formats and devices. *Anal. Chim. Acta.* 568:232-247.

Boonstra AH, Baken JME (1989) Hydrolysis-condensation reactions of silica gels during autoclave drying. *J. Non-Crystalline Solids.* 109:1-8.

Borrebaeck CAK (2000) Antibodies in diagnostics – from immunoassays to protein chips. *Immunol. Today.* 21: 379-382.

Bradbury ARM, Marks JD (2004) Antibodies from phage antibody libraries. *J. Immunol. Methods.* 290: 29-49.

Braun S, Rappoport S, Zusman R, Avnir D, Ottolenghi M (1990) Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes. *Mat. Letters.* 10:1-5.

Butler JE (2000a) Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *Methods.* 22(1): 4-23.

Butler JE (2000b) Enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunoassay.* 21(2-3): 165-209.

Califice S, Castronovo V, Bracke M, van den Brûle F (2004a) Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene.* 23, 7527–7536.

Califice S, Castronovo V, Van Den Brule F (2004b) Galectin-3 and cancer (Review). *Int. J. Oncol.* 25(4):983-92.

Cao Z, Said N, Amin S, Wu HK, Bruce A, Garate M, Hsu DK, Kuwabara I, Liu FT, Panjwani N (2002) Galectins-3 and -7, but not galectin-1, play a role in re-epithelialization of wounds. *J. Biol. Chem.* 277: 42299–42305.

Carneiro Leão AMA, Oliveira EA, Carvalho Jr LB (1991) Immobilization of protein on ferromagnetic Dacron. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 311: 53-58.

Carvalho Jr LB, Araújo AM, Almeida AMP, Azevedo WM (1996) The use of polyvinyl alcohol glutaraldehyde antigen coated discs for laser induced fluorescence detection of plague. *Sensors & Actuators B.* 35: 427-430.

Carvalho Jr LB, Melo EHM, Vasconcelos ARA, Lira RR (1986) Glucose oxidase immobilised on gel beads polyacrylamide and polyethyleneterephthalate. *Arq. Biol. Tecnol.* 291: 525-531.

Carvalho Jr LB, Lima CJ, Melo EHM, Kennedy JF (1989) Determination of vitamin C by immobilised ascorbate oxidase. *Proc. Biochem.* 4: 52-54.

Carvalho Jr LB, Oliveira EA, Silva MPC, Accioly LGA (1988) IMP synthesis using immobilized adenosine phosphate deaminase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 191: 21-25.

Carvalho Jr LB, Silva MPC, Melo EHM (1987) Activity of immobilized alpha-amylase. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 201: 521-526.

Castronovo V, Van Den Brule FA, Jackers P, Clausse N, Liu FT, Gillet C, Sobel ME (1996) Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J. Pathol.* 179: 43–48.

Cavalcante AHM, Carvalho Jr LB, Carneiro-da-Cunha MG (2006) Cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. as a film support for trypsin immobilisation. *Biochem. Eng. J.* 29: 258-261.

Chan FL, Choi HL, Ho SM (2001) Analysis of glycoconjugate patterns of normal and hormone-induced dysplastic noble rat prostates and an androgen-independent noble rat prostate tumor by lectin and protein blotting. *Prostate.* 46(1): 21-32.

Chen JP, Hwang YN (2003) Polyvinyl formal resin plates impregnated with lipase-entrapped sol-gel polymer for flavor ester synthesis. *Enz. Microbiol. Technol.* 33: 513-519.

Christoph F, Grunbaum M, Wolkers F, Muller M, Miller K (2004) Prostate cancer metastatic to the stomach. *Urology* 63: 778.e14-15.

Chung EJ, Sung YK, Farooq M, Kim Y, Im S, Tak WY, Hwang YJ, Kim YI, Han HS, Kim JC, Kim MK (2002) Gene expression profile analysis in human hepatocellular carcinoma by cDNA microarray. *Mol. Cell.* 14: 382-387.

Clarke JN (2004) A comparison of breast, testicular and prostate cancer in mass print media (1996-2001). *Social Sci. Med.* 59: 541-551.

CNPq (Conselho Nacional de Pesquisas) – DGP (Diretório Geral de Pesquisas). 2006. <http://dgp.cnpq.br/6466300269003304>. Acessado em 15/10/2006 às 23:40h.

Coelho RAL, Santos GMP, Azevedo PHS, Jaques GA, Azevedo WM, Carvalho Jr LB (2001) Polyaniline-dacron composite as solid phase in enzyme linked immunosorbent assay for Yersinia pestis antibody detection. J. Biom. Mat. Res. 56: 257-260.

Coelho RAL, Jaques GA, Barbosa AD, Velazquez G, Montenegro SML, Azevedo WM, Carvalho Jr LB (2002) Magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol composite as solid-phase in chemiluminescent assays. Biotechnol. Letters. 24: 1705-1708.

Coelho RAL, Yamasaki H, Perez EP, Carvalho Jr LB (2003) The use of polysiloxane-polyvinyl alcohol beads as solid phase in IgG anti-Toxocara canis detection using a recombinant antigen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98: 391-393.

Constantinides C, Manousakas TH, Pavlaki K, Zizi D, Kyriakou G, Alamanis CH, Dimopoulos C (2000) The distribution of S-100 protein in hyperplastic and neoplastic prostatic epithelium. Int. Urol. Nephrol. 32(2), 259-261.

Cooper DN (2002) Galectinomics: finding themes in complexity. Biochim. Biophys. Acta. 1572: 209-231.

Cunha, FOVM, Diogo HR, Veronese VB (2004) Study of castor oil polyurethane - poly(methyl methacrylate) semi-interpenetrating polymer network (SIPN) reaction parameters using a 2³ factorial experimental design. Mat. Res. 7(4); 539-543.

Danguy A, Camby I, Kiss R (2002) Galectins and cancer. Biochim. Biophys. Acta 1572: 285–293.

Diamandis EP, Yousef GM, Bunting P (2000) Human kallikrein 6 Zyme/protease M/Neurosin): A new serum biomarker of ovarian carcinoma. Clin. Biochem. 33(7): 579-583.

Donato R (2001) S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. J. Biochem. Cell. Biol. 33, 637-638.

Dumic J, Dabelic S, Flögel M (2006) Galectin-3: An open-ended story. Biochim. Biophys. Acta. 1760(4): 616-635.

Ellerhorst J, Nguyen T, Cooper DN, Lotan D and Lotan R (1999) Differential expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in human prostate cancer cell lines and effects of overexpressing galectin-1 on cell phenotype. Int. J. Oncol. 14 217-224.

Eloa MT, Chiesa ME, Alberti AF, Mordoh J, Fink NE (2005) Galectin-1 receptors in different cell types. J. Biomed. Sci. 12(1):13-29.

Faggiano A, Talbot M, Baudin , Bidart JM, Schlumberger M, Caillou B (2003) Differential expression of galectin 3 in solid cell nests and C cells of human thyroid J. Clin. Pathol. 56:142-143.

Feng G, Xu X, Youssef EM, Lotan R (2001) Diminished expresión of S100A2, a putative tumor suppressor, at early stage of lung carcinogenesis. *Cancer Res.* 61, 7999-8004.

Figueiredo ZMB, Carvalho Jr LB (1991) L-Malic acid production using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 301: 217-224.

Flora K, Brennan JD (1999) Comparison of formats for the development of fiber-optic biosensors utilizing sol-gel derived materials entrapping fluorescently-labelled protein. *The Analyst.* 124: 1455-1462.

Fuentes M, Mateo C, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R (2005) Preparation of inert magnetic nanoparticles for the directed immobilization of antibodies. *Biosensors Bioelectron.* 20: 1380-1387.

Gill I (2001) Bio-doped nanocomposite polymers: sol-gel bioencapsulates. *Chemistry of Materials*, 13: 3404-3421.

Gill I, Ballesteros A (2000) Bioencapsulation within synthetic polymers (Part I): sol-gel encapsulated biologicals. *Trends in Biotechnol.* 18: 282-296.

Gillenwater A, Xu XC, el-Naggar AK, Clayman GL, Lotan R (1996) Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 18: 422-432.

Gua Y, Li H, Miki J, Kima KH, Furusato B, Sesterhenn IA, Chub WS, McLeoda DG, Srivastava S, Ewingd CM, Isaacs WB, Rhima JS (2006) Phenotypic characterization of telomerase-immortalized primary non-malignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines. *Exp. Cell Res.* 312: 831-843.

Harpio R, Einarsson R (2004) S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clin. Biochem.* 37, 512-518.

Heizmann CW (2002) The multifunctional S100 protein family. *Meth. Mol. Biol.* 172, 69-80.

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

Hermani A, De Servi B, Medunjanin S, Tessier PA, Mayer D (2006) S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-B signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. *Exp. Cell Res.* 312: 184-197.

Honjo Y, Inohara H, Akahani S, Yoshii T, Takenaka Y, Yoshida J, Hattori K, Tomiyama Y, Raz A and Kubo T (2000) Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 6: 4635-4640.

Hsu DK, Zuberi RI, Liu FT (1992) Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *J. Biol. Chem.* 267: 14167-14174.

Hughes RC (2001) Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie.* 83:667-676.

Ilg EC et al. (1996) Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. *Int. J. Cancer.* 68, 325-332.

INCA - Instituto Nacional de Câncer Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2005. 94p.

Ingersoll CM, Bright FV (1997) Using sol-gel-based platforms for chemical sensors. *Chem. Innovation Chem.Tech.* 26-31.

Inufusa H, Nakamura M, Adachi D, Aga M, Kurimoto M, Nakatani Y, Wakano T, Miyake M, Okuno K, Shiozaki H, Yasutomi H (2001) Role of galectin-3 in adenocarcinoma liver metastasis. *Int. J. Oncol.* 19: 913-919.

Inufusa H, Nakamura M, Adachi D, Aga M, Kurimoto M, Nakatani Y, Wakano T, Miyake M, Okuno K, Shiozaki H, Yasutomi H (2001) Role of galectin-3 in adenocarcinoma liver metastasis. *Int. J. Oncol.* 19: 913-919.

Jordão RCC, Silva NH, Carvalho Jr LB (1996) Glyptal as a support for enzyme immobilization. *Biotechnol. Tech.* 10: 59-62.

Kanamori T, Takakura K, Mandai M, Kariya M, Fukuhara K, Fujii S (2004) Increased expression of calcium-binding protein S100 in human uterine smooth muscle tumours. *Mol. Hum. Reprod.* 10(10):735-742.

Kanno S, Yanagiba Y, Haruyama T, Kobatake E, Aizawa M (2000) Assembling of engineered IgG-binding protein on gold surface for highly oriented antibody immobilization. *J. Biotechnol.* 76: 207-214.

Kim YD, Dordick JS, Clark DS (2001) Siloxane-based biocatalytic films and paints for use as reactive coatings. *Biotechnol. Bioeng.* 72: 475-482.

Klausen J, Andresen LO, Barford K, Sorensen VV (2001) Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 6 in pig serum. *Vet. Microbiol.* 79: 11-18.

Kramer K, Lepschy J, Hock B (2001) Long-term monitoring of atrazine contamination in soil by ELISA. *J. AOAC Int.* 84: 150-155.

Kricka LJ (1994) Selected strategies for improving assay sensitivity and reliability of immunoassays. *Clin. Chem.* 40: 347-357.

Kumar P, Agrawal SK, Misra A, Gupta KC (2004) A new heterobifunctional reagent for immobilization of biomolecules on glass surface. *Biorganic Med. Chem. Letters.* 14: 1097-1099.

Lee NY, Lim JR, Kim YS (2006) Selective patterning and immobilization of biomolecules within precisely-defined micro-reservoirs. *Biosens. Bioelectron.* 21: 2188-2193.

Lei C-X, Yang Y, Wang H, Shen G-L, Yu R-Q (2004) Amperometric immunosensor for probing complement III (C3) based on immobilizing C3 antibody to a nano-Au monolayer supported by sol-gel-derived carbon ceramic electrode. *Analytica Chim. Acta.* 513: 379-384.

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

Lins, RDA, Freitas, RA, Figueiredo, CRLV, Silveira, ÉJD, Medeiros, KB, Godoy GP. (2003) Células Dendríticas: Origem, Distribuição, Morfologia, Estrutura, Atividade funcional e métodos de identificação - Uma revisão. *Rev. Bras. Patol. Oral.* 2(3): 29-35.

Litynska A, et al. (2001) Comparison of the lectin-binding pattern in different human melanoma cell lines. *Melan. Res.* 11(3): 205-212.

Liu FT, Patterson RJ, Wang JL (2002) Intracellular functions of galectins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1572:263-73.

López-Gallego F, Betancor L, Mateo C, Hidalgo A, Guisán JM, Fernández-Lafuente R (2005) Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on animated supports. *J. Biotechnol.* 119: 70-75.

Lu B, Smyth MR, O'Kennedy R (1996) Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. *Analyst.* 121: 29-32R.

Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G (2004) S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 322, 1111-1122.

Martinez VG, Pellizzari EH, Díaz ES, Cigorruga SB, Lustig L, Denduchis B, Wolfenstein-Todel C, Iglesias MM (2004) Galectin-1, a cell adhesion modulator, induces apoptosis of rat Leydig cells in vitro. *Glycobiology.* 14(2):127-137.

Mason MD, Davies G, Jiang WG (2002) Cell adhesion molecules and adhesion abnormalities in prostate cancer. *Crit. Rev. Oncol.* 41: 11-28.

Massia SP, Hubbell JA (1999) Covalent surface immobilization of Arg-Gly-Asp- and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-containing peptides to obtain well-defined cell-adhesive substrates. *Anal. Biochem.* 187(2): 292-301.

Masson J-F, Battaglia TM, Davidson MJ, Kim Y-C, Prakash AMC, Booksh KS (2005) Biocompatible polymers for antibody support on gold surfaces. *Talanta.* 67: 918-925.

Mateo C, Fernández-Lorente G, Abian O, Guisán JM. (2000) Multifunctional epoxy supports: A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules.* 1:739-745.

Melo-Junior MR, Araujo Filho JL, Cavalcanti CL, Ramos M Patu VJ, Beltrao EI, Carvalho LB Jr (2006) Detection of S100 protein from prostatic cancer patients using anti-S100 protein antibody immobilized on POS-PVA discs. *Biotechnol. Bioeng. Sep 29 (on line).*

Melo-Junior MR, Araujo Filho JL, Pontes-Filho NT, Carvalho LB Jr (2006) Immobilization of anti-Galectin-3 onto POS-PVA discs used in ELISA for tumor prostatic diseases. *Exp. Mol. Pathol.* Submetido

Miyazaki J, Hokari R, Kato S, Tsuzuki Y, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Miura S (2002) Increased expression of Galectin-3 in primary gastric cancer and metastatic lymph nodes. *Oncol. Reports.* 9:1307-1312.

Mollenhauer J, Deichmann M, Helmke B, Muller H, Kollender G, Holmskov U, Ligtenberg T, Krebs I, Wiemann S, Bantel-Schaal U, Madsen J, Bikker F, Klauck SM, Otto HF, Moldenhauer G, Poustka A (2003) Frequent downregulation of DMBT1 and galectin-3 in epithelial skin cancer. *Int. J. Cancer.* 105: 149-157.

Montenegro SLM, Almeida AMP, Carvalho Jr LB (1993) Standardization of the dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for experimental plague. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 88:119-123.

Montenegro SML (1992) Immunodiagnosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87 (suppl. IV): 333-335.

Montenegro SML, Almeida AMP, Carvalho AB, Carvalho Jr LB (1991) The use of dacron plates for dot enzyme linked immunosorbent assay (dot-ELISA). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 86:461-465.

Montenegro SML, Silva JDB, Brito MEF, Carvalho Jr. LB (1999) Dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for schistosomiasis diagnosis using dacron as solid phase. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32: 139-143.

Mora LB, Buettner R, Ahmad N, Seigne JD (2001) Prostate adenocarcinoma: Celular and molecular abnormalities. *Cancer Control.* 8(6): 551-561.

Moreno MJ, Abad A, Montoya A (2001) Production of monoclonal antibodies to the n-methylcarbamate pesticide propoxur. *J. Agric. Food Chem.* 49: 72-78.

Morgan CL, Newman DJ, Price CP (1996) Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine. *Clin. Chem.* 42: 193-209.

Myers RB, Grizzle WE (1996) Biomarker expression in prostatic intraepithelial neoplasia. *Eur. Urol.* 30(2):153-66.

Nadruz Jr W, Marques ETA, Azevedo WM, Lima Filho JL, Carvalho Jr LB (1996) Immobilized xanthine oxidase on polyaniline silicone composite. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29: 347-350.

Narayan P, Gajendran V, Taylor SP, Tewari A, Presti JC, Leidich R (1995) The role of transrectal ultrasound-guided biopsy-based staging, preoperative serum prostate-specific antigen, and biopsy Gleason score in prediction of final pathologic diagnosis in prostate cancer. *Urology.* 46:205-12.

Narayan P, Jajodia P (1994) Prostatic oncology. *Clin. Geriat. Med.* 6: 131-161.

Nascimento MC, Bisi H, Alves VA, Longatto-Filho A, Kanamura CT, Medeiros-Neto G (2001) Differential reactivity for galectin-3 in Hurthle cell adenomas and carcinomas. *Endocr. Pathol.* 12:275-9.

Ochieng J, Leite-browning ML, Warfield P (1998) Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by Galectin-3. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 246:788-791.

Oliveira EA, Costa ARA, Figueiredo ZMB, Carvalho Jr LB (1994) L-Malic acid production by entrapped *Saccharomyces cerevisiae* into polyacrylamide gel beads. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 47: 65-72.

Oliveira EA, Silva MPC, Figueiredo ZMB, Carvalho LB (1989) Immobilization of proteins on plates of dacron. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 221: 109-114.

Oréface RL, Hench LL, Clark AE, Brennan AB (2001) Novel sol-gel bioactive fibers. *J. Biom. Mat. Res.* 55: 460-467.

Pacis RA, Pilat MJ, Pienta KJ, Wojno K, Raz A, Hogan V, Cooper CR (2000) Decreased galectin-3 expression in prostate cancer. *The Prostate.* 44(2): 118-123.

Pallini M, Compagnone D, Di Stefano S, Marini S, Coletta M, Palleschi G (2001) Immunodetection of lactosylated proteins as a useful tool to determine heat treatment in milk samples. *The Analyst.* 126: 66-70.

Perschbacher K, Jackson-Boeters L, Daley T (2004) Adhesion molecules NCAM, HCAM, PECAM-1 and ICAM-1 in normal salivary tissues and salivary gland malignancies. *J. Oral Pathol. Med.* 33(4): 230-236.

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

Pinheiro SMB, Carvalho Jr LB, Chaves MEC (1999) The use of ferromagnetic Dacron as solid-phase in chemiluminescent assays. *Biotechnol. Tech.* 13: 919-922.

Postma R, Schröder RH (2005) Screening for prostate cancer. *Eur. J. Cancer.* 41:825–833.

Pradal M, Menezes AM, di Dio R (2004) Marcadores tumorais. *LAES & HAES.* 30: 146-182.

Qoronfleh MW, Emery LRD, Perr M, Kaboord B (2003) Use of immunomatrix methods to improve protein-protein interaction detection. *J. Biomed. Biotechnol.* 5: 291-298.

Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano M (2002) Role of Galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1572: 274-284.

Rabinovich GA (1999) Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties: a trip from the gene to clinical therapy. *Cell. Death Differentiation.* 6: 711-721.

Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Iacobelli S (2002) Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?. *Trends in Immunol.* 23(6): 313-320.

Raja J, Ramachandran N, Munneke G, Patel U (2006) Current status of transrectal ultrasound-guided prostate biopsy in the diagnosis of prostate cancer. *Clin. Radiol.* 61, 142–153.

Rak J, Yu JL (2004) Oncogenes and tumor angiogenesis. The questions of vascular “supply” and vascular “demand”. *Sem. Cancer Biol.* 14: 93-104.

Reiter G, Hasslen N, Weber V, Falkenhagen D, Fringeli VP (2004) In situ FTIR ATR spectroscopic study of the interaction of immobilized human necrosis factor- α with a monoclonal antibody in aqueous environment. *Biochem. Biophys.* 1699: 253-261.

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

Rogers YH, Jiang-Baucom P, Huang ZJ, Bogdanov V, Anderson S, Boyce-Jacino MT (1999) Immobilization of Oligonucleotides onto a Glass Support via Disulfide Bonds: A Method for Preparation of DNA Microarrays. *Analytical Biochemistry*. 266(1): 23-30.

Roldán W, Cornejo W, Espinoza Y (2006) Evaluation of the dot enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with standard ELISA for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101(1): 71-74.

Ronald A, Stimson WH (1998) The evolution of immunoassay technology. *Parasitol.* 117: S13-S27.

Rongen HAH, Bult A, van Bennekom WP (1997) Liposomes and immunoassays. *J. Immunol. Meth.* 204: 105-133.

Rosa MP, Kanamura CT, Carvalho MB (2005) Expression of galectin-3 and cytokeratin 19 in the epithelial neoplasm of the thyroid gland and histopathological correlation. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 41(1): 61-70.

Salzman NH, et al. (1998) Enteric defensin expression in necrotizing enterocolitis. *Pediatr. Res.* 44: 20-26.

Sarkar M, Mandal C (1985) Immobilization of antibodies on a new solid phase for use in ELISA. *J. Immunol Methods*. 83: 55-60.

Shekhar MP, Nangia-Makker N, Tait L, F. Raz M (2004) Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression: functional analysis of galectin-3 in breast epithelial– endothelial interactions. *Am. J. Pathol.* 165 1931–1941.

Shmanai VV, nikolayera TA, Vinokurova LG, Litosha AA (2001) Oriented antibody immobilization to polystyrene macrocarriers for immunoassay modified with hydrazide derivatives of poly(meth)acrylic acid. *BMC Biotech.* 1: 4-8.

Shottner G (2001) hybrid sol-Gel-derived polymers: Applications of multifunctional materials. *Chem. Mater.* 13: 3422-3435.

Soares CMF, Santana MHA, Zanin GM (2003) Effect of poly (ethylene) glycol and albumin on the immobilization of microbial lipase and catalysis and catalysis in organic media. *Quim. Nova.* 26(6): 832-838.

Soutullo A, Verwimp VV, Riveros M, Pauli R, Tonarelli G (2001) Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. *Vet. Microbiol.* 79: 111-121.

Tanaka G, Funabashi H, Mie M, Kobatake E (2006) Fabrication of an antibody microwell array with self-adhering antibody binding protein. *Anal. Biochemistry.* 350: 298-303.

Taylor RH, Fournier SM, Simons BL, Kaplan H, Hefford MA (2005) Covalent protein immobilization on glass surfaces: Application to alkaline phosphatase. *J. Biotechnology.* 118: 265-269.

Ting YP, Sun G (2000) Use of polyvinyl alcohol as a cell immobilization matrix for copper biosorption by yeast cells. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75: 541-546.

Torrance L, Ziegler A, Pittman H, Peterson M, Toth R, Eggleston I (2006) Oriented immobilization of engineered single-chain antibodies to develop biosensors for virus detection. *J. Virol. Met.* 134: 164-170.

Turkeri LN, Sakr WA, Wydes SM, Grignon DJ, Pontes JE, Macoska JA (2004) Comparative analysis of epidermal growth factor receptor expression and protein product in benign, pre-malignant, and malignant prostatic tissue. *Prostate.* 25:199-205.

Turner APF (2000) Biosensors – Sense and sensitivity. *Science.* 290(5495): 1315-1317.

Ustun C, Ceber E (2004) Ethical issues for cancer screenings five countries-four types of cancer. *Prevent. Med.* 39: 223-229.

Van den Brule FA, Buicu C, Sobel ME, Liu FT and Castronovo V (1995) Galectin-3, a laminin binding protein, fails to modulate adhesion of human melanoma cells to laminin. *Neoplasma.* 42: 215-219.

Van den Brule FA, Waltregny D, Liu FT and Castronovo V (2000) Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. *Int. J. Cancer.* 89: 361-367.

Van den Brule F, Califice S, Castronovo V (2004) Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj. J.* 19: 537–542.

Vidal AMB, Catapani WR (2005) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. *Sao Paulo Med. J.* 123(6): 282-285.

Volle JN, Chambon G, Sayah A, Reymond C, Fasel N, Gijs MAM (2003) Enhanced sensitivity detection of protein immobilization by fluorescent interference on oxidized silicon. *Biosens. Bioelectron.* 19: 457-464.

Wang B, Zhang J, Dong S (2000) Silica sol-gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 15: 397-402.

Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R (1995) Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am. J. Pathol.* 147:815-22.

Xu XC, Sola Gallego JJ, Lotan R, El-Naggar AK (2000) Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in benign and malignant salivary gland neoplasms. *Int. J. Oncol.* 17: 271–276.

Yarlow RS, Berson SA (1959) Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature.* 184: 1648-1649.

Yonemura Y, Endou Y, Kimura K, Fushida S, Sasaki T (2000) Inverse expression of S100A4 and E-Cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* 6, 4234-4242.

Ziegler A, Torrance L (2002) Applications of recombinant antibodies in plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 3: 401-407.

Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W (1995) The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res. Bull.* 37(4): 417-29.

TRABALHOS CIENTÍFICOS DESENVOLVIDOS DURANTE O DOUTORADO (2004-2006)

Artigos publicados

Melo-Júnior, MR; Telles, AMS; Albuquerque, FEB; Pontes-Filho, NT; Carvalho Jr, LB; Beltrão, EIC. **Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro, 2(4): 123-125, 2004.

Alexandre Sergio Cabral de Brito; Mario Ribeiro de Melo-Júnior; Jorge Luiz Silva Araújo-Filho; Vasco José Ramos Malta Patu; Nicodemos Teles de Pontes-Filho. **Exposição de ratas adultas a doses crônicas de aguardente: estudo ponderal e histomorfológico do coração.** Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco. 50(2): 100-103, 2005.

Bruno Pires Ferreira e Silva; Mario Ribeiro de Melo-Júnior; Jorge Luiz Silva Araújo-Filho; Vasco José Ramos Malta Patu; Carmelita Bezerra de Lima Cavalcante; Nicodemos Teles de Pontes-Filho. **Efeitos da exposição perinatal à aguardente sobre o córtex cerebral de ratos.** Revista Paraense de Medicina. 20(1): 7-16, 2006.

Mario Ribeiro Melo-Júnior; Jorge Luiz Araújo Filho; Vasco José Ramos Patu; Marcos Cezar Feitosa Machado; Luciano Albuquerque Mello; Luiz B. Carvalho Junior. **Langerhans cells in Cutaneous Tumours: Immunohistochemistry study using a Computer Image Analysis System.** Journal of Molecular Histology. Publicado on line (Nov 2, 2006).

Mario R. Melo-Júnior; Jorge Luiz S. Araújo-Filho; Vasco José Ramos M. Patu; Marcos Cezar F. de Paula Machado; Eduardo I.C. Beltrão; Luiz B. Carvalho Jr. **Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry.** Brazilian Journal of Pathology and laboratory medicine 42(4): *In press*, 2006.

Mario Ribeiro Melo-Junior; Marcos Cezar Feitosa de Paula Machado; Jorge Luiz Silva Araújo-Filho; Vasco José Ramos Malta Patu; Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão; Nicodemos Teles de Pontes-Filho. **Avaliação Histoquímica da mucosa gastrointestinal de ratos expostos ao álcool.** Revista Paraense de Medicina. *In press*, 2006.

Jorge Luiz Silva Araújo-Filho; Mario Ribeiro de Melo-Júnior; Consuelo Antunes Barreto Lins; Marcos Cezar Feitosa P. Machado; Nicodemos Teles de Pontes-Filho. **Galectin-3 into Prostatic Prostatic Tumours: Immunohistochemistry and Digital Image Analysis** Brazilian Journal of Pathology and laboratory medicine 42(5): *In press*, 2006.

Melo-Júnior, MR; Oliveira, YS; Machado, MCFP; Patu, VJRM; Araújo-Filho, JLS. **Histomorphometrical evaluation of the micronucleous and collagen associated to skin neoplasms.** Anais Brasileiros de Dermatologia. *In press*, 2006.

Trabalhos apresentados em congressos científicos

Jorge Luiz Silva Araújo-Filho, Renata Kelly de Araújo Veiga, Marcos Cezar F. Paula Machado, Vasco José Ramos Malta Patu, Mario Ribeiro de Melo-Júnior. **Avaliação histomorfométrica de micronúcleos e colágeno associado a neoplasias de pele.** X Congresso Nacional de Biomedicina, Goiânia-GO, 2006.

Marcos Cezar F. Paula Machado, Mario Ribeiro de Melo-Júnior, Jorge Luiz Silva Araújo-Filho, Vasco José Ramos Malta Patu, Adriana Maria da Silva Telles. **Análise digital de micronúcleos e colágeno intersticial associado a lesões tumorais de mama.** X Congresso Nacional de Biomedicina, Goiânia-GO, 2006.

Humberto Gonçalves Bertão, Mario Ribeiro de Melo-Junior, Marcos Cezar F. de Paula Machado, Renato dos Anjos Souza, Jorge Luiz Silva Araújo-Filho. **Estudo retrospectivo da incidência de meningite meningocócica no estado de pernambuco no período 2001 a 2003.** X Congresso Nacional de Biomedicina, Goiânia-GO, 2006.

Mário Ribeiro de Melo-Júnior; Marcos Cezar F. Paula Machado; Paulo Roberto Eleutério Souza; Rosangela V. Souza Araújo; Adriana M. Silva Telles; Francisco Eduardo B. Albuquerque. **Correlation between molecular and histopathologic aspects of anal and perianal lesions from HIV and HPV patient.** X Congresso Nacional de Biomedicina, Goiânia-GO, 2006.

Cynarha Daysy Cardoso da Silva; Renato dos Anjos; Mário Ribeiro de Melo-Júnior; Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão; Luiz Bezerra de Carvalho Júnior. **Identificação Histoquímica de Carboidratos em epidídimo de pacientes com filariose.** X Congresso Nacional de Biomedicina, Goiânia-GO, 2006.

Luciano de Albuquerque Mello; Mário Ribeiro de Melo-Júnior; Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque; Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho. **Hepatite C em pacientes hemodializados: Uma análise da soroprevalência.** X Congresso Nacional de Biomedicina, Goiânia-GO, 2006.

Rodrigo Bacelar da Costa-Silva; Mario R. Melo-Júnior; Carlos Renato F.C. Mota; Conrado Bastos Batista; José Humberto Melo; Laíse Paula G. Dornelas. **Estudo de viabilidade de células tumorais do sarcoma 180 e da atividade anti-tumoral do PJU-SO₄ *in vivo*.** X Congresso Nacional de Biomedicina, Goiânia-GO, 2006.

Araújo-Filho JLS; Lins RAB; Antunes CBL; Vasconcelos SKS; Melo-Junior MR; Pontes-Filho NT; Carvalho Jr LB. **Profile expression of the galectin-3 into prostate tumour diseases**. Reunião Regional da SBBq – Natal, 2006.

Mello, Luciano Albuquerque; Melo-Júnior, Mario Ribeiro; Carvalho Jr, Luiz Bezerra de; Pontes-Filho, Nicodemos Teles de. **New method to quantification of the Helicobacter pylori in human gastric mucosae by image analysis system**. In: XXV Congresso Brasileiro de Patologia, Natal. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. v. 41. p. 81-81. 2005.

Araújo-Filho, Jorge Luiz Silva; Melo-Junior, Mario Ribeiro; Lins, Consuelo Antunes Barreto; Carvalho Jr, Luiz Bezerra; Pontes-Filho, Nicodemos Teles. **Digital Image Analysis of Immunohistochemistry into Prostatic Neoplasms**. XXV Congresso Brasileiro de Patologia, 2005, Natal. J. Br. Patol. Med. Lab. v.41, n.3, p121, 2005.

Melo-Junior, Mario Ribeiro; Araújo-Filho, Jorge Luiz Silva; Pontes-Filho, Nicodemos Teles. **Método semi-automático para análise morfométrica de granulomas esquistossomóticos**. XXV Congresso Brasileiro de Patologia, 2005, Natal. J. Br. Patol. Med. Lab. v. 41, n. 3, p 27, 2005.

Patu, José Ramos Malta; Melo-Junior, Mario Ribeiro; Araújo-Filho, Jorge Luiz Silva; Pontes-Filho, Nicodemos Teles. **Integrando o Ensino da Patologia às Novas Competências Educacionais**. XXV Congresso Brasileiro de Patologia, 2005, Natal. J. Br. Patol. Med. Lab. v.41, n.3, p61, 2005.

Veiga, Renata Kelly Araújo; Araújo, Juliana Amorim; Araújo-Filho, Jorge Luiz Silva; Lins, Consuelo Antunes Barreto; Melo-Junior, Mario Ribeiro. **Evaluation of c-erbB-2 protein expression in breast carcinomas by immunohistochemistry and digital image analysis**. XXV Congresso Brasileiro de Patologia, 2005, Natal. J. Br. Patol. Med. Lab. v.41, n.3, p 54, 2005.

Araújo-Filho, Jorge Luiz Silva; Melo-Junior, Mario Ribeiro; Lins, Consuelo Antunes Barreto; Carvalho Jr, Luiz Bezerra; Pontes-Filho, Nicodemos Teles. **Digital Image Analysis of Galectin-1 expressed into prostatic neoplasm tissue**. I Jornada Científica do LIKA, Recife-PE, 2005.

Figueiredo, José Luiz de; Melo-Júnior, Mario Ribeiro; Brandt, Carlos Teixeira; Carvalho Jr, Luiz Bezerra de. **Repercussion of the surgical treatment in the histopatological profile from gastric mucosa of patients with schistosomotic portal hypertension**. In: XXV Congresso Brasileiro de Patologia, 2005, Natal. Revista Brasileira de Patologia e Medicina Laboratorial. v.41. p.88-88. 2005.

Araújo, R.V.S.; Araújo, F.V.S.; Melo-Júnior, M.R.; Iacomini, M.; Leão, A.M.A.C.; Magalhães, N.S.S. **Histopathological evaluation of the treatment with free and liposome-loaded polysaccharide of Anacardium occidentale**. In: XXXIV Congresso de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Águas de Lindóia-SP. CD-Rom, 2005.

Prêmio de 1º Lugar “mérito científico”:

Machado, Marcos Cezar Feitosa de Paula; Araújo-Filho, Jorge Luiz Silva; Melo-Junior, Mario Ribeiro; Cavalcanti, Carmelita Lima Bezerra; Telles, Adriana Maria Silva; Albuquerque, Francisco Eduardo B. **Estudo comparativo do perfil histoquímico entre colite ulcerativa e cólon normal através da análise digital de imagens.** Concedido pela Sociedade Regional de Coloproctologia, Maceió, 2005.

Araújo-Filho, Jorge Luiz Silva; Pontes-Filho, Nicodemos Teles de; Veiga, Renata Kely Araujo; Melo-Junior, Mario Ribeiro de. **Histochemical and morphometric analysis of the rat cardiac tissue exposed to ethanol and chronic undernutrition.** In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambú-MG, 2004.

Veiga, Renata Kely Araujo; Araújo-Filho, Jorge Luiz Silva; Pontes-Filho, Nicodemos Teles de; Melo-Júnior, Mario Ribeiro de. **Immune disturbances in the thymus, spleen and Peyer's patches during the pre and post-natal exposition to ethanol.** In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambú-MG, 2004.

Araújo, R.V.S.; Marques, H.A.L.; Araújo, F.V.S.; Beltrão, E.I.C.; Melo-Júnior, M.R.; Carvahó Jr, L.B.; Iacomini, M.; Leão, A.M.A.C.; Magalhães, N.S.S. **Antihelmintic activity of liposome-loaded polysaccharide of Ramalina celastri on Schistosoma mansoni infected mice.** In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2004, Caxambú. XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2004.

Lima Neto, R.G.; Melo-Junior, M.R.; Carvalho Jr, L.B. **Quantitative analysis of the subcutaneous lesions histochemistry in superficial mycosis caused by sporotrichosis and chromomycosis.** In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2004, Caxambú. Programa e Resumos da XXXIII reunião anual da SBBq. 2004. v. Unico.

Melo-Júnior, M.R.; Maciel, W.V. **Estudo histomorfométrico das glândulas salivares de ratos tratados com inibidor seletivo de recaptura da serotonina - ISRS.** In: 21ª Reunião Anual SBPqO, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research. São Paulo: Brazilian Oral Research, 2004. v.18. p. 203-203.

Melo-Junior, Mario Ribeiro de.

Imobilização de anticorpos em compósito de Polisiloxano-Álcool polivinílico para uso em imunodiagnóstico. / Mario Ribeiro de Melo-Junior. – Recife: O Autor, 2006.

96 folhas : il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia, 2006.

Inclui bibliografia.

1. Polímero - Polisiloxano-Álcool 2. Imunologia 3. Anticorpos I. Título.

**57.083.3
571.96**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2007-007**