



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
MESTRADO EM PATOLOGIA

MARCOS CEZAR FEITOSA DE PAULA MACHADO

**IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS KI67 E p53
EM PACIENTES COM RETOCOLITE ULCERATIVA
INESPECÍFICA TRATADOS CLINICAMENTE E
CIRURGICAMENTE**

Recife, 2008

MARCOS CEZAR FEITOSA DE PAULA MACHADO

**IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS KI67 E p53
EM PACIENTES COM RETOCOLITE ULCERATIVA
INESPECÍFICA TRATADOS CLINICAMENTE E
CIRURGICAMENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mestrado em Patologia, do Centro de Ciências da Saúde - UFPE, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador:

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes-Filho

Co-orientadores:

Prof^a. Dr^a. Adriana Maria da Silva Telles

Prof. Dr. Francisco Eduardo Bezerra de Albuquerque Lima

Recife, 2008

Machado, Marcos Cezar Feitosa de Paula

Imunoexpressão das proteínas KI67 e p53 em pacientes com retocolite ulcerativa inespecífica tratados clinicamente e cirurgicamente / Marcos Cezar Feitosa de Paula Machado. – Recife : O Autor, 2008.

54 folhas. Il: fig., graf e tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2008.

Inclui bibliografia, anexo e apêndices.

1. Patologia. 2. Retocolite Ulcerativa. 3. Imunohistoquímica. 4. P53. 5. KI67 I. Título.

616.34

CDU (2. ed)

UFPE

616.34

CDD (22.ed.)

CCS2008-001



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MESTRADO EM PATOLOGIA

AUTOR: MARCOS CEZAR FEITOSA DE PAULA MACHADO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA GERAL

NOME DA TESE: "IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS KI67 E P53 EM
PACIENTES COM RETOCOLITE ULCERATIVA TRATADOS CIRURGICAMENTE".

ORIENTADOR: PROFESSOR DOUTOR NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO

CO-ORIENTADORA: PROFESSORA DOUTORA ADRIANA DA SILVA TELES

TESE DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA

DATA: 12 DE AGOSTO DE 2008.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Paloma Lys de Medeiros

Paloma Lys de Medeiros

Prof. Dr. Luciano Tavares Montenegro

Luciano Tavares Montenegro

Prof. Dr. Etenildo Dantas Cabral

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

A minha avó, *Maura Machado* e minha noiva *Priscila Rodrigues*,
pessoas maravilhosas, que nunca mediram esforços
para me apoiar nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao grande amigo Mario Ribeiro, que sempre me incetivou a não parar por maiores que se parecessem os obstáculos.

A professora Adriana Telles, por ter me dado inúmeras oportunidades e nunca ter me deixado sem seu apoio nos momentos mais difíceis desta caminhada.

A professor Nicodemos Teles por todo apoio que me deu nos momentos mais críticos desta caminhada, com certeza eu não estaria nesse momento sem sua ajuda e compreensão.

A minha noiva Priscila Rodrigues que me “agüentou” nos momentos de maiores estresses, não posso esquecer, pois sem ela com certeza a caminhada teria sido muito mais difícil.

A Jorge Luiz, companheiro sempre presente na labuta no laboratório, obrigado pelo auxílio na confecção desse trabalho tanto aqui quanto em Juazeiro.

AOS AMIGOS(AS):

Vasco Patú, Luciano Mello, Carmelita Cavalcanti pela amizade e conselhos sempre bem vindos durante todo meu caminhar acadêmico.

Agradecimento especial à família GP3, vocês realmente são pessoas formidáveis que por mais que procuremos não encontraremos tanta confiança e capacidade para realizarmos quaisquer trabalhos e acima de tudo são meus amigos...

RESUMO

Os métodos imunohistoquímicos associados aos sistemas computadorizados de análise de imagens tem sido de extrema importância, como ferramentas auxiliares, no estudo da expressão de proteínas relacionadas a neoplasias malignas em pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais. Neste estudo, obteve-se o perfil imunohistoquímico das proteínas p53 e Ki-67 do tecido intestinal de pacientes com colite ulcerativa (n=30) um grupo tratado clinicamente e outro cirurgicamente de ambos os sexos e idade média de 38,5 anos. Os tecidos foram fixados em formalina a 10%, submetidos à rotina histológica e montados em parafina. Fragmentos de tecido (4 µm) foram submetidos à técnica de imunohistoquímica para as proteínas Ki-67 e p53. Os perfis de marcação tecidual foram quantificados através de uma estação de análise de imagem contendo um microscópio óptico equipado com uma câmera digital ambos acoplados a um computador contendo o software OPTIMAS®. Os resultados obtidos demonstram diferenças significativas nos padrões de marcação no tecido inflamado em pacientes tratados clinicamente quando comparados aos tecidos de pacientes tratados cirurgicamente. As proteínas Ki-67 e P-53 indicam marcadores imunohistoquímicos úteis para diferenciação de tecidos de colite ulcerativa que trazem características pré-neoplásicas sugestivas de malignidade.

Palavras-chave: Retocolite Ulcerativa, Imunohistoquímica, p53, Ki67.

ABSTRACT

The immunohistochemical methods associated with computerised systems for analysis of images has been of extreme importance, as auxiliary tools in the study of the expression of proteins related to malignant neoplasms in patients with inflammatory bowel diseases. In this study, got up the profile of immunohistochemical intestinal tissue of patients with ulcerative colitis (n =30), of both sexes and an average age of 38.5 years. Tissues were fixed in formalin to 10%, subject to routine histological and assembled in paraffin. Fragments of tissue (4 μ m) were subjected to immunohistochemistry for the technique of protein Ki-67 and p53. The profiles of marking tissue were quantified through a workstation containing an optical microscope equipped with both a digital camera attached to a computer containing the software OPTIMAS ®. The results show significant differences in patterns of dialling into the inflamed tissue in patients treated medically when compared to the tissues of patients treated surgically. The proteins Ki-67 and p53 indicate be good immunohistochemical markers for differentiation of tissues of ulcerative colitis that bring pre-neoplastic features suggestive of malignancy.

Keywords: Ulcerative Colitis, Immunohistochemistry, p53, Ki67.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1	34
Tabela 2	35
Tabela 3	36

Gráfico 1. Análise digital da imunomarcagem da proteína Ki-67 em pacientes com retocolite ulcerativa inespecífica.....	38
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de bolsa leal.....	16
Figura 2. Heterogenicidade das vias de sinalização utilizadas pela proteína p53 em seu papel de “guardião do genoma” (Fonte: Rev. Bras. Hmatol e hemoter,2002).....	20
Figura 3. Diferentes mecanismos de inativação da proteína p53 (Fonte: Rev. Bras. Hmatol e hemoter,2002.....	21
Figura 4. Estação de análise de imagens do Departamento de Patologia.....	31
Figura 5. Mucosa colônica em pacientes com retocolite ulcerativa apresentando Áreas de erosão (Tricômico de Masson. Magnificação:400X).....	33
Figura 6. Fibros intersticial em paciente com retocolite ulcerativa tratado Clinicamente (Tricômico de Masson. Magnificação).....	34
Figura 7. Mucosa colônica em pacientes com retocolite ulcerativa apresentando agregados linfóides reativos (Tricômico de Masson. Magnificação Magnificação: 400x).....	35
Figura 8. Biópsia intestinal. Expressão tecidual da proteína p53 em mucosa intestinal de paciente com retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) e padrão de marcação intenso e nuclear (setas) para proteína Ki-67 em pacientes com RCUI (Magnificação 400x).....	

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP – Alfafetoproteína

AIA - Anastomose íleo anal

AIR - Anastomose íleo retal

BAX – Proteína X associada a bcl_2

Bcl_2 – Linfoma de células B - 2

BTA - Antígeno tumoral da bexiga

CEA - Antígeno carcinoembrionário

CRC - Câncer coloretal

DAB – Diaminobenzidina

DC - Doença de Crohn

DII - Doença inflamatória intestinal

DNA - Ácido desoxirribonucleico

kD - Quilodaltons

LDH - Desidrogenase láctica

MCA - Antígeno mucóide associado ao carcinoma

NMP22 - Proteína da matriz nuclear

NSE - Enolase neurônio-específica

PAP - Fosfatase acida prostática

PCT - Proctocolectomia total

PSA - Antígeno prostático específico

RCUI - Retocolite ulcerativa inespecífica

RI - Reservatório ileal

TA - temperatura ambiente

μm – Micrômetros

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
1.1. Doenças inflamatórias intestinais	10
1.1.1. Retocolite ulcerativa	10
1.1.2. Tratamento cirúrgico	13
1.1.3. Bolsa ileal.....	15
1.1.4. Marcadores moleculares da DII	17
1.2 A Importância Biológica e Clínica das Proteínas p53 e Ki67	18
1.3 Análise Digital de Imagens em Patologia	23
2. JUSTIFICATIVA CIENTÍFICA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 Geral	27
3.2 Específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. Seleção de casos	28
4.2 Processamento Histológico	28
4.3 Preparação dos cortes histológicos (Desparafinização e Hidratação).....	29
4.4 Imunohistoquímica para revelação das proteínas Ki-67 e p53	29
4.5 Leitura das lâminas.....	30
4.6 Análise Computadorizada de Imagens.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Aspectos histopatológicos.....	33
5.2 Expressão das proteínas p53 e Ki67	35
6. CONCLUSÕES	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS.....	53
Anexo 1.....	Erro! Indicador não definido.
Anexo 2.....	Erro! Indicador não definido.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Doenças inflamatórias intestinais

Na sua conceituação mais ampla, “as doenças inflamatórias intestinais” (DII) correspondem a qualquer processo inflamatório envolvendo o trato gastrointestinal, seja ele agudo ou crônico, na sua maioria, são afecções de etiologia desconhecida e de grande importância em saúde pública, cujo tratamento envolve custos extremamente altos, incluindo aqueles relacionados à perda de produtividade. Além disso, os pacientes portadores de Doença de Crohn (DC) ou Retocolite Ulcerativa Inespecífica (RCUI) geralmente já experimentaram vários tratamentos cirúrgicos e com agentes imunossupressores (Rothenberg, 2002; Campos *et al.*, 2002).

A despeito de constituírem doenças distintas, compartilham aspectos clínicos e epidemiológicos sugerindo a possibilidade de fatores etiológicos comuns. O curso clínico, cujas manifestações principais são diarreia, dor abdominal e sangramento retal, é caracterizado por períodos de remissão e exacerbação, e apresenta complicações as mais diversas (Damião *et al.*, 2004).

A retocolite ulcerativa inespecífica, juntamente com a doença de Crohn (DC), compõem as doenças inflamatórias intestinais mais frequentes da atualidade (Lanna *et al.*, 2006). Em aproximadamente 10% dos casos não é possível, diagnóstico diferencial entre a RCUI e a DC retal (Sutherland *et al.*, 2002).

1.1.1. Retocolite ulcerativa

A etiopatogenia exata da retocolite ulcerativa inespecífica é desconhecida, mas há várias propostas de explicação focando a atenção em três teorias primárias: suscetibilidade genética, desencadeantes ambientais e distúrbios da regulação imune em indivíduos geneticamente suscetíveis (Orholm *et al.*, 2000). Segundo

Kandice (2002) todas as teorias estão implicadas e nenhum fator isolado é causal.

A idéia de participação de mecanismos imunes é baseada nas manifestações sistêmicas que podem acompanhar essas doenças e na resposta terapêutica a agentes imunossupressores. Estudos sugerem que a DII pode resultar de distúrbio da regulação imune em resposta a antígenos comumente presentes na luz intestinal. Em pessoa normal parece haver um balanço entre os mediadores da inflamação (citocinas pró- e antiinflamatórias). Na DII, a tolerância imunológica à flora endógena pode ser aberrante e resultar em desequilíbrio entre citocinas pró- e antiinflamatórias. Conseqüentemente, uma resposta imune inapropriada pode ocorrer e estimular inflamação crônica (Kandice, 2002).

O diagnóstico da RCUI é principalmente baseado na colonoscopia e nos achados histopatológicos. A RCUI invariavelmente afeta o reto e estende proximalmente a uma distância variável. A inflamação é caracteristicamente confluenta, com o aparecimento de hemorragia e irritação mucosa. Os sinais mais precoces tendem a ser perda sutil de padrões vasculares com hiperemia e o edema da mucosa. Com inflamação mais ativa, a mucosa fica granular com presença de muco e hemorragia de contato. Em estado avançado encontra-se intensa ulceração que se assemelha com a DC severa (Turina *et al.*, 2006).

No diagnóstico da RCUI teremos duas características críticas influentes na administração subsequente que serão: a extensão e a severidade da doença.

A retocolite ulcerativa é uma doença idiopática caracterizada por um processo inflamatório crônico que acomete predominantemente as camadas mucosa e submucosa do intestino grosso (Figueirêdo *et al.*, 2004; Plevy *et al.*, 2007). A doença na grande maioria das vezes afeta o reto e pode se estender cranialmente, em geral de forma contínua, ou seja, sem áreas de mucosa normal entre as porções afetadas comprometendo parte ou todo cólon (Ghosh *et al.*, 2000; Figueirêdo *et al.*, 2004).

A doença pode iniciar em qualquer idade, sendo homens e mulheres igualmente afetados. O pico de incidência ocorre dos 20 aos 40 anos e um segundo pico nos idosos (Cottone *et al.*, 2008).

A retocolite ulcerativa inespecífica tem despertado a atenção pelo aumento crescente da freqüência demonstrado em casuística com números significativamente maiores de doentes nos últimos anos (Marakhouski *et al.*, 2007). Sua importância

relaciona-se ao fato de atingir adultos jovens, prejudicando todas as suas atividades. A doença é incapacitante devido ao número aumentado de evacuações com sangue e muco, às vezes, acompanhada de incontinência anal, dores abdominais, náuseas, mal estar, anorexia e perda de peso, com comprometimento nutricional importante. (Lamers, 1997). O tratamento clínico não cura a doença, entretanto mantém controlada em 80% dos casos RCUI (Habr-Gama, 2001).

A prevalência e a incidência das DII variam amplamente e dependem de múltiplos fatores, incluindo etnia e localização geográfica. Segundo Kandice (2002), a prevalência da DII nos Estados Unidos é de aproximadamente 100 casos por 100 000 habitantes, com 10 000 casos novos diagnosticados anualmente. A prevalência de RCUI é de 12/100 000 habitantes (Zaltman, 2007). Na Europa, a média de incidência é de 10 casos de RCUI por 100 000 habitantes (Binder, 2004).

Nos países em desenvolvimento as taxas de prevalência estão em ascensão e apontam para a influência ambiental na gênese das DII. A América Latina é considerada uma região de baixa prevalência da doença quando comparada com países como os EUA, Reino Unido e Austrália. As taxas de prevalência, incidência e mortalidade no Brasil ainda são desconhecidas, apesar de relatos regionais descreverem um aumento no número de casos novos de DC, se comparados aos de RCUI (Zaltman, 2007).

No Brasil, a prevalência elevada das doenças infecto-parasitárias, as quais podem manifestar-se com colite, é uma dificuldade a mais para o diagnóstico da RCUI, sobretudo, se há resistência em se pensar nessa afecção em crianças. Embora as afecções infecto-parasitárias devam ser consideradas por sua importância epidemiológica, principalmente nas classes economicamente desfavorecidas. Quanto a extensão de comprometimento da doença, poderá limitar-se ao reto (proctite), sigmoide e reto (proctossigmoidite) acometer todo o cólon esquerdo (colite esquerda) e finalmente o comprometimento de todo o cólon e reto (Pancolite ou colite universal) (Ghosh *et al.*, 2000; Sutherland *et al.*, 2002). Contudo, deve-se fazer o diagnóstico diferencial com precocidade. (Watson *et al.*, 2002; Figueirêdo *et al.*, 2004).

Tipicamente as lesões começam no reto e se estendem proximalmente em um padrão contínuo e confluyente. Os locais afetados são o reto e o cólon sigmoide

em 30% dos casos; o reto, o cólon sigmóide e o cólon descendente, em 40%; e todo o cólon, em 30% (Stenson, 1995).

O grau de atividade inflamatória varia na sua severidade de moderado ou grave com períodos de remissão, ou de forma contínua. O sangramento retal é o sintoma de apresentação mais comum; outros sintomas incluem as evacuações mucopurulentas pelo reto, urgência fecal, tenesmo e cólicas abdominais (Rose, 1998).

A associação entre RCUI e câncer colorretal tem sido confirmada em vários estudos, segundo os quais o risco de câncer é variável e dependente de fatores como tempo de evolução da RCUI e extensão da doença (Roessner *et al.*, 2008; Rubin *et al.*, 2007). As chances de ocorrer câncer na retocolite ulcerativa são maiores nos pacientes com mais de dez anos de doença e nos casos de pancolites. Em crianças acometidas da doença é incomum o câncer. O risco de câncer colorretal em pacientes com RCUI tem diminuído em pacientes tratados com drogas antiinflamatórias (Tsianos, 2000).

No entanto, dados recentes sugerem que pacientes com tratamentos muito longos que não demonstrem uma diminuição da extensão das áreas acometidas podem sofrer uma proctocolectomia.

1.1.2. Tratamento cirúrgico

Em pacientes com RCUI grave que inicialmente responderam a corticosteróides, as taxas de proctocolectomia variam entre 38% a 60% (Plevy *et al.*, 2007). Setenta por cento dos pacientes graves, que são tratados com corticosteróides serão não apresentarão os sintomas em um período de 5 dias, 5% terão uma melhoria significativa, e 25% não demonstrara nenhuma evolução (Jannerot *et al.*, 2005).

Gorfine e colaboradores (2000) revisaram os espécimes cirúrgicos de portadores de RCUI submetidos à proctocolectomia ou proctocolectomia restauradora entre 1987 e 1999. O acompanhamento dos pacientes foi realizado

com colonoscopias anuais e biópsias seriadas da mucosa colônica, para detecção de câncer ou displasia. Analisados os laudos de biópsias de colonoscopias, e observou que cerca da metade dos espécimes cirúrgicos continham pelo menos um foco de displasia. O diagnóstico de displasia esteve associado com risco maior de aparecimento de câncer. O valor preditivo positivo de um achado pré-operatório de displasia de qualquer grau foi de 50% para câncer. Os autores concluem que, até o aparecimento de um marcador melhor, o achado de displasia deve ser visto com forte suspeita de coexistência com câncer colorretal.

A indicação cirúrgica ficaria reservada para os pacientes considerados intratáveis clinicamente, ou seja, que não respondem aos diversos esquemas de tratamento, com dosagem no limite dos efeitos colaterais, ou eventualmente já apresentando início dos efeitos colaterais das medicações para manter um mínimo de estabilidade da doença, em geral pacientes jovens com pancolite. O megacólon tóxico, e presença de displasia de alto grau nas biópsias de seguimento endoscópico (20%), câncer, perfuração e hemorragia maciça (Leal *et al.*, 2006).

O tratamento cirúrgico da retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) tem evoluído ao longo das últimas décadas (Lillehei, 2007). Desde a sua introdução em 1978 por Allan Parks, a proctocolectomia com construção da bolsa ileal e anastomose ileo anal tornou-se o tratamento cirúrgico de escolha para a retocolite ulcerativa (RCUI), quando ganhou a indicação de tratamento cirúrgico (Ilnyckyj, 2007).

Esta tem sido a melhor opção nas últimas duas décadas, para o tratamento desta afecção, embora a colectomia com anastomose ileo-retal ainda tenha seu lugar em casos selecionados com resultados funcionais aceitáveis, bem como uma melhor qualidade de vida para os pacientes e observando-se que o nível de satisfação do mesmo após construção da bolsa ileal com anastomose ileo anal é geralmente elevado, consegue padrões de função intestinal satisfatório, com número de evacuações diárias (4-6 vezes) e as fezes com preservação da consistência e função sexual preservada. (Michelassi *et al.* 2003; Shibata *et al.*, 2006).

1.1.3. Bolsa ileal

Várias alternativas de construção de bolsas foram utilizadas com o objetivo de mimetizar a perda do reto e substituir suas funções tais como; de armazenamento e controle da eliminação das fezes. Os objetivos básicos do tratamento cirúrgico da RCUI são extirpar a doença e preservar a continência. A Proctocolectomia com bolsa ileal representou um dos maiores avanços no tratamento. Este procedimento cirúrgico possui a vantagem de ser o tratamento efetivo dessas enfermidades, deixando o paciente livre de uma ileostomia definitiva (Lillehei, 2007).

No Brasil, o Reservatório ileal (RI) foi introduzido em 1984, por Góes e colaboradores com apresentação dos três primeiros casos operados. Várias modificações na confecção do RI foram propostas como alternativas aos formatos em “S” (Parks *et al.*, 1978; Góes *et al.*, 1986) e em “J” (Utsunomiya *et al.*, 1980). Reservatórios em “W” (Nicholls *et al.*, 1985), em dupla câmara (Góes *et al.*, 1993), além de outros, foram descritos, visando ao aprimoramento na função de armazenamento do conteúdo assim como o seu esvaziamento adequado (Góes *et al.*, 1995) (**Figura 1**).

O RI em “J” tem sido o mais utilizado, com relatos de acompanhamento dos mesmos a longo prazo. Este tipo de reservatório apresenta como vantagens a facilidade na sua confecção, e maior eficiência funcional da evacuação (Leal *et al.*, 2006). O comprimento do segmento ileal escolhido varia de acordo com a disposição dos vasos mesentéricos e com a estrutura anatômica pélvica dos pacientes. O tamanho final da bolsa é de 15cm (Góes *et al.*, 1995).

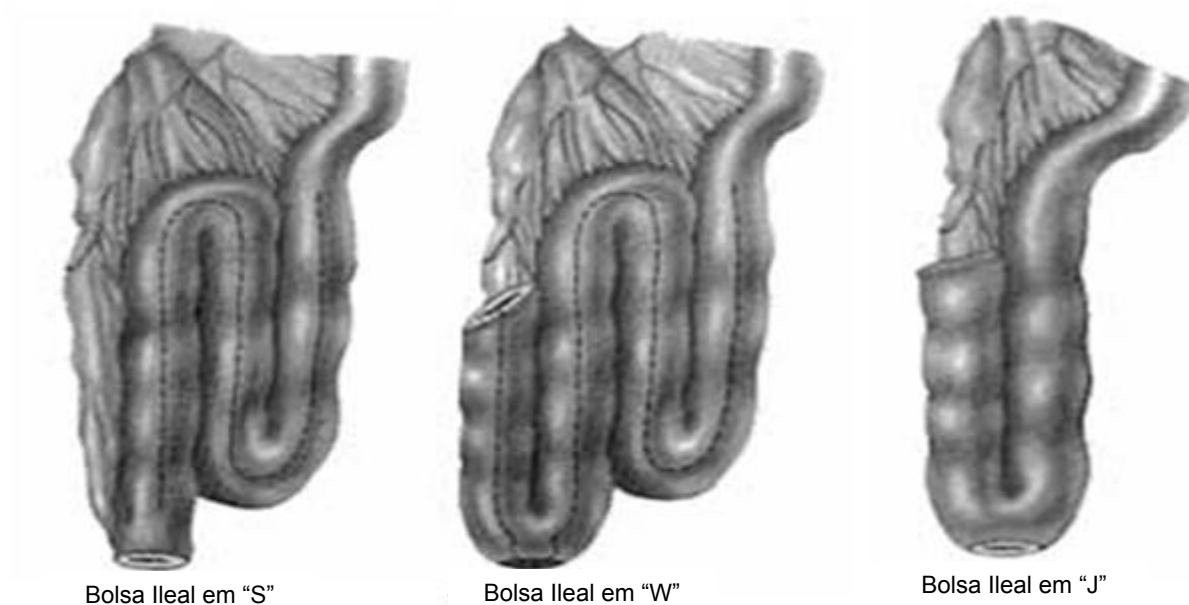


Figura 1. Tipos de bolsa ileal (Fonte: www.surgery.wisc.edu/general/images/pouch_w.jpg)

A proctocolectomia total com anastomose íleo-anal e AIA consiste na colectomia total, sepultamento do reto ao nível dos músculos elevadores do ânus, confecção de reservatório ileal, seguida de anastomose íleo-anal. As vantagens deste procedimento são: resultado funcional satisfatório, elimina a doença intestinal e o risco de câncer, mantém a continência anal e preserva a imagem corporal. Todas estas vantagens têm feito com que as indicações para tratamento cirúrgico da retocolite ulcerativa universal tenham se tornado mais frequentes, encurtando o tempo decorrido entre o início da sintomatologia e a indicação do tratamento cirúrgico (Lillehei, 2007).

Além das medidas terapêuticas cirúrgicas tradicionais cada vez mais tem sido estimuladas as pesquisas envolvendo métodos menos invasivo e eficazes no diagnóstico e conhecimentos sobre a evolução das lesões inflamatórias intestinais mais frequentes. O desenvolvimento de marcadores moleculares tem sido bastante estimulado como ferramenta de apoio clínico e cirúrgico.

1.1.4. Marcadores moleculares da DII

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

Os marcadores biológicos são macromoléculas presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, cujo aparecimento e/ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento de células neoplásicas (Capelozzi, 2001). Tais substâncias funcionam como indicadores da presença de câncer, e podem ser produzidas diretamente pelo tumor ou pelo organismo, em resposta à presença do tumor (Silveira, 2005). Os marcadores tumorais, em sua maioria, são proteínas ou frações de proteínas (Almeida, 2004), incluindo antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormônios (Mattos *et al.*, 2005).

Esses marcadores podem ser úteis no manejo clínico dos pacientes com câncer, auxiliando nos processos de diagnóstico, estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognóstico (Alonzo, 2005), além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento (Pacheco *et al.*, 2002). Podem ser caracterizados ou quantificados por meios bioquímicos ou imunohistoquímicos nos tecidos ou no sangue, e por testes genéticos para pesquisas de oncogenes, genes supressores de tumores e alterações genéticas (Mattos *et al.*, 2005).

Entre os principais marcadores tumorais estão: AFP (alfafetoproteína); MCA (antígeno mucóide associado ao carcinoma); Cromogranina A; BTA (antígeno tumoral da bexiga); Telomerase; NMP22 (proteína da matriz nuclear); Cyfra 21.1; PAP (Fosfatase Ácida Prostática); CA 72.4; β -HCG (Gonadotrofina coriônica humana); CA 125; CA 15.3; CA 19.9; CA 27.29; CA 50; Calcitonina; Catepsina D; CEA (antígeno carcinoembrionário); C-*erbB*-2 (oncogene); LDH (desidrogenase láctica); K-ras; NSE (Enolase Neurônio-Específica); PSA (antígeno prostático específico); p53 e beta 2-Microglobulina (Pradal *et al.*, 2004).

O marcador ideal reúne as características de diagnóstico precoce de neoplasias e de sua origem, estabelecimento da extensão da doença, monitorização da resposta terapêutica e detecção precoce de recidiva (Reis, 2005; Rosa *et al.*, 2005), além de ser órgão-sítio específico e ter meia-vida curta, permitindo acompanhar temporariamente as mudanças do tumor (Silveira, 2005). A maioria dos marcadores disponíveis falha pela falta de especificidade e sensibilidade, exceção feita ao PSA que é utilizado para rastreamento de neoplasia prostática (Rosa *et al.*, 2005).

Embora a RCUI seja uma doença inflamatória de origem não-neoplásica, o câncer coloretal ainda é a principal causa de morte nos pacientes acometidos com essa DII (Lashner *et al.*, 2003). Além disso, até aproximadamente 1993 os doentes assintomáticos com displasia de grau elevado ou câncer eram aconselhados a se submeterem a colectomia total (Riddell *et al.*, 1983).

Por outro lado, os programas de vigilância (marcadores de prognóstico) e prevenção direcionados para estes parâmetros não conseguiram diminuir mortalidade relacionada com câncer (Provenzale & Onken, 2001).

Dentre os marcadores de prognóstico atualmente testados estão alguns marcadores sorológicos e/ou tumorais, como o IL-6, ICAM, α -TNF, Dehydroepiandrosterona (DHEA), ciclooxygenase-2 (Ferreira *et al.*, 2004; Louro *et al.*, 2002); proteínas p53 e Ki67 (Straub *et al.*, 1998; Lashner *et al.*, 2003; Silva-Filho *et al.*, 2005; Acay *et al.*, 2006).

1.2 A Importância Biológica e Clínica das Proteínas p53 e Ki67

O gene *p53* localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) foi descoberto através de estudos bioquímicos realizados por Lane e Crawford em 1979, quando se observou a codificação de uma fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos e 53 kD e denominada p53 (Gasco & Crook, 2003). Essa proteína que tem sido responsabilizada por uma série de funções regulatórias do desenvolvimento celular, é expressa a partir de um gene regulador chave do ciclo celular que, que ao sofrer mutações, leva ao desencadeamento de neoplasias malignas. Tem um

papel importante nas vias de carcinogênese de diferentes tipos de tecidos, atuando, portanto, como um gene supressor tumoral em condições normais, ou seja, bloqueia a proliferação celular (Park *et al.*, 2007). Por esse motivo a p53 é chamada guardiã do genoma (Lane, 1992) e está no ponto de convergência de várias rotas sinalizadoras distintas (Morris *et al.*, 2008). Esta proteína é um tetrâmero capaz de se ligar a seqüências específicas do DNA sendo um fator de transcrição que controla de forma positiva ou negativa a expressão de diversos genes envolvidos em várias vias celulares (**Figura 2**). Dentre as vias mais importantes se destacam a inibição da replicação do DNA, funcionando como uma molécula de “check-point” da progressão da célula no ciclo celular da fase G1 para a fase S e também da fase G para fase M.

Desta forma, é garantida a manutenção da integridade do genoma e o controle da proliferação celular (Chen *et al.*, 2003). Adicionalmente, a p53 também está envolvida na apoptose, embora uma via de apoptose independente da p53 tenha sido identificada (Janssen *et al.*, 2008).

A atividade da proteína p53 inicia-se com a sua ligação ao DNA induzindo a transcrição de um outro gene regulador, o p21. Este, por sua vez, transcreve uma proteína de 21 quilodaltons (p21) que se une ao complexo da ciclina G1-CDK2, o qual, na ausência dessa proteína, faz a célula transpor o ponto de checagem G1, ou seja, o ponto de início do ciclo celular. Portanto, a p53 impede indiretamente, através da proteína p21, que a célula progrida para a fase S e replique seu DNA. Além disso, a p53 inibe a expressão de bcl-2 e promove a síntese de Bax, ou seja, contribui para a morte celular programada ou apoptose (Inoue *et al.*, 2005).

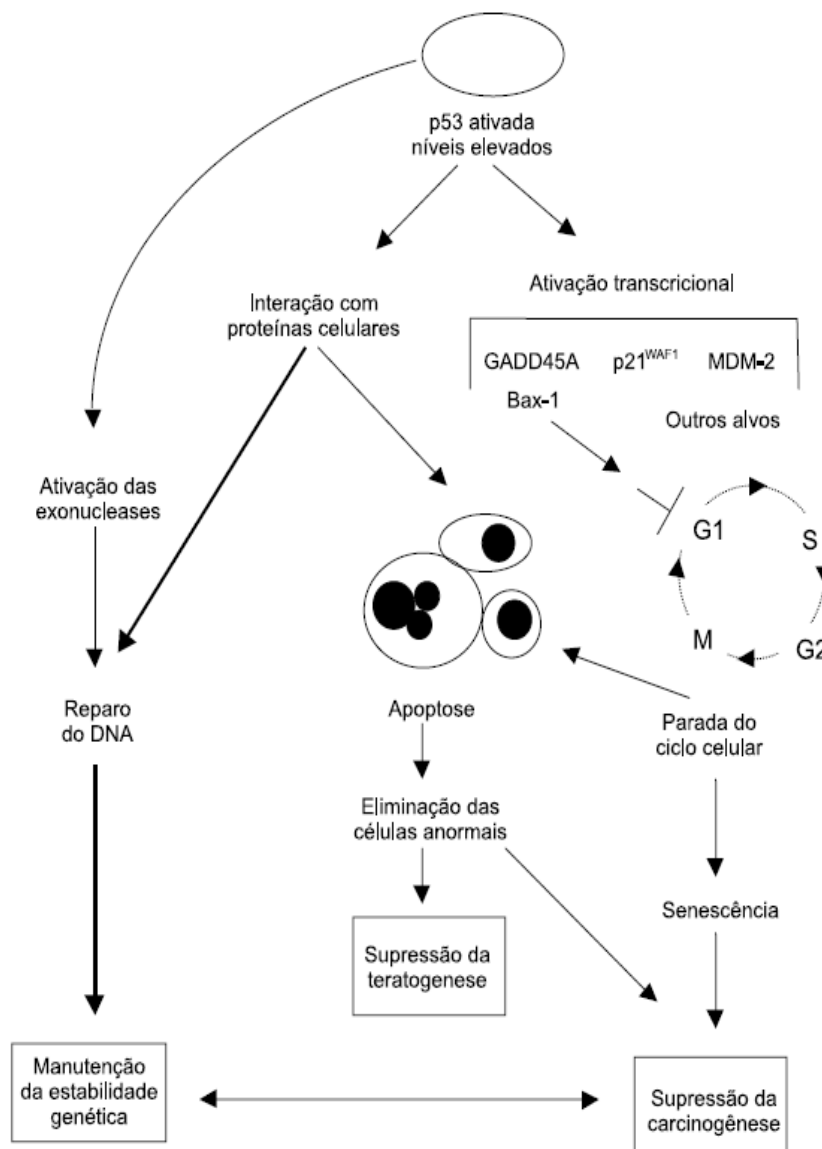


Figura 2. Heterogeneidade das vias de sinalização utilizadas pela proteína p53 em seu papel de “guardião do genoma” (Fonte: Rev.bras.hematol.hemoter., 2002).

Estudos indicam, ainda, que a superexpressão da proteína p53 em outros tumores (por exemplo, carcinomas de mama, cólon e bexiga) correlaciona-se com diminuição da diferenciação histológica, comportamento biológico mais agressivo e redução da sobrevida dos pacientes (Lazzaro *et al.* 2000; Chen *et al.*, 2003; Hofseth *et al.*, 2004).

Alteração no gene *p53* pode ser detectada tanto pelo sequenciamento direto do gene quanto pela superexpressão imunohistoquímica da sua proteína. A

superexpressão da proteína p53 pode ser um indicador de mutação desse gene (Gasco & Crook, 2003).

Vários estudos têm demonstrado que anormalidades do gene *p53* estão envolvidas na gênese de aproximadamente 50% das neoplasias malignas (Soussi *et al.*, 2007). A proteína mutante p53 inativa a proteína p53 normal ocasionando perda da função de supressão tumoral desse gene, o que permite a atividade oncogênica (**Figura 3**). A proteína p53 é metabolicamente lábil, sendo rapidamente degradada no núcleo com uma meia-vida variando entre 6 a 30 minutos e provavelmente por esse motivo é usualmente indetectável em células de tecidos normais. A forma mutante dessa proteína exibe um aumento de sua meia-vida, podendo ser detectada por técnicas imunohistoquímicas em muitos tumores (Horn *et al.*, 2007).

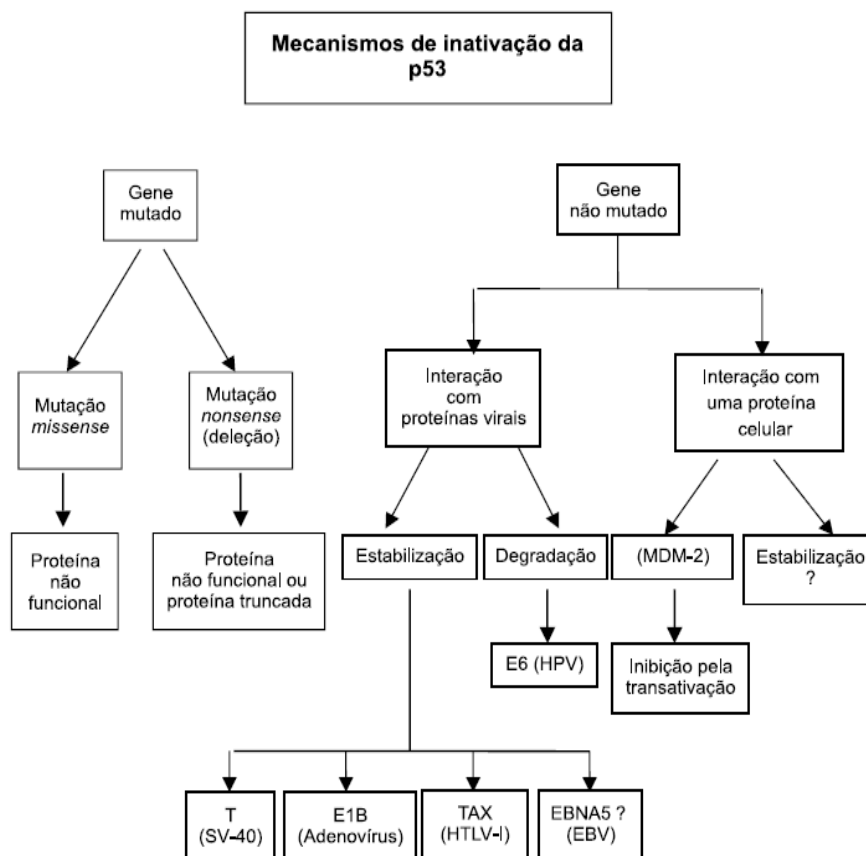


Figura 3. Diferentes mecanismos de inativação da proteína p53 (Fonte: Rev.bras.hematol.hemoter.,2002).

A p53 regula a expressão de genes envolvidos na apoptose, angiogênese, ciclo celular e manutenção do genoma. Mutações no gene p53 são encontradas em cerca de 50% dos cânceres colo retal, com a maioria das mutações que ocorrem em exons 5-8 (Mills *et al.*, 2005).

Estas mutações parecem ser formadas relativamente tarde na gênese do Câncer colorctal (CRC), ou seja, durante a conversão da displasia em carcinoma invasivo. A p53 tem sido amplamente investigada tanto como um prognóstico como uma terapia preditiva como marcador no CRC. Além disso, uma variedade de métodos foram utilizados para determinar anormalidades da p53. Estes métodos têm geralmente empregado a imunohistoquímica para detectar a proteína p53 ou análise da sequência de DNA para detectar mutações genéticas (Duffy *et al.*, 2007).

Em pacientes com RCUI a avaliação dos níveis de p53 tem sido considerado como teste complementar para displasia e fator prognóstico para o câncer intestinal (Lasher e tal., 2003; Paun et al., 2006)

A Ki-67 é uma proteína não histônica, com peso molecular aparente de 345 a 349 Kd sendo o anticorpo monoclonal obtido pela primeira vez por Gerdes e colaboradores em 1983. Esta proteína está presente em todas as fases do ciclo de divisão celular (exceto a fase G0) (Brown *et al.*, 2002), alcançando sua maior expressão nas fases G2 e M (Barbosa *et al.*, 2003). Sendo um antígeno monoclonal, de vida média de uma hora (Zhang, 2001), o cromossomo 10 parece ser aquele envolvido na síntese protéica determinante deste antígeno no ciclo celular (Key *et al.*, 1993). Assim, vários trabalhos referenciam o Ki-67 como indicador clínico do comportamento biológico das neoplasias malignas (Gerdes *et al.*, 1991), pois sinaliza a síntese do DNA da célula tumoral com o aumento da marcação de células malignas com este antígeno. Outro aspecto que merece ser ressaltado é a definição das margens cirúrgicas pelo Ki-67, pois demonstram a invasão tumoral por vezes não detectadas à microscopia óptica, sendo o aumento de sua positividade determinante nos índices de mau prognóstico.

O uso do Ki-67 está restrito ao tecido a fresco, pois o epítipo não sobrevive à fixação histológica de rotina. MIB-1 é um verdadeiro anti-Ki-67 equivalente, que pode ser empregado em tecidos fixados em formalina e em tecidos rotineiramente

processados com recuperação antigênica através de microondas. Uma das técnicas imunohistoquímicas na avaliação da proliferação celular é a detecção do Ki-67 (Muskhelishvili, 2003).

Freqüentemente a proteína Ki67 é utilizada como um marcador para a proliferação celular em cortes teciduais (Aoyagi *et al.*, 2008), sendo importante ressaltar que a sua positividade não é exclusiva nas neoplasias malignas, mas sim predominante em relação às benignas nos tecidos glandulares, sendo o melhor marcador de transformação maligna, como, por exemplo, do carcinoma versus adenoma pleomórfico (Barbosa *et al.*, 2003). Em outros trabalhos demonstrou-se através da imunohistoquímica que a ausência de marcação em biópsias de pacientes com colite ulcerativa é um indicador do grau de displasia (Wong *et al.*, 2000; Zivkovic *et al.*, 2004; Acay *et al.*, 2006).

1.3 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 inflamatórias (Francis, 2000), seja através da análise colorimétrica de células neoplásicas em cultura (Alley, 1991), citometria automática ou variações morfométricas nucleares (Roels, 2000).

No apoio à interpretação dos resultados obtidos pela histoquímica de células inflamatórias, os sistemas computadorizados de análise de imagens têm fornecido dados qualitativos e quantitativos mais refinados esclarecendo assim, vários aspectos histomorfológicos (Demirkaya, 1999; 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 (Montironi *et al.*, 2000).

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 morfométricas de padrões histológicos e citológicos (Hamilton, 1997; Lambert *et al.*, 2001; Melo-Júnior, 2003).

Inúmeras técnicas morfométricas foram desenvolvidas durante os últimos anos com a expectativa de introduzir na prática da patologia critérios objetivos e reprodutíveis relacionados ao diagnóstico e ao prognóstico de doenças inflamatórias intestinais. Contudo, os estudos quantitativos não foram inicialmente considerados práticos devido à complexidade das técnicas e o longo tempo necessário para o processo (Bartels & Thompson, 1994).

Com o avanço dos componentes computacionais, novos métodos para captação e tratamento de imagens têm facilitado cada vez mais a precisão das informações devido à capacidade de se realçar, excluir e delimitar certas características obtidas pela imagem digital. Estas imagens digitais são representadas por uma matriz cujos elementos são chamados pixels (*picture elements*) que representam a unidade fundamental de análise de uma figura através de tonalidades específicas de cor (Synopsis, 1996).

Programas computacionais cada vez mais especializados em análise de parâmetros microscópicos tenderão a se tornar uma prática freqüente nos laboratórios, seja para pesquisa ou diagnóstico de rotina (Hamilton, 1997; Barbosa-Júnior, 2001).

As vantagens da mensuração das estruturas biológicas na histopatologia e na citopatologia incluem: diminuição da variabilidade na quantificação dos aspectos celulares e teciduais; promoção de uma escala numérica e reprodutível dos aspectos qualitativos; aumento da sensibilidade na detecção de alterações mínimas; avaliação dos efeitos de diferentes métodos de processamento histológico; emprego no controle de qualidade; determinação da forma e tamanhos padrões para ensino e diagnóstico; maximização como ferramenta de pesquisa (Hamilton & Allen, 1995; True, 1996).

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).

Avaliações histológicas através da imunohistoquímica, 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.

Através da captação de imagens histológicas pelo computador novas aplicações têm surgido no intuito de agilizar o fluxo de informações sobre temas e problemáticas no campo da interpretação das diversas alterações morfológicas e até bioquímicas dos ambientes celulares durante as mais variadas situações de estresse resultando numa maior precisão dos resultados obtidos (Rashbass, 2000; Peterson *et al.*, 2000).

Esta opção metodológica tem se apoiado cada vez mais em novas tecnologias permitindo a troca de informações e resultados de estudos em tempo real através da captação e análise de imagens utilizando-se da rede mundial de computadores / *internet* (Eusebi *et al.*, 1997; Strauchem *et al.*, 2000; Demartines *et al.*, 2000).

Os dois métodos básicos para realizar medições aplicando-se sistemas computacionais são: o sistema interativo de análise de imagens através de um operador para definir as estruturas de interesse usando cursores ou canetas digitais e o sistema automático de análise de imagens que através de vídeo câmera acoplada captura as imagens histológicas para serem armazenadas na memória do computador (Hamilton, 1997; Lambert *et al.*, 2001).

Estudos mencionados na literatura 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), próstata (Araújo-Filho *et al.*, 2006).

2. JUSTIFICATIVA CIENTÍFICA

O conhecimento do maior número de variáveis diretamente associadas ao prognóstico para evolução de tumores intestinais torna-se necessário para a melhor identificação de pacientes que poderão se beneficiar de ferramentas diagnósticas complementares, como o uso de marcadores biológicos como o caso de algumas, proteínas específicas que desempenham importantes funções no desenvolvimento de doenças neoplásicas e inflamatórias.

A partir disso, este trabalho propõe avaliar as repercussões teciduais quanto aos aspectos histológicos e a imunoexpressão das proteínas Ki67 e p53 de pacientes diagnosticados com RCUI e tratados clinicamente ou através da cirurgia com a construção de uma bolsa ileal.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar através da imunohistoquímica as principais alterações histopatológicas na mucosa intestinal de pacientes acometidos pela RCUI tratados clinicamente ou subseqüentemente tratados com ileostomia e construção de bolsa ileal.

3.2 Específicos

- Obter o perfil anátomopatológico de portadores de retocolite ulcerativa tratados clinicamente ou cirurgicamente;
- Avaliar o estudo imunohistoquímico da expressão de proteínas Ki-67 e p53 pelas células glandulares em tecidos com RCUI;
- Realizar estudo morfométrico através de análise digital de imagens da expressão das proteínas Ki-67 e p53 nos tecidos estudados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Seleção de casos

Foram selecionados blocos de parafina contendo fragmentos de tecido intestinal anteriormente diagnosticados com retocolite ulcerativa (n=20) de pacientes em tratamento clínico e blocos pacientes já tratados cirurgicamente com proctocolectomia com anastomose íleo-anal com bolsa ileal (n=10), dos arquivos do setor de patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – UFPE, gentilmente cedido pelo professor Francisco Albuquerque Lima. Para controle foram selecionados e analisados a contra parte normal da biópsia. Todas as amostras foram oriundas de pessoas com idades entre 19 e 72 anos de ambos os sexos (média = 38,5 anos).

Foram utilizados como critérios de inclusão, a realização de exame colonoscópico entre os anos de 2000 e 2008, diagnóstico clínico acima de 7 anos baseados na sintomatologia, radiologia e/ou endoscopia e a não apresentação de displasia ou metaplasia intestinal. Já como fatores de exclusão foram desconsiderados os pacientes submetidos a qualquer processo cirúrgico do cólon (plástica ou remoção de tumores) e portadores de doença de crohn ou colite indeterminada.

O protocolo experimental desenvolvido no presente trabalho foi submetido e aprovado pelo comitê de ética de pesquisas envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE nº 200/08) (Anexo 1).

4.2 Processamento Histológico

Das amostras foram obtidos cortes histológicos com 4 µm de espessura, montados em seguida montadas e coradas pela hematoxilina-eosina para análise histopatológica.

4.3 Preparação dos cortes histológicos (Desparafinização e Hidratação)

As preparações histológicas foram colocadas em estufa a 37°C por 12 horas (overnight) e em seguida em xilol por 10 minutos. Posteriormente, foram hidratadas em banhos consecutivos de soluções com concentração decrescente de álcool absoluto até 90%, permanecendo um minuto em cada diluição.

4.4 Imunohistoquímica para revelação das proteínas Ki-67 e p53

Para a técnica de imunohistoquímica, foi utilizado um anticorpo primário monoclonal de camundongo da marca DAKO Corporation p53 (Clone Pab240) e um anticorpo monoclonal primário antiproteína Ki-67 (Clone MIB-1) da marca DAKO Corporation.

Para cada anticorpo foi utilizado um controle positivo que apresentava marcação quase na totalidade das células lesionadas. Para o anticorpo p53, utilizou-se um caso de carcinoma coloretal e um fragmento de pele normal para o anti-Ki-67.

Para a recuperação antigênica foi empregada a incubação das preparações histológicas em tampão citrato (3,84g de ácido cítrico, 48ml de hidróxido de sódio 1M, completando para 2000ml de água destilada, pH 6), Com o objetivo de inibir as ligações inespecíficas colocou-se uma solução de leite nas preparações histológicas sob calor úmido (Vaporeto[®]), durante 20 minutos . A solução de leite foi preparada no dia, utilizando-se 30ml TRIS (hidroxi-metil-aminometano) + 0,30g de albumina bovina. Homogenizou-se esta solução com o auxílio de um agitador magnético e adicionou 0,30g de leite desnatado em pó Molico. Em seguida, filtrou-se essa solução em filtro milipore. Os anticorpos primários foram diluídos em uma solução comercial (Antibody diluent, with background reducing components, código: S3022, DAKO Cytomation – Carpinteria – USA) numa diluição de 1:50

Posteriormente, foram incubadas com o anticorpo primário (solução contendo anticorpo monoclonal anti-Ki67 ou anti-p53 na diluição 1:50, por 30 min, em temperatura ambiente de 25°C).

Logo após as preparações histológicas foram imersas em tampão de

lavagem TBS (800ml de ácido clorídrico 1N, 116g de cloreto de sódio, 122g de TRIS, 10ml de tween 20, completando para 20ml de água destilada) em dois banhos de cinco minutos. Em seguida pingou-se o anticorpo secundário (LSAB).

As preparações histológicas receberam inicialmente o Link (anticorpo secundário de porco anti-camundongo, cabra e coelho) por trinta minutos e depois o Estreptavidina por mais trinta minutos, na câmara umidificada em temperatura ambiente.

Para revelação das lâminas utilizou-se o substrato cromógeno diaminobenzidina (Liquid DAB + substrate, Chromogen System, código: K3468, DAKO – USA) preparado conforme instruções do fabricante e com tempos previamente estabelecido para cada anticorpo, onde o p53 teve um tempo de 45 minutos e o Ki-67 um tempo de 3 minutos.

Lavagens em água destilada foram feitas para retirada do excesso do cromógeno e posteriormente os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris por 30 segundos e lavados em cinco banhos de água destilada, sendo que o terceiro banho continha hidróxido de amônia para conferir a coloração azulada da Hematoxilina.

Finalmente procedeu-se a desidratação dos cortes em dois banhos de álcool (um minuto cada) seguido por quatro banhos de xilol (um minuto cada). As lâminas foram montadas com Enthelam (código: 107961, Merck – Alemanha) para fixação das lamínulas em resina e avaliadas no microscópio óptico (Olympus BH-2, Japão).

4.5 Leitura das lâminas

Para p53 e Ki-67 foram considerados como positivos, na análise, as laminas que apresentaram mais de 10% de núcleos celulares intensamente corados, por campo microscópico de magnificação de 400 vezes. A contagem do total de células nas áreas de interesse, e à contagem das células positivas nesta área, estabelecendo sua proporção em termos de percentuais.

A Imunohistoquímica era considerada negativa, quando demonstrava ausência de coloração imunohistoquímica ou menos de 10% dos núcleos corados, respectivamente para p53 e Ki-67 e positiva havendo mais de 10% dos núcleos corados para p53 e Ki-67, respectivamente conforme a literatura (Shimada e tal.,

1999)

4.6 Análise Computadorizada de Imagens

As imagens das preparações histológicas foram capturadas utilizando um sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico (Olympus BH-2), já utilizado com sucesso em análises diagnósticas (Oberholzer *et al.*, 1996). O sistema interativo de análise de imagens utiliza o Software OPTIMAS[®] 6.1 e Câmera digital CCBBW 410 (Sansung), disponíveis no Departamento de Patologia da UFPE (Figura 4).



Figura 4. Estação de análise de imagens do Departamento de Patologia, CCS-UFPE (abril, 2007).

Os perfis de marcação da imunohistoquímica dos cortes histológicos (magnificação 200x) foram captados pelo ajuste do contraste do nível de cinza (gray value). A partir da captura das imagens, e após digitalização, padronizou-se a margem de variação (threshold range).

Foram realizadas as contagens de células com padrão nuclear de marcação em marron. Todas as células captadas foram contadas por dois analistas isoladamente sendo avaliados cinco campos por lâmina (perfazendo um total de 150 campos analisados).

O parâmetro morfométrico adotado foi a área média total (μm^2) composta pelo

somatório das estruturas citoplasmáticas marcadas (perfil de marcação da imuno-histoquímica para o p53 e o Ki-67) por campo captado (área de 12.234 μm^2) da preparação histológica.

Para minimizar distorções nos valores das medições devido à presença de células não-marcadas, aplicou-se um fator de correção (FC) de acordo com a equação $FC = s/S$, onde “s” é o valor da área superficial marcada e “S”, a área total medida. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o teste t de Student pareado, considerando-se um nível de significância, $p < 0,05$.

Para o estudo do padrão de marcação dos anticorpos foi aplicada uma escala semiquantitativa (DxI) levando-se em consideração a intensidade da coloração (I), foi calculada a área média de células por campo captado (área de 12.234 μm^2) em porcentagem (%) onde a marcação fraca = 15-20%, moderada = 25-55% e forte = 60-95%, e a distribuição (D) variando entre fraca (+), moderada (++) e intensa (+++), conforme metodologia utilizada (Özer *et al.*, 2000; Melo-Junior *et al.*, 2008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Aspectos histopatológicos

Nos pacientes em que a cirurgia não é o tratamento de escolha é fundamental a utilização de outros fatores prognósticos para melhor compreender a história natural da retocolite ulcerativa e definir melhor a terapia (Felin *et al.*, 2008).

Dentre os fatores prognósticos avaliados no presente estudo, podemos destacar o perfil da resposta inflamatória e a imunorreatividade às proteínas Ki-67 e p53. Na avaliação histológica dos casos de RCUI estudados foi observada uma diferença no perfil de resposta inflamatória entre os pacientes portadores de RCUI tratados cirurgicamente quando comparados aos pacientes tratados clinicamente.

Foi observado nos pacientes tratados clinicamente um maior infiltrado inflamatório predominantemente linfo-plasmocitário associado a áreas de desgaste da mucosa colônica (erosões/ulcerações) (**Figura 5**), entremeado por regiões com fibrose intersticial (**Figura 6**). No grupo tratado cirurgicamente a arquitetura glandular estava mais bem preservada e com ausência de infiltrações por células inflamatórias (**Tabela1**).

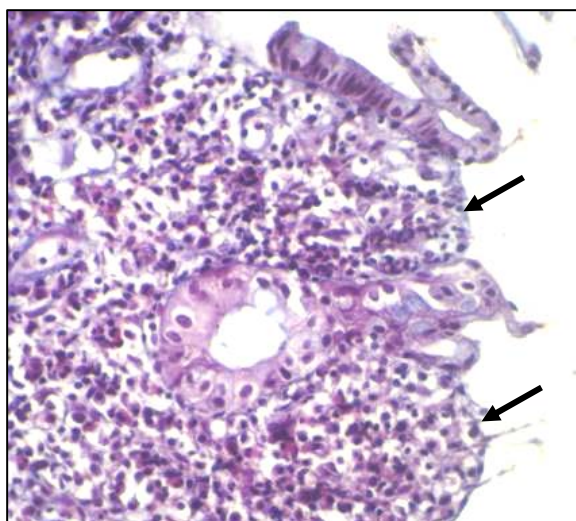


Figura 5. Mucosa colônica em paciente com retocolite ulcerativa apresentando áreas de erosão (setas) (Tricrômico de Masson. Magnificação: 400x).

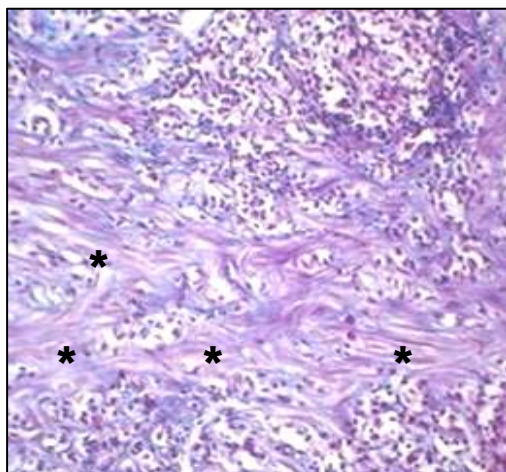


Figura 6. Fibrose intersticial (*)em paciente com retocolite ulcerativa tratado clinicamente (Tricrômico de Masson. Magnificação: 400x).

Tabela 1: Prâmetros histopatológicos em pacientes com retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI).

	Parâmetros histopatológicos		
Grupo	Inflamação	Fibrose	Erosão/ulceração
RCUI-Clin	Presente	Presente	Presente
RCUI-Cir	Ausente	Ausente	Presente

Segundo nosso estudo, o quadro inflamatório demonstrou ser bastante característico em ambos os grupos estudados, o que evidencia ser isto um fator de averiguação e também fator de risco adicional para progressão neoplásica (Itzkowitz & Yio, 2004; Rutter *et al.*, 2004). Entretanto, existe muito pouca concordância entre as interpretações histopatológicas o que evidencia a necessidade de aprofundar os estudos sobre esse aspecto (Eaden *et al.*, 2001).

Em ambos os grupos (cirúrgico e clínico) não foram observadas áreas de ectasia vascular, hiperemia ou hemorragias, porém no grupo tratado clinicamente foi encontrado um maior número de agregados linfóides reativos (**Figura 7**).

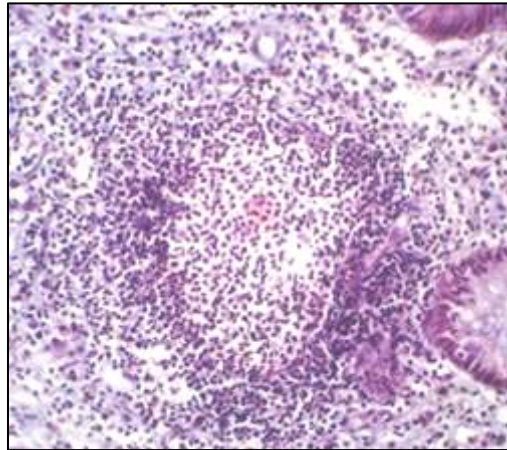


Figura 7. Mucosa colônica em paciente com retocolite ulcerativa apresentando agregados linfóides reativos (Tricrômico de Masson) Magnificação: 400x).

5.2 Expressão das proteínas p53 e Ki67

No estudo imunohistoquímico foi constatada uma reatividade para ambas as proteínas p53 e Ki67 nas áreas com RCUI (Tabela 2 e 3).

Tabela 2: Padrão de marcação para proteínas teciduais (Ki-67) em pacientes com retocolite ulcerativa idiopática (RCUI).

Proteína tecidual	
Grupo	Ki67
RCUI-Cir	16,66% (5/30)
RCUI-Cli	73,33% (22/30)
% (Positivo/ número total de preparações histológicas)	

Tabela 3: Padrão de marcação para proteínas teciduais (p53) em pacientes com retocolite ulcerativa idiopática (RCUI).

Proteína tecidual	
Grupo	p53
RCUI-Cir	26,66% (12/30)
RCUI-Cli	66,66% (20/30)

% (Positivo/ número total de preparações histológicas)

No entanto, a expressão aumentada de p53 nos grupos tratados clínica (Figura 8A) quando comparamos com o grupo tratado cirurgicamente sugere que estes tratamentos diminuem as chances de ocorrer transformação neoplásica das lesões de RCUI devido ao fato desta proteína estar relacionada a supressão tumoral (Wong *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2007).

No presente estudo, a imunoreatividade foi mais intensa nos tecidos inflamados, aspecto este que corrobora o resultado observado por Sato & Machinami (1999) ao reportarem que a reatividade das células em condições não-neoplásicas correlaciona-se com severidade da inflamação.

Nossos resultados confirmam estudo mais recente que afirma que, quando ocorrem mutações e alta expressão do gene p53 ocorre o surgimento de mais de 75% cânceres coloretais. Além disso, o aumento da frequência de alelos mutantes do p53 em tecidos intestinais pode conferir susceptibilidade para o desenvolvimento de neoplasias em um microambiente inflamatório (Hussain, *et al.*, 2000).

A análise de imagem da imunoreatividade tecidual da proteína Ki-67 (Figura 8B) demonstrou um aumento estatisticamente significativo na sua expressão no grupo de pacientes portadores de RCUI tratados clinicamente quando comparados àqueles pacientes tratados cirurgicamente (**Gráfico 1**).

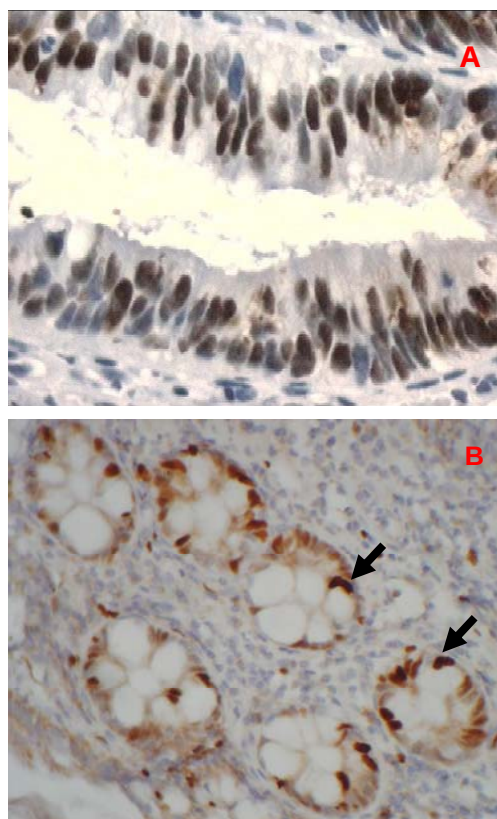


Figura 8. Biópsia intestinal. (A) Expressão tecidual da proteína p53 em mucosa intestinal de paciente com retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI). Na figura B, observa-se padrão de marcação intenso e nuclear (setas) para proteína Ki-67 em pacientes com RCUI (Magnificação 400x).

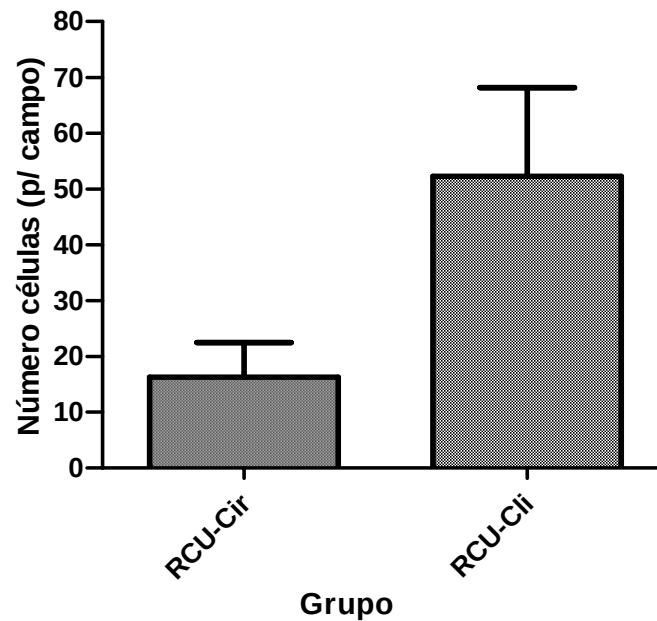


Gráfico 1. Análise digital da imunomarcção da proteína Ki-67 em pacientes com retocolite ulcerativa.

Protocolos experimentais para análise imunohistoquímica da proteína Ki-67 em tecido parafinizado estão sendo testados para marcação de lesões displásicas na colite ulcerativa (Wong *et al.*, 2000). Embora não se saiba ainda qual a verdadeira influência da resposta inflamatória na expressão de proteínas relacionadas ao câncer intestinal, estudos como este se tornam importantes no entendimento dos vários aspectos relacionados as DII.

6. CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia utilizada podemos concluir que:

- ✓ Ocorre diferença no perfil da resposta inflamatória nas amostras de pacientes com RCUI tratados cirurgicamente e clinicamente, nestes últimos há presença mais acentuada de infiltrado linfo-plasmocitário, fibrose intersticial e agregados linfóides reativos;
- ✓ Houve diferença significativa na reatividade tecidual da proteína p53 entre as amostras estudadas quando comparados os pacientes tratados clinicamente com aqueles submetidos a cirurgia, visto que os tratados cirurgicamente não apresentavam uma área inflamada.
- ✓ Ocorre aumento significativo no número médio de células com reatividade para a proteína Ki-67 nas amostras teciduais de pacientes tratados clinicamente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acay R. R., Felizzola C. R., Araújo N. S., Sousa S. O. M. Evaluation of proliferative potential in oral lichen planus and oral lichenoid lesions using immunohistochemical expression of p53 and Ki67. *Oral Oncology* (2006) 42, 475–480

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.

Almeida, J.R.C. Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade. São Paulo: Atheneu; 2004:61-72.

Alonzo, T.A. Standards for reporting prognostic tumor marker studies. *J Clin Oncol.* 2005;23(36):9053-9054.

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.

Aoyagi S., Akiyama M., Shimizu H. High expression of Ki-67 and cyclin D1 in invasive extramammary Paget's disease. *Journal of Dermatological Science* (2008)

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.* v.37, n. 3, p. 197-200, 2001.

Barbosa, T.V.; Rosas, M.P.; Costa, A.C.; Rapoport, A. Prognostic significance of Ki-67 in great cell undifferentiated carcinoma of the major salivary glands: study of 11 cases. *Rev Bras Otorrinolaringol.* V.69, n.5, 629-34, set./out. 2003.

Bartels, P.H.; Thompson, D. The video photometer. In: *Image Analysis. A primer for pathologists.* Marchevsky AM & Bartels PH (Ed.) Raven Press Ltd. New York. p. 29-

56, 1994.

Binder, V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, London, v. 18, n. 3, p. 463-479, 2004.

Brown DC, and Gatter KC: Ki-67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 40: 2–11, 2002.

Campos, F.G.; Waitzberg, D.L.; Habr-Gama, A.; Logullo, A.F.,;Noronha, I.L.; Jancar, S.; Torrinhas, R.S.; Furst, P. Impact of parenteral n-3 fatty acids on experimental acute colitis. *Br J Nutr.* 2002; 87 (1): S83-8.

Capelozi, V.L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. *J Pneumol.* 2001;27(6):321-28.

Chen, S-L. p53 is a regulator of the metastasis suppressor gene Nm23-H1. *Mol Carcinog*, v. 36, v. 4, p. 204-14, 2003.

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

Cottone M., Scimeca D. , Mocciaro F., Civitavecchia G., Perricone G., Orlando A. Clinical course of ulcerative colitis *Digestive and Liver Disease*, Volume 40, Supplement 2, July 2008, Pages S247-S252.

Damião, A.O.M.C.; Sipahi, A.M. Doença Inflamatória Intestinal. *Gastroenterologia*. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda p.1105-1149, 2004.

Demartines, N.; Battegay, E.; Liebermann, J.; Oberholzer, M.; Rufli, T.; Harder, F. Telemedicine: Perspectives and multidisciplinary approach. *Schweiz. Med. Wochensh.* v. 130, n. 9, p. 314-323, 2000.

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.

Duffy, M.J.; Van Dalen, A.; Haglund, C.; Hansson, L.; Holinski-Feder, E.; Klapdor, R.; Lamerz, R.; Peltomaki, P.; Sturgeon, C.; Topolcan, O. Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *European journal of cancer* 43 (2007) 1348– 1360.

Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001;48:526–535.

Eusebi, V.; Roshini, L.; Erde, S.; Rosai, J. Transcontinental consults in surgical pathology via the internet. *Hum. Pathol.* v. 28, p. 13-16, 1997.

Felin C.R.; Rocha A.B., Felin I.P.D., Regner A., Grivicich I. Expressão das Proteínas p53 e Cox-2 em Adenocarcinoma Intestinal e Mucosa Adjacente. *Revista brasileira Coloproctologia*, 2008;28(1): 019-025.

Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. 1st ed. São Paulo: Atheneu. p.171-81, 2004.

Figueirêdo, A.A.; Mota, J.A.C.; Penna, F.J.; Pontes, G.A. Non-specific ulcerative colitis in children and adolescents: casuistic analysis. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, Recife, 4 (3): 309-315, jul. / set., 2004

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.

Gasco, M.; Crook, T. The p53 network in head and neck cancer. *Oral oncol*, 39: 221-

30. 2003.

Gerdes, J.; Schlueter, C.L.L.; Duchrow, M.; Wohlenberg, C.; Gerlach, C.; Stahmer, I.; Kloth, S.; Brandt, E.; Flad, H. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 238:867-73.

Ghosh, S.; Shand, A.; Ferguson, A. Ulcerative colitis. *BMJ* 2000;320:1119-23.

Góes, J.R.N.; Fagundes, J.J.; Costa, A.M.; Peres, M.A.O.; Medeiros, R.R.; Leonardi, L.S. Colectomia, proctomucosectomia, reservatório ileal em tripla alça e anastomose íleo-anal. *Rev Col Bras Cir* 1986;13:173.

Góes, J.R.N., Fagundes, J.J.; Coy, C.S.R.; Amaral, C.A.R.; Peres, M.A.O.; Medeiros, R.R. The Two-Chamber Ileal Pelvic Reservoir – An Alternative Design. *Dis Colon Rectum* 1993;36:403-404.

Góes, J.R.N.; Beart, R.W. Physiology of Ileal Pouch-Anal Anastomosis. *Current Concepts. Dis Colon Rectum* 1995;38:996-1005.

Gorfine, S.R.; Bauer, J.J.; Harris, M.T.; Kreel, I. Displasia complicating chronic ulcerative colitis: is immediate colectomy warranted? *Dis. Colon Rectum, Philadelphia* v. 43, n. 11, p. 1575-1581, 2000.

Gupta, R. B. Harpaz, N., Itzkowitz, S. Hossain, S., Matula, S., Kornbluth, A., Bodian, C., Ullman, T. Histologic Inflammation Is a Risk Factor for Progression to Colorectal Neoplasia in Ulcerative Colitis: A Cohort Study *GASTROENTEROLOGY*. 133:1099–1105, 2007

Hamilton, P.W.; Allen, D.C. Morphometry in Histopathology. *J. Pathol.* v. 175, p. 369-379, 1995.

Hamilton, P.W. Interactive computer-aided morphometry. In: *Quantitative Clinical*

Pathology. Peter W. Hamilton & Derek C. Allen (Ed.), Blackwell-Science, USA, p. 342, 1997.

Habr- Gama, A. & Teixeira, M.G. Tratamento cirúrgico da retocolite ulcerativa / proctocolectomia restauradora com bolsa ileal. Em Habr-Gama A., Doença Inflamatória Intestinal, Livraria Atheneu Editora, 2001;133-147.

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

Hofseth, L.J.; Hussain, S.P.; Harris, C.C. p53 : 25 years after its discovery. Trends in Pharm Sci; 25: 177-81,2004.

Hussain, S. P., Amstad, P., Raja, K., Ambs, S., Nagashima, M., Bennett, W.P., Shields, P. G., Ham, A.J., Swenberg, J. A., Marrogi, A. J., Harris C. C., Increased p53 Mutation Load in Noncancerous Colon Tissue from Ulcerative Colitis: A Cancer-prone Chronic Inflammatory Disease. CANCER RESEARCH 60, 3333–3337, 2000

Ilnyckyj, A. Surgical treatment of inflammatory bowel diseases and pregnancy Best Practice & Research Clinical Gastroenterology Vol. 21, No. 5, pp. 819–834, 2007.

Inoue, D.P.; Amar, A.; Cervantes, O. Marcadores tumorais no câncer da laringe revista brasileira de cirurgia de cabeça e pescoço - vol. 34 / nº 1 / jan./fev./mar./abr. 2005.

Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol;287:G7–G17 2004.

Janssen, A.; Schiffmann, S.; Birod, K.; Maier, B.T., Wobst, I.; Geisslinger, G.; Großsch, S. p53 is important for the anti-proliferative effect of ibuprofen in colon carcinoma cells Biochemical and Biophysical Research Communications 365 (2008) 698–703.

Jarnerot, G.; Hertervig, E.; Friis-Liby, I. Infliximab as rescue therapy in severe to

moderately severe ulcerative colitis: a randomized, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 2005;128:1805–1811.

Kandice, L.K. Inflammatory bowel disease. *Clinical Cornerstone*, Belle Mead, v. 4 n. 4, p. 49-57, 2002.

Key, G.; Petersen, J.L.; Becker, M.H.G.; Duchrow, M.; Schlüter, C.; Askaa, J.; Gerdes, J. New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin wax sections. *J Clin Pathol* 1993; 46:1080-4.

Lambert, W.C.; Lapidus, A.; Rao, B.K. Melanoma diagnosis by computerized analysis of clinical images. *Arch. Dermatol.* v. 137, n. 3, p. 377, 2001.

Lamers CB. Treatment of extraintestinal complications of ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9: 850-853.

Lane, D.P. Cancer: p53, guardian of genome. *Nature* 1992; 558:15-16.

Lane DP, Crawford LV. T-antigen is bound to host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-263.

Lanna, C.C.D.; Ferrari, M.L.A.; Carvalho, M.A.P.; Cunha, A.S. Manifestações Articulares em Pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 46, supl.1, p. 45-51, 2006.

Lashner B. A., Bauer W. M, Rybicki L. A., Goldblum J. R. Abnormal p53 Immunohistochemistry Is Associated With an Increased Colorectal Cancer–Related Mortality in Patients With Ulcerative Colitis *The American Journal of Gastroenterology* Vol. 98, No. 6, 2003

Lazzaro B, Cleveland D. p53 and Ki-67 antigen expression in small oral biopsy specimens of salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 89:613-7.

Leal, R.F.; Coy, C.S.R.; Velloso, L.A.; Ayrizono, M.L.S.; Fagundes, J.J.; Marciane, A.; Góes, J.R.N. Atividade Inflamatória em Mucosa de Reservatório Ileal na Polipose Adenomatosa Familiar e Retocolite Ulcerativa Inespecífica de TNF- α , NF- κ B e IL-1 β . *Rev bras Coloproct*, 2006;26(4): 399-405.

Lee, C.M.; Lee, R.J.; Hammond, E. 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.

Lillehei, C.W. Ileal pouch–anal anastomosis for ulcerative colitis: Technical considerations *Seminars in Pediatric Surgery*, Volume 16, Issue 3, August 2007, Pages194-199.

Louro ID, Llerena JC, Mello MS, Prolla P, Froes N. *Genética Molecular do Câncer*. 2nd ed. São Paulo: MSG, 2002. p.63-90.

Mattos, L.L.; Machado, L.N.; Sugiyama, M.M.; Bozzetti, R.M.; Pinhal, M.A.S. Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. *Arq méd ABC*. 2005;30(1):19-25.

Marakhouski Y., Hargun J., Marakhouski K. Epidemiology, clinical presentation and outcome in ulcerative colitis: observation from urban population during 10 years period. *Journal of Crohn's and Colitis Supplements*, Volume 1, Issue 1, March 2007, Page17

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

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 Bras Patol Med Lab. v. 42, n. 6, p. 455-460, 2006.

Melo-Junior M.R., Cavalcanti C.L.B., Pontes-Filho N.T., Carvalho Jr L.B., Beltrão E. I. B. Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to helicobacter pylori Brazilian Journal of Microbiology (2008) 39:238-240

Michelassi, F.; Lee, J.; Rubin, M. Long-term functional results after ileal pouch anal restorative proctocolectomy for ulcerative colitis: A prospective observational study. Ann Surg 2003;238:433–441.

Mills, A.A. p53: links to the past, bridge to the future. Genes Dev 2005;19:2091–9.

Montironi, R. et al. Nuclear changes in the normal-looking columnar epithelium adjacent to and distant from prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. Morphometric analysis in whole-mount sections. Virchows Archives. v. 437, n. 6, p. 625-34, 2000.

Morris S. M., Akerman G. S., Desai V. G., Tsai C., Tolleson W. H., Melchior Jr. W. B., Lin C. J., Fuscoe J. C., Casciano D. A., Chenf J. J. Effect of p53 genotype on gene expression profiles in murine liver. Mutation Research 640 (2008) 54–73

Muskhelishvili L, Latendresse J. R., Kodell R. L., Henderson E. B. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. Juornal Histochemistry Cytochemistry 2003; 51: 1681-1688.

Nicholls, R.J.; Moskovitz, R.L.; Shepard, N.A. Restorative proctocolectomy with ileal reservoir. Br J Surg 1985;72:76-79.

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.

Orholm, M.; Binder, V.; Sorensen, T.I.; Rasmussen, L.P.; Kyvik, K.O. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1075–81.

ÖZER E, SARIOGLU S & GÜRE A. Effects of prenatal ethanol exposure on neuronal migration, neurogenesis and brain myelination in the mice brain. *Clin. Neuropathol.* 19(1): 21–25, 2000.

Pacheco, F.A.; Paschoal, M.E.M.; Carvalho, M.G.C. Marcadores tumorais no câncer de pulmão: um caminho para uma terapia biológica. *J Pneumol.* 2002;28(3):143-49.

Park, S.E.; Min, Y.K.; Ha, J.D.; Kim, B.T.; Lee, W.G. Novel small molecule induces p53-dependent apoptosis in human colon cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358 (2007) 842–847

Parks. A.G.; Nicholls, R.J. Proctocolectomy without ileostomy for ulcerative colitis. *Br Med J* 1978;2:85-7.

Pau Ni I. B., Lim P., Balraj P., Hang E. S U., Zakaria Z. Quantitative analysis of the expression of p53 gene in colorectal carcinoma by using real-time PCR. *Tropical Biomedicine* 23(1): 53–59 (2006)

Peterson, I.; Wolf, G.; Roth, K.; Schlüns, K. Telepathology by the internet. *J. Pathol.* v. 191, n. 1, p. 8-14, 2000.

Plevy, S.; Salzberg, B.; Van Assche, G.; Regueiro, M.; Hommes, D.; Sandborn, W.; Hanauer, S.; Targan, S.; Mayer, L.; Mahadevan, U.; Frankel, M.; Lowder, J.; A Phase I Study of Visilizumab, a Humanized Anti-CD3 Monoclonal Antibody, in Severe Steroid-Refractory Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 2007;133:1414–1422.

Pradal, M.; Menezes, A.M.; Di Dio, R. Marcadores tumorais. *LAES & HAES.* v. 30, p.

146-182, 2004.

Provenzale D, Onken J. Surveillance issues in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2001;32:99–105.

Rashbass, J. The impact of information technology on histopathology. *Histopathology*. v. 36, n. 1, p. 1-7, 2000.

Reis, F.J.C. Rastreamento e diagnóstico das neoplasias de ovário: papel dos marcadores tumorais. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;27(4):222-27.

Riddell R.H., Goldman H., Ransohoff D.F. Dysplasia in inflammatory bowel disease: Standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* 1983;14:931–68.

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.

Roessner A., Kuester D., Malfertheiner P., Schneider-Stock R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis *Pathology – Research and Practice* 204 (2008) 511–524

Rosa, G.D.; Barcellos, G.B.; Carvalhal, G.F.; Dornelles Neto, E.J. Marcadores tumorais em urologia. *Acta Médica (Porto Alegre)*. 2005;26:155-65.

Rose, S. Inflammatory bowel disease. In: (Ed). *Gastrointestinal and hepatobiliary pathophysiology*. Madison Conn: Fence Creek Publishing, 1998. p. 245-257.

Rothenberg, S.S. Laparoscopic segmental intestinal resection. *Semin Pediatr Surg* 2002; 11 (4): 211 -6.

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.

Rubin D. T., Rothe J. A., Hetzel J. T., Cohen R. D., Hanauer S. B. Are dysplasia and colorectal cancer endoscopically visible in patients with ulcerative colitis? *Gastrointestinal Endoscopy*, Volume 65, Issue 7, June 2007, Pages 998-1004

Rutter M, Saunders B, Wilkinson K. , et al. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*;126:451–459, 2004.

Sato, A., Machinami, R. p53 immunohistochemistry of ulcerative colitis-associated with dysplasia and carcinoma. *Pathology international*, 49;10 858-868,1999

Shibata, C.; Funayama, Y.; Fukushima, K.; Takahashi, K.; Saijo, F.; Nagao, M.; Haneda, S.; Watanabe, K.; Kudoh, K.; Kohyama, A.; Sasaki, I. Factors Affecting the Bowel Function after Proctocolectomy and Ileal J Pouch–Anal Anastomosis for Ulcerative Colitis *Journal of Gastrointestinal Surgery* Vol. 10, No. 7 2006.

Shimada Y., Iamamura M., Wantanabe G., Uchida S. Prognostic factors of esophageal squamous cell from the perspective of molecular biology. *Brazilian Journal of Cancer* 1999; 80(8): 1281-1288.

Silva-Filho, A.L.; Bruno, B.N.; Silva, L.B.; Traiman, P.; Silva, J.G.C.; Triginelli, S.A. Association between p53 and Ki-67 expression and clinicopathologic features in patients with carcinoma of the cervix. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005; 27(5): 243-7

Silveira, A.S. Câncer ginecológico: Diagnóstico e tratamento. In: Gil RA. Fatores prognósticos, preditivos e marcadores tumorais no câncer ginecológico. Florianópolis: UFSC; 2005:135-52.

Soussi T., Wiman K. G. Shaping Genetic Alterations in Human Cancer: The p53 Mutation Paradigm *Cancer Cell* 12, October 2007

Stenson, W. Inflammatory bowel disease. In: YAMADA et al. (Ed.). *Textbook of*

gastroenterology. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1995. v. 1, p. 1754-1757.

Strauchem, J.A. Further called for "Teleconsultation". Am. J. Clin. Pathol. v. 113, n. 4, p. 595, 2000.

Sutherland, L.; Roth, D.; Beck, P.; Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. (Cochrane Review). The Cochrane Library, Issue 1, 2002. Oxford: Update Software.

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

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

Tsianos, E.V. Risk of câncer in inflammatory bowel disease (IBD). European Journal of Internal Medicine, Amsterdam, v. 11, p. 75-78, 2000.

Turina, M.; Pennington, C.J.; Kimberling, J., Stromberg, A.J., Petras, R.E.; Galandiuk, S. Chronic Pouchitis After Ileal Pouch–Anal Anastomosis for Ulcerative Colitis: Effect on Quality of Life Journal of Gastrointestinal Surgery Vol. 10, No. 4 2006.

Utsunomiya, J.; Iwama, T.; Imajo, M.; Matsuo, S.; Sawai, S.; Yaegashi, K.; Total colectomy, mucosal proctectomy, and ileoanal anastomosis. Dis Colon Rectum 1980;23(7): 459-466.

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.

Watson, A.J.; Johnston, A.T.; Barker, P.M.; Youngson, G.G.; Bisset, W.M.; Mahomed, A.A. The presentation and management of juvenile-onset chronic inflammatory bowel disease in Northeastern Scotland. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 83-86.

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

Wong, N.A.C.S., Mayer N.J., MacKell S., Gilmour, H. M., Harrison D.J.

Immunohistochemical assessment of Ki67 and p53 expression assists the diagnosis 2000 and grading of ulcerative colitis-related dysplasia *Histopathology*. 37, 108±114, 2000.

Zhang W., Rashid A., Wu H., Xu X. C. Differential expression of retonic acid receptors and p53 protein in mormal, premalignant, and malignat esophageal tissues. *Juornal Cancer Resarsh Clinical Oncology* 2001; 127: 237-242.

Zaltman, C. Inflammatory bowel disease: how relevant for Brazil?. *Cadernos de Saúde Pública*, 2007, vol.23, n. 5, ISSN 0102-311X.

Zivkovic v., katic V., Nagorni A., Gligorijevc J. Benedeto-Stojanov D., Bjelakovic G., Petrovic A., Anđelkovic Z., Grozdanovic V. Histopathological and imunohistochemical features of dysplasia-associated lesions or masses in ulcerative colitis. *Arch Oncol* 2004;12

ANEXOS

Trabalhos desenvolvidos durante o mestrado

MELO JUNIOR, M R ; FIGUEIREDO, J. L. ; ARAUJO FILHO, J. L. S. ; MACHADO, Marcos Cezar Feitosa de Paula ; BRANDT, C. T. ; Pontes-Filho N. T. . Portal hypertension in mansonic schistosomiasis: repercussions of surgical treatment on the histomorphometric profile of the gastric mucosa.. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42, p. 71-75, 2007

MELO JUNIOR, M R ; ARAUJO FILHO, J. L. S. ; MACHADO, Marcos Cezar Feitosa de Paula ; PATU, V. J. R. M. . Análise digital de imagens em patologia a interface com a engenharia biomédica. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, v. 22, p. 203-206.

Cardoso-silva, C.D ; MELO JUNIOR, M R ; PATU, V. J. R. M. ; ARAUJO FILHO, J. L. S. ; MACHADO, Marcos Cezar Feitosa de Paula ; Pontes-Filho N. T. . A exposição crônica ao álcool e a desnutrição interferem no desenvolvimento do fígado durante o período perinatal?. Revista Brasileira de Nutrição Clínica, v. 22, p. 220-225, 2007.

MELO JUNIOR, M R ; ARAUJO FILHO, J. L. S. ; PATU, V. J. R. M. ; MACHADO, Marcos Cezar Feitosa de Paula ; Pontes-Filho N. T. . Integrando o ensino da patologia às novas competências educacionais. Ciências & Cognição (UFRJ), v. 12, p. 112-116, 2007.

ARAUJO FILHO, J. L. S. ; MELO JÚNIOR, Mario Ribeiro de ; MACHADO, Marcos Cezar Feitosa de Paula ; PATU, V. J. R. M. ; Pontes-Filho N. T. . Análise histomorfométrica do coração de ratos expostos indiretamente ao etanol e à desnutrição crônica. Revista de Ciências Médicas e Biológicas, v. v6, p. 17-25, 2007.

ARAUJO FILHO, J. L. S. ; MELO JUNIOR, M R ; LINS, C. A. B. ; LINS, R. A. B. ; MACHADO, Marcos Cezar Feitosa de Paula ; CARVALHO JÚNIOR, Luiz Bezerra de ; Pontes-Filho N. T. . Galectina-3 em tumores de próstata: imunohistoquímica e análise digital de imagens.. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 42, p. 469-475, 2006.

MELO JUNIOR, M R ; ARAUJO FILHO, J. L. S. ; PATU, V. J. R. M. ; MACHADO, Marcos Cezar Feitosa de Paula ; MELLO, L. A. ; CARVALHO JÚNIOR, Luiz Bezerra de . Langerhans cells in Cutaneous Tumours: Immunohistochemistry study using a Computer Image Analysis System.. Journal of Molecular Histology, v. 37, p. 321-325, 2006.

MELO JUNIOR, M R ; ARAUJO FILHO, J. L. S. ; PATU, V. J. R. M. ; MACHADO, Marcos Cezar Feitosa de Paula ; BELTRAO, E. I. C. ; CARVALHO JÚNIOR, Luiz Bezerra de . Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry.. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 42, p. 455-460, 2006.

MELO JUNIOR, M R ; MACHADO, Marcos Cezar Feitosa de Paula ; ARAUJO FILHO, J. L. S. ; PATU, V. J. R. M. ; BELTRAO, E. I. C. ; Pontes-Filho N. T. . 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, Marcos Cezar Feitosa de Paula ; 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.

Trabalhos apresentados em congressos

MACHADO, Marcos Cezar Feitosa de Paula ; MELO JÚNIOR, Mario Ribeiro de ; LINS, C. A. B. ; TELLES, A. M. S. ; ALBUQUERQUE, F. E. . Análise Digital da Imunoexpressão das Proteínas KI67 e P53 em Pacientes com Colite Ulcerativa. In: XXIV Congresso da Regional Norte Nordeste de Coloproctologia, 2007. Anais do XXIV Congresso da Regional Norte Nordeste de Coloproctologia, 2007

MACHADO, Marcos Cezar Feitosa de Paula ; MELO JÚNIOR, Mario Ribeiro de ; ARAUJO FILHO, J. L. S. ; PATU, V. J. R. M. ; TELLES, A. M. S. . Análise digital de micronúcleos e colágeno intersticial associado a lesões tumorais de mama.. In: II Jornada Científica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, 2007, Recife. Anais II Jornada Científica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, 2007

PATU, V. J. R. M. ; ARAUJO FILHO, J. L. S. ; MACHADO, Marcos Cezar Feitosa de Paula ; MELO JUNIOR, M R . Avaliação histomorfométrica de micronúcleos e colágeno associado a neoplasias de pele.. In: II Jornada Científica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, 2007, Recife. Anais da II Jornada científica do LIKA-UFPE, 2007

MELLO, L. A. ; ARAUJO FILHO, J. L. S. ; PATU, V. J. R. M. ; MACHADO, Marcos Cezar Feitosa de Paula ; CARVALHO JÚNIOR, Luiz Bezerra de . Polysiloxane-polyvinyl alcohol discs as support for antibody immobilization: ultra-structural and physical-chemical characterization.. In: II Jornada científica do LIKA-UFPE, 2007. Anais da II Jornada científica do LIKA-UFPE, 2007.

BERTAO, H. G. ; MELO JUNIOR, M R ; MACHADO, Marcos Cezar Feitosa de Paula ; ARAUJO FILHO, J. L. S. . . Estudo retrospectivo da incidência de meningite meningocócica no estado de pernambuco no período 2001 a 2003. In: X Congresso Brasileiro de Biomedicina, 2006, 2006, Goânia. Anais do X Congresso Brasileiro de Biomedicina, 2006, 2006