



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VASCO JOSÉ RAMOS MALTA PATU

**Imunohistoquímica e análise digital de imagens no
carcinoma ductal infiltrante**

Recife, 2008

VASCO JOSÉ RAMOS MALTA PATU

**Imunohistoquímica e análise digital de imagens no
carcinoma ductal infiltrante**

Dissertação 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 Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Co-orientador:

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Recife, 2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Autor: Vasco José Ramos Malta Patu

Título: Imunohistoquímica e análise digital de imagens no carcinoma ductal infiltrante.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior (Orientador)
Departamento de Bioquímica da UFPE

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão (Co-Orientador)
Departamento de Bioquímica da UFPE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho
Departamento de Patologia da UFPE

DEDICATÓRIA

A meus pais, a minha futura esposa, a minha irmã e aos meus sogros que apoiaram minhas decisões, e me deram todo o carinho durante mais uma jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e co-orientador Eduardo Beltrão pelos valiosos ensinamentos desde minha graduação, pelos momentos tão agradáveis de pura ciência, por ter sido sempre solícito, mesmo com suas tantas atribuições.

Ao meu amigo Mario Ribeiro por todo seu apoio e dedicação.

A Jorge Luiz, por sua amizade e bondade, sempre disposto a ajudar os que o cercam. Obrigado, por sua contribuição científica e pelo incentivo moral.

Ao Professor e orientador, Luiz Carvalho, pela oportunidade de entrar no seu seletor grupo de pesquisa, por estar presente em muitos dos momentos importantes de minha vida acadêmica e pela confiança em mim depositada.

A o professor Nicodemos, pela contribuição dada com seus conhecimentos e por ter sido o grande responsável pelo início da minha carreira acadêmica.

A Rebeca, Bruno e Moacir que muito contribuíram para o término desse trabalho.

A todos do nosso grupo de pesquisa, Carmelita Bezerra, Renata Veiga, Marcos Machado e Luciano Mello, pelas contribuições e pelos momentos de descontração, que por muitas vezes, me fizeram esquecer o cansaço.

Aos que fazem o LIKA, Moisés Melo, Ilma Maria, Conceição Chimenes, Vera Santana e Paulo Freitas, em suas diferentes atividades possuem particular importância para o desenvolvimento de nosso trabalho.

E a Deus, meu grande guia, que esteve sempre junto a mim, me impulsionando, inspirando e fortalecendo através de todas estas pessoas especiais às quais agradeço.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

1. REVISÃO DA LITERATURA	10
1.1 HISTOFISIOLOGIA DA MAMA	10
1.2 CÂNCER, UMA VISÃO GERAL	12
1.3 CÂNCER DE MAMA.....	13
1.4 VIMENTINA.....	16
1.5 HISTOQUÍMICA COM LECTINAS	18
1.6 ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS EM PATOLOGIA.....	19
2. JUSTIFICATIVAS	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GERAL.....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. METODOLOGIA.....	23
4.1 SELEÇÃO DOS CASOS	23
4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	23
4.3 PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO	23
4.4 HISTOQUÍMICA COM LECTINAS	23
4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA	24
4.6 ANÁLISE DE IMAGENS.....	24
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6.CONCLUSÕES	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
8. ANEXO.....	46

Lista de Figuras

- Figura 1:** Aspecto anatomo-funcional de mama normal de mulher adulta. 11
- Figura 2:** Padrão membranar da imunoexpressão da proteína vimentina 27 em carcinoma ductal infiltrante (Magnificação de 200x).
- Figura 3:** Padrão heterogêneo da marcação de glucose/manose 29 evidenciada pela con A em CDI (Magnificação de 200x).

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Análise de imagem das áreas imunomarcadas para a proteína vimentina (área média = $12234\mu\text{m}^2$)	28
Gráfico 2. Análise semi-quantitativa da expressão das lectinas nos casos de carcinoma ductal infiltrante	29
Gráfico 3. Análise semi-quantitativa da expressão das lectinas versus a vimentina-positiva em casos de carcinoma ductal infiltrante	30
Gráfico 4. Análise semi-quantitativa da expressão das lectinas versus a vimentina-negativa em casos de carcinoma ductal infiltrante	30

RESUMO

A imuno-histoquímica é uma técnica de grande ajuda no diagnóstico de doenças da mama, incluindo os tumores. De igual importância, a análise digital de imagens vem sendo cada vez mais utilizada em estudos de alterações na mama. O presente estudo teve como objetivo quantificar morfometricamente a expressão do anticorpo através da imuno-histoquímica em tecidos de mama normal e o carcinoma ductal infiltrante e compará-los com a histoquímica com as lectinas Concanavalina A (Con A) e a Peanut agglutinin (PNA), todas conjugadas a peroxidase. Fragmentos cirúrgicos de tecido mamário com CDI ($n = 25$) foram fixados em formalina, submetidos à rotina histológica e embebidos em parafina. Foram feitos cortes histológicos ($4\mu\text{m}$) montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (HE) para confirmar o diagnóstico. As amostras teciduais selecionadas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-vimentina por uma hora em temperatura ambiente (37°C) e então incubadas com um anticorpo secundário. A revelação foi realizada após incubação com diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio. Os tecidos serão desparafinizados em xilol e hidratados em álcool (70%-100%). As lâminas foram megulhadas (10 min) em 10 mM de tampão fosfato(PBS) e H_2O_2 . Os cortes foram contracorados com hematoxilina e eosina rápida e analisados em microscópio óptico. Para controle, as ligações das lectinas foram inibidas utilizando-se methyl- α -D-manosídeo para Con A e D-galactose para PNA (sigma USA). Nas 25 amostras de carcinoma ductal infiltrante foi observada a marcação de 42% dos casos para vimentina e nesses casos foi observado um aumento na marcação de PNA e diminuição da marcação com Con A. Já no restante das amostras (58%) não houve marcação para vimentina e os padrões de Con A e PNA foram invertidos em relação aos vimentina positivos. Os diferentes perfis de expressão da vimentina oferecem um ótimo suporte quantitativo para a investigação de células neoplásicas de mama.

Unitermos: Mama, Vimentina, Análise digital de imagens, Tumor

SUMMARY

The immunohistochemistry is a technique of great help in diagnosing diseases of the breast, including tumors. Equally important, the analysis of digital images is being increasingly used in studies of changes in the breast. This study aimed to quantify the expression of the antibody morfometricamente through immunoperoxidase as in normal breast tissue, and infiltrating ductal carcinoma and compare them with histochemistry with lectins Concanavalin A (Con A) and Peanut agglutinin (PNA), all combined with peroxidase. Fragments submitted to routine histological and embedded in paraffin. The tissue samples were incubated with selected monoclonal antibody anti-vimentin by one hour at room temperature (37°C) and then incubated with a secondary antibody. The revelation was made after incubation with diaminobenzidine (DAB) and hydrogen peroxide. Tissues will be desparafinizados in xylol and hydrated in alcohol (70% -100%). The different profiles of expression of vimentin offer a great support for the quantitative research of malignant cells in breast.

Key words: Mama, Vimentin, analysis of digital images, tumor

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 HISTOFISIOLOGIA DA MAMA

As glândulas mamárias ficam sobre o músculo peitoral na parede torácica superior. São compostas por tecido especializado glandular suportado por tecido conectivo predominantemente adiposo, com agrupamentos neurovasculares e uma quantidade variável de tecido fibroso (Cunha *et al.*, 2004).

Seis a dez dos principais sistemas ductais originam-se no mamilo. O epitélio escamoso queratinizado da pele sobrejacente continua dentro dos ductos e então muda abruptamente para um epitélio cubóide de camada dupla. Um pequeno tampão de queratina é encontrado, com freqüência, no orifício do ducto. A pele alreolar circunjacente é pigmentada e sustentada por musculatura lisa (Robbins *et al.*, 2005).

A ramificação sucessiva de grandes ductos leva, eventualmente, à unidade ductolobular terminal. Na mulher adulta, as ramificações do ducto terminal criam um agrupamento de ácinos que formam um lóbulo. Cada sistema ductal ocupa tipicamente um quarto da mama, e sobrepõem-se extensivamente sobre outros. Em algumas mulheres, os ductos estendem-se ao tecido subcutâneo da parede torácica e da axila (Ian & D'Arrigo, 2004).

Na mama normal (**Figura 1**) os ductos e lóbulos são forrados por dois tipos de células. Uma camada inferior plana e descontínua de células contráteis contendo miofilamentos (células mioepiteliais) que ficam sobre a membrana basal. Essas células ajudam na ejeção do leite durante a lactação e têm um

papel importante na manutenção da estrutura e função normais do lóbulo e da membrana basal. Uma segunda camada de células epiteliais demarca os lúmens. As células luminais do ducto terminal e do lóbulo produzem leite, porém aquelas que revestem o grande sistema ductal não (Ivan & D'Arrigo, 2004).



Figura 1. Aspecto anatomo-funcional de mama normal de mulher adulta.
Fonte: <http://www.mentorcorp.com/global> (15/12/2007)

A maioria do estroma mamário consiste em tecido conjuntivo fibroso denso misturado com tecido adiposo (estroma interlobular). Os lóbulos são confinados por um estroma mamário específico hormonalmente responsivo, delicado e mixomatoso que contém uma disseminação de linfócitos, chamado estroma intralobular (Robbins *et al.*, 2005).

Desta forma, devido a grande variedade de estruturas, a mama torna-se alvo de uma série de distúrbios anatomo-funcionais que acomete grande parcela da população mundial feminina.

1.2 CÂNCER: UMA VISÃO GERAL

A carcinogênese inicia-se a partir de uma alteração no DNA celular ou da ativação anormal de genes presentes em células sadias. Tais genes coordenam a proliferação, a diferenciação, a morte por apoptose e outras funções celulares primordiais. A expressão amplificada de proteínas reguladas por tais genes pode determinar a progressão de alterações celulares levando aos estados neoplásicos malignos (Conde *et al.*, 2005).

No que se refere às funções bioquímicas, as moléculas de adesão e vias de transdução dos sinais para o crescimento tumoral são bastante alterados durante a progressão tumoral. 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 transdução de sinais localizados na superfície celular (Gua *et al.*, 2006).

Os diferentes tipos de carboidratos 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 da célula e organelas

celulares também são evidentes durante o desenvolvimento dos processos patológicos (Astoul *et al.*, 2000).

O mecanismo de reconhecimento molecular na superfície da célula, o que a torna capaz de reconhecer células semelhantes e assim interagir com as mesmas mantendo a homeostase, é afetado quando células normais sofrem neoplasia. O resultado é um crescimento e divisão descontrolados, devido às alterações nesse mecanismo. (Shekhar *et al.*, 2004). Em estudos com extratos de tumores realizados por Hirschfeld & Thonsen na década de 30 foram os primeiros a demonstrar alterações bioquímicas nas células tumorais, o que foi posteriormente confirmado como padrões de glicosilação aberrantes associados ao tumor (Dabelsteen *et al.*, 1992).

Com o advento da tecnologia de anticorpos monoclonais e o avanço das pesquisas com a histoquímica com lectinas, descobriram-se vários epítomos "tumor-específicos" dentre os quais carboidratados, especialmente em glico-esfingolipídeos. Além do que, correlações significativas entre certos tipos de glicosilação alterada e o atual prognóstico de tumores referidos de animais experimentais ou humanos aumentam o interesse sobre essas mudanças bioquímicas específicas (Beltrão *et al.*, 2001; Melo-Junior *et al.*, 2006)

1.3 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a segunda neoplasia mais prevalente em mulheres, só ficando atrás dos cânceres de pele do tipo não melanoma (INCA, 2006). Ligados aos fatores genéticos, estudos epidemiológicos conduzidos em diferentes populações determinaram que fatores de risco como idade,

localização geográfica, situação socioeconômica e eventos reprodutivos (idade da menarca e da menopausa, infertilidade, gravidez e amamentação) estão associados a uma maior incidência de carcinomas de mama (Dumitresco & Cotarla, 2005).

Dentre os tumores malignos de mama, o carcinoma ductal infiltrante representa o maior grupo, constituindo cerca de 65 a 80% dos carcinomas mamários (Dantas *et al.*, 2003). O carcinoma ductal infiltrante pode ser de origem familiar ou esporádica, estima-se que entre 5 e 10% dos casos são de origem familiar. As aberrações cromossômicas encontradas não são específicas para este tumor e os cariótipos indicam um alto grau de heterogeneidade nestes tumores (Hoffmann & Schallag, 2000).

A Organização Mundial da Saúde estima que, por ano, ocorram mais de 1.050.000 novos casos de câncer de mama em todo o mundo, o que o torna o câncer mais comum entre as mulheres (WHO, 2006).

Tem-se observado, em alguns países desenvolvidos, como é o caso dos Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Holanda, Dinamarca e Noruega, um aumento da incidência do câncer de mama acompanhado de uma redução da mortalidade por esse câncer, o que está associado à detecção precoce por meio da introdução da mamografia para rastreamento e à oferta de tratamento adequado. Em outros países, como no caso do Brasil, o aumento da incidência tem sido acompanhado do aumento da mortalidade, o que pode ser atribuído, principalmente, a um retardamento no diagnóstico e na instituição de terapêutica adequada (INCA, 2006).

As estimativas para o ano de 2006 calculavam uma ocorrência de 472.050 casos novos de câncer no Brasil. O tipo mais incidente no sexo

feminino, com exceção do câncer de pele (não melanoma), seria o de mama (49.000 casos), estes valores correspondem a um risco estimado de 52 novos casos a cada 100 mil mulheres acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo. Dados demonstraram que no Brasil, em 2006, foram informadas 36.744 internações e 2.344 mortes de mulheres por neoplasia maligna da mama (Datasus, 2007).

Frente às limitações práticas para a implementação, junto à população, de estratégias efetivas para a prevenção do câncer de mama, as intervenções, do ponto de vista da Saúde Pública, passam a ser direcionadas a sua detecção precoce, com a garantia de recursos diagnósticos adequados e tratamento oportuno (INCA, 2006).

A vasta exibição de semelhanças histológicas de doença mamária proliferativa atípica, bem como carcinomas, traduz-se nas manifestações externas de dúzias ou centenas de alterações biológicas. Atualmente, nenhuma alteração genética ou funcional comum pode ser encontrada em cada tipo de câncer de mama. A maioria das alterações reportadas ocorre em somente um subconjunto de carcinomas e, em geral, em combinações altamente variáveis com outras alterações (Mirtrunen & Hirvonen, 2003)

As alterações morfológicas na mama associadas ao menor risco de câncer são lesões com números crescentes de células epiteliais (alterações proliferativas). Isto sugere que as alterações iniciais estão relacionadas à evasão de sinais inibidores do crescimento, da apoptose e da auto-suficiência dos sinais de crescimento. Há evidências de que, mesmo no estágio inicial, exista expressão anormal dos receptores hormonais e regulação anormal da

proliferação em associação à positividade dos receptores hormonais (Iqbal *et al.*, 2001).

O estágio final da carcinogênese, a transição do carcinoma limitado pela membrana basal dos ductos e lóbulos (carcinoma *in situ*) ao carcinoma infiltrante, é o menos compreendido. As funções gênicas específicas necessárias à invasão são de difícil identificação (Porter *et al.*, 2004). O desequilíbrio cromossomal ocorre com os ganhos ou perdas em múltiplos *locus*, como em lesões hiperplásicas que progridem para carcinoma ductal *in situ* até carcinoma ductal infiltrante. Não obstante, as mudanças cromossômicas compartilhadas com ambos os carcinomas ductal *in situ* e adjacente ao carcinoma ductal infiltrante demonstram sua relação clonal e evolucionária (Menezes *et al.*, 2006).

1.4 VIMENTINA

A vimentina é uma proteína que faz parte dos filamentos intermediários do citoesqueleto de células animais. Trabalhos demonstraram que a super-expressão, na membrana da célula, dessa proteína está envolvida em processos patológicos como o aparecimento de tumores infiltrantes. Além da sua correlação com esses tumores de grande invasividade, a super-expressão da vimentina está ligada a tumores quimioresistentes (Gilles *et al.*, 2003). Células neoplásicas de mama podem expressar vimentina em suas membranas, por essa razão, essa proteína do citoesqueleto pode ser usada como um bom prognóstico para o câncer de mama (Woelfle *et al.* 2005). A expressão dessa proteína coincide com o crescimento celular e, também, com

a regulação do ciclo celular. Por essas características, o aparecimento da vimentina pode contribuir com o aumento da invasividade de alguns tumores (Izmailova & Zehner, 1999).

A susceptibilidade hereditária, causada por mutações em genes dominantes autossômicos, é responsável por quase 10% de todos os tipos de câncer de mama (Liebens *et al.*, 2007). As mutações no gene BRCA1 são responsáveis pela grande maioria dos cânceres com ocorrência hereditária (Mcclain *et al.*, 2005), as mutações podem aumentar o aparecimento de vimentina e/ou laminina em tumores malignos da mama (Rodriguez-Pinilla *et al.* 2006).

A grande expressão da vimentina é observada devido ao crescimento e a angiogênese tumoral (Orimo *et al.*, 2005), causados pelas mutações no BRCA1 (Foulkes, 2008). Dessa forma, tem-se usado a vimentina e algumas citoqueratinas(5,6,8,18) como marcadores para identificar possíveis alterações no BRCA1 (Tischkowitz & Foulkes, 2006) No entanto, os mecanismos bioquímicos de ação desse gene ainda não foram totalmente elucidados, sabe-se que o BRCA1 assume papéis importantes em processos celulares como reparos no DNA, na apoptose, ativação e repressão transcricionais (Narod & Foulkes, 2004).

A identificação precoce de alterações na expressão desse gene é essencial para uma melhor prevenção e/ou tratamento dos tumores malignos de mama (Carvalho *et al.*, 2007).

As mutações em genes como o BRCA1 ocasionam alterações importantes na bioquímica das células envolvidas na carcinogênese (Foulkes, 2008). Essas modificações bioquímicas provocam modificações na expressão

de carboidratos e a menor ou maior expressão desses pode estar envolvida com o aparecimento de metástases e angiogênese tumoral (Kannagi *et al.*, 2004).

1.5 HISTOQUÍMICA COM LECTINAS

A variação na expressão de carboidratos nos vários processos metabólicos, de desenvolvimento e de reconhecimento celular, possibilita o uso das lectinas como marcadores estruturais revelando a organização das superfícies celulares e mudanças durante envelhecimento e patologias (Beltrão *et al.*, 1998, 2001, 2003; Campos *et al.*, 2006; Melo-Junior *et al.*, 2006).

Lectinas são uma classe de proteínas de origem não imunológica, de distribuição ubíqua na natureza e que reconhecem carboidratos livres ou ligados às superfícies celulares através de sítios de ligações a carboidratos, nos quais a hidrofobicidade é a principal força de interação (Thom *et al.*, 2007).

Um grande número de lectinas tem sido empregado como marcadores histoquímicos de tecidos. Dentre elas destacam-se as lectinas de amendoim ("Peanut agglutinin"; PNA), a de *Canavalia ensiformis* (Con A), de *Ulex europaeus* 1 (UEA-1), de *Dolichos biflorus* (DBA) e a de *Triticum vulgaris* (WGA) (Herling *et al.*, 2000).

Em Histoquímica as Lectinas, conjugadas à peroxidase, isotiocianato de fluoresceína, éster de acridina e criptato, têm sido intensamente utilizada para caracterização de superfícies celulares como sondas na detecção de mudanças na glicosilação e na expressão de carboidratos, que ocorrem durante a embriogênese, crescimento e doença. Neste último as lectinas têm

sido empregadas no auxílio de diagnósticos histopatológicos, para o mapeamento dos estágios de diferenciação e desdiferenciação, nível de malignidade e capacidade de metástases (Brooks, 2000; Danguy *et al.*, 2002) em tecidos da cavidade oral (Komath *et al.*, 2000); cérebro humano (Beltrão *et al.*, 2003); baço (Dullman *et al.*, 2000); mama (Beltrão *et al.*, 1998, 2001, 2006); útero (Pillai *et al.*, 1994); próstata (van den Brûle *et al.*, 2001); pele (Melo-junior *et al.*, 2006), entre outros.

1.6 ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS EM PATOLOGIA

Os mais diversos métodos de análise têm sido aplicados para traduzir de forma mais objetiva e numericamente representativa as transformações que ocorrem nas células tumorais (Francis *et al.*, 2000), seja através da análise colorimétrica de células neoplásicas em cultura (Alley *et al.*, 1991), citometria automática ou variações morfométricas nucleares (Roels *et al.*, 2000).

No apoio à interpretação dos resultados obtidos pela histoquímica de células tumorais, os sistemas computadorizados de análise de imagens têm fornecido dados qualitativos e quantitativos mais refinados, esclarecendo assim, vários aspectos histomorfológicos das neoplasias (Lee *et al.*, 2004).

A análise digital de imagens é de grande importância para o diagnóstico, especialmente nos casos onde a suspeita clínica de câncer prevalece mesmo após uma biópsia negativa (Hilbe *et al.*, 2003). O avanço da computação digital tem oferecido grandes benefícios na discriminação e estudo estatístico de dados numéricos. A possibilidade da utilização de ferramentas computacionais na construção de gráficos complexos, avaliação dos padrões de cor e

capacidade de armazenar imagens tem sido amplamente utilizada nas análises morfológicas de padrões histológicos e citológicos (Tawafik *et al.*, 2006).

Avaliações histológicas através da imunohistoquímica (Melo-Junio *et al.*, 2006), imunofluorescência (Waggoner *et al.*, 1996), densitometria do DNA (Cohen *et al.*, 1996) e reconstrução tri-dimensional de estruturas (Whinster & Cookson, 1995), conjugados a métodos morfológicos computadorizados, tanto no modelo experimental (Figueredo-Silva *et al.*, 1999), como em seres humanos (Araújo-Filho *et al.*, 2006; Melo-Jr, 2003) têm fornecido resultados mais precisos e completos para os mais diversos tipos de alterações morfológicas nos tecidos.

Estudos realizados por Melo-Júnior e colaboradores demonstraram a utilidade da análise digital de imagem na identificação e quantificação de áreas marcadas através de reação imunohistoquímica em neoplasias de pele (Melo-Júnior *et al.*, 2006) e próstata (Araújo-Filho *et al.*, 2006).

No estudo da mama, observa-se atualmente o desenvolvimento de diferentes técnicas de análise de imagem, pode-se citar como exemplo o sistema diagnóstico auxiliado por computador (Computer-Aided Diagnosis, CAD), que tem o objetivo de facilitar, na mamografia, a visualização dos tumores pelos radiologistas, identificando padrões de imagens previamente fornecidas ao software (Giger, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

A incidência de câncer no Brasil vem aumentando o cada ano e as descobertas de tratamento não acompanham esse aumento de incidência. Estimou-se para o ano de 2006 o surgimento de 472.050 novos casos de câncer. O câncer de mama foi responsável por 49.000 desses, perdendo em incidência apenas para o câncer de pele do tipo não melanoma (61.000 novos casos) em mulheres (INCA, 2006). Por esses motivos, nos últimos anos, tem-se acentuado o interesse por estudos relacionados aos mecanismos envolvidos na carcinogênese da mama, em parte devido a correlação do aparecimento de tumores com o aumento na glicosilação celular e a identificação de proteínas específicas relacionadas com o aparecimento dos tumores.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, através da histoquímica com lectina, imunohistoquímica e análise digital de imagens, a expressão de carboidratos específicos (glucose/manose e D-galactose) e da proteína vimentina no carcinoma ductal infiltrante (CDI) e compará-los com tecido de mama normal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Estabelecer a expressão tecidual da proteína vimentina e dos glicoconjugados em neoplasia maligna (CDI) e tecido de mama normal;

3.2.2 Comparar morfometricamente através da área média (μm^2), a expressão da proteína vimentina, de glicose/manose e galactose na superfície celular em tecido de mamário normal e com CDI.

4. METODOLOGIA

4.1 SELEÇÃO DOS CASOS

Foram selecionados 25 biópsias (carcinoma ductal infiltrante) do Arquivo do Setor de Patologia do LIKA, órgão suplementar da Universidade Federal de Pernambuco, provenientes do Hospital do Câncer de Pernambuco.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O protocolo experimental desenvolvido fez parte de um projeto submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do CCS/UFPE (Registro CEP/CCS/UFPE N°312/06).

4.3 PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO

As biópsias selecionadas foram fixadas em formalina a 10% e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes (4µm) montados em lâminas histológicas, coradas pela hematoxilina-eosina e analisadas por um Patologista confirmando a hipótese clínica de acordo com os achados histológicos. Os tumores foram classificados segundo critérios da Organização Internacional de Classificação Histológica de Tumores (Eisenberg, 2004).

4.4 HISTOQUÍMICA COM LECTINAS

Foram testadas as lectinas *Concanavalina A* (Con A) e a *Peanut agglutinin* (PNA), todas conjugadas a peroxidase (Sigma, USA). Os cortes (4µm), desparafinizados em xilol e hidratados em álcool (70%-100%), foram tratados com solução de tripsina (0,1%) a 37°C por 2 min e metanol-H₂O₂ por 20 min e

incubados com as lectinas (Con A - 25µg/ml e PNA - 25µg/ml) a 4°C por duas horas. A peroxidase foi visualizada com DAB e H₂O₂. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina e eosina rápida e analisados em microscópio óptico. Para controle, as ligações das lectinas foram inibidas utilizando-se methyl-α-D-manose para Con A e D-galactose para PNA (Sigma, USA). Para a obtenção do padrão de marcação oferecido pela histoquímica com lectinas foi utilizada a visualização da marcação por dois observadores independentes, e, a classificação usada foi a de: marcação inexistente (-) para ausência de coloração; marcação fraca (+) para coloração fraca ou imperceptível em mais de 10% das células tumorais; marcação moderada (++) para coloração de intensidade fraca ou moderada em mais de 10% das células tumorais, e, finalmente marcação forte (+++) para coloração intensa em mais de 10% das células tumorais (Scillitani *et al.*, 2007).

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

A detecção do antígeno foi realizada com anticorpo (DAKO). As lâminas foram incubadas por 16h, sendo em seguida adicionado ao tecido o anticorpo secundário (sistema LSAB). Para revelação foi utilizada solução cromógena de DAB e H₂O₂. Para o controle negativo, foi omitido o anticorpo primário.

4.6 ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS

Para análise histomorfométrica foi utilizado o sistema interativo de análise de imagens que utiliza o Software OPTIMAS® 6.1 e Câmera digital CCBBW 410 (Sansung), disponíveis no Departamento de Patologia da UFPE. Os parâmetros morfométricos adotados foram o número médio de células

marcadas por campo (campo = $12234 \mu\text{m}^2$), e área média (μm^2) das células marcadas (6 campos aleatórios por lâmina).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas obtidas foram submetidas ao estudo estatístico utilizando-se os testes t de student e Tukey, através do software PRISMA[®] 3.0. Em todos os casos, foi considerado como nível de significância para rejeição da hipótese nula um valor $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A susceptibilidade hereditária, causada por mutações em genes dominantes autossômicos, é responsável por quase 10% de todos os tipos de câncer de mama (Liebens *et al.*, 2007). As mutações no gene BRCA1 são responsáveis pela grande maioria desses cânceres (Mcclain *et al.*, 2005), elas podem aumentar o aparecimento de vimentina e/ou laminina em tumores malignos da mama (Carvalho *et al.*, 2007). A grande expressão da vimentina é observada devido ao crescimento e a angiogênese tumoral (Orimo *et al.*, 2005), causados pelas mutações no BRCA1 (Foulkes, 2008). Dessa forma, tem-se usado a vimentina e algumas citoqueratinas (5, 6, 8, 18) como marcadores para identificar possíveis alterações no BRCA1 (Tischkowitz & Foulkes, 2006).

As mutações em genes como o BRCA1 ocasionam alterações importantes na bioquímica das células envolvidas na carcinogênese (Foulkes, 2008). Essas modificações bioquímicas provocam alterações importantes na expressão de carboidratos e a menor ou maior expressão desses pode estar envolvida com o aparecimento de metástases e angiogênese tumoral (Kannagi *et al.*, 2004).

Neste trabalho, observou-se que 64% dos casos de carcinoma ductal infiltrante apresentaram marcação positiva para a vimentina (**Figura 2**), essa marcação foi bem evidenciada nas membranas das células tumorais (**Gráfico 1**). Corroborando com os resultados de Woelfle e colaboradores (2004) que encontraram uma expressão membranar da vimentina e a relacionaram com a invasividade desses carcinomas e apontaram ainda essa proteína como uma boa alternativa no prognóstico para o carcinoma ductal infiltrante.

A análise de imagem feita nas amostras vimentina-positiva, demonstrou haver uma diferença significativamente maior ($p < 0,0001$) na expressão da vimentina quando comparada com o tecido normal da mama. Sendo uma proteína presente nos filamentos intermediários das células, é normalmente expressa em células de origem mesenquimal (Gilles *et al.*, 2003). No entanto, trabalhos como o de Bindels e colaboradores (2006) mostraram que a grande expressão da vimentina está relacionada à processos fisiológicos e patológicos na migração celular, bem como na invasividade tumoral.

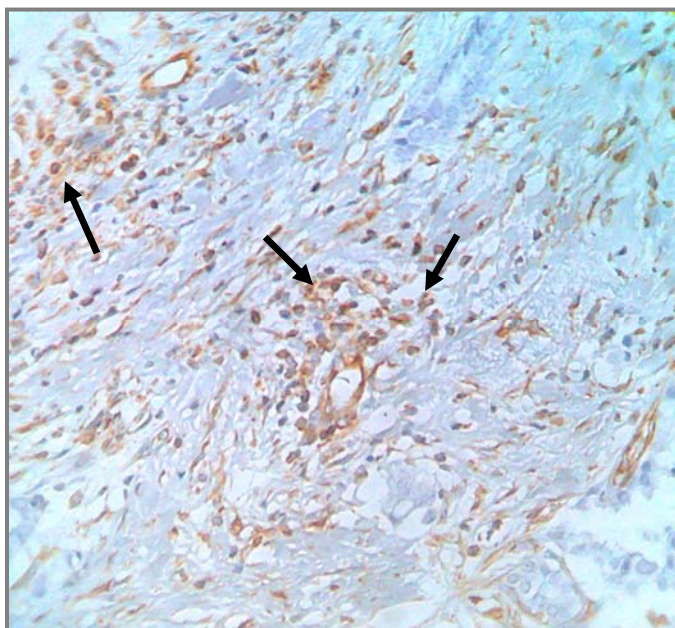
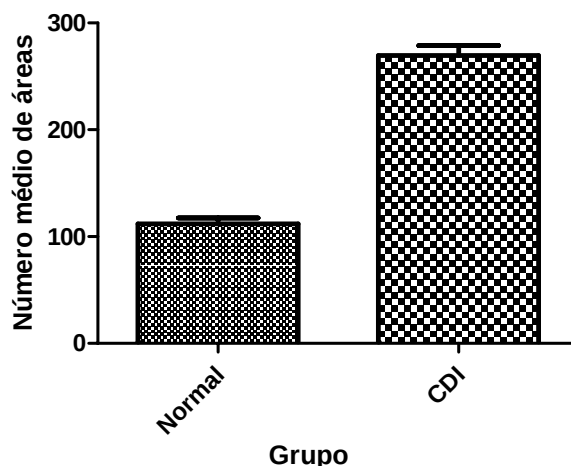


Figura 2: Padrão membranar da imunoexpressão da proteína vimentina em carcinoma ductal infiltrante (Magnificação de 200x).

Gráfico 1: Análise de imagem das áreas imunomarcadas para a proteína vimentina (área média = $12234\mu\text{m}^2$)



Nesse estudo, foi feita a comparação semi-quantitativa das áreas marcadas com a histoquímica para as lectinas *Concanavalina A* (Con A) e a *Peanut agglutinin* (PNA), juntamente com a imunohistoquímica para a proteína vimentina seguindo o parâmetro estabelecido por Scillitani e colaboradores (2007). Para a análise da histoquímica com lectinas consideramos as amostras vimentina-positiva assim como as amostras vimentina-negativa.

Nas amostras normais (bordas livres de tumor dos cortes histológicos) observamos uma marcação fraca e heterogênea para as duas lectinas.

Os resultados encontrados tanto para a lectina Con A quanto para a PNA não obtiveram diferença estatisticamente relevante quando comparadas entre si nas amostras do tumor (vimentina-positiva e vimentina-negativa) (**Gráfico 2**). Estando assim de acordo com os resultados encontrados por Carter e Brooks (2005) que observaram um aumento na expressão dos glicoconjugados evidenciados pelas lectinas quando comparadas ao tecido normal da mama, no entanto não visualizaram uma marcação distinta entre a

Con A e a PNA. Nos casos de carcinoma ductal infiltrante (CDI) em que a vimentina foi positiva, ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na expressão do carboidrato glucose/manose, evidenciada pela Con A (**Figura 3**) comparada com a marcação para vimentina e D-galactose (**Gráfico 3**).

Gráfico 2: Análise semi-quantitativa da expressão das lectinas nos casos de carcinoma ductal infiltrante

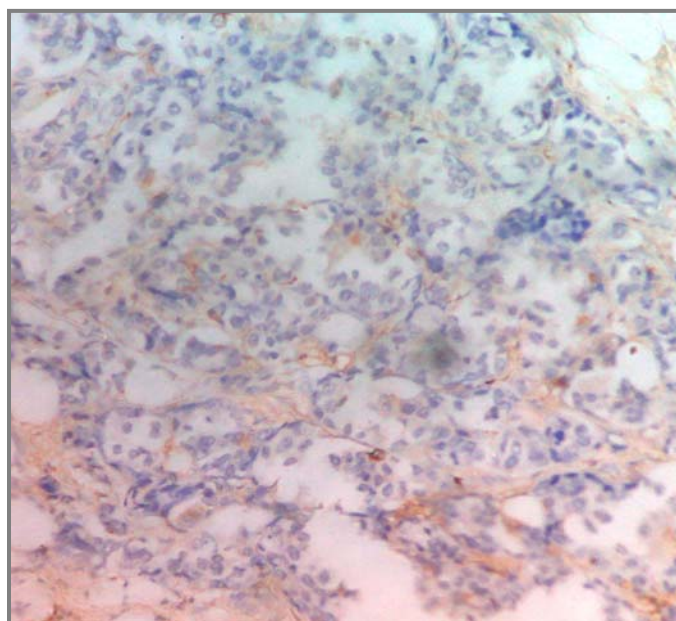
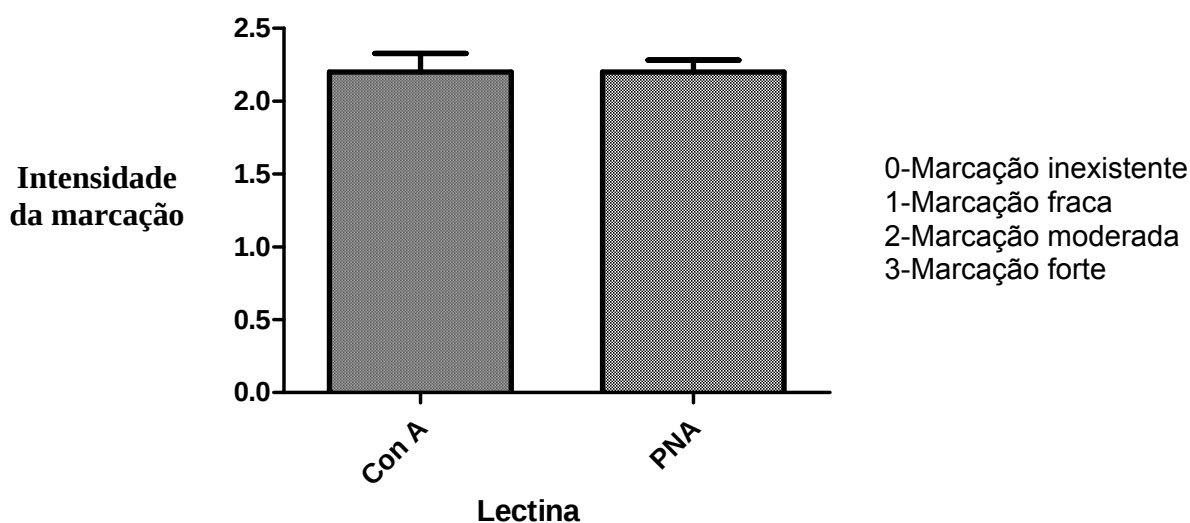
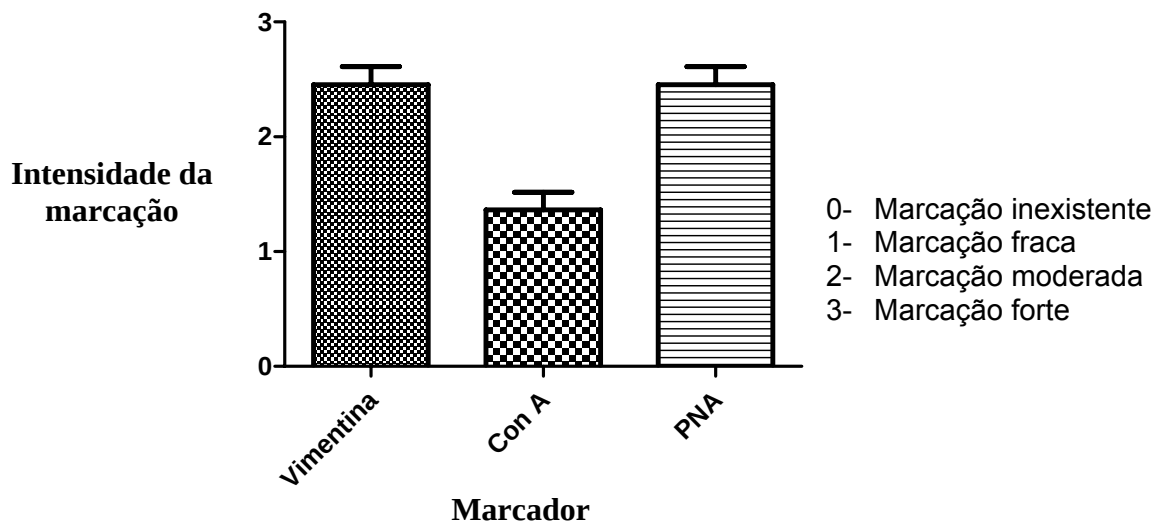


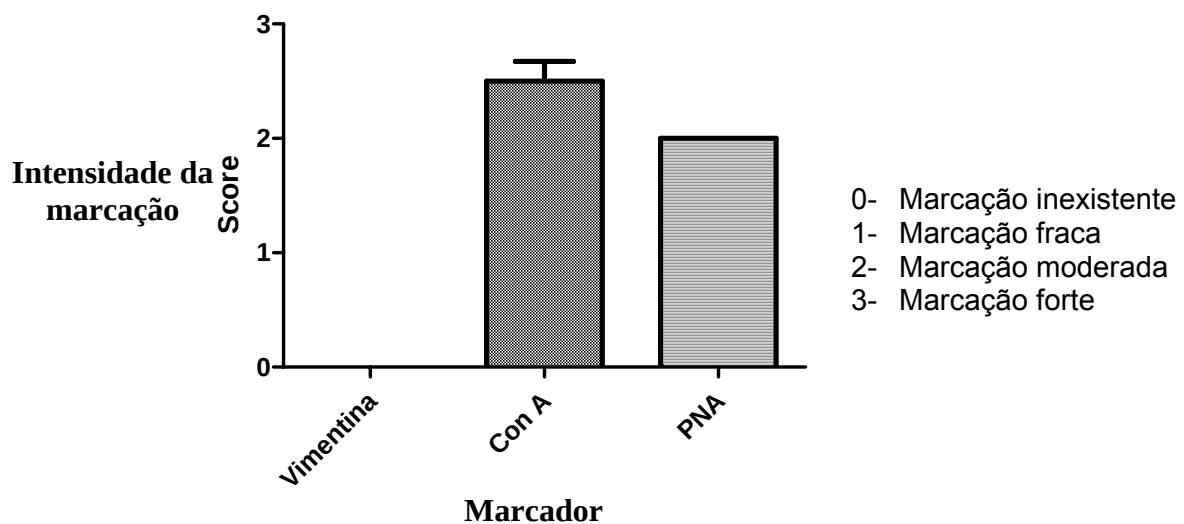
Figura 3: Padrão heterogêneo da marcação de glucose/manose evidenciada pela con A em CDI (Magnificação de 200x).

Gráfico 3: Análise semi-quantitativa da expressão das lectinas versus a vimentina-positiva em casos de carcinoma ductal infiltrante



Nas amostras vimentina-negativas, a PNA mostrou um padrão de marcação significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparada com a marcação evidenciada pela Con A (**Gráfico 4**).

Gráfico 4: Análise semi-quantitativa da expressão das lectinas versus a vimentina-negativa em casos de carcinoma ductal infiltrante



As marcações das lectinas analisadas no presente estudo foram heterogêneas, apresentando-se ora membranar, ora citoplasmática ou ainda perinuclear. As amostras não seguiram um padrão específico, tendo como consequência a não obtenção de um padrão de análise quantitativa pelo analisador de imagens.

Quanto ao sistema computadorizado de imagens utilizado, pode-se observar que as diferentes etapas desde a captura, processamento e análise morfométricas das imagens, foram executadas em um tempo médio de 10 minutos para cada lâmina analisada, o que demonstra que, após a calibração inicial do equipamento, o método proposto não se configura uma técnica muito demorada.

Tanto na prática clínica como em trabalhos experimentais é de fundamental importância a utilização de métodos para quantificar parâmetros relevantes observados na formação de tecido tumoral (Barbosa-Júnior, 2001).

Vários trabalhos têm empreendido a utilização de métodos morfométricos computadorizados para o estudo de distúrbios morfológicos da mama (Carter *et al.*, 2003). Entretanto, o número de trabalhos com a análise de imagem de técnicas imunohistoquímicas na mama é pequeno, porém aquelas que o fazem relatam ganhos significantes, principalmente como um instrumento de relevante valor prognóstico (Tawfik *et al.*, 2006).

A partir dos resultados recentes da análise morfométrica utilizando o sistema de análises OPTIMASTM 6.1, pode-se constatar a eficiência desse sistema para avaliar tecidos marcados com a técnica de imunohistoquímica (Araújo-Filho *et al.*, 2006).

Todavia, existem algumas limitações, como padronização (calibração), alto preço do equipamento e longo período de treinamento, que podem ser as causas da lenta implantação dessa metodologia nos laboratórios de patologia, tanto para uso na rotina histológica como para utilização em imunohistoquímica de tecidos com lesões tumorais (Barbosa-Júnior, 2001).

O desenvolvimento e a execução de metodologias automatizadas podem trazer um grande benefício para a rotina clínica, sendo útil para o controle de qualidade e a quantificação exata da marcação imunohistoquímica. Alguns autores enfatizam a possibilidade do armazenamento de dados e das análises realizadas, o que torna possível a re-análise a qualquer momento. Desta maneira os assistentes técnicos podem executar uma pré-análise que pode ser avaliada pelo perito posteriormente, e ainda pode ser usado como uma boa ferramenta para a formação de novos profissionais (Hilbe *et al.*, 2003).

A partir dos resultados obtidos com a análise de imagens pode-se concluir que a super-expressão da vimentina em casos de carcinoma ductal infiltrante é um fenômeno condizente com o estágio de proliferação das células neoplásicas e que, referente a esse marcador específico, as células normais possuem um padrão totalmente discrepante.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- As amostras de carcinoma ductal infiltrante apresentaram uma super-expressão da vimentina, diferentes das células mamárias normais;
- A expressão da Con A e da PNA não foram estatisticamente diferentes em todas as amostras de CDI;
- Considerando as amostras vimentina-positivas, a expressão de D-galactose foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) que a expressão de glucose/manose;
- Em contrapartida, nas amostras vimentina-negativas a expressão de glucose/manose foi significativamente maior ($p < 0,05$) que a expressão de D-galactose;
- A histoquímica com a lectina PNA não apresentou diferença estatística quando comparamos os casos de vimentina-positiva e vimentina-negativa;
- O sistema de análise de imagens utilizado (OPTIMASTM 6.1) demonstrou ser eficiente na quantificação da vimentina identificada pela imunohistoquímica, porém, esse sistema não apresentou eficiência na quantificação das células mamárias marcadas pela histoquímica com lectinas;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEY, M.C. Morphometric and colorimetric analysis of human tumor-cell line growth and drug sensitivity in soft agar culture. **Câncer Res.** V. 51, n. 4, p. 1247-1256, 1991.

ARAÚJO-FILHO, J.L.S.; MELO-JÚNIOR, M.R.; LINS, C.A.B.; LINS, R.A.B.; MACHADO, M.C.F.P.; CARVALHO-JR, L.B.C.; PONTES-FILHO, N.T. Galectina-3 em tumores de próstata: imuno-histoquímica e análise digital de imagens. **J Bras Patol Med Lab.** V. 42, n. 6, p. 469-475, 2006.

ASTOUL, C.H.; PEUMANS, W.J.; VAN DAMME E.J. 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.** V. 274, n. 2, p. 455-460, 2000.

BARBOSA-JÚNIOR, A.A. Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. **J. Bras. Patol Med Lab.** V.37, n. 3, p. 197-200, 2001.

BARREIRO, B. *et al.* Comparison between automatic and manual analysis in the diagnosis of obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. **Arch Bronconeumol** v. 39, n. 12, p. 544-548, 2003.

BELTRÃO E.I.C. ; CORREIA M.T.S.; FIGUEREDO-SILVA J.; COELHO L.C.B.B. Binding evaluation de isoform Cratylia mollis lectin to human mammary tissues. **Appl Biochem Biotechn.** V. 74, p. 125-134, 1998.

BELTRÃO E.I.C. ; MEDEIROS P.L. ; RODRIGUES O.G. ; FIGUEREDO-SILVA J. ; VALENÇA M.M. ; COELHO L.C.B.B. ; CARVALHO-JR L.B. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meninge tumor. **Eur J Histochem.** V 27,n. 2 p. 139-142, 2003.

BELTRÃO, EIC, CABRAL TA, FIGUEREDO-SILVA J, COELHO, L.C.B.B. ; CARVALHO JR. L.B. Infiltrating ductal mammary carcinoma : a lectin histochemistry study. **Anais Faculdade Medicina da UFPE.** 46(1) :32-35, 2001

BINDELS, S. *et al.* Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. **Onc.**v.25, p.4975–4985, 2006.

BROOKS S.A. The involvement of Helix pomatia lectin (HPA), binding N-acetylgalactosamine glycans in cancer progression. **Histol Histopathol.** V.15, n.1, p. 143-58, 2000.

CAMPOS, L.M. ; CAVALCANTI, C.L.B. ; LIMA-FILHO, J.L. ; CARVALHO-JUNIOR, L.B. ; BELTRÃO, E.I.C. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. **Biomarkers**, Sep-Oct, V.11, n. 5, 480-484, 2006

CARTER, J.K. *et al.* A computer model for the study of breast cancer. **Computer Biol Med.** V. 33, p. 345-360, 2003.

CARTER, T.; BROOKS S. Detection of aberrante glycosylation in breast cancer using lectin histochemistry. **Breas Canc Res Prot.** V. 13, p. 201-216, 2005.

CARVALHO M.A.; COUCHC F. J.; ALVARO N.A. Functional assays for BRCA1 and BRCA2 Review. **Internat J Biochem Cell Biol.** V. 39, p. 298–310 ,2007.

COHEN, C. Image Cytometry Analysis in Pathology. **Hum. Pathol.** V. 27, p. 428-493, 1996.

CONDE, D.M.; TERRESAN, R.Z.; KASHIMOTO, E.; CARVALHO, L.E.C.; FILHO, C.C. Fibroadenoma in axillary supernumerary breast: case report. **São Paulo Med. J.** v. 123, n. 5, p. 253-5, 2005.

CUNHA, G.R.; COOKE, P.S.; KURITA, T. Role of stromal-epithelial interaction in hormonal responses. **Arch Histol Cytol.** V. 65, n. 5, p. 417- 434, 2004.

DABELSTEEN, E.; CLAUSEN, H.; MANDEL, U. Carbohydrate changes in squamous cell carcinomas. **APMIS.** (suppl. 27) v. 100, p. 130-138, 1992.

DANGUY A.; CAMBY I.; KISS R. Galectins and cancer. **Biochim Biophys Acta.** V.1576, n. 3, p. 285-93, 2002.

DANTAS, K.A.; SANTOS, G.C.; FILHO, O.G. Sistemas de graduação para carcinoma: estudo comparativo da concordância cito-histológica. **Rev Bras Gine Obst.** V. 25, n. 2, 2003.

DATASUS, 2007. Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus>. Acesso em 12 mai. 2007.

DULLMAN J.; FELDHAUS S.; VAN DAMME E.J., PEUMANS W.J., SCHUMACHER U. Lectin histochemistry of the spleen: a new lectin visualizes the stromal architecture of white pulp and the sinuses of red pulp. **J Histochem Cytochem.** V. 48 n.7, p. 923-931, 2000.

DUMITRESCO, R.G.; COTARLA, I. Understanding breast cancer risk — where do we stand in 2005? **J Cell Mol Med.**v. 9, n. 1, p. 208-21, 2005.

EISENBERG A. L. A. TNM: classificação de tumores malignos. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Instituto Nacional de Câncer.** Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 254p, 2004.

FIGUEREDO-SILVA, J.; PONTES-FILHO, N.T.; MONTENEGRO, L.T.; SANTANA, J.W.; FREITAS, S.B. Esquistossomose mansônica experimental: Estudo morfométrico e experimental das células caliciformes intestinais. **An. Fac. Med. UFPE.** V. 44, p. 21-25, 1999.

FOULKES W.D. BRCA1-sowing the seeds crooked in the furrow. **Nature**. V 40, p. 8-9, 2008.

FRANCIS, I.M. Manual versus image analysis estimation of PCNA in breast carcinoma. **Anal. Quant. Cytol. Histol.** V. 22, n. 1, p. 11-16, 2000.

GIGER, M.L. Computerized Analysis of Images in the Detection and Diagnosis of Breast Cancer. **Seminars Ultrasound CT MRI**. V. 25, p. 411-418, 2004.

GILLES C, POLETTE M, MESTDAGT M, NAWROCKI B, RUGGERI P, BIREMBAUT P, FOIDAR J. Transactivation of Vimentin by β -Catenin in Human Breast Cancer Cells. **Cancer Research**. V. 63, p. 2658–2664, 2003.

GUA, Y.; LI, H.; MIKI, J.; KIMA, K.H.; FURUSATO, B.; SESTERHENN, I.A.; CHUB, W.S.; MCLEODA, D.G.; SRIVASTAVA, S.; EWINGD, C.M.; ISAACS, W.B.; RHIMA, J.S. Phenotypic characterization of telomerase-immortalized primary non-malignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines. **Experimental Cell Research**. V. 312, p. 831-843, 2006.

HILBE, W.; GACHTER, A.; DUBA, H.C.; DIRNHOFER, S.; EISTERER, W.; SCHMID, T. *Et al.* Comparison of automated cellular imaging system and manual microscopy for immunohistochemically stained cryostat sections of lung cancer specimens applying p53, ki-67 and p120. **Oncology Reports**; v. 10, n. 1, p. 15-20, 2003.

HOFFMANN, W.; SCHALAG, P.M. BRCA1 and BRCA2 breast Cancer Susceptibility Genes. **J Cancer Res Clin Oncol** v. 126, n. 9, p. 487-96, 2000.

IAN, S.F.; D'ARRIGO, C. Pathogenesis of breast carcinoma. **Int J Clin Pract.** V. 58, n. 1, p. 35–40, 2004.

INCA – Instituto Nacional de Câncer Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 94p, 2006. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/2006>. Acesso em: 08 fev. 2007.

IQBAL, M.; DAVIES, M.P.; SHOKER, B.S.; JARVIS, C.; SINBSON, D.R.; SLOANE, J.P. Subgroups non-atypical hyperplasia of breast defined by proliferation of estrogen receptor-positive cells. **J Pathol.** V. 193, p. 333, 2001.

IZMAILOVA E.S., ZEHNER ZENDRA E. An antisilencer element is involved in the transcriptional regulation of the human vimentin gene. **Gen.** v. 230, p. 111–120, 1999.

KANNAGI R.; IZAWA M.; KOIKE T.; MIYAZAKI K.; KIMURA N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. **Can. Sci.** v. 95, p. 377–384, 2004

KOMATH S.S., BHANU K., MAIYA B.G., SWANY M.J. Binding of porphyrins by the tumour-specific lectin, jacalin. **Biosci Rep.** v.20, n.4, p.265-276, 2000.

LIEBENS F. P., CARLY B., PASTIJN A., ROZENBERG S. Management of BRCA1/2 associated breast cancer: A systematic qualitative review of the state of knowledge in 2006. **Eur J Cancer**. V. 43, p. 238–257, 2007.

MCCLAIN, M.R. *et al.* Adjusting the estimated proportion of breast cancer cases associated with BRCA1 and BRCA2 mutations: public health implications. **Genet Med**. V 7, p. 28–33, 2005.

MCLAIN MR, PALOMAKI GE, NATHANSON KL, HADDOW JE. Adjusting the estimated proportion of breast cancer cases associated with BRCA1 and BRCA2 mutations: public health implications. **Genet Med**. V. 7, p. 28–33, 2005.

MELO-JÚNIOR M.R.; ARAÚJO-FILHO J.L.S.; PATU, V.J.R.M.; MACHADO, M.C.F.P.; BELTRÃO, E.I.C.; CARVALHO-JR, L.B. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumour differential diagnosis. **J cânc Patol Med Lab**. V. 42, n. 6, p. 455-460, 2006.

MELO-JÚNIOR, M.R. *et al.* Análise digital de imagens em patologia a interface com a engenharia biomédica. **Rer cânc Eng Biomed**, v. 22, p. 203-206, 2006.

MELO-JÚNIOR, M.R. *et al.* Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumour differential diagnosis. **J cânc Patol Med Lab**. V. 42, n. 6, p. 455-460, 2006.

MELO-JÚNIOR, M.R. Histoquímica e análise digital de imagens em neoplasias cutâneas. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 56p. (Tese Mestrado), 2003.

MENEZES, M.V.M.; CESTARI, A.L.O.; ALMEIDA, O.; ALVARENGA, M.; PINTO, G.A.; GURGEL, A.S.C.; SOUZA, G.A.; ZEFERINO, L.C. Protein expression of c-erbB-2 and p53 in normal ducts, ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma of the same breast. **São Paulo Med J.** v. 124, n. 3, p. 121-124, 2006.

MIRTRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. **Mutation Research** v. 544, p. 9–41, 2003.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. Carcinogênese. In: Patologia processos gerais. Capítulo 13, 4ª edição, Editora Atheneu, São Paulo, 320p, 2004.

NAROD S.A, FOULKES W.D. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. **Nat Rev Cancer.** V. 4, p. 665–76, 2004.

NISHIMURA A., SAWADA S., USHIYAMA I., YAMAMOTO Y., NAHAGAWA T., TANEGASHIMA A., NISHI K. Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain. **F Sci Inter.** V. 113, n.1-3, p. 265-269, 2000.

ORIMO A.; GUPTA P.B.; SGROI D.C.; ARENZANA-SEISDEDOS F.; DELAUNAY T.; NAEEM R.; CAREY V.J.; RICHARDSON A.L.; WEINBERG R.A. Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. **Cell**. V 121, p. 335–348, 2005.

PHIPPS, S.; YANG, T.H.J.; HABIB, F.K.; REUBEN, R.L.; MCNEILL, S.A. Measurement of tissue mechanical characteristics to distinguish between benign and malignant prostatic disease. **Urology**. V. 66, p. 447–450, 2005.

PILLAI K.R., REMANI P., KANNAN S., MATHEW A., SUJATHAN K., VIJAYAKUMAR T., NAIR M.K. Jack fruit lectin-specific glycoconjugate expression during the progression of cervical intraepithelial neoplasia: a study on exfoliated cells. **Diagn Cytophatol**. V. 10, n.4, p. 342-346, 1994.

PORTER, D.; LAHTI-DOMENICI, J.; KESHAVIAH, A.; BAE, Y.K. *et al.* Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. **Mol Câncer Res**. V. 1, p. 362, 2001.

PRADAL, M.; MENEZES, A.M.; DI DIO, R. Marcadores tumorais. LAES & HAES. V. 30, p. 146-182, 2004.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. Bases Patológicas das Doenças. 7º Edição; Ed. Guanabara-Koogan, Editores: Kumar V, Abbas K, Nelson F, Robbins S. Rio de Janeiro. P. 1169-1205, 2005.

RODRIGUEZ-PINILLA S.M.; SARRIO D.; HONRADO E.; MORENO-BUENO G.; HARDISSON D., CALERO F.; BENITEZ J.; PALACIOS J. Vimentin and laminin expression is associated with basal-like phenotype in both sporadic and BRCA1-associated breast carcinomas. **J Clin Pathol**. Published Online First: 14 November 2006. <http://jcp.bmj.com/cgi/content/abstract/jcp.2006.042143v1>.

ROELS, S.L.M.F. DNA ploidy and nuclear morphometric variables for the evaluation of melanocytic tumors in dogs and cats. **Am. J. Vet. Res.** V. 61, n. 9, p. 1074-1079, 2000.

SCILLITANI, G. *et al.* Lectin histochemistry of gastrointestinal glycoconjugates in the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum* (Schreber, 1774). **Acta Histo.** V.109, p. 347-357, 2007.

SHEKHAR, M.P.; NANGIA-MAAKKER, N.; TAIT, L.; RAZ, M.F. 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.** V. 165, p. 1931–1941, 2004.

SYNOPSIS, A. Image and Sign Process. Yearbook of medical Informatics. Hasmam (Ed.), 1996.

TAWFIK, O.W.;KIMLER, B.F.;DAVIS, M.;DONAHUE, J.K.;PERSONS, D.L.;
FAN, F.; HAGEMEISTER, S.; THOMAS, P.; CONNOR, C.; JEWELL, W.;
FABIAN, C.J. Comparison of immunohistochemistry by automated cellular
imaging system (ACIS) versus fluorescence in-situ hybridization in the
evaluation of HER-2/neu expression in primary breast carcinoma. **Histopathol.**
V. 48, n. 3, p. 258-67, 2006.

THOMA I.; SCHULT-KRONEFELDA O.; BURKHOLDERBI.; GOERNA M.;
ANDRITZKYA B.; BLONSKIC K.; KUGLERD C.; EDLERB L.; BOKEMEYE
C..Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung. L **Cancer.**
V 56, p. 391-397,2007.

TISCHKOWITZ MD, FOULKES WD.The basal phenotype of BRCA1-related
breast cancer: past, present and future. **Cell Cycle.** V. 5, p. 963-7, 2006.

VAN DEN BRÛLE F.A., WALTREGNY D., CASTRONOVO V. Increased
expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome
in prostate carcinoma patients. **J Pathol.** V. 193, n.1, p. 80-7, 2001

WAGGONER, A.; TAYLOR L.; SEADLER, A.; DURLAY, T. Multiparameter
Fluorescence Imaging Microscopy: Reagents and Instruments. **Hum. Pathol.** V.
27, p. 494-502, 1996.

WOELFLE U.; SAUTER G.; SANTJER S.; BRAKENHOFF R.; PANTEL K.
Down-Regulated Expression of Cytokeratin 18 Promotes Progression of Human
Breast Cancer. **Clin Cancer Resear.** V. 10, p. 2670–2674, 2004.

WOELFLE, U. *et al.* Down-Regulated Expression of Cytokeratin 18 Promotes
Progression of Human Breast Cancer. **Clin Cancer Resear.** V. 10, p. 2670–
2674, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2006. Disponível em:
<http://www.who.int/en/>. Acesso em 05 jun. 2007.

8. ANEXO

TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O MESTRADO

Artigos completos publicados em periódicos

MELO-JÚNIOR, Mario Ribeiro ; ARAÚJO-FILHO, Jorge Luiz Silva ; MALTA-PATU, V.J.R. ; BELTRAO, E. I.C. ; CARVALHO JR, L. B. . Detection of s100 protein from prostatic cancer patients using anti-s100 protein antibody immobilized on POS-PVA discs. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, p. 182-187, 2007.

SILVA, Cynarha Daysy Cardoso ; MELO-JÚNIOR, M. R. ; MALTA-PATU, V.J.R. ; ARAÚJO-FILHO, J. L. S. ; MACHADO, M. C. F. P. ; PONTES FILHO, Nicodemos Teles de . A exposição crônica ao álcool e a desnutrição interfere no desenvolvimento do fígado durante o período perinatal?. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v. 22, p. 220-225, 2007.

ARAÚJO FILHO, Jorge Luiz da Silva ; MELO-JÚNIOR, M. R. ; VEIGA, Renata Kelly de Araújo ; MACHADO, M. C. F. P. ; MALTA-PATU, V.J.R. ; PONTES FILHO, Nicodemos Teles de . Análise histomorfométrica do coração de ratos expostos indiretamente ao etanol e à desnutrição crônica durante o período perinatal. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 6, p. 17-25, 2007.

MELO-JÚNIOR, M. R. ; ARAÚJO FILHO, Jorge Luiz da Silva ; MALTA-PATU, V.J.R. ; MACHADO, M. C. F. P. ; PONTES FILHO, Nicodemos Teles de . Integrando o Ensino da Patologia às Novas Competências Educacionais. *Ciências & Cognição (UFRJ)*, São Paulo/Brasil, v. 12, p. m347177, 2007.

SILVA, Bruno Pires Ferreira ; MELO-JÚNIOR, Mario Ribeiro ; ARAÚJO-FILHO, Jorge Luiz Silva ; MALTA-PATU, V.J.R. ; CAVALCANTI, Carmelita Lima Bezerra ; PONTES-FILHO, Nicodemos Teles . Ethanol Exposition in the Perinatal to Aguardente into Rats Cerebral CórteX. Revista Paraense de Medicina, v. 20, p. 7-14, 2006.

MELO-JÚNIOR, Mario Ribeiro ; ARAÚJO-FILHO, Jorge Luiz Silva ; MALTA-PATU, V.J.R. ; MACHADO, M. C. F. ; BELTRAO, E. I.C. ; CARVALHO JR, L. B. . Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 42, p. 455-460, 2006.

MELO-JÚNIOR, Mario Ribeiro ; ARAÚJO-FILHO, Jorge Luiz Silva ; MALTA-PATU, V.J.R. ; MACHADO, M. C. F. ; Mello LA ; CARVALHO JR, L. B. . Langerhans cells in Cutaneous Tumours: Immunohistochemistry study using a Computer Image Analysis System. Journal of Molecular Histology, v. 37, p. 321-325, 2006.

MELO-JÚNIOR, Mario Ribeiro ; ARAÚJO-FILHO, Jorge Luiz Silva ; MALTA-PATU, V.J.R. ; BELTRAO, E. I.C. ; PONTES-FILHO, Nicodemos Teles . Avaliação histoquímica da mucosa gastrointestinal de ratos expostos ao álcool. Revista Paraense de Medicina, v. 20, p. 7-12, 2006.

MELO-JÚNIOR, M. R. ; ARAÚJO FILHO, Jorge Luiz da Silva ; MACHADO, M. C. F. P. ; MALTA-PATU, V.J.R. . Análise digital de imagens em patologia a

interface com a engenharia biomédica. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, v. 22, p. 203-206, 2006.

Brito ASC ; MELO-JÚNIOR, Mario Ribeiro ; ARAÚJO-FILHO, Jorge Luiz Silva ; MALTA-PATU, V.J.R. ; PONTES-FILHO, Nicodemos Teles . 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, v. 50, p. 100-1003, 2005.

Resumos publicados em anais de congressos

MALTA-PATU, V.J.R. ; MELO-JÚNIOR, Mario Ribeiro ; ARAÚJO-FILHO, Jorge Luiz Silva ; Mello LA ; CARVALHO JR, L. B. ; BELTRAO, E. I.C. . Chronic effects of the ethanol and undernutrition in the histological profile of pancreas. In: XXXVI Annual Meeting of the SBBq, 2007, Salvador. XXXVI Annual Meeting of the SBBq, 2007. v. unico.

MACHADO, M. C. F. ; MELO-JÚNIOR, Mario Ribeiro ; ARAÚJO-FILHO, Jorge Luiz Silva ; PATU, Vasco José Ramos Malta ; MALTA-PATU, V.J.R. ; TELLES, Adriana Maria da Silva . Análise digital de micronúcleos e colágeno intersticial associado a lesões tumorais de mama. In: Congresso Brasileiro de Biomedicina, 2006, Goiânia. Anais do X Congresso Brasileiro de Biomedicina, 2006.

ARAÚJO-FILHO, Jorge Luiz Silva ; MACHADO, M. C. F. ; MALTA-PATU, V.J.R. ; MELO-JÚNIOR, Mario Ribeiro . Avaliação histomorfométrica de micronúcleos e colágeno associado a neoplasias de pele.. In: X Congresso Brasileiro de Biomedicina, 2006, Goiânia-GO. Anais doX Congresso Brasileiro de Biomedicina, 2006.

MALTA-PATU, V.J.R. ; MELO-JÚNIOR, Mario Ribeiro ; ARAÚJO-FILHO, Jorge Luiz Silva ; PONTES-FILHO, Nicodemos Teles . Integrando o Ensino da Patologia às Novas Competências Educacionais. In: XXV Congresso Brasileiro de Patologia, 2005, em Natal/RN. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. São Paulo. v. 41. p. 61-61.

Artigos aceitos para publicação

MALTA-PATU, V.J.R. ; MELO-JÚNIOR, Mario Ribeiro ; ARAÚJO-FILHO, Jorge Luiz Silva ; MACHADO, M. C. F. ; CAVALCANTI, Carmelita Lima Bezerra ; PONTES-FILHO, Nicodemos Teles . EFEITOS DO ETANOL E DESNUTRIÇÃO CRÔNICOS SOBRE O PERFIL HISTOLÓGICO DO PÂNCREAS DE RATOS. Revista Paraense de Medicina, 2007.