



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Mestrado em Patologia**

GEORGE LUIZ DE SOUZA ARAÚJO

**Análise histológica e histoquímica de fatores
prognósticos em pacientes com retocolite ulcerativa**

Recife, 2008

GEORGE LUIZ DE SOUZA ARAÚJO

**Análise histológica e histoquímica de fatores
prognósticos em pacientes com retocolite ulcerativa**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Patologia do Centro de Ciências
da Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito para
obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Co-orientador:

Prof. Dr^a. Adriana Maria da Silva Telles
Prof. Dr. Francisco Eduardo de Albuquerque Lima

Recife, 2008

Araújo, George Luiz de Souza

Análise histológica e histoquímica de fatores prognósticos em pacientes com retocolite ulcerativa / George Luiz de Souza Araújo. – Recife : O Autor, 2009.

36 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Reto. 2. Retocolite Ulcerativa. 3. Galectina-3. 4. Análise digital de imagens I. Título.

616.351

616.3434

CDU (2.ed.)

CDD (21.ed.)

UFPE

CCS2009-010



Universidade Federal de Pernambuco
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MESTRADO EM PATOLOGIA

AUTOR: GEORGE LUIZ DE SOUZA ARAÚJO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA GERAL

**NOME DA TESE: "ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DE FATORES
PROGNÓSTICOS EM PACIENTES COM RETOCOLITE ULCERATIVA".**

ORIENTADOR: PROF. DOUTOR NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO

TESE DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA

DATA: 14 DE AGOSTO DE 2008.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo Júnior

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE- REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

D I R E T O R DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Hilton Justino da Silva

R E C I F E

2008

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Luiz de Souza Araújo* e *Cleide Araújo de Souza*,
pessoas maravilhosas, que nunca mediram esforços para
deixar a herança mais importante em nossas vidas,
a Educação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Eduardo e sua esposa Profa. Dra. Adriana Telles, co-orientadores, pela confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Nicodemos Teles, orientador, pelo apoio intelectual e motivador com a célebre frase: “não se apavore, apenas trabalhe!”.

Ao Prof. Dr. Mario Ribeiro, pelas valiosas idéias.

À minha futura esposa, Charlene Barbosa, pelo ombro acolhedor nos momentos de incerteza.

Aos amigos conquistados neste âmbito acadêmico:

Heitor Barros

João Hermógenes

Jorge Luiz

Marcos César

Wagner Piauí

Zenóbio Fernandes

À esta Universidade, pela minha formação.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Nos últimos anos tem se aumentado o interesse pelo estudo cada vez mais detalhado dos processos patológicos envolvidos nas doenças inflamatórias intestinais, em especial a retocolite ulcerativa idiopática. Visando oferecer um método que auxilie o diagnóstico diferencial ou mesmo que seja indicador da transformação neoplásica, a galectina-3 surge como um potencial marcador da fisiopatologia de diversos tipos de câncer, entre eles o câncer colorretal. Para este estudo, o perfil imunohistoquímico foi avaliado em tecido intestinal de pacientes com retocolite ulcerativa (n=20) e sua respectiva contraparte normal, de ambos os sexos e idade média de 55 anos. Os tecidos foram fixados em formalina a 10% e submetidos à histoquímica da reação de Schiff (PAS) para visualizações das inclusões citoplasmáticas de glicosaminoglicanos, e tricrômico de Masson para visualização das fibras colágenas. Fragmentos de tecido (4 µm) foram submetidos à técnica de imunohistoquímica para a proteína galectina-3. Os perfis de marcação tecidual foram analisados através de uma estação de trabalho contendo um microscópio óptico equipado com uma câmera digital ambos acoplados a um computador contendo o software OPTIMAS®. Os resultados obtidos demonstram uma diminuição da expressão da galectina-3 no sítio inflamatório da retocolite ulcerativa. Houve um aumento significativo ($p<0.022$) no número de células caliciformes dos pacientes tratados clinicamente, porém com redução do conteúdo glandular. Os dados sugerem que a atividade glandular juntamente com a redução da expressão da galectina-3 possam auxiliar o diagnóstico e o monitoramento desses pacientes.

Palavras-chave: Retocolite ulcerativa, galectina-3, análise digital de imagens

ABSTRACT

Recently the interest for the study of the pathological processes involved in the inflammatory bowel disease, in special the ulcerative colitis, has increased. Aiming to offer a diagnosis method or a prognostic marker, galectin-3 appears as a potential marker of the physiopathology of diverse diseases and some types of cancer, Among them the colorectal cancer. For this study, the immunohistochemical and histological profiles were evaluated in intestinal biopsies of patients with ulcerative colitis (n=20) and its normal counterpart, from both sexes and average age of 55 year-old. The biopsies were fixed in formalin at 10% formalin and submitted to Periodic Acid of Schiff (PAS) for visualization of cytoplasmic glycosaminoglicans inclusions, and Masson's trichomic for visualization of collagen fibers. Fragments (4µm) were submitted to immunohistochemistry for galectin-3 protein. Tissues stainings were analyzed using an image analyzer station with the software OPTIMAS®. Results demonstrate a reduction of galectin-3 expression in ulcerative colitis inflammatory site from surgically and clinically treated patients. The goblet cells number from the surgically treated patients had suffered a significant reduction ($p<0.022$), however with increase of its glandular content. The data suggest that the glandular activity together with the reduction of the galectin-3 expression can help to diagnose these patients.

Keywords: ulcerative colitis, galectin-3, image digital analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espécime de ressecção cirúrgica de paciente com retocolite ulcerativa em fase ativa	12
Figura 2: Secções histológicas de retocolite ulcerativa crônica.	13
Figura 3: Displasia de alto grau em doença inflamatória intestinal	13
Figura 4: Estrutura molecular da galectina-3	16
Figura 5: Funções da galectina-3	17
Figura 6. Estação de análise de imagens do Departamento de Patologia	21
Figura 7: Perfis de marcação da galectina-3 em tecido colônico	23
Figura 08: Área de extensa fibrose	24
Figura 09: Área de tecido evidenciando infiltrado linfoplasmocitário	25
Figura 10: Área de erosão da mucosa colônica	26
Figura11: Comparação entre o número de células caliciformes entre os subgrupos	26
Figura 12: Marcação PAS de tecido colônico	27

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	8
1.1 Doenças inflamatórias intestinais	8
1.2 Incidência.....	9
1.3 Imunobiologia da retocolite ulcerativa.....	10
1.4 Patogênese da retocolite ulcerativa.....	11
1.5 Tratamento e método diagnóstico	14
1.6 Galectina-3	15
1.7 Análise digital de imagens em Patologia	18
2 OBJETIVOS	19
2.1 Geral	19
2.2 Específicos	19
3 METODOLOGIA.....	20
3.1 Seleção de Casos.....	20
3.2 Imunohistoquímica para galectina-3	20
3.3 Estudo histoquímico.....	21
4.4 Análise Computadorizada de Imagens	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5 CONCLUSÕES	27
6 REFERÊNCIAS	28
ANEXO.....	35
Parecer de aprovação do comitê de ética em pesquisa com seres humanos	35
Submissão do artigo científico em periódico indexado	36

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Doenças inflamatórias intestinais

A retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) e a doença de Crohn (DC) são as formas mais comuns de doenças inflamatórias intestinais (DII), que se caracterizam por inflamação crônica do intestino, de etiologia ainda não definitivamente esclarecida e em cuja patologia estão envolvidos fatores genéticos, ambientais e imunológicos (Sartor, 1997; Rutgeers, 1998). As DII ocorrem em todo o mundo e representam um sério problema de saúde, pois atingem preferencialmente pessoas jovens, cursam com recidivas freqüentes e admitem formas clínicas de alta gravidade (Jewel, 1998; Krombluth *et al.* 1998). A DII é resultante de ativação persistente e inadequada do sistema imune mucoso (Robbins e Cotran, 2005), admitindo-se que possa estar relacionada com um distúrbio autoimune (Takaishi *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2003).

A RCUI e a DC são consideradas formas distintas de DII. Contudo, os sintomas clínicos das duas se sobrepõem, e o diagnóstico diferencial em muitos casos é difícil (Gower-Russeal *et al.*, 2004). A RCUI acomete total ou parcialmente, a extensão do cólon ou reto, enquanto a DC pode afetar todo o trato gastrointestinal, desde a boca ao ânus, ocorrendo freqüentemente no intestino delgado distal e cólon (Robbins e Cotran, 2005). Porém, há um subgrupo de casos de DC com uma apresentação típica da RCUI, o que ilustra o grau de similaridade destas doenças (Irvine *et al.* 2001; Jewel, 1998). Isto significa que um paciente pode inicialmente ter sido diagnosticado com RCUI e mais tarde ser considerado portador de DC (Krombluth, 1998; Maeda *et al.* 1994).

Na DC as manifestações clínicas são variáveis, mais sutis que na RCUI, geralmente apresentando-se com febre, diarreia (ocasionando perda de peso e de eletrólitos), dor abdominal e períodos assintomáticos que pode durar semanas a meses. Em pacientes com DC, manifestada no cólon, pode apresentar perda de sangue fecal evidente ou oculta podendo levá-los a anemia e também a outras complicações hepáticas e renais (Castro *et al.* 2002; Robbins e Cotran, 2005). Na sua fase crônica podem surgir complicações como estenose fibrosante e fistulas.

Na RCUI os pacientes também apresentam surtos de diarreia com muco e sangue em períodos assintomáticos de meses, anos ou até décadas. Alguns pacientes podem apresentar uma única crise, leve, moderada ou grave tornando-se uma emergência médica em algumas situações (Robbins e Cotran, 2005). A dor abdominal na RCUI e diarreia com sangue são muito frequentes (Castro *et al.* 2002).

Levando-se em consideração os fatores genéticos, é sabido que a retocolite é um fator predisponente ao surgimento de câncer de cólon (Chambers *et al.* 2005). Na RCUI, são reconhecidos três tipos de lesões pré-malignas: a displasia plana, as lesões/tumores associados à displasia e os pólipos adenomatosos esporádicos (Malcomson e McGregor, 2002).

Neste sentido Rutter e colaboradores (2004) dão ênfase ao processo inflamatório estabelecido em longo prazo como sendo fator determinante da carcinogênese colorretal envolvida na DII. Contudo, existem indícios de que a carcinogênese oriunda da inflamação crônica poderia estar relacionada com um dano causado pela ativação prolongada das vias de sinalização responsáveis pela renovação celular continuada (Beachy *et al.*, 2004; McDonald *et al.*, 2006). Apesar destes achados, um estudo retrospectivo (Jess *et al.*, 2006) demonstrou que a severidade da inflamação é o fator que ofereceria um maior risco para o surgimento de uma neoplasia, com destaque, o tempo da doença e a extensão da mesma (pancolite).

1.2 Incidência

Importantes trabalhos retrospectivos sobre a epidemiologia da DII realizados, sobretudo, a partir de 1980 (Sedlack *et al.*, 1980; Stonnington *et al.*, 1981; Sonnenberg, 1986; Rose *et al.*, 1988), demonstraram que está havendo uma tendência mundial no aumento da incidência (Ekbom *et al.*, 1991; Irvine *et al.*, 2001) com destaque para os países do sul da Europa e Ásia e em muitos outros países em desenvolvimento, locais historicamente considerados de baixa incidência (Loftus, 2004). Embora estes dados possam sugerir a existência de um gradiente do norte para o sul, eles também poderiam indicar a variação no acesso, qualidade nos serviços de saúde, bem como diferentes níveis de industrialização, políticas

sanitárias e higiene. Dentre as razões para esta mudança de comportamento da doença nos países em desenvolvimento, estaria a mudança de estilo de vida no decorrer das últimas décadas e também o aperfeiçoamento dos métodos diagnósticos. Em todos os grupos populacionais estudados, o aumento da incidência da RCUI pareceu preceder, em até 20 anos, o aumento da incidência da DC (Binder *et al.*, 1982; Bjorson, 1989; Ekblom *et al.*, 1991; Róin e Róin, 1989).

A DC e a RCUI têm uma maior prevalência em pessoas de cor branca, especialmente mulheres. Vale ressaltar que o risco de recorrência para a incidência familiar da retocolite ulcerativa é de 20-30% entre filhos de pais positivamente diagnosticados (Haddad, 2001). A partir dos estudos com gêmeos, a contribuição genética para o desenvolvimento da doença inflamatória intestinal, parece, por sua vez ser mais importante na doença de Crohn do que na RCUI, com múltiplos produtos fatores contribuindo para o risco (Gaia *et al.* 2006).

As diferenças regionais com relação à frequência, à apresentação clínica e à gravidade tanto da DC quanto da RCUI, podem provavelmente ser explicadas por fatores de natureza genética e ambiental (Nemetz *et al.*, 1999; Triantafyllidis *et al.*, 2000).

Outro aspecto que deve ser levado em consideração no estudo das DII é a grande escassez de estudos sobre a ocorrência da DC e da RCUI nos países em desenvolvimento (Irvine *et al.*, 2001) o que inclui, sobretudo, o Brasil. Dessa maneira tornando mais difícil a realização de inquéritos epidemiológicos sobre estas doenças.

1.3 Imunobiologia da retocolite ulcerativa

A primeira linha de defesa do sistema imune de mucosa é a barreira epitelial (Baumgart e Dignass, 2002). Sendo o epitélio intestinal composto por uma camada simples polarizada recoberto por muco, no qual as bactérias comensais estão mergulhadas (Swidsinski *et al.*, 2002). Existem relatos na literatura de que defeitos na produção de muco são descritos em pacientes com RCUI (Smithson *et al.*, 1997).

O tecido linfóide de mucosa inclui células T, células B, granulócitos, mastócitos, células NK, células T NK, que estão localizadas no tecido conectivo frouxo da lâmina própria. Além destas, uma população de enterócitos altamente

especializada serve como interface entre a camada epitelial e o tecido linfóide subjacente – as células dendríticas. Estas células são a chave no controle da imunidade contra patógenos bem como a tolerância aos microorganismos comensais. Diferente das células epiteliais, as células efectoras imunes expressam uma série de moléculas receptoras capazes de fazer a distinção entre comensais e patógenos, além de ativar ou silenciar respostas mediadas por células T (Iwasaki e Medzhitov, 2004).

A função das células dendríticas é regulada por sua localização, número e estado de maturação (Banchereau e Steinman, 1998). Nos indivíduos saudáveis, estas células são capazes de captar antígenos comensais e induzir a uma baixa responsividade talvez por estimular a diferenciação das células T virgens em células T CD4 reguladoras conhecidas como células Th3. Este processo aconteceria de forma que a resposta tolerogênica (Th3) se sobressaísse em relação a respostas efectoras dos tipos Th1 (IFN- γ , IL-2) ou Th2 (IL-4, IL-10) e assim mantendo a tolerância (Banchereau e Steinman, 1998).

Atualmente já está bem estabelecido que a doença inflamatória intestinal resulte de uma resposta inapropriada do sistema imune de mucosa defeituoso, incapaz de distinguir a microbiota de outros antígenos luminiais (Baumgart e Daniel, 2007). Mas o modo e o porquê de como esta indução inapropriada acontece ainda esta sendo alvo de pesquisas no que diz respeito a sua patogênese.

1.4 Patogênese da retocolite ulcerativa

Na prática clínica o termo doença inflamatória intestinal é usualmente reservado para a retocolite ulcerativa idiopática, para doença de Crohn e para a doença inflamatória intestinal de tipo indeterminado. A retocolite ulcerativa é uma doença inflamatória crônica que envolve primariamente o reto e intestino grosso. Ela acomete o reto e se estende proximalmente de modo contíguo, podendo variar desde uma proctite a uma pancolite dependendo do grau de atividade da doença (Gramlich et al., 2007).

O exame macroscópico revela um cólon mais curto do que o normal e com leve espessamento da parede. A aparência da mucosa também varia dependendo da extensão da atividade da doença. A inflamação/doença ativa causa rubor e

granulações na mucosa (figura 1). Úlceras profundas podem ser vistas na RCUI fulminante e na colite indeterminada. Além desses achados, podem surgir pólipos inflamatórios não neoplásicos como resultado da ulceração da mucosa adjacente e da formação de tecido de granulação. Estes pólipos podem ser focais ou de localização extensa, em alguns casos podem aumentar o risco do aparecimento de neoplasia (Gramlich et al., 2007).



Figura 1: Espécime de ressecção cirúrgica de paciente com retocolite ulcerativa em fase ativa [Gramlich et al., 2007].

Já em relação às características histológicas da RCUI, a avaliação da arquitetura tecidual, bem como da natureza do infiltrado inflamatório indicam se o processo visualizado é “crônico”. Os termos “idiopático”, “indeterminado”, “inespecífico”, às vezes mencionados, referem-se à ausência de características peculiares que indicariam o tipo exato de inflamação, na RCUI a característica principal é a distorção da arquitetura tecidual do revestimento mucoso do cólon. A mucosa colônica normal contém criptas retas e tubulares, paralelas e compactas se estendendo para a camada muscular mucosa. Estes achados contrastam com a mucosa observada na RCUI (figura 2).

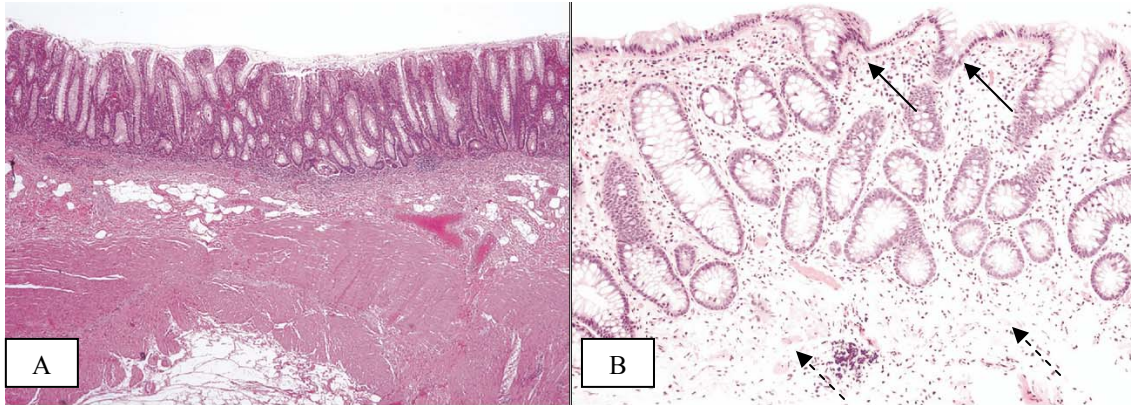


Figura 2: Secções histológicas de um cólon com retocolite ulcerativa crônica. (A) Mudanças na arquitetura tecidual da mucosa. (B) Arquitetura tecidual alterada evidenciando criptas atróficas que não se estendem para a camada muscular mucosa – setas cheias. Características adicionais de cronicidade incluem criptas ramificadas e irregularmente moldadas. Além disso, um infiltrado linfoplasmocítico e edema na lâmina própria podem ser visualizados na RCUI – setas seccionadas [Gramlich et al., 2007].

A displasia é uma alteração neoplásica das células epiteliais como resultado da inflamação crônica e subsequente regeneração (figura 3). O repetitivo dano epitelial com posterior reparo teoricamente aumenta a probabilidade de desenvolver anormalidades genéticas, resultando em neoplasia, achado mais comum em RCUI (Gramlich *et al.*, 2007).

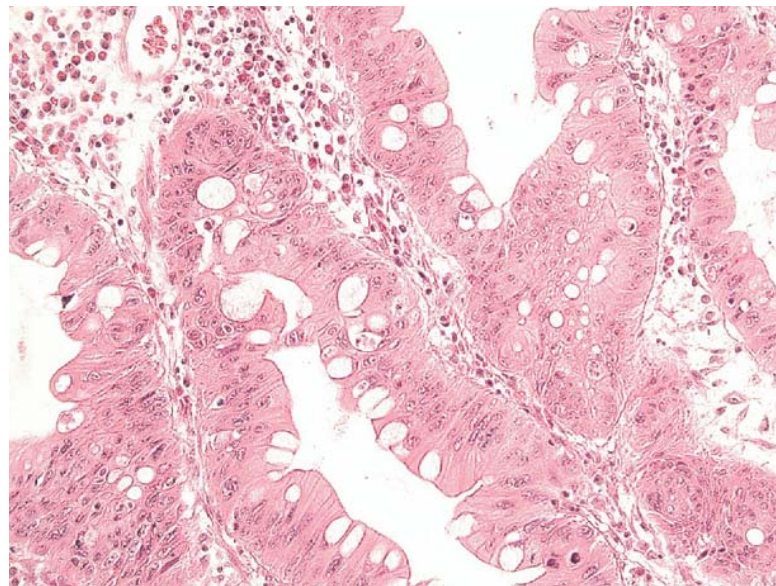


Figura 3: Displasia de alto grau em doença inflamatória intestinal. Notar os agrupamentos nucleares irregulares com sobreposição [Gramlich et al., 2007].

Dessa forma, os pacientes com RCUI com displasia tecidual têm um risco mais alto de desenvolver câncer colorretal do que a população geral (Eaden *et al.* 2001). A extensão e a duração da doença são dois fatores críticos que corroboram esta associação, apesar de estudos recentes também apontarem que a gravidade da doença é mais um fator predisponente ao surgimento da neoplasia intestinal. Para diminuir este risco, os pacientes são incluídos em programas de vigilância, com realização colonoscópica com biopsia seriadas dos segmentos do colon e reto anuais naqueles cuja doença é diagnosticada entre 8 e 10 anos.

1.5 Tratamento e método diagnóstico

Mesmo com todas essas informações a respeito do comportamento dessas doenças, existe necessidade de novos métodos para aperfeiçoar o diagnóstico de fatores de risco adicionais para a progressão neoplásica, permitindo o acompanhamento de pacientes com alto risco.

Logo o sucesso do tratamento vai depender do diagnóstico preciso da doença inflamatória intestinal. Esse tratamento pode ser medicamentoso apresentando melhores resultados nos casos inflamatórios; o cirúrgico é mais indicado na doença fibroestenótica (Castro *et al.*, 2002). Outra aplicação seria a colectomia adotado como medida profilática para os pacientes com alto risco de câncer colorretal (displasia grave). Porém a colectomia não deve ser proposta a qualquer termo, tanto pelo fato da natureza traumática da técnica, quanto pelas possíveis complicações às vezes relacionadas com o procedimento. (Agabidi *et al.*, 2005).

Atualmente aconselha-se que o estudo histopatológico da mucosa retal deve sempre ser realizado e se constitui no método diagnóstico mais importante, embora não-patognomônico para o esclarecimento da etiologia da colite (Diaz *et al.*, 2002). O diagnóstico histopatológico de amostras teciduais obtidos por endoscopia é essencial e crucial para determinação do tratamento (Abdel-Hady e Bunn, 2004).

Com base nesses achados, nos últimos anos tem-se acentuado o interesse no diagnóstico diferencial da retocolite ulcerativa (RCUI) e doenças inflamatórias intestinais (DII) que apresentam aspectos epidemiológicos e clínicos comuns. Entretanto diferem de modo significativo quanto à evolução, as formas de

exteriorização clínica e à resposta ao tratamento, permitindo caracteriza-las como entidades distintas.

Os métodos consagrados de diagnóstico definitivos, muitas vezes classificam um pequeno grupo de pacientes com doença inflamatória intestinal com “colite indeterminada”, baseada em critérios histopatológicos. Os exames laboratoriais rotineiros revelam alterações comuns às duas afecções, não permitindo, portanto, diferenciá-las. Por este motivo a utilização de ferramentas moleculares como apoio ao diagnóstico vem ganhando espaço no sentido de identificar marcadores celulares específicos.

A expressão de galectina-3 tem emergido como um potencial marcador diagnóstico/prognóstico de algumas neoplasias, em especial o adenocarcinoma de cólon (Sanjuan, *et al.* 1997; Bresalier *et al.*, 1998).

Nesse contexto, o presente trabalho propôs-se a buscar uma correlação entre a expressão tecidual da galectina-3 de pacientes com retocolite ulcerativa, juntamente com marcadores histoquímicos, tais como PAS e tricrômico de Masson para obter dados quantitativos e qualitativos que possam auxiliar no prognóstico das doenças inflamatórias intestinais.

1.6 Galectina-3

As galectinas pertencem uma família de proteínas que se ligam a resíduos de galactose em glicoconjugados (glicoproteínas e/ou glicolipídios) e representam um grupo especial das chamadas proteínas ligantes de carboidrato, as lectinas (Hughes, 2004). A estrutura molecular das galectinas geralmente consiste de cerca de 130 aminoácidos, altamente conservados, com uma região de reconhecimento a carboidratos (CRD – carbohydrate recognition domain) e específica para β -galactosídeos (Barondes *et al.*, 1994; Lahm *et al.*, 2004) (figura 4).



Figura 4. Estrutura molecular da galectina-3.

Até o presente, 14 membros da família das galectinas foram identificados, entre eles está a Galectina-3. Esta se encontra distribuída em uma ampla variedade de células e tecidos, podendo ser encontrada no interior da célula ou mesmo secretada no espaço extracelular (Dumic *et al.*, 2006) (figura 5).

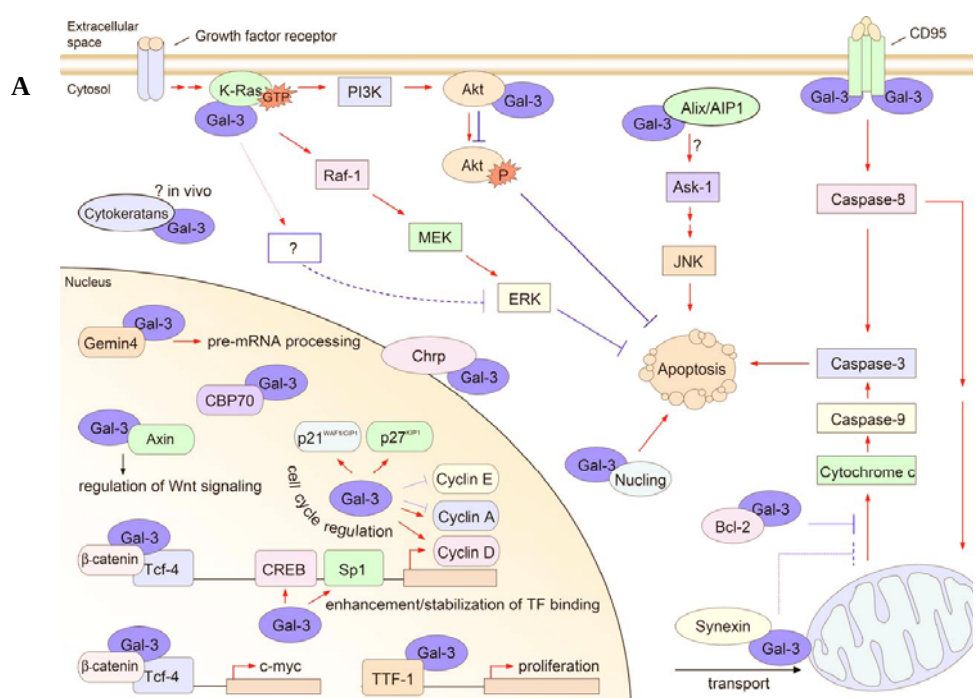


Figura 5: continuação...

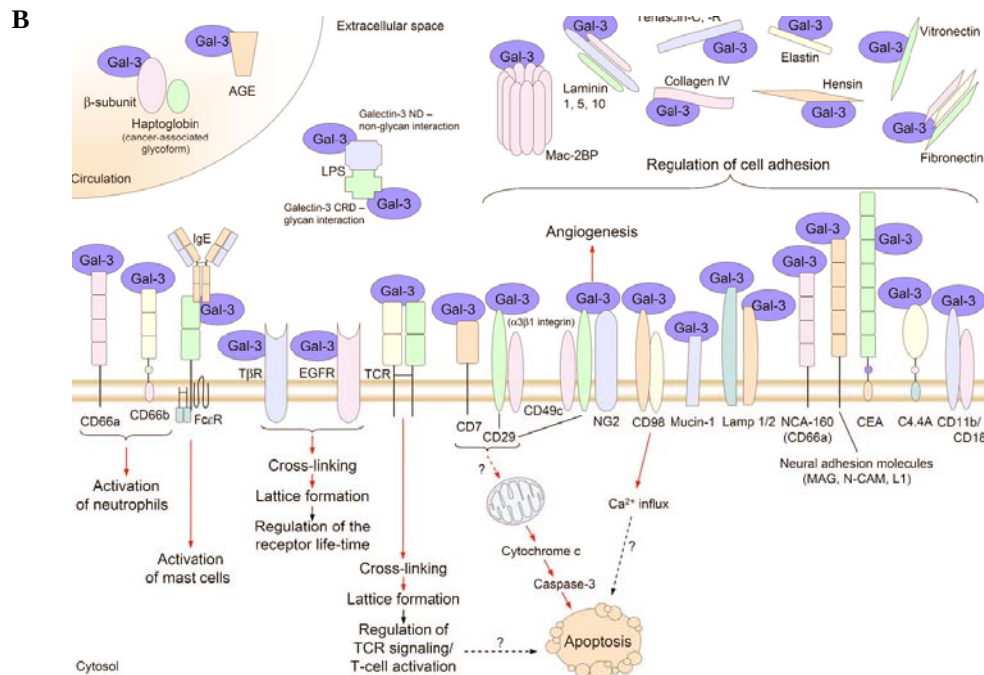


Figura 5: Funções da galectina-3 (A) Intracelulares. (B) Extracelulares [Dumic et al., 2006]

Um grande número de processos biológicos tanto extracelulares quanto intracelulares envolve a galectina-3, refletindo a participação desta proteína em condições fisiológicas e patológicas (Dumic *et al.*, 2006). Vários estudos apontam a galectina 3 relacionada ao controle da homeostase celular, participando do crescimento e diferenciação celular (Sasaki *et al.*, 1999; Inohara *et al.*, 1998), eventos anti-apoptóticos (Yang *et al.*, 1996) e pró-apoptóticos (Lee *et al.*, 2003), mecanismos efetores das respostas imunes (Colnot *et al.*, 1998; Mandrell *et al.*, 1994; Zubery *et al.*, 2004), inflamatórias (Jensem-Jarolin *et al.*, 2001) e autoimunes (Ohshima *et al.*, 2003).

Em muitos casos, a expressão das galectinas encontra-se favorecida por fatores de crescimento ou mesmo oncogenes, e atenuada em razão de genes supressores tumorais. Em processos patológicos a galectina-3 assume múltiplos papéis na patogênese, proliferação e disseminação de metástases (Dumic *et al.*, 2006) por meio da modulação da adesão das células malignas em sítios distantes através do endotélio vascular (Hughes, 2004). Assim, a galectina-3 pode ser encontrada em uma ampla variedade de malignidades (Danguy *et al.*, 2002; Hughes 2004).

Assim na tentativa de evidenciar a localização celular e tecidual de componentes de interesse, como a galectina-3 por exemplo, diferentes métodos de análise têm sido aplicados com sucesso para traduzir de forma mais objetiva e numericamente representativa as transformações que ocorrem nas células tumorais (Francis, 2000), seja através da análise colorimétrica de células neoplásicas em cultura (Alley, 1991), citometria automática ou variações morfométricas nucleares (Roels, 2000). Nesse contexto surge a análise digital de imagens.

1.7 Análise digital de imagens em Patologia

Os resultados obtidos pela histoquímica de células tumorais, contam com o apoio dos sistemas computadorizados de análise de imagens os quais fornecem dados qualitativos e quantitativos mais refinados esclarecendo assim, vários aspectos histomorfológicos das transformações neoplásicas (Demirkaya, 1999; Lee *et al.*, 2004).

Através da análise computadorizada de imagens podem ser processadas medidas lineares, contagem de objetos, determinação de forma, estereologia, além de mensurações mais complexas e multiparamétricas (Barterls & Thompson, 1994; True, 1996; Oberholzer *et al.*, 1996). Estes novos parâmetros têm servido como auxiliares no diagnóstico de neoplasias dos mais variados tipos (Herman, 1996; Waldman *et al.*, 1996; Novik, 2000; Rubegni *et al.*, 2001).

Assim, a análise de todas essas variáveis com respeito à retocolite ulcerativa já obteve sucesso em estudos passados, como os de Thompson e colaboradores (1985), Allen e colaboradores (1987) e Zaitoum e colaboradores (1991). Avaliações histológicas através da imunohistoquímica (Weinberg, 1994), imunofluorescência (Waggoner *et al.*, 1996), densitometria do DNA (Cohen, 1996) e reconstrução tri-dimensional de estruturas (Whimster & Cookson, 1995), conjugados a métodos morfométricos computadorizados, tanto no modelo experimental (Figueiredo-Silva *et al.*, 1999), como em seres humanos (Araújo-Filho *et al.*, 2006; Melo-Júnior, 2003) tem fornecido resultados mais precisos e completos para os mais diversos tipos de alterações morfológicas nos tecidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Descrever a expressão tecidual de marcadores histoquímicos e histológicos em tecido intestinal de pacientes com retocolite ulcerativa em diferentes condições de tratamento.

2.2 Específicos

- Realizar análise morfométrica do padrão de marcação da galectina-3 em tecido intestinal de pacientes com retocolite ulcerativa em relação a contraparte normal;
- Estabelecer um parâmetro quantitativo, através da análise digital de imagens (OPTIMAS);
- Buscar associação entre os dados encontrados e correlacioná-los com os marcadores prognósticos da retocolite ulcerativa.

3 METODOLOGIA

3.1 Seleção de Casos

Os critérios de inclusão dos pacientes foram: diagnóstico clínico acima de 7 anos baseado em sintomas, radiologia ou colonoscopia, apresentação de displasia no momento do exame. Pacientes submetidos a algum processo cirúrgico do cólon (plástica ou remoção de tumores), portadores de doença de Crohn ou colite indeterminada foram excluídos do estudo.

Selecionou-se biópsias de tecido de intestino anteriormente diagnosticado com retocolite ulcerativa (n=20) dos arquivos do Setor de Patologia do LIKA, órgão suplementar da Universidade Federal de Pernambuco. Como controle, foi utilizada a contraparte normal das bordas das amostras sem alterações de natureza anatômica ou funcional.

As amostras foram divididas em dois grupos: blocos de pacientes tratados clinicamente (n=12) e blocos de pacientes tratados cirurgicamente (n=08).

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE sob nº. 198/2008).

3.2 Imunohistoquímica para galectina-3

Foi utilizada a anti-galectina-3 conjugada a peroxidase (Sigma, USA) seguindo o protocolo desenvolvido por Hsu e colaboradores (1981). Os tecidos foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool (70-100%). As lâminas com tecidos (4µm) foram incubadas com tampão citrato à 100°C por 30 min sob vapor úmido, em seguida lavadas (por 5 min) com PBS e incubadas com leite Molico®, em seguida incubadas com peróxido de hidrogênio por 5 min e lavadas com PBS. As amostras foram então incubadas com uma solução de anticorpo monoclonal anti-galectina-3 (na diluição 1:400) por 30 min em temperatura ambiente (25° C). Em seguida os tecidos foram incubados com anticorpo secundário biotinilado (Kit LSAB DAKO/USA). A revelação do anticorpo foi obtida através da reação da enzima

peroxidase visualizada pela incubação dos tecidos em uma solução de diaminobenzidina (DAB+H₂O₂). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina e analisados em microscópio óptico (Olympus BH-2, Japão).

3.3 Estudo histoquímico

Os cortes obtidos foram previamente expostos à rotina histológica e submetidos a diferentes técnicas de coloração: Hematoxilina-Eosina (HE), para observação das características histológicas gerais; e Tricrômico de Masson (TM) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) para evidenciar, respectivamente, a deposição de colágeno no tecido e a expressão de glicosaminoglicanos. Todos os protocolos experimentais foram desenvolvidos segundo Spicer (1987).

4.4 Análise Computadorizada de Imagens

Imagens digitais foram capturadas das lâminas histológicas utilizando um sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico (Olympus BH-2), já utilizado com sucesso em análises diagnósticas. O sistema interativo de análise de imagens utiliza o Software OPTIMAS[®] e Câmera digital CCBBW 410 (Sansung), disponíveis no Departamento de Patologia da UFPE (figura 6).



Figura 6. Estação de análise de imagens do Departamento de Patologia, CCS-UFPE (Agosto, 2007).

Os perfis de marcação dos depósitos PAS+ (Glicosaminoglicanos) numa magnificação 200x, avaliando-se cinco unidades glandulares por lâmina, perfazendo um total de 60 campos analisados.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o teste *t* de Student, para um nível de significância ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As galectinas pertencem a uma família extensamente estudada de ligantes de carboidratos que estão implicadas em uma ampla variedade de processos biológicos. A característica dessa família de proteínas é possuir um domínio de reconhecimento de carboidratos responsável pela ligação de β -galactosídeos (Danguy *et al.*, 2006).

No presente estudo, a reação de imunohistoquímica para a galectina-3 revelou que a proteína foi expressa principalmente nas células epiteliais do cólon, com diferença marcante entre a região normal e a região inflamada; com fraca marcação tanto no grupo tratado cirurgicamente quanto no tratado clinicamente. (figura 7).

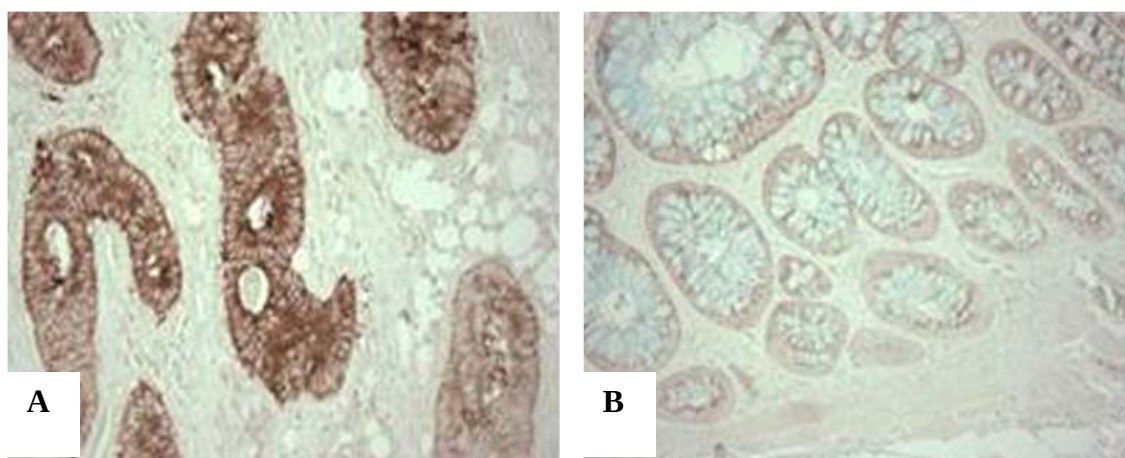


Figura 7: Perfis de marcação da galectina-3 em tecido colônico em indivíduos sem alterações, mucosa normal com padrão difuso citoplasmático (A). Em B observa-se fraca reatividade em mucosa de paciente com retocolite ulcerativa.(Magnificação, 100x).

A literatura aponta diversas localizações tanto intracelulares quanto extracelulares para a galectina-3. Rubinstein e colaboradores (2004) sugerem um papel pró-inflamatório para a galectina-3, o que não foi observado em nossos resultados. Neste sentido, Lippert e colaboradores (2008) reforçam esta idéia ao apontarem a galectina-3 como sendo detentora de um potencial papel no comportamento da doença inflamatória intestinal no qual o processo inflamatório causaria dano às camadas de células epiteliais e estas, por sua vez, poderiam

liberam então a galectina-3 no espaço intercelular. A galectina-3, dessa forma, estaria conduzindo a uma ativação de outras células, tais como os fibroblastos da lâmina própria colônica, induzindo a um quadro de fibroplasia. Um vez que os fibroblastos são importantes na manutenção da homeostase do tecido adjacente, eles contribuem com a secreção de fatores de crescimento e síntese de muitos componentes da matriz extracelular, entre eles colágeno e fibronectina. Dessa maneira, os fibroblastos possuem um proeminente papel no reparo tecidual (figura 8).

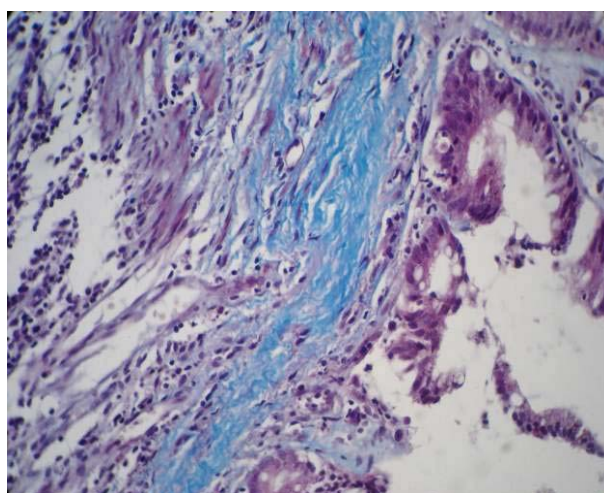


Figura 08: Fibrose intersticial encontrada na mucosa intestinal de paciente portador de retocolite ulcerativa tratado clinicamente (Tricrômico de Masson, Magnificação 100x).

Por outro lado, pode-se afirmar que já está bem assumido que o risco de desenvolvimento da neoplasia colorretal pode estar relacionado com a inflamação crônica do intestino e que a colite é um importante fator de risco para o câncer colorretal (Gupta *et al.*, 2007).

Isso porque a demasiada exposição aos radicais livres gerados durante o processo de lesão e reparação tecidual poderia causar uma alteração irreversível no ciclo normal de crescimento das células envolvidas no processo. Na figura 9 pode-se observar em pacientes tratados cirurgicamente uma área de tecido apresentando um infiltrado linfoplasmocitário. Além disso, pode-se observar a ausência de fibrose com a presença de raros fibrócitos.

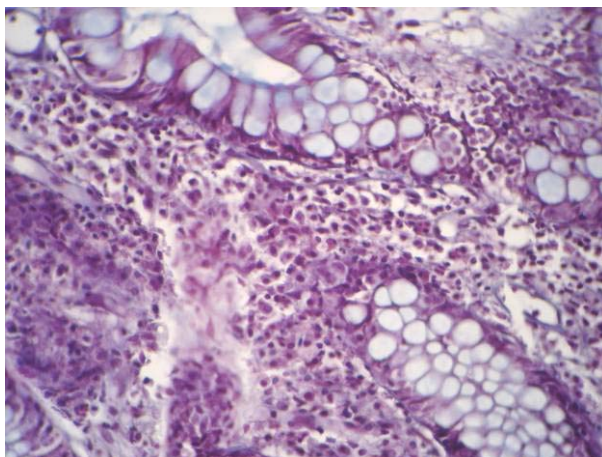


Figura 9: Área de recólite ulcerativa evidenciando intenso infiltrado linfoplasmocitário em paciente tratado cirurgicamente (Tricrômico de Masson, Magnificação 100x).

Por outro lado, o padrão de expressão da galectina-3 relacionada à progressão ao câncer colorretal, continua sob debate devido à falta de consenso entre os resultados publicados. Alguns pesquisadores têm encontrado níveis elevados de galectina-3 na progressão ao carcinoma de cólon, enquanto outros têm obtido resultados opostos (Sanjuan, 1997).

Neste presente trabalho, a expressão da galectina-3 foi observada no núcleo e/ou citoplasma nas células de todos os tipos de lesão examinados, bem como na mucosa normal, porém, como dito anteriormente, com diferenças bastante significativas entre as regiões analisadas. Vale ressaltar que os nossos resultados indicam que o padrão citoplasmático e nuclear da expressão da galectina-3 não pode ser diretamente relacionado com a progressão ao câncer colorretal, e neste caso poderia assumir diversos significados biológicos, como os descritos acima. Isso porque de todas as amostras analisadas, apenas uma progrediu para a neoplasia colorretal.

Em nosso trabalho foi observado um infiltrado de plasmócitos basais e linfócitos como indicadores de cronicidade nas lesões estudadas (figura 9 e figura 10).

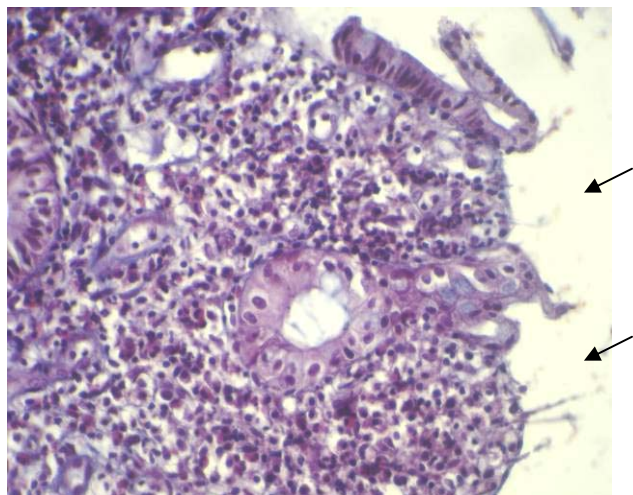


Figura 10: Área de erosão da mucosa colônica em paciente com retocolite ulcerativa tratado clinicamente – setas (Tricrômico de Masson, Magnificação 100x).

Com o intuito de descrever parâmetros qualitativos e quantitativos, nosso estudo comparou o número de células e a intensidade da marcação histoquímica para glicosaminoglicanos entre dois subgrupos de pacientes da pesquisa. Logo, as amostras dos pacientes tratados cirurgicamente obtiveram uma redução significativa ($p < 0,022$) do número de células caliciformes com relação ao grupo tratado clinicamente (figura 11).

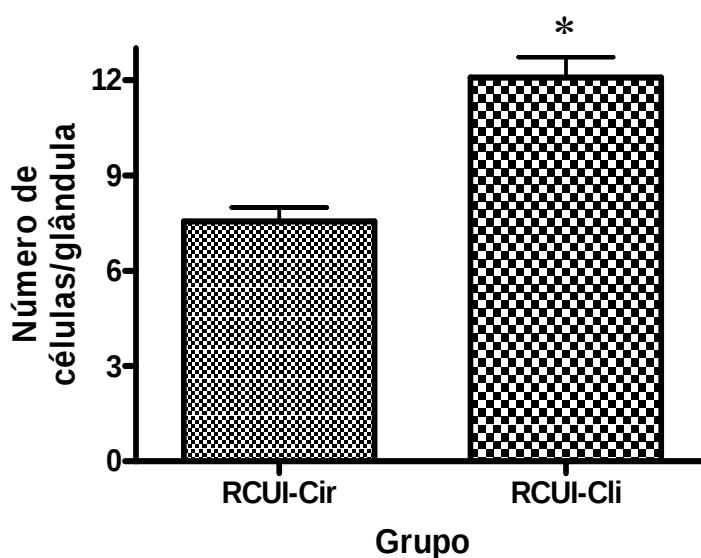


Figura 11: Comparação entre o número de células caliciformes entre os grupos tratados cirurgicamente (RCUI-Cir) e tratados clinicamente (RCUI-Cli) na retocolite ulcerativa idiopática. * $p < 0,022$.

Histologicamente, observa-se na figura 12 a marcação do PAS mais intensa nos pacientes tratados cirurgicamente, o que reforça a hipótese que a síntese de muco pelas glândulas intestinais parece estar relacionada ao grau de atividade inflamatória da doença. Assim um dado relevante do nosso estudo, foi a constatação de que onde há infiltrado inflamatório, existe uma menor produção de muco (figura 10 e 12A). Logo a submissão desses pacientes para a cirurgia para a constituição da bolsa ileal talvez esteja conduzindo à remissão de alguns dos sintomas clínicos observados na retocolite ulcerativa ativa como consequência recuperação da fisiologia normal do tecido.

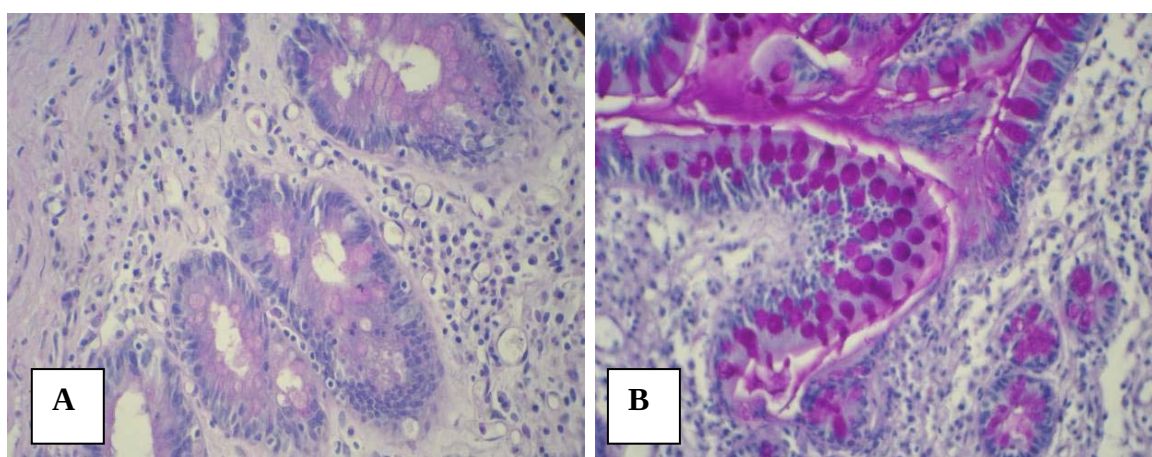


Figura 12: Marcação PAS de tecido colônico. (A) Os pacientes tratados clinicamente possuem uma menor expressão de glicosaminoglicanos quando comparados com os pacientes tratados cirurgicamente (B). PAS, Magnificação 100x.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que:

- Houve redução significativa da expressão tecidual da galectina-3 em tecido epitelial intestinal de retocolite ulcerativa quando comparado com a contraparte normal de ambos os grupos.
- Houve um aumento da atividade das células caliciformes em tecido colônico submetido à cirurgia de bolsa ileal o que poderia indicar o restabelecimento da função normal do tecido.
- Atividade glandular juntamente com a redução da expressão da galectina-3 possam auxiliar no monitoramento clínico desses pacientes.

6 REFERÊNCIAS

- Abdel-Hady, M; Bunn, SK. Inflammatory bowel disease. *Current Pediatrics* 14(7): 598-604, 2004.
- Agabiti, E. et al. Cancer of Ileostomy: a late complication of Colectomy for ulcerative colitis. *Acta Chirurgica Belg* 105: 99-101, 2005.
- Allen, DC; Hamilton, PW; Watt, PCH *et al.* Morphometrical analysis in ulcerative colitis with dysplasia and carcinoma. *Histopathology* 11 (9); 913-926, 1987.
- 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.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245–52.
- 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.
- Baumgart DC, Dignass AU. Intestinal barrier function. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care.* 2002; 5: 685–94.
- Baumgart, Daniel C; Carding, Simon R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 369: 1627-1640, 2007.
- Beachy, P. A.; Karhadkar, S. S.; Berman, D. M. Tissue Repair and Stem Cell Renewal in Carcinogenesis. *Nature* 432: 324-330, 2004.
- Binder V; Both H; Hansens PK; Hendriksen C; Krein S; Torp-Pedersen. Incidence and prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in country of Copenhagen: 1962-1978. *Gastroenterology* 83: 563-568, 1982.
- Bjorson S. Inflammatory bowel disease in Iceland during a 30-year period, 1950-1979. *Scand J Gastroenterology* 24, suppl 170: 47-49, 1989.
- Bresalier, Robert S.; Mazurek, Nachman; Steimberg, Lawrence R. et al. Metastasis of human colon is altered by modifying expression of the β -galactoside-binding protein galectina-3. *Gastroenterology* 115 (2): 287-296, 1997.
- Castro LP; Savassi-Rocha PR; Filho AL; Conceição SA. Tópicos de Gastroenterologia: Avanços em Coloproctologia vol. 11. Ed. Medsi, 2002.

Chambers *et al.* Cancer surveillance in ulcerative colitis. *British Journal of Surgery* 92 (8): 928-936, 2005.

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

Colnot C; Ripoche MA; Milon G; Montaguteli X; Crocker PR; Poirier F. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-null mutant mice. *Immunology* 94: 290-296, 1998.

Danguy A; Camby I; Robert K. Galectins and Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1572: 285-293, 2002.

Demirkaya, O. Automated identification of stained cells in tissue sections using digital image analysis. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* v. 21, n. 2, p. 93-102, 1999.

Diaz, Norys Josefim; Patrício, Fraucy Silvio; Fagundes-Neto, Ulysses. Colite alérgica: características clínicas e morfológicas da mucosa retal em lactentes com enterorragia. *Arquivos de Gastroenterologia* 39(4): 260-267, 2002.

Dumic J; Dabelic S; Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760: 616-635, 2006.

Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*; 48: 526–35, 2001.

Ekbom A; Helmick C; Zack M; Adami HO. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large population-based study in Sweden. *Gastroenterology* 100: 350-358, 1991.

Figueirêdo-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. Univ. Fed. Pe.* v. 44, p. 21-25, 1999.

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.

Gower-Russeal CC; Salomonez JL; Dupas JL; Marti R; Nuttens MC; Votte A; Lemahiel M; Lemaire B; Colombel JF, Cortot A. Incidence of inflammatory bowel disease in Northern France (1988-1990). *Gut* 35: 1433-1438, 1994.

Gramlich, Terry; Petras, Robert E. Pathology of inflammatory bowel disease. *Seminars in Pediatric Surgery* 16: 154-163, 2007.

Gupta, Roopali Bansal,* Harpaz, Noam,‡ Itzkowitz, Steven *et al.* Histologic Inflammation Is a Risk Factor for Progression to Colorectal Neoplasia in Ulcerative Colitis: A Cohort Study. *Gastroenterology* 133: 1099-1005, 2007.

Haddad, Marcos Túlio. Diagnóstico Diferencial das Doenças Inflamatórias Intestinais. Em "Tópicos em Gastroenterologia: Avanços em Coloproctologia," ed. Castro, L. P. et al. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

Herman, C.J. Image Cytometry in Pathology. *Hum. Pathol.* v. 27, p. 435-436, 1996.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29:577-580.

Hughes RC. Galectins. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier vol. 2. p. 171-174, 2004.

Inohara H; Akahani S; Raz A. Galectin-3 stimulates cell proliferation. *Experimental Cell Research* 245: 294-302, 1998.

Irvine E; Faltokbyar F; Swarbrick ET. A critical review of epidemiology studies in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 36: 2-15, 2001.

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology* 2004; 5: 987-995.

Jensem-Jarolin E; Neumann C; Oberhuber G; Gscheidlinger R, Neuchrist C; Reinisch W; Zuberi RI; Penner E; Liu F-T; Boltz-Nitulescu G; Anti-galectin-3 IgG antibodies in patients with Crohn's disease characterized by means of phage display peptide libraries. *Journal of Clinical Immunology* 21: 348-356, 2001.

Jess, Tine et al. Risk of Intestinal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Study From Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 130: 1039-1045, 2006.

Jewel DP. Ulcerative colitis. In: Feldman M; Scharschmidt BF; Sleisenger MH. *Sleisenger & Fordtrans's gastrointestinal and liver disease – pathophysiology, diagnosis and management*. 6.ed Philadelphia: W B Saunders. p. 1708-1734, 1998.

Krombluth A; Sachar DK; Salomon P. Crohn's disease. In: Feldman M; Scharschmidt BF; Sleisenger MH. *Sleisenger & Fordtrans's gastrointestinal and liver disease – pathophysiology, diagnosis and management*. 6.ed Philadelphia: W B Saunders. p. 1708-1734, 1998

Latham VH, Oppenheimer SB (1999) A simple image analysis method for evaluating cell binding to derivatized beads. *Acta Histochem.* 101(3): 263-270.

Lee YJ; Song YK; Song JJ; Siervo-Sassi RR; Kim HR; Li L; Spitz DR; Lokshin A; Kim JH. Reconstitution of galectin-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of Akt. *Experimental Cell Research* 288: 21-34, 2003.

Lee, C.M.; Lee, R.J.; Hammond, E. et al: Expression of HER2neu (cerbB-2) epidermal growth factor receptor in cervical cancer: prognostic correlation with clinical characteristics, and comparison of manual and automated imaging analysis. *Gynecol Oncology* v. 93, p. 209-214, 2004.

Lippert, E. et al. Regulation of galectin-3 function in mucosal fibroblasts: potential role in mucosal inflammation. *Clinical and Experimental Immunology* 152, p. 285-297, 2008.

Loftus, Edward V. Jr. Clinical Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: Incidence, prevalence, and Environmental Influences. *Gastroenterology* 126: 1504-1517, 2004.

Maeda K; Okada M; Yao T; Sakurai T; Lida M; Fuchigami T; Yoshinaga K; Imamura K; Okeda Y; Sakamoto K. Intestinal and extra-intestinal complications of Crohn's disease: predictors and cumulative probability of complications. *J Gastroenterology* 29: 577-582, 1994.

Malcomson, Roger D. G.; McGregor, Angus H. Molecular Screening for Colon cancer in Inflammatory Bowel Disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 14 (10):1045-1047, 2002.

Mandrell RE; Apicella MA; Lindstedt R; Leffler H; Possible interaction between animal lectins and bacterial carbohydrates. *Methods in Enzymology* 236: 231-254, 1994.

McDonald, S. A. C. *et al.* Mechanisms of Disease: from Stem Cells to Colorectal Cancer. *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology* 3 (5): 267-274, 2006.

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

Nakamura RM; Matsutani M; Barry M. Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. *Clinica Chimica Acta* 235 (1-2): 9-20, 2003.

Nakamura, Robert M.; Matsutani, Mariko; Barry, Mary. Advances in Clinical laboratory Tests for Inflammatory Bowel Diseases. *Clinica Chimica Acta* 335: 9-20, 2003.

Nemetz A; Kope A; Molnar T; Kovaks A; Feber J; Tulassay Z; Nagy F; Garcia-Gonzales MA; Pena AS. Significant differences in the interleukin-1b and interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms in a Hungarian population with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2: 175-179, 1999.

Novik, V.I. The use of computer technology in the cytologic diagnosis of neoplasms. *Vopr. Onkol.* v. 46, n. 2, p. 239-42, 2000.

Oberholzer, M.; Östreicher, M.; Christen, H.; Brühlmann, M. Methods in quantitative image analysis. *Histochem. Cell. Biol.* v. 105, p. 333-355, 1996.

Ohshima S; Kuchen S; Seemayer CA; Kyburz D. Hirt A; Klinzing S; Michel BA; Gay RE; Liu F-T; Gay S; Neidhart M; Galectin-3 and its ligand protein in rheumatoid arthritis *Arthritis and Rheumatism* 48: 2.788-2.795, 2003.

Robbins LT; Cotran P. *Patologia: bases patologias das doenças*. 7.ed. Rio de Janeiro. ABDR. p. 888-893, 2005.

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.

Róin F; Róin J. Inflammatory bowel disease of Faroe Islands: 1981-1988. *Scand j Gastroenterol* 24, suppl 170: 44-46, 1989.

Rose JDR; Roberts GM; Williams A; Maybarry JF; Rhodes J. Cardiff Crohn's disease jubilee: the incidence over 50 years. *Gut* 29: 346-351, 1988.

Rubegni, P.; Cevenini, G.; Burrioni, M. Digital dermoscopy analysis of pigmented skin lesions: An important auxiliary for clinical decision and not for automatic diagnosis. *Arch. Dermatol.* v. 137, n. 3, p. 378, 2001.

Rubinstein N. et al. The role galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens*, v. 64, p. 1-12, 2004.

Rutgeers P. Medical therapy of inflammatory bowel disease. *Digestion* 59: 453-469, 1998.

Rutter, M. et al. Severity of Inflammation is a Risk Factor for Colorectal Neoplasia in Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 126: 451-459, 2004.

Sanjuan, Xavier; Fernández, Pedro L.; Castells, Antoni; Castronovo, Vincent et al. Differential Expression of Galectin 3 and Galectin 1 in Colorectal Cancer Progression. *Gastroenterology* 113:1906–1915, 1997.

Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 92: 5-11, 1997.

Sasaki S; Bao Q; Hughes RC. Galectin-3 modulates rat mesangial cell proliferation and matrix synthesis during experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1.1 antibodies. *Journal of Pathology* 187: 481-489, 1999.

Sedlack RE; Whisnant J; Elveback LR; Kurjand LT. Incidence of Crohn's disease in Olmsted Country – Minnesota, 1935-1975. *Am J Epidemiol* 112: 759-763, 1980.

Smithson JE, Campbell A, Andrews JM, Milton JD, Pigott R, Jewell DP. Altered expression of mucins throughout the colon in ulcerative colitis. *Gut*; 40: 234–40, 1997.

Spicer, S. S. *Histochemistry in pathologic diagnosis*. New York: Dekker, 1987.

Sonnenberg A. Geographic variation in the incidence of and mortality from inflammatory bowel disease. *Diseases of the Colon and Rectum* 29: 854-861, 1986.

Stonnington CM; Philips SF, Zinsmeister AR; Melton LJ. Chronic ulcerative colitis: incidence and prevalence in a community. *Gut* 28, 402-409, 1981.

Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 44-54, 2002

Synopsis, A. Image and Sign Process. Yearbook of medical Informatics. Hasman (Ed.), 1996.

Takaishi, Hiromassa et al. CiRCUllating Autoantibodies Against Purified Colonic Mucin in Ulcerative Colitis. *Journal of Gastroenterology* 35: 20-27, 2000.

Thompson, EM; Price, AB; Altman, DG et al. Quantitation in inflammatory bowel disease using computerized interactive image analysis. *Journal of Clinical Pathology* v. 38; p. 631-638, 1985.

Triantafillidis JK; Emmanouilidis A; Manousos ON; Nicolakis D; Kovevinas M. Clinical patterns of Crohn's disease in Greece: a follow up study of 155 cases. *Digestion* v. 61: p.121-128, 2000.

True, L.D. Morphometry Applications in Anatomic Pathology. *Human Pathology* v. 27, p. 450-467, 1996.

Waggoner, A.; Taylor L.; Seadler, A.; Durlay, T. Multiparameter Fluorescence Imaging Microscopy: Reagents and Instruments. *Hum. Pathol.* v. 27, p. 494-502, 1996.

Waldman, F.M.; Sauter, G.; Sudar, D.; Thompson, C.T. Molecular Cytometry of Cancer. *Human Pathology*. v. 27, p. 441-449, 1996.

Whimster, W.F.; Cookson, M.J.; Three-dimensional reconstruction. In: *Quantitative Clinical Pathology*. Hamilton PW (Ed.). Blackwell Science Ltd. Oxford. p. 289-300, 1995.

Yang RY; Hsu DK; Liu F-T. expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6.737-6.742, 1996.

Zaitoun, AM, Cobden, I; Al Mardini, H et al. Morphometric studies in rectal biopsy specimens from patients with ulcerative colitis: effect of oral 5 amino salicylic acid and rectal prednisone. *Gut* 32, p. 1983-1987, 1991.

Zubery RI; Hsu DK; Kalayci O; Chen HY; Sheldon HK, Yu L; Apgar JR; Kawakami T; Lilly CM; Liu F-T. Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in murine model of asthma. *American Journal of Pathology* 165: 2.045-2.053, 2004.

ANEXO

Parecer de aprovação do comitê de ética em pesquisa com seres humanos


SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 232/2008 - CEP/CCS Recife, 08 de agosto de 2008

Registro do SISNEP FR – 204459
CAAE – 0192.0.172.000-08
Registro CEP/CCS/UFPE Nº 198/08
Título: “Análise digital de expressão tecidual da galectina-3 em pacientes com retocolite ulcerativa”

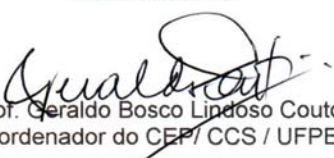
Pesquisador Responsável: George Luiz de Souza Araújo

Senhor Pesquisador:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 06 de agosto de 2008.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório ao final da pesquisa (31/07/2009)

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Ao
Mestrando George Luiz de Souza Araújo
Programa de Pós-Graduação em Patologia – CCS/UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cid. Universitária, 50670-901, Recife - PE, Tel/fax: 81 2126 8588; cepccs@ufpe.br

Submissão do artigo científico em periódico indexado



Print ISSN 0101-9880

Publication of
Cidade Editora Científica Ltda

Mission
To present Works on medicine and human surgery.

© 2008 *Sociedade Brasileira de Coloproctologia*

Av . Marechal Câmara, 160- sala 916 - Ed Orly - 20020-080 - Rio de Janeiro - RJ
Tel 2240 8927
Fax 21 22205803

e-Mail
sbcp@sbcp.org.br

Protocolo de envio junto a Agência Brasileira de Correios e Telégrafos sob o número
RC619024274BR