

**CARMEN AUSTRÁLIA PAREDES MARCONDES RIBAS**

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA E QUANTIFICAÇÃO EM  
PORCENTAGEM DA GALECTINA- 1 NO ESÔFAGO DE  
BARRETT SEM DISPLASIA, ATRAVÉS DE SISTEMA  
INFORMATIZADO DE ANÁLISE DE IMAGEM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

Co-orientador: Prof. Dr. Vinicius Milani Budel

**CURITIBA  
2000**

Ribas, Carmen Austrália Paredes Marcondes

Avaliação da presença e quantificação em porcentagem da galectina-1 no esôfago de Barrett sem displasia, através de sistema informatizado de análise de imagem. – Carmen Austrália Paredes Marcondes Ribas. Curitiba, 2000.

xiii 76p., 28cm.

Dissertação – (Mestrado em Medicina Interna) – Departamento de Clínica Médica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientador : Prof. Dr. Osvaldo Malafaia. Co-orientador : Prof. Dr. Vinicius Milani Budel

1. Esôfago de Barrett – imuno-histoquímica 2. Galectina-1. 3. Esôfago – Câncer. 4. Análise de imagem – sistema informatizado I. Título.



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Paraná  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA  
DOUTORADO

---

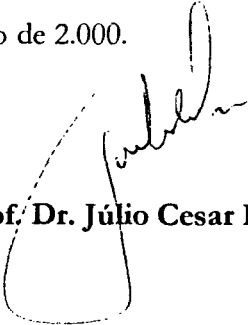
## PARECER


**PARECER CONJUNTO** dos Professores **Dr. Joaquim Prado P. de Moraes**, **Dr. Júlio Cesar Pisani**, e **Dr. Osvaldo Malafaia** sobre a Dissertação de Mestrado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborada por **Carmen Austrália Paredes Marcondes Ribas**, intitulada: **“AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA GALECTINA-1 NO ESÔFAGO DE BARRETT, SEM DISPLASIA, ATRAVÉS DE SISTEMA INFORMATIZADO DE ANÁLISE DE IMAGEM (SAMBA 4000) “**

A Banca Examinadora considerou que **Carmen Austrália Paredes Marcondes Ribas** apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe: Conceito **“A”**, correspondente ao Grau **“10”**, sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **MESTRA EM MEDICINA** e a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 03 de outubro de 2.000.

  
Prof. Dr. Joaquim Prado P. de Moraes

  
Prof. Dr. Júlio Cesar Pisani

  
Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

Custa tanto ser uma pessoa plena, que muito pouco são aquelas que tem a luz ou a coragem de pagar o preço...  
É preciso abandonar por completo a busca da segurança e correr o risco de viver com os dois braços.  
É preciso aceitar a dor como condição de existência.  
É preciso cortejar a dúvida e a escuridão como preço do conhecimento.  
É preciso ter uma vontade obstinada no conflito, mas também uma capacidade de aceitação total de cada consequência do viver e do morrer

Morris West

Ao meu marido Jurandir, pela amizade e amor sempre presentes, possibilitando a compreensão da luta diária e a transformação de nossos ideais em realizações. Pelas suas atitudes corajosas e perseverantes, que me esclarecem o complexo e o controverso .

A minha filha Fernanda e meu filho Gustavo por compartilharem e fazerem parte de sonhos realizados. Encanto e sinceridade que me ensinam que a vida não pode ser despojada da feliz consciência da harmonia, compreensão e dedicação.

A minha mãe, pelo carinho, proteção e incentivo imprescindíveis, sólido elo da nossa união.

Ao meu pai, saudade constante, cuja confiança em mim depositada perpetuarei como base do meu trabalho.

A minha família pela compreensão e lealdade mesmo quando deliberadamente nos distanciamos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. OSVALDO MALAFAIA, pela orientação que recebi neste e em muitos outros momentos da minha vida pessoal e profissional. Pelo exemplo de atenção e seriedade com a ciência, passando da verdade filosófica para a verdade dos empreendimentos. Ensinando não por glória ou por lucro, mas pela atitude encorajadora do despertar da consciência acadêmica .

Ao Prof. Dr VINÍCIUS MILANI BUDEL, pela sua generosa participação neste estudo mostrando-me a universalidade do livre pensamento. Com argumentos de inestimáveis benefícios, decorrentes de sua bondade de caráter e moral. Orientando-me a transpor os obstáculos que se interpõem no caminho da busca do saber, aceitando com a mesma seriedade as críticas e os elogios.

Ao Prof. Dr. ROBERT KISS, cientista devotado a pesquisa, pela oportunidade de me permitir vivenciar o futuro em um laboratório de excelência científica passo crucial na aquisição da perspectiva dos conhecimentos que obtive, o meu profundo respeito e admiração.

Ao Prof. Dr LINEU WERNEK, coordenador do Programa de Pós Graduação em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, pela consideração com que me recebeu e por me proporcionar essa oportunidade tão importante na minha carreira acadêmica e profissional.

Ao Prof. Dr SÉRGIO IOSHI, pela inestimável ajuda no controle da

temática histológica utilizada nesta dissertação de forma clara e imprescindível.

Ao Prof. Dr. NICOLAU GREGORI CZECZKO que com sua vivência acadêmica me permitiu o descobrimento de novos propósitos e o esclarecimento essencial para o desenvolvimento da pesquisa.

A YVES BRONCKART, jovem pesquisador, pelo gentil e eficiente auxílio em todos os momentos na realização deste estudo, tanto no Departamento de Histologia da Universidade Livre de Bruxelas como também pela oportunidade do trabalho de cooperação realizado no IPEM.

Ao Prof. Dr. JÚLIO CÉSAR PISANI pela pronta colaboração na realização das biópsias necessárias para a complementação desta dissertação.

Ao IPEM (INSTITUTO DE PESQUISAS MÉDICAS) que me ofereceu todo o suporte necessário para a realização deste trabalho.

A bibliotecária DULCE MARIA BASTOS, não somente pela sua competente colaboração no exercício do desenvolvimento deste estudo, mas principalmente pela dedicação em fazer bem feito pelo prazer em fazer.

A Dra LÚCIA HELENA TONON, amiga de todas as horas, pelo otimismo, incentivo e colaboração que recebi de maneira singular.

A Prof. Dra. TEREZA CRISTINA CAVALCANTI, pela possibilidade de colaboração técnica e principalmente pelo seu desprendimento, educação e dedicação que tive oportunidade de conhecer.

Aos amigos do IPEM pelo tempo, esforço e trabalho que compartilhamos, estímulos poderosos para o nosso amadurecimento

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	5
2.1 ASPECTOS CONCEITUAIS .....	5
2.1.1 CITOFOTOMETRIA .....	5
2.1.2 PROTEÍNAS LIGANTES A CARBOIDRATOS .....	7
2.2 ENSAIOS CLÍNICOS E EXPERIMENTAIS DAS GALACTINAS .....	14
2.2.1 ENSAIOS CLÍNICOS .....	14
2.2.2 ENSAIOS EXPERIMENTAIS .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	35
3.1 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DE CASOS .....	35
3.2 PREPARO DAS LÂMINAS PARA ANÁLISE.....	36
3.3 COLORAÇÃO GLICOIMUNOHISTOQUÍMICA.....	36
3.4 ORGANIZAÇÃO FUNCIONAL DO SISTEMA SAMBA 4000 .....	38
3.4.1 Equipamentos componentes ( <i>hardware</i> ) .....	38
3.4.1.1 Microscópio .....	39
3.4.1.2 Câmera de vídeo.....	39
3.4.1.3 Computador.....	40
3.4.1.4 Impressora.....	40
3.4.2 Programa computacional ( <i>software</i> ) .....	40

3.4.2.1 Binarização ou segmentação da imagem .....	40
3.4.2.2 Numerização da imagem.....	41
3.4.2.3 Procedimento de leitura .....	41
3.5 PARÂMETROS ANALISADOS PELO SISTEMA SAMBA.....	44
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS UNIVARIADAS.....	45
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
4.1 NÍVEL DA EXPRESSÃO DO MARCADOR EM RELAÇÃO AO ÍNDICE DE MARCAGEM (LI) NO ESÔFAGO DE BARRETT .....	48
4.2 NÍVEL DE EXPRESSÃO DO MARCADOR EM RELAÇÃO A DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA (MOD) NO ESÔFAGO DE BARRETT .....	51
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
5.1 DO ESÔFAGO DE BARRETT.....	54
5.2 DA ESCOLHA DA CITOFOTOMETRIA .....	54
5.3 DO MATERIAL DE ESTUDO .....	55
5.4 DA COLORAÇÃO GLICOIMUNOHISTOQUÍMICA.....	56
5.5 DO PROCESSO PARA ANÁLISE CITOFOTOMÉTRICA .....	57
5.6 DOS PARÂMETROS ANALISADOS PELO SISTEMA SAMBA 4000.....	58
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

1 ÍNDICE DE MARCAGEM DO GRUPO 1.....	48
2 ÍNDICE DE MARCAGEM DO GRUPO 2.....	49
3 ÍNDICE DE MARCAGEM DO GRUPO 3.....	50
4 DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA DO GRUPO 1.....	51
5 DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA DO GRUPO 2.....	52
6 DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA DO GRUPO 3.....	53

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1 TRÊS TIPOS ESTRUTURAIS DA GALECTINA .....	9
2 ILUSTRAÇÃO MORFOLÓGICA DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DA GALECTINA 1 NO EPITÉLIO DE REVESTIMENTO (X 200) .....	37
3 ILUSTRAÇÃO MORFOLÓGICA DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DA GALECTINA 1 NO EPITÉLIO GLANDULAR (X 200).....	37
4 ILUSTRAÇÃO MORFOLÓGICA DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DA GALECTINA 1 NO TECIDO CONJUNTIVO (X 200).....	38
5 SISTEMA SAMBA 4000 .....	39
6 IMAGEM BINÁRIA .....	41
7 SEGMENTAÇÃO DA SUPERFÍCIE A SER ANALISADA .....	42
8 SELEÇÃO DA ÁREA A SER QUANTIFICADA .....	43
9 IDENTIFICAÇÃO DA ESTRUTURA PELO SISTEMA IMMUNO (SAMBA 4000) .....	43
10 IMAGEM DA ESTRUTURA QUE FOI RECONHECIDA E ANALISADA QUANTITATIVAMENTE.....	44
11 IMMUNO MARCAGEM POR SUPERFÍCIE .....	47

## RESUMO

Atualmente considera-se esôfago ou epitélio de Barrett a condição pela qual o epitélio escamoso do esôfago é substituído pelo epitélio colunar especializado, o qual se caracteriza pela presença de células caliciformes tanto no epitélio de revestimento como no epitélio glandular. O esôfago de Barrett é o único fator de risco bem documentado para o desenvolvimento de adenocarcinoma do esôfago distal, o que explica a ênfase dada a essa condição pré-maligna. Existe considerável grau de subjetividade e discordância interobservadora e intraobservadora neste diagnóstico. O progresso no conhecimento da biologia molecular pode permitir o aperfeiçoamento diagnóstico nesta patologia. Com o objetivo de analisar novos parâmetros para complementar o diagnóstico convencional das metaplasias, utilizou-se uma amostra inicial constituída de 86 biópsias endoscópicas de esôfago de Barrett, as quais foram reavaliadas independentemente por dois patologistas pelos critérios que caracterizam o esôfago de Barrett sem displasia. Após a confirmação dos laudos a amostra final foi de 60 blocos de parafina contendo esôfago de Barrett, com ausência de displasia. O restante excluído não apresentava material suficiente para a realização de novos cortes histológicos, apresentavam os tecidos sobrepostos na lâmina em estudo ou material inadequadamente conservado.. Realizou-se a técnica de coloração imunohistoquímica utilizando-se o anticorpo primário policlonal de coelho-IgG anti galectina-1 e anticorpo secundário biotilado policlonal anti IgG de coelho. O padrão de expressão da galectina 1 foi avaliado imunohistoquimicamente nas diferentes estruturas deste epitélio. A quantificação da coloração foi realizada através da citometria de imagem, pelo sistema informatizado de análise SAMBA 4000. Foram computadorizadas três variáveis: índice de marcagem, densidade óptica média e heterogeneidade da amostra. Os resultados obtidos revelaram positividade de expressão do marcador utilizado nas seguintes estruturas analisadas: epitélio de revestimento, epitélio glandular e tecido conjuntivo. A diferença da média do índice de marcagem do epitélio de revestimento e tecido epitelial glandular teve um valor extremamente significativo ( $p = 0.0004$ ), o mesmo ocorrendo quando avaliava-se a diferença do índice de marcagem entre tecido epitelial glandular e tecido conjuntivo ( $p = 0.0001$ ). Em relação à diferença de densidade óptica média entre tecido epitelial glandular e tecido conjuntivo foi considerada significativa ( $p = 0.0001$ ) como também foi significativa esta diferença entre tecido epitelial de revestimento e tecido conjuntivo. Concluiu-se que o sistema SAMBA 4000 permite a análise quantitativa do marcador de maneira subjetiva, as quais passam a não depender unicamente da apreciação do investigador, este método pode ser utilizado em rotinas laboratoriais como técnica auxiliar no diagnóstico do esôfago de Barrett sem displasia.

## ABSTRACT

Nowadays, Barrett's oesophagus or epithelium is considered to be the condition in which stratified squamous epithelium is replaced by specialised columnar epithelium. Barrett's oesophagus is the only well-documented risk factor in the development of Barrett's adenocarcinoma, which explains the emphasis given to this pre-malignant condition. Diagnosis involves a high level of both inter-observer and intra-observer subjectivity and discordance. The progress in Molecular Biology knowledge may allow both diagnostic and therapeutic perfection of this pathology. With the objective of analysing new parameters to complement the conventional diagnosis of metaplasias, a sample made up of 60 paraffin blocks containing dysplasia-absent Barrett's epithelium, was used. The expression standard Galectina 1 was examined immunohistochemically in the different structures of the epithelium. The staining quantification was carried out by image cytophotometry, using the computerised analysis system SAMBA 4000. Three variables were computed: labelling index, mean optical density and sample heterogeneity. The results obtained revealed positiveness of expression of the marker used in all the analysed structures. The difference in the labelling index averages of the covering epithelium and the glandular epithelial tissue was of an extremely significant value ( $p = 0.0004$ ), the same occurring when the difference in the labelling index averages of the glandular epithelial tissue and the conjunctive tissue ( $p = 0.0001$ ) was evaluated. In relation, the difference in the mean optical density of the glandular epithelial tissue and the conjunctive tissue was considered to be significant ( $p = 0.0001$ ) as was the difference between covering epithelial tissue and conjunctive tissue. It was concluded that image cytophotometry is an effective auxiliary diagnostic method for quantifying immunohistochemical markers.

## 1 INTRODUÇÃO

A compreensão da progressão tumoral, como processo evolutivo das fases iniciais de transformação celular até a aquisição do fenótipo invasivo e/ou metastático, permitiu o estabelecimento de uma série de conceitos da moderna biologia celular e molecular, como os dos mecanismos de controle do ciclo celular, morte celular programada (apoptose), mecanismos de manutenção, remodelamento dos tecidos e de colonização seletiva de órgãos à distância.

O argumento freqüentemente utilizado é que a partir da definição dos elementos do processo de modificação, no nível celular e molecular, seja possível determinar que fatores biológicos tenham papel no diagnóstico precoce, definição do prognóstico e orientação do tratamento específico. No entanto, o impacto destes achados na prática clínica ainda hoje é restrito; além do que, o valor dessas variáveis como fatores independentes na determinação de prognóstico e/ou conduta terapêutica precisa ser estabelecido (CHAMMAS,1999).

Os pacientes com esôfago de Barrett, quando comparados com a população em geral, apresentam risco 30 a 40 vezes mais alto de desenvolver câncer. O prognóstico dos que apresentam a doença é sombrio e só será possível modificá-lo tentando o reconhecimento e detecção das lesões que o antecedem (WILLIAMSON, ELLIS e GIBB, 1991).

De acordo com FERRANDO et al. (1998), desde 1984 os trabalhos prospectivos questionam a magnitude deste risco e determinam a necessidade de seguimento endoscópico de todos os pacientes. Discute-se também, ser este um procedimento de alto custo, porém com a possibilidade de detectar o adenocarcinoma precocemente quando a cirurgia ainda pode ser curativa. A biópsia evidenciando displasia continua sendo o padrão ouro como marcador de risco aumentado para a malignidade, embora nem sempre se reconheça esta etapa ou seu tempo de evolução. O desenvolvimento do esôfago de Barrett ocorre em torno de 40% dos pacientes com esofagite de refluxo e tem demonstrado uma distribuição bimodal com um pico entre 0 e 15 anos e outro entre 40 e 80 anos de idade afetando preferencialmente homens brancos. A incidência de neoplasia em um paciente com esôfago de Barrett tem sido estimada de 1 em 46 até 1 em 441 pacientes por ano.

A displasia não poderia ser considerada marcador potencial de malignidade já que mesmo entre patologistas experientes, existe considerável grau de subjetividade e substancial discordância interobservador e intraobservador no diagnóstico e classificação das lesões metaplásicas e displásicas. Considera-se ainda que existe a necessidade de serem encontrados métodos mais acurados e objetivos para sinalizar o risco de transformação para malignidade (GIMÉNEZ et al.,1998).

O adenocarcinoma de esôfago tem aumentado em países desenvolvidos sobretudo nas três últimas décadas, refletindo genuíno aumento em sua lesão precursora o esôfago de Barrett, apesar do avanço nas multimodalidades terapêuticas o prognóstico do adenocarcinoma continua ruim. Os recentes avanços no estudo do esôfago de Barrett, permitem observar que a progressão da metaplasia para adenocarcinoma está associada com alterações que incluem: aneuploidia, deleção cromossômica, instabilidades cromossômicas, produção e resposta inapropriada aos fatores de crescimento e alteração nas moléculas de adesão molecular. Estas alterações ocorreriam em um momento anterior à

invasão. A exploração destes eventos moleculares pode levar a diagnósticos mais precoces e melhor entendimento destas lesões. O processo pelo qual o epitélio escamoso é substituído pela metaplasia intestinal especializada é pouco conhecido, talvez um dos eventos moleculares precoces seja a seleção e propagação dos clones de metaplasia intestinal especializada, subsequente à perda da adesão celular e instabilidade genômica. Uma vez estes elementos definidos será possível determinar fatores biológicos com impacto no diagnóstico precoce e mais especificidade no tratamento (JANKOWSKI et al., 1999).

A glicobiologia teve seu papel reconhecido quando ficou demonstrado que as partes glicânicas dos glicoconjugados não são somente elementos passivos plásticos de estabilização da conformação protéica ou elementos da estrutura de proteção, mas que têm papel ativo e específico nos sinais de reconhecimento celular (LIS e SHARON, 1993; MONSIGNY, 1994).

A glicohistoquímica ocupa lugar de destaque, com a vantagem insubstituível de manter a integração das células dos tecidos e também de revelar suas ligações morfológicas. A descoberta das lectinas abriu um capítulo novo da histoquímica: a glicohistoquímica moderna. Entre as lectinas endógenas, as galectinas, definidas como uma família de proteínas que tem afinidade por  $\beta$ -galactosídeos são as mais estudadas (DANGUY et al., 1998). De acordo com HASSID (1996), a especificidade destas moléculas por seus proteoglicanos e receptores endógenos, aliada a sistemas de visualização informatizados altamente capazes, permitiram aprimorar as análises, razão pela qual se propõe a utilização da glicohistoquímica como ferramenta para caracterizar algumas das propriedades biológicas na metaplasia intestinal do esôfago de Barrett.

A citometria de imagem computadorizada, em cortes de tecidos, tem a vantagem de analisar estruturas preservadas em seu conjunto arquitetônico, permitindo correlação morfológica e seleção das áreas do tecido com padrões histológicos variados na mesma região, para identificação de mudanças pré-malignas ou tumores *in situ* (SUSNIK et al., 1995). O material utilizado pode

ser exame histopatológico de rotina ou material de arquivo. Outra vantagem da análise de imagens é a quantificação das reações histoquímicas, histoenzimáticas e imuno-histoquímicas. A positividade da amostra passa a ser expressa em porcentagem, o que confere maior objetividade ao exame possibilitando assim uma maior sensibilidade a pequenas variações, que algumas vezes podem não serem percebidas ao olho humano.

As alterações moleculares na seqüência evolutiva da metaplasia do epitélio de Barrett para displasia e câncer são na atualidade objeto cada vez maior de pesquisas. Até o momento os marcadores ainda não estão testados em grande escala, e são estudados na tentativa de se determinar uma potencial utilização como auxiliares no aperfeiçoamento diagnóstico dos pacientes em acompanhamento (WEINSTEIN, 1999).

Os objetivos deste estudo foram:

- 1) avaliar a presença de galectina-1 no esôfago de Barrett, sem displasia;
- 2) quantificar a porcentagem de marcação da galectina-1 no epitélio de revestimento, no epitélio glandular e tecido conjuntivo de biópsias endoscópicas do esôfago de Barrett sem displasia, utilizando o Sistema Informatizado de Análise de Imagem (SAMBA 4000);
- 3) avaliar esta metodologia como técnica de quantificação de marcadores imuno-histoquímicos em rotinas de diagnóstico laboratorial no esôfago de Barrett.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS CONCEITUAIS

#### 2.1.1 CITOFOTOMETRIA

A tradicional maneira para avaliar o grau de malignidade de um corte histológico proveniente de uma lesão estava exclusivamente baseado em características qualitativas, associadas com freqüente grau de subjetividade e pouca reprodutibilidade. Novas técnicas baseadas nas análises quantitativas desenvolvidas nas últimas décadas permitiram maior eficiência e objetividade nas análises histopatológicas (SORENSEN, 1995; NAZERAN et al., 1995).

Estudos, principalmente em tecidos animais, têm expandido significativamente na tentativa de se encontrar nova e objetiva maneira de realizar diagnósticos, prognósticos e diferenciação de subtipos em várias neoplasias, através de técnicas glicoimuno-histoquímicas, as quais apresentam alta resolução e sensibilidade (DANGUY et al., 1995).

As mudanças que ocorrem nos componentes das células e tecidos em várias doenças podem ser quantificadas e qualificadas pela morfometria, fornecendo dados úteis ao diagnóstico como também ao prognóstico do curso da doença. Embora os princípios da morfometria sejam conhecidos há séculos, com a evolução da informática e os progressos efetuados no domínio da análise de imagens microscópicas, foi possível desenvolver a automatização da obtenção da

imagem e, paralelamente, aumentar a velocidade desta obtenção (TRUE, 1996; KATEMENTSKY et al., 1997).

A imuno-histoquímica desde a sua introdução no início de 1940 tem se desenvolvido em várias direções e, um dos aperfeiçoamentos de sua utilização, foi a mensuração da quantidade de coloração imuno-histoquímica das células, conhecida como imunoquantificação pela análise de imagem (BRANDTZAEG, 1998).

Entre as técnicas modernas que permitem direcionar a conduta diagnóstica, prognóstica ou terapêutica nas várias especialidades da medicina, a citometria por imagem tem obtido ampla aceitação. O termo análise de imagem é o processo reservado a uma disciplina da patologia que tem por objetivo obter informações de maneira objetiva e reprodutível, através de medidas e contagens (MEIJER et al., 1997).

A análise informatizada de imagens citológicas ou histológicas permite a descrição quantitativa de diversos marcadores protéicos, glicoproteicos ou glicohistoquímicos. Neste tipo de análise simultaneamente obtém-se a informação microscópica e matemática, as imagens analógicas observadas na microscopia são transformadas em imagens numéricas e assim é possível o tratamento estatístico dos dados (HASSID, 1996). As principais etapas da análise consistem: 1) na aquisição da imagem dos objetos analisados, através da captura e armazenamento; 2) na determinação dos parâmetros fotométricos de fundo, pela obtenção de um contraste máximo da imagem a ser considerada eliminando os artefatos; 3) na segmentação da imagem, a qual permite a obtenção das medidas relacionadas ao reconhecimento do objeto a ser analisado; 4) na descrição numérica da imagem (OBERHOLZER et al., 1996).

No início dos anos 80, foram desenvolvidas novas técnicas computadorizadas e de captação de imagens através de câmeras, permitindo o

abandono das metodologias analógicas em benefício da captação e armazenamento numérico da imagem. O conversor é um *chip*, o qual produz um valor numérico entre 0 e 255, sendo que o valor 0 corresponde ao preto e 255 ao branco. A gradação entre estes valores é representada por tons de cinza que será convertida em imagem numérica. O olho humano é capaz de diferenciar apenas 64 diferentes tons de cinza, muito diferente dos 256 obtidos pela fotocitometria.

Inovações tecnológicas na década de 1990 permitiram o desenvolvimento da citometria por *scanner*, apresentando uma série de benefícios, incluindo a relocalização da célula para visualização e outros aspectos adicionais de mensuração. Nesta década, também, os microscópios tornaram-se mais viáveis e programas desenvolvidos permitiram facilitar as medidas da área da célula e componentes dos tecidos (MEIJER et al., 1997).

### 2.1.2 LECTINAS

A maioria das proteínas expostas na superfície celular, da membrana plasmática de todas as células eucarióticas, contém cadeias de oligossacarídeos que lhe são covalentemente ligados. Essa cobertura de carboidratos ajuda a proteger a superfície celular de lesões mecânicas e químicas e algumas das cadeias de oligossacarídeos são reconhecidas por proteínas de superfície celular ligantes de carboidratos, as lectinas (ALBERTS et al., 1997).

O estudo das lectinas das plantas iniciou-se com Hermann STILLMARK'S, em 1888, porém a galectina-1 foi a primeira galectina de mamífero descoberta em 1975, por TEICHBERT. Por mais de 20 anos suas funções permaneceram obscuras (COOPER, 1997).

As lectinas de plantas e invertebrados são comumente aceitas como instrumentos glicohistoquímicos para a análise de estruturas normais e alteradas de glicosaminoglicanos em histologia e patologia. As lectinas dos mamíferos e

neoglicoproteínas são acréscimos recentes a este painel para identificação de epítopes de carboidratos (BRINCK et al., 1998).

As lectinas e integrinas são classificadas esquematicamente como moléculas de adesão, sendo que as lectinas são divididas em cinco grupos de acordo com seus ligantes específicos: 1) lectinas tipo C a qual tem como ligantes a manose, galactose e fucose; estas lectinas incluem grande classe de distintas glicoproteínas entre as quais as selectinas e seus ligantes, que desempenham papel crítico nos processos de invasão de vários tipos de cânceres incluindo os de estômago, pulmão e melanomas; 2) lectinas tipo I tendo como ligantes a Man $\alpha$ 6 GlcNac, ácido hialurônico,  $\alpha$ 2,3/ $\alpha$ 2,6-sialolactose; 3) lectinas tipo S que apresentam como ligantes os  $\beta$ -galactosídeos onde se encontram as galectinas; 4) as lectinas tipo P tendo como ligantes a Manose-6-fosfato; 5) pentraxinas que possuem monossacarídeos sulfatados e fosforilados como ligantes (GABIUS, 1996; DANGUY et al., 1998).

As galectinas constituem o terceiro grupo de lectinas, tipo S ou seja, solúvel-lactose-ligante. Elas se unem especificamente aos  $\beta$ -galactosídeos presentes em muitos componentes da matriz extracelular, incluindo laminina, fibronectina e colágeno. O nome genérico de galectinas foi proposto em 1994, para uma família de lectinas animais, as quais tinham capacidade de se ligar a galactose e possuíam uma seqüência característica de aminoácidos. Apresentam como característica o fato de serem solúveis, metal independentes em suas atividades, não possuem pontes dissulfídicas e na maioria dos casos apresentam o terminal N acetilado como as proteínas plasmáticas. Entretanto, sua localização histológica é diversa, não restrita ao citoplasma, mas também presente no núcleo, sobre a superfície celular e no interior da matriz extracelular (HIRABAYASHI, 1997; PERILLO et al., 1998).

As galectinas, atualmente, são numeradas em ordem de descobrimento e registradas no *Gen Bank*. Existem, de acordo com este sistema, dez galectinas de mamíferos registradas, cada uma das quais, preenchendo critérios mínimos, como ter afinidade por  $\beta$ -galactosídeos e estrutura definida similar no carboidrato de reconhecimento do domínio os quais são derivados de dois exons e apresentam uma extensa seqüência homóloga dentro da mesma família (HIRABAYASHI, 1997; HUGHES, 1997; PERILLO et al., 1998).

De acordo com os seus arranjos arquitetônicos, as galectinas foram classificadas em três diferentes tipos estruturais: *proto*, *chimera* e *tandem-repeat*. No primeiro grupo, *proto*, o qual é constituído de homodímeros não covalentes, compostos por dois idênticos carboidratos de reconhecimento do domínio, as galectinas-1, -2, -5, -7 são encontradas. No grupo tipo *chimera*, cuja estrutura é composta por um carboidratos de reconhecimento do domínio ligado a prolina, glicina e tirosina o único membro desta família é a galectina-3, e no terceiro grupo *tandem-repeat* constituído por dois distintos carboidratos de reconhecimento do domínio estão incluídas as galectinas-4, -6, -8 e -9 (KASAI e HIRABAYASHI, 1996).

A galectina-1 é referida como um homodímero de 14kDa. O carboidrato de preferência para esta galectina ligar-se é a lactosamina, o qual está presente em muitas glicoproteínas contrareceptoras. Há várias glicoproteínas identificadas que se ligam a galectina-1, incluindo a laminina, fibronectina, proteína associada a membrana do lisossoma, CD<sub>43</sub> e CD<sub>45</sub> da superfície protéica da membrana das células hematopoiéticas (PERILLO et al., 1998).

Como resultado da capacidade de união aos carboidratos da superfície celular, as galectinas podem mediar várias funções biológicas. A interação carboidrato-proteína é utilizada no mecanismo de adesão celular através do reconhecimento de peptídeos. O código de açúcares contribui significativamente

para a especificidade da seleção celular dos ligantes participantes. A galectina-1 e galectina-3, lectinas ligantes a galactosídeos com pesos moleculares de M (r) 14,797 e 31,000 respectivamente, são expressas em células normais e malignas e têm sido propostas como mediadoras dos contatos de adesão célula-célula e célula-matriz, e como indutoras da apoptose de algumas células (OHANNESIAN et al., 1995; KALTNER e STIERSTORFER, 1998). Sendo implicadas também, em fenômenos como regulação do crescimento celular, diferenciação celular, morfogênese, embriogênese e capacidade de invasão do câncer (OHANNESIAN et al. 1995; KASAI e HIRABAYASHI, 1996; BRÜLE et al. 1997; PERILLO et al. 1998).

As galectinas são provavelmente responsáveis pelo reconhecimento da estrutura N-acetilactosamina (LacNAc), que está presente em vários glicoconjugados e consideradas como importantes glicocódigos (KASAI e HIRABAYASHI, 1996). Partindo-se da avaliação da secreção, modulação e interação da galectina com a laminina, observa-se que ela pode ser secretada por uma via não clássica e pode interagir com a laminina e outros glicoconjugados extracelulares *in vivo* (COOPER, 1997).

As alterações da interação da célula tumoral com a laminina, são características fenotípicas consistentes de invasão e metástase. Qualitativa e quantitativamente, mudanças na expressão da proteína ligante a laminina têm sido correlacionadas com a capacidade das células cancerígenas de atravessar a membrana basal. Tais modificações fenotípicas estão relacionadas com prognóstico insatisfatório (BRULE et al., 1996).

O padrão de expressão de diferentes galectinas muda durante o desenvolvimento e este padrão é também alterado em determinados locais da inflamação e em carcinomas de mama, colon, próstata e tireóide. O nível de expressão de algumas galectinas em células tumorais parece estar correlacionado

com o potencial metastático. Expressão aberrante das galectinas na superfície das células tumorais parece ser indicativo de prognóstico ruim (PERILLO et al., 1998).

A galectina-1, também é conhecida como galaptina ou L-14 e a galectina-3 também conhecida como CBP 35, Mac 2, L-29 e L-34, parecendo serem as mais envolvidas nos processos de invasão.

O papel biológico das galectinas tem se expandido rapidamente e as funções propostas até o momento podem ser sintetizadas nos mecanismos de adesão, podendo promover ou inibir a adesão celular, regular a proliferação celular e a sobrevivência da célula. O mecanismo de adesão celular pode ser observado nas ações mediadoras da adesão das células T em relação as células epiteliais e na inibição da adesão dos mioblastos na laminina. Pode estimular a proliferação de células endoteliais e inibir a proliferação dos fibroblastos humanos em células de cultura. Em relação a regulação da sobrevivência da célula, induz a apoptose das células T e os macrófagos a eliminarem uma citotoxina (BRÛLE et al., 1995; ITZKOWITZ, 1997; PERILLO et al., 1998).

## 2.2 ENSAIOS EXPERIMENTAIS E CLÍNICOS

Foram obtidos conceitos, dados e informações sobre galectinas em ensaios experimentais e clínicos realizados em cólon, pele, timo, tireóide, endométrio, útero, bexiga, placenta e embriogênese. No entanto, não foram encontrados na literatura trabalhos relativos a expressão de galectina-1 no esôfago de Barrett, tema deste estudo.

Os autores dos ensaios referidos acima apresentam dados sobre a expressão da galectina-1, que foram reunidos e cujas conclusões são apresentadas

subdivididas esquematicamente em ensaios experimentais e clínicos, para melhor compreensão e efeito deste trabalho.

### 2.2.1 ENSAIOS EXPERIMENTAIS

Nos ensaios experimentais observou-se que :

- células de ovário de hamster chinês sintetizam galectina-1. A cinética de externalização da galectina-1 mostrou que as células segregam a proteína em aproximadamente 20 horas e que a forma da superfície celular da galectina-1 em células do ovário do hamster é ativa e ligada à superfície de glicoconjugados (CHO e CUMMINGS, 1995);
- a super expressão da galectina-1 causa a transformação de fibroblastos BALB3T3. A galectina-1 purificada (t-galectina-1) tem potente atividade mitogênica em células BALB3T3, mas não apresenta atividade ligante de açúcar. O tratamento da t-galectina-1 com 2-mercaptoetanol diminui sua atividade mitogênica, porém resulta no aparecimento de atividade ligante de açúcar. A modificação química de grupos sulfidril na t-galectina-1 com [14C]-iodoacetamida sugere a presença de ligações dissulfídicas intramoleculares. Estas ligações dissulfídicas intramoleculares da t-galectina-1 são essenciais para sua atividade mitogênica e diferentes atividades podem ser reguladas por mudanças estruturais causadas pela sua quebra (YAMAOKA et al., 1996);
- a dimerização e divalência são presumivelmente importantes. Mutações específicas em galectina-1 de hamster podem alterar o equilíbrio monomérico-dimérico sem afetar a atividade de ligação de carboidrato. A disponibilidade de monômeros ativos e dímeros covalentes funcionais de galectina-1 podem auxiliar em futuros estudos para compreensão da função biológica da lectina (CHO e CUMMINGS, 1996);

- a lectina consiste de uma única cadeia idêntica de subunidades de polipetídeos composta de 134 amino-ácidos (massa calculada, 14,797 daltons), e seu resíduo terminal, alanina, é N-acetilada. Quando comparada com as sequências de galectinas conhecidas, a galectina do ovário do sapo *Bufo arenarum Hensel* em sua estrutura primária, com especificidade do carboidrato e especialmente de suas propriedades bioquímicas, exibe a mais alta identidade (48% de toda molécula e 77% do carboidrato de reconhecimento do domínio), com galectina-1 do baço bovino, mas surpreendentemente menor identidade (38% de toda a molécula e 47% para o carboidrato de reconhecimento do domínio) com uma galectina da pele de outra espécie de sapo *Xenopus laevis skin*. A galectina do sapo compartilha também, três dos seis resíduos de cisteína que são conservados em todas as galectinas-1 de mamíferos. Conclui-se que dentro da família das galectinas a correlação entre conservação da estrutura primária e distâncias filogenéticas entre as espécies fonte poderia não ser direta como propostas por outros autores (AHMED et al., 1996);
- algumas galectinas do aparelho digestório de ratos Wistar, entre 6 e 8 semanas de vida de ambos os sexos, parecem ser produzidas pelo epitélio, podendo ser secretadas extracelularmente. A galectina recombinante é biologicamente ativa e útil como prova citoquímica para determinar endógenos ligantes da galectina-1. A galectina recombinante reconhece intensamente a mucina e a célula epitelial de superfície do glicocálice do tecido gastrointestinal. A razão pela qual a galectina recombinante não reconhece a membrana basal é obscura e provavelmente se deve ao fato dela estar completamente ocupada pela galectina-1 endógena, não havendo substrato livre para a galectina recombinante exógena. Estes complexos ligantes de galectina podem ter papel protetor na superfície celular contra o conteúdo do lúmen, como secreção gástrica, enzimas digestivas e outros organismos (WASANO e HIRAKAWA,

1997);

- a sequência de aminoácidos completa da galectina-1 ovina, obtida por digestão trípica e quimotríptica, revela que esta proteína ligante a carboidrato compartilha todos os resíduos absolutamente preservados e críticos encontrados em outros membros da subfamília de mamíferos da galectina-1. Acréscimo de lactose não produz mudanças significativas, sugerindo que ela não causa modificações na estrutura secundária da lectina. Neste estudo observaram a potencial atividade inibitória da galectina-1 no crescimento celular e implicações na morte de células T, e encontraram evidências das propriedades antagônicas entre as galectinas-1 e-3 (IGLESIAS et al., 1998);
- o anticorpo monoclonal para galectina-1 de cérebro humano liga-se especificamente a galectina-1 de várias origens animais, mas não se une a galectina-2 e nem galectina-3, o que induz particularmente sua monoespecificidade com eficiência (CORNILLOT et al., 1998).

### 2.2.2 ENSAIOS CLÍNICOS

Nos ensaios clínicos em cólon foram observadas as seguintes constatações:

- a galectina-1 foi expressa em 7 linhas celulares e a galectina-3 em 20 das 21 linhas celulares detectadas de carcinoma de cólon humano. A galectina-3 demonstrou ligar-se à laminina humana, ao antígeno carcinoembriogênico e à glicoproteína da membrana lisossômica, que estão envolvidos com a adesão celular e foi localizada sobre a superfície celular das células KM12. Várias glicoproteínas endógenas e proteínas de superfície celular de pesos moleculares variando entre M (r) 58 a 200 foram identificadas como ligantes da galectina-3. Conclui-se que a galectina-3 interage com várias moléculas de adesão e sugere-se que ela pode ter um papel na adesão celular do carcinoma

do cólon humano (OHANNESIAN et al., 1995);

- expressão da galectina-1 foi detectada principalmente nas células do tecido conjuntivo e correlacionada com a progressão tumoral da mucosa normal para adenoma e carcinoma ( $p < 0,0001$ ). A mucosa coloretal normal apresenta fraca ou negativa expressão de galectina-1, enquanto que a expressão de galectina-1 foi intensa em 40% dos adenomas estudados e em 84% dos carcinomas. Não houve correlação entre a expressão da galectina-1 e o grau de displasia nos adenomas. A galectina-1 na mucosa coloretal é predominantemente um produto do tecido conjuntivo cuja super expressão está associada com a progressão neoplásica do câncer coloretal (SANJUÁN et al., 1997);
- a apendicite não causa alterações identificadas na ligação da neoglicoproteína; em contraste, a tumorigênese do adenoma colônico foi caracterizada pelo aumento da lectina-reativa a galactose (Gal; Gal-beta 1, 3-GalNAc), fucose e N-acetilglucosamina. O estudo revelou que lectinas endógenas e neoglicoproteínas são importantes instrumentos glicohistoquímicos para análise na gastroenteropatologia (BRINCK et al., 1998);
- os glicoconjugados são ferramentas capazes de determinar a natureza benigna versus maligna do adenoma coloretal. A expressão dos glicoconjugados foi demonstrada pela expressão de cinco lectinas vegetais nominadas *Arachis hypogaea* (PNA), *Dolichos biflorus* (DBA), *Amaranthus caudatus* (ACA), *Maackia amurensis* (MAA) e *Sambucus nigra* (SNA), pertencentes à família de antígenos de Thomsen-Friedenrich. O padrão de coloração glicohistoquímica pôde identificar entre benigno (normal e baixo grau de displasia) e maligno (alto grau de displasia, carcinoma *in situ* e câncer), sugerindo que as displasias parecem ser distintas em dois grupos ao invés de três e que as displasias de alto grau são distintas do carcinoma *in situ*. Em síntese, observa-se que a maioria das displasias de alto grau são ainda benignas

enquanto os carcinomas *in situ* são realmente lesões carcinomatosas e devem ser tratados devidamente; que as displasias de alto grau são biologicamente diferentes do carcinoma *in situ* e que estas duas entidades não devem ser incluídas no mesmo grupo (BRONCKART et al., 1999).

Ensaio clínico em pele humana demonstraram que:

- a pele humana normal produz galectina; ela está localizada na epiderme, particularmente nos queratinócitos, células de Langerhans e também na derme, sendo importante para o contato célula/célula e/ou adesão na epiderme e na interação célula/matriz (AKIMOTO et al., 1995);
- a galectina-1 parece participar da adesão celular do melanoma com a laminina e poderia ser um modulador de invasão e metástase. Sugere-se que a alteração da expressão da galectina-1 pode ser um caminho na evolução dos processos invasivos (BRÜLE et al., 1995).

Os estudos relacionados com o timo detectaram que:

- as células epiteliais do timo humano sintetizam a galectina-1, que liga oligossacarídeos da superfície dos timócitos e das células T linfoblásticas. O grau de ligação da galectina-1 com os timócitos está relacionado com o estágio de maturação das células, ou seja, timócitos imaturos ligam mais galectina-1 do que os maduros. Sugere-se que a galectina-1 participa das interações das células epiteliais/timócitos/tímicas e que esta interação pode ser regulada pela expressão de oligossacarídeos ligantes sobre a superfície dos timócitos (BAUM et al., 1995);
- a galectina-1, sintetizada por células tímicas epiteliais em timo juvenil normal, serve como mediadora entre a adesão de células T imaturas e epitélio do timo (HAFER-MACKRO et al., 1996);
- a expressão da galectina-1 em células epiteliais do timo parece ter um papel de adesão celular na hiperplasia e neoplasia tímicas, observados na doença auto-

imune *miastenia gravis*. Há abundante expressão de galectina-1 em células epiteliais de timos hiperplásicos e neoplásicos de pacientes com *miastenia gravis*. Culturas primárias de células epiteliais neoplásicas de um timoma expressam galectina-1 e ligam células T imaturas; a ligação de célula T é inibida pelo acréscimo de lactose e tiodigalactosídeo, sugerindo que a galectina-1 participa da adesão célula-célula (HAFER-MACKRO et al., 1996).

Nos ensaios clínicos em tireóide foram realizadas as seguintes observações:

- na tireóide humana, a galectina-1 expressa níveis mais elevados em 6 linhas celulares derivadas de carcinomas de tireóide do que em culturas primárias de tireóide normal e células de adenomas. Os níveis de galectina-1 aumentaram em 28 dos 40 carcinomas papilares e em 6 dos 7 carcinomas anaplásicos comparados com tireóide normal e hiperplásica. Inversamente, a expressão de galectina-1 não é afetada em carcinomas foliculares e adenomas benignos. A análise imuno-histoquímica da tireóide normal e de carcinoma papilar revela expressão maior desta proteína em células foliculares neoplásicas do que em células normais (CHIARIOTTI et al., 1995);
- todas as lesões malignas da tireóide de origem epitelial e o nódulo linfático metastático de um carcinoma papilar apresentam altos níveis de expressão da galectina-1 e galectina-3; os carcinomas medulares da tireóide mostram fraca e variável expressão destas galectinas e em contraste, nenhum dos adenomas benignos da tireóide nem dos tecidos adjacentes de tireóide normal manifestam a presença de galectina-1 ou galectina-3. Sugere-se que as galectinas-1 e -3 podem estar associadas com transformação maligna do epitélio da tireóide e, potencialmente, podem servir como marcadores para distinguir adenomas benignos de carcinomas diferenciados da tireóide (XU et al., 1995).

Ensaio clínico em placenta e embriogênese detectaram que:

- em placenta humana, estudos com anticorpos monoclonais, demonstram que a fibronectina e laminina servem como ligantes endógenos para a galectina-1, sugerindo que esta tenha importante papel na adesão da matriz extracelular e no controle da adesão celular e que este efeito de adesão é inibido na presença da lactose (OSEKI et al., 1995);
- há expressão da galectina-1 e galectina-3 durante o primeiro trimestre da embriogênese humana. A expressão da galectina-1 é demonstrada no tecido conjuntivo e tecidos derivados, tais como células musculares lisas e estriadas e em alguns epitélios, como nas camadas basais da pele após 14 semanas e nas células epiteliais das gônadas. A galectina-3 é detectada principalmente na pele, epitélio do trato digestório, e respiratório, urotélio, e tubos excretórios do rim, também nas células do miocárdio, nos condrócitos e no fígado. A expressão diferencial destas duas lectinas sugere que elas poderiam participar do processo complexo de diferenciação tecidual (BRÜLE et al., 1997).

Nos ensaios clínicos em endométrio, útero e bexiga foram realizadas as seguintes observações:

- a expressão de três proteínas ligantes a laminina, 67kDa receptora de laminina (67 LR), galectina-1 e galectina-3 apresentam-se alteradas no câncer endometrial humano avançado, similar ao relatado em outros carcinomas tais como, os de cólon, mama e ovário. Há aumento significativo da expressão da 67 LR e galectina-1 nas células cancerígenas comparadas com o endométrio normal adjacente ( $p= 0,0004$  e  $0,0022$  respectivamente); e significativa diminuição da expressão da galectina-3 nestas células (BRÜLE et al., 1996);
- os níveis de expressão da laminina e da galectina-1 e -3 e seus sítios ligantes podem ser utilizados de maneira confiável para diferenciação entre leiomiomas e leiomiossarcomas uterinos. Há evidentes diferenças nos parâmetros (índice

de marcação, densidade óptica média, e heterogeneidade de concentração do marcador relacionados com a galectina-3 nos dois grupos avaliados. A porcentagem de tecido que expressou a galectina-3 e seus sítios de ligação é significativamente mais alta no leiomiossarcoma do que no leiomioma. Embora significativamente mais alta a concentração de laminina é mais heterogenicamente distribuída no leiomiossarcoma em relação ao leiomioma. Em contraste os níveis de expressão da galectina-1 permanecem similares tanto nos leiomiomas como nos leiomiossarcomas (SCHWARZ JR. e BUDEL, 1999);

- os níveis de expressão de galectina-1 apresentam-se bastante aumentados na maioria dos carcinomas de bexiga humana de alto grau de diferenciação histológica quando comparados com o epitélio normal da bexiga ou nos tumores com baixo grau de diferenciação histológica. Os níveis de galectina-3 também mostram-se aumentados na maioria dos tumores quando comparados com o epitélio normal da bexiga, porém são similares entre os tumores de diferentes graus histológicos (CINDOLO et al., 1999).

### 3 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi realizado no Instituto de Pesquisas Médicas (IPEM) do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba (HUEC) / Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná (FEMPAR) e no Departamento de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade Livre de Bruxelas, Bélgica.

Utilizou-se a *Nomina Anatomica* (1985). Tomaram-se como base para a padronização as *Normas para Apresentação de Trabalhos*, da Universidade Federal do Paraná (1996). Aplicaram-se as *Normas para Referências Bibliográficas* (NBR 6023) e *Abreviação de Títulos de Periódicos* (NBR 6032) da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), as *Normas para apresentação gráfica de dados: tabelas*, do Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social – IPARDES, do Governo do Estado do Paraná.

#### 3.1 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DE AMOSTRAS

A amostra inicial consistiu de 86 biópsias endoscópicas de pacientes com esôfago de Barrett sem displasia. Cada amostra foi submetida a avaliação prévia para a inclusão no estudo. Os espécimes estavam identificados e processados de acordo com as técnicas histológicas de rotina, conservados em solução de formol

tamponado e fixados em parafina.

### 3.2 AVALIAÇÃO PRÉVIA

Cada bloco histológico foi submetido a microtomia para obtenção de novos cortes com espessura de 5  $\mu$  . Foram então corados com hematoxilina e eosina e reavaliados independentemente por dois patologistas experientes, para se obter a confirmação do laudo histológico de acordo com os critérios que caracterizam o esôfago de Barrett sem displasia, assim definido: substituição do epitélio escamoso pelo epitélio colunar especializado, com a presença de células caliciformes interpostas entre as células mucosas, tanto na camada de revestimento como na porção glandular. Ao microscópio óptico, esse epitélio de revestimento pode esboçar arranjo viloso como também rudimentar (TOLENTINO, 1998). Das 86 biópsias de esôfago de Barrett sem displasia foram selecionados 60 amostras para realização da técnica de coloração imuno-histoquímica. Os blocos excluídos apresentavam material insuficiente para a realização de novos cortes histológicos, tinham tecidos sobrepostos, ou o material estava inadequadamente conservado.

As 60 amostras que vieram a constituir a casuística do presente estudo foram selecionadas entre as biópsias esofágicas que apresentaram confirmação diagnóstica, através de critérios histológicos de epitélio de Barrett sem displasia e encontravam-se adequadas para se realizar a técnica de glicoimuno marcagem.

Todas as amostras foram obtidas no CITOLAB - Laboratório de Citologia e Histopatologia Ltda., da cidade de Curitiba, coletadas de fevereiro a novembro de 1998. Na distribuição da amostra obteve-se um total de 25 pacientes do sexo feminino e 35 pacientes do sexo masculino, a média de idade foi de 42 anos (ANEXO 1).

### 3.3 PREPARO DAS LÂMINAS PARA ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os blocos de parafina foram submetidos a microtomia com espessura do corte de 5  $\mu$ , os quais foram dispostos sobre uma lâmina tratada com *poly-L-lysine* (SuperFrostColor<sup>®</sup> -Menzel-Alemanha).

### 3.4 TÉCNICA DE COLORAÇÃO GLICOIMUNO-HISTOQUÍMICA.

O procedimento de coloração imuno-histoquímica utilizado nos cortes parafinados foi realizado conforme o seguinte método:

1. Desparafinização e hidratação dos cortes de tecidos através de 3 banhos em toluol e séries de álcool com graduação decrescente (100%, 90%, 70%) com duração de 10 minutos cada banho,
2. Lavagem das lâminas por 5 minutos em água da torneira,
3. Inibição da peroxidase endógena pela imersão das lâminas por 30 minutos em solução composta por 200 ml de metanol e 6ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,3 %,
4. Lavagem das lâminas em água corrente durante 5 minutos e incubadas em solução tampão TBS (Tris Buffered Saline) em pH 7,3 por 5 minutos,
5. Incubação dos cortes por 20 minutos com soro bloqueador: kit avidina-biotina. (Avidin-Biotin Blocking-kit<sup>®</sup>-Vector Laboratories, Ca-USA). Neste procedimento deve-se secar as lâminas com papel absorvente, retirando o excesso de tampão, após realizar a aplicação da gota de avidina sobre o corte e incubação das lâminas durante 15 minutos em atmosfera úmida,
6. Lavagem das lâminas em dois banhos de solução tampão TBS,
7. Incubação dos cortes por 20 minutos com soro bloqueador: kit avidina-biotina (Avidin-Biotin Blocking-kit<sup>®</sup>-Vector Laboratories, Ca-USA). Neste procedimento

deve-se também secar as lâminas com papel absorvente, retirando o excesso de tampão, fazendo então a aplicação da gota de biotina sobre o corte e depois incubação das lâminas durante 15 minutos em atmosfera úmida,

8. Adição do anticorpo primário policlonal de coelho-IgG anti-galectina-1 biotinilada e incubação dos cortes por 30 minutos em atmosfera úmida. (Este anticorpo vai se fixar sobre o antígeno específico que é a galectina-1),

9. Lavagem das lâminas por 5 minutos em solução tampão TBS,

10. Adição do anticorpo secundário biotinilado que se fixará nos anticorpos primários e incubação das lâminas em atmosfera úmida por 30 minutos,

11. Lavagem das lâminas em dois banhos de 10 minutos cada em solução tampão TBS,

12. Incubação dos cortes por 30 minutos no complexo ABC (Vecstain Elite ABC Reagent<sup>®</sup> - Vector Laboratories, Ca-USA),

13. Lavagem das lâminas em dois banhos sucessivos de 5 minutos cada em solução tampão TBS,

14. Incubação dos cortes com solução de *DAB* – diaminobenzinaperoxidase (Liquid *DAB*<sup>®</sup>-Biogenex- USA),

15. Lavagem dos cortes em água corrente e posterior colocação das lâminas por 5 minutos em água bidestilada e deionizada,

16. Realiza-se então a contracoloração, as lâminas retiradas da água bidestilada são colocadas na hematoxilina. Durante este tempo de incubação, as estruturas não marcadas são coradas de azul,

17. Colocação das lâminas em água bidestilada por 5 minutos,

18. Desidratação e clareamento, neste procedimento as lâminas são colocadas em banhos de álcoois de concentração crescente (70%, 90%, 100%) e depois colocadas em 3 banhos de toluol com 5 minutos de duração cada,

19. Montagem das lâminas realizada pela fixação das lamínulas sobre os cortes

com a ajuda de resina de cedro miscível em toluol.

O controle da reação para o marcador em estudo é obtido omitindo-se o passo de incubação com o anticorpo primário em uma das lâminas (ítem 8). Deve-se ter o cuidado de colocar esta lâmina em banho de solução TBS separadamente evitando assim qualquer contato com os anticorpos primários advindos de outras lâminas

### 3.5 ORGANIZAÇÃO FUNCIONAL DO SISTEMA INFORMATIZADO DE ANÁLISE DE IMAGEM

O sistema SAMBA 4000, *Système d'analyse microscopique à balayage automatique* (Sistema de Análise Microscópica de Busca Automática), desenvolvido pela Alcatel (Grenoble, França), é constituído por um *hardware*, capaz de captar imagens microscópicas, e por um *software* capaz de interpretar e analisar as imagens captadas.

#### 3.5.1 EQUIPAMENTOS COMPONENTES (*HARDWARE*)

O *hardware* é composto por quatro unidades: microscópio, câmara de vídeo, microcomputador, impressora e dois monitores (FIGURA 1).

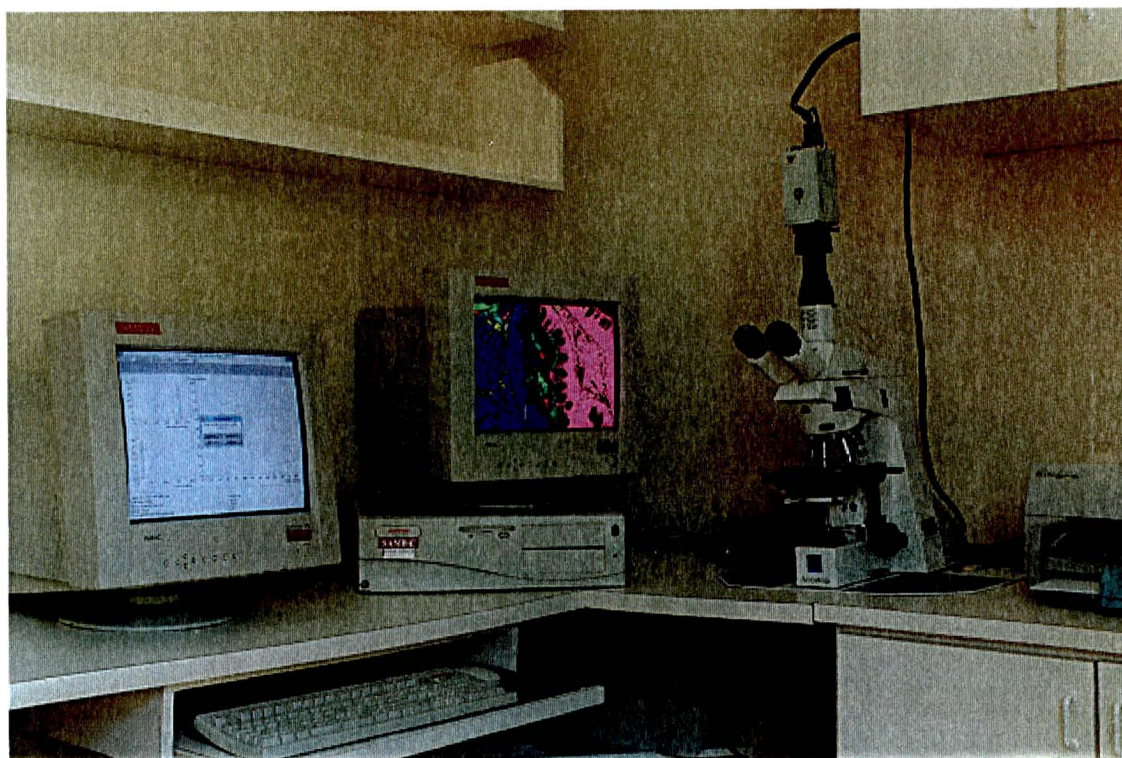


FIGURA 1: SISTEMA SAMBA 4000

NOTA: SISTEMA DE CITOFOTOMETRIA DE IMAGEM CONSTITUÍDO POR IMPRESSORA, MICROSCÓPIO, CÂMERA DE VÍDEO, MICROCOMPUTADOR E DOIS MONITORES.

### 3.5.1.1 Microscópio

O microscópio utilizado é o aparelho da marca Axioskop® (Zeiss-Alemanha). O fluxo luminoso, oriundo da lâmpada de xenônio, é controlado por um potenciômetro capaz de avaliar com precisão a quantidade de luz. Este feixe atravessa o condensador, a lâmina histológica a objetiva em uso e então é separado em duas partes: uma via destinada a observação visual através da ocular do microscópio e a via de captação da imagem pela câmera de vídeo a qual é enviada ao monitor do computador.

#### 3.5.1.2 Câmera de vídeo.

A captura das imagens é feita através de uma câmera DXC-970MD 3CCD® (Sony- Japão) que padroniza as cores verde, azul e vermelha de forma que o sistema trabalhe com o mesmo nível de captação determinado.

#### 3.5.1.3 Computador.

Utilizou-se um computador, Pentium III com 16 Mb RAM e disco rígido de 12 *Gigabytes*, que executa as seguintes funções: importação das imagens do microscópio e da câmara de vídeo, execução do *software Immuno* do sistema SAMBA 4000, e transferência de dados para a impressão.

#### 3.5.1.4 Impressora.

Utilizou-se para a impressão dos dados numéricos uma impressora DESKJET® - 680C ( Hewlett Packard – USA).

### 3.5.2 PROGRAMA COMPUTACIONAL (*SOFTWARE*)

Ao iniciar a utilização do *software Imunno* deve-se realizar a calibração do sistema SAMBA 4000 e padronizar o protocolo de rotina. Este processo de padronização consiste nas seguintes etapas:

- aquisição da imagem (FIGURA 2)
- processamento e digitalização da imagem (níveis de cinza)
- binarização da imagem
- segmentação da imagem (FIGURA 3)
- identificação do objeto (FIGURA 4)
- seleção e reconhecimento do objeto de interesse (FIGURA 5)
- análise da imagem (FIGURA 6)
- resultados

As imagens analógicas, tais quais são percebidas, são captadas através da câmera, e transformadas em imagens numéricas. A análise tem por finalidade transformar as imagens coradas pelo marcador em matriz numérica e, a partir desta, calcular parâmetros matemáticos que permitam a análise numerizada das imagens microscópicas.

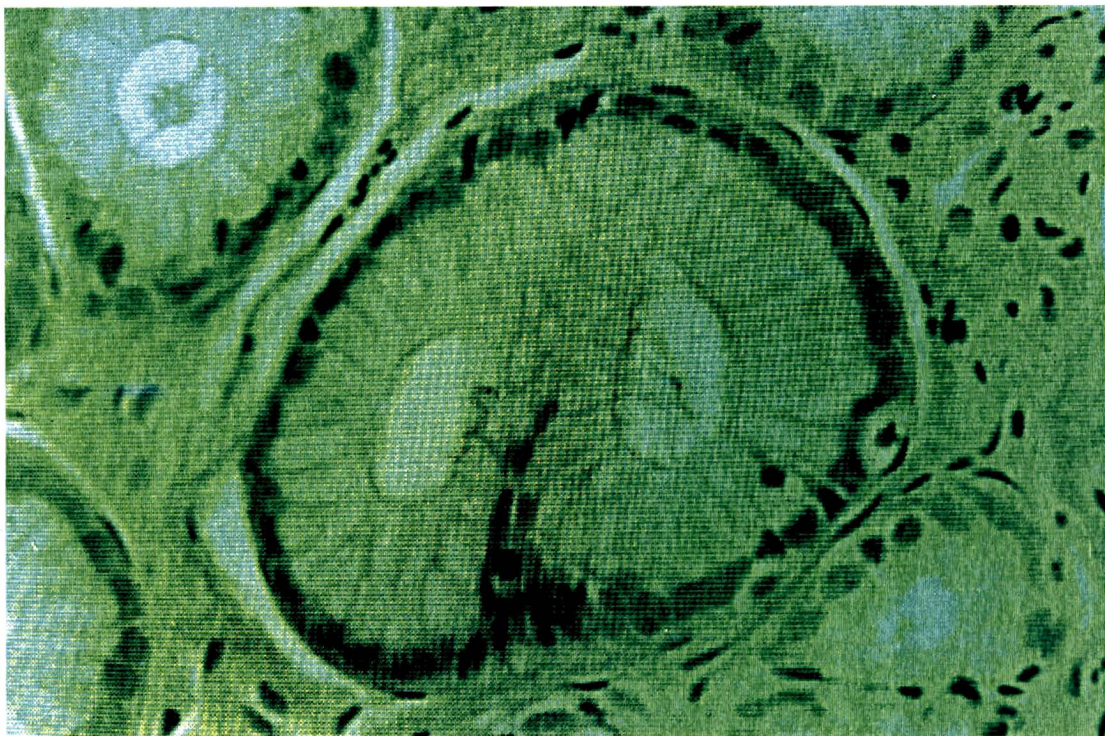


FIGURA 2: FOTOMICROGRAFIA DE UM CAMPO HISTOLÓGICO A SER ANALISADO.

NOTA: OBTENÇÃO DA IMAGEM ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELEGENDO-SE O CAMPO DESEJADO PARA REALIZAÇÃO DA LEITURA.

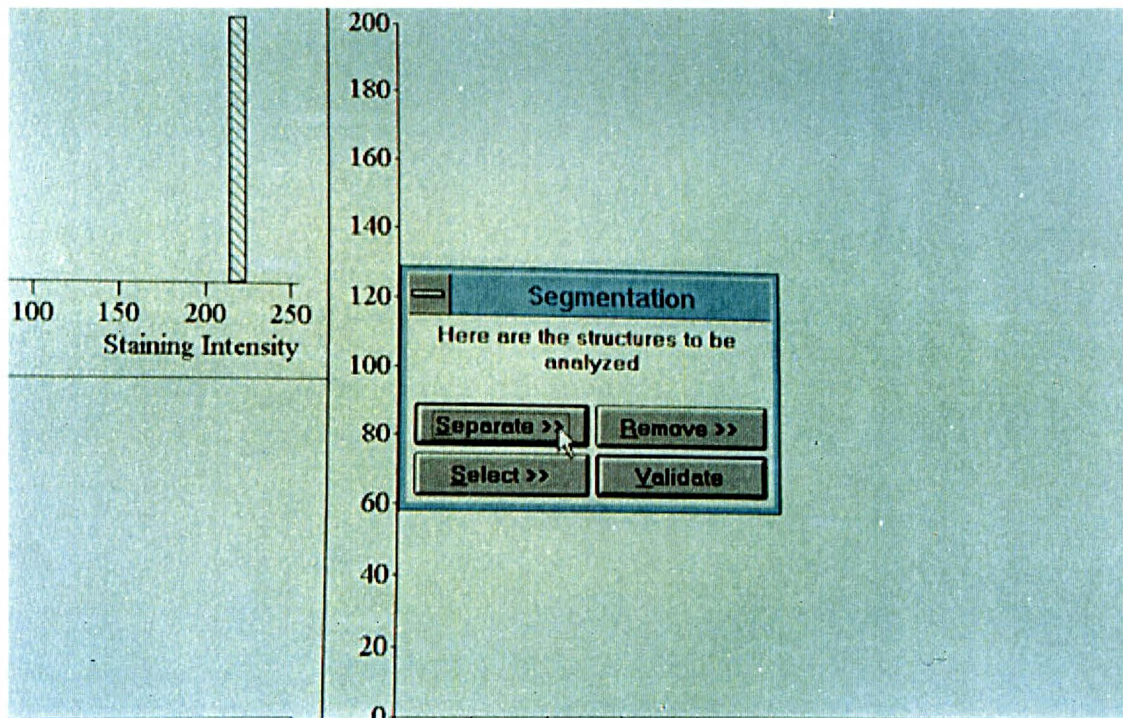


FIGURA 3: ASPECTO DA TELA DO MONITOR NO TEMPO DE SEGMENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS

NOTA: OS COMANDOS DO PROGRAMA PERMITEM REALIZAR A SEGMENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUE SERÃO ANALISADAS SENDO POSSÍVEL SEPARÁ-LAS DAS DEMAIS IMAGENS, REMOVER IMAGENS QUE NÃO SÃO DESEJADAS, SELECIONAR AS ESTRUTURAS PARA A ANÁLISE E ENTÃO TORNÁ-LAS VÁLIDAS PARA LEITURA.

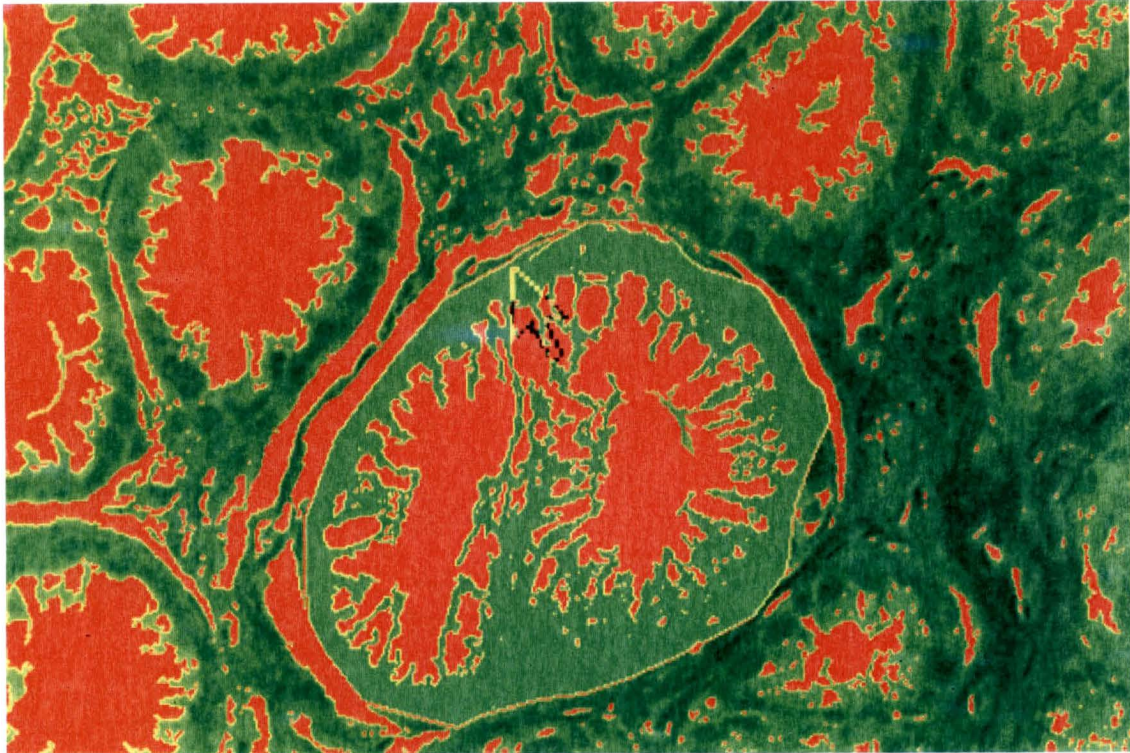


FIGURA 4 : FOTOMICROGRAFIA EXEMPLIFICANDO A IDENTIFICAÇÃO DA ESTRUTURA DE INTERESSE  
NOTA: IDENTIFICA-SE A IMAGEM DE INTERESSE APÓS A DELIMITAÇÃO DAS BORDAS DA ESTRUTURA  
A SER ANALISADA

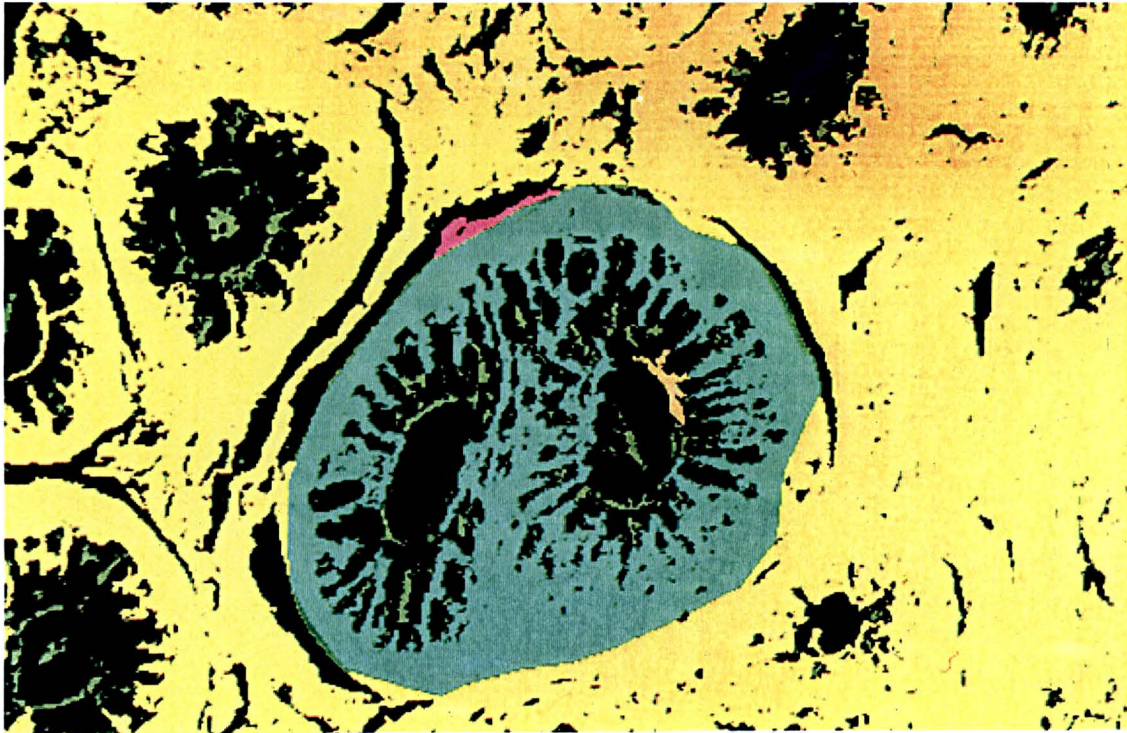


FIGURA 5: FOTOMICROGRAFIA DE UM EXEMPLO DE RECONHECIMENTO DA IMAGEM PELO SISTEMA SAMBA 4000



FIGURA 6: FOTOMICROGRAFIA EXEMPLIFICANDO A IMAGEM DE UMA ESTRUTURA ANALISADA  
NOTA: NESTE MOMENTO OBTÊM-SE SIMULTANEAMENTE OS RESULTADOS DOS PARÂMETROS ANALISADOS

As imagens processadas pelo sistema computadorizado são digitalizadas em *pixels*. Este processo confere um valor para cada ponto-imagem (*pixel*). A luz absorvida pelo tecido em cada segmento será quantificada. A quantificação da luz absorvida é expressada através de uma escala de variações de níveis de cinza que vai do 0 (preto) ao 255 (branco). Este processo corresponde a numerização da imagem que envolve duas etapas: geração da matriz em tons de cinza e transformação desta em matriz numérica binária (TRUE e HERMAN, 1993).

### 3.5.3 PROCEDIMENTO DE LEITURA

Para otimização do aproveitamento das imagens em cada lâmina, seguiu-se a metodologia descrita por BRUGAL e CHASSERY (1997) a qual consiste no rastreamento dos campos visuais com o procedimento de leitura sendo realizado em barra grega.

A leitura foi realizada utilizando uma objetiva de aumento 20 X em cinco campos de epitélios de revestimento, dez campos constituídos de epitélio glandular sendo considerado para leitura as glândulas que tinham a presença das células caliciformes e cinco campos de tecido conjuntivo o que correspondeu a uma área escaneada de vinte campos com superfície variando em cada campo entre 60000 a 120000  $\mu\text{m}^2$ . O tempo para leitura de cada lâmina foi de aproximadamente 40 minutos. Esta metodologia foi obtida e qualificada pelo laboratório da Universidade Livre de Bruxelas, Bélgica e aplicada no Instituto de Pesquisas Médicas do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba.

### 3.6 PARÂMETROS ANALISADOS PELO SISTEMA SAMBA 4000

O programa *Imunno* foi utilizado para analisar três variáveis que

caracterizam quantitativamente as reações de coloração histoquímicas: índice de marcagem, densidade óptica média e heterogeneidade de concentração.

O índice de marcagem descreve a porcentagem de área tecidual especificamente marcada pela prova glicohistoquímica .

A densidade óptica média denota a intensidade de coloração.

A heterogeneidade de concentração que expressa a distribuição da concentração do marcador nos campos individuais avaliados.

Para realizar a padronização do sistema para a análise microscópica computadorizada a lâmina histológica considerada controle negativo, da qual o anti-corpo anti-galectina-1 foi omitido, foi analisada para cada um dos parâmetros acima mencionados.

Os testes para análise e estatística foram realizados com o *software Imunno* do sistema SAMBA 4000. A representação das diferentes variáveis calculadas pela quantificação do marcador imuno-histoquímico, através da imagem computadorizada permite, em um mesmo momento, observar a área da superfície analisada, a intensidade de marcação e a concentração da coloração (FIGURA 7).

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA MONOVARIADA

Após a análise dos parâmetros estabelecidos pelo programa computacional do sistema SAMBA 4000: índice de marcagem, densidade óptica média e heterogeneidade de concentração em cada amostra de tecido foi realizada a análise estatística monovariada .

Os resultados serão apresentados, segundo seu grau de significância, em função da probabilidade p, cuja significancia estatística foi aceita quando  $p < 0,05$  .

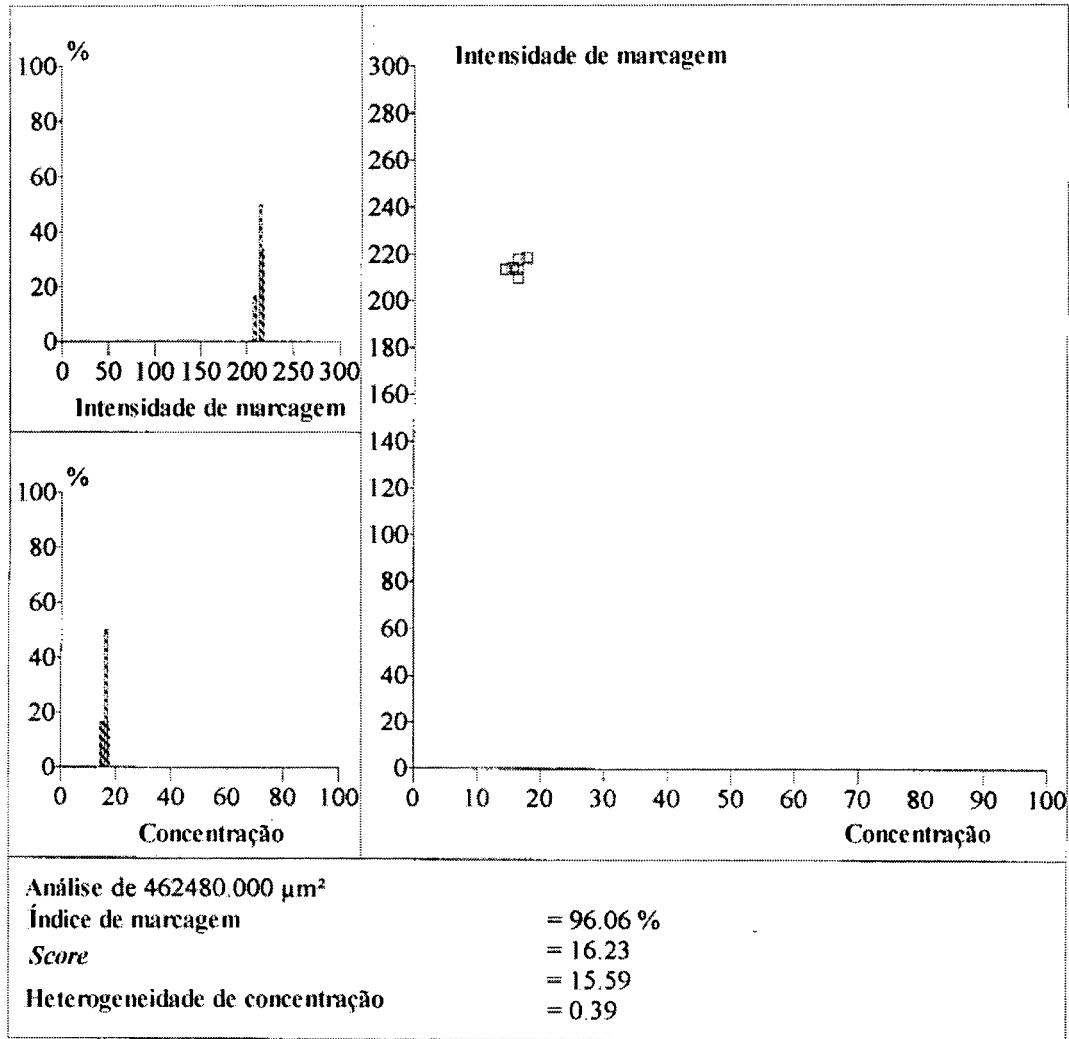


FIGURA 7: PARÂMETROS ANALISADOS

## **4 RESULTADOS**

Das 60 amostras incluídas no estudo em 37 foi possível avaliar o epitélio de revestimento e em 54 amostras o epitélio glandular e tecido conjuntivo. A amostra apresentou homogeneidade de marcação em todas as observações analisadas.

### **4.1 PADRÃO DE COLORAÇÃO OBTIDO NO ESÔFAGO DE BARRETT SEM DISPLASIA UTILIZANDO ANTICORPO ANTI-GALECTINA-1**

Observou-se a expressão da galectina-1 tanto no núcleo como no citoplasma das células do epitélio de revestimento (FIGURA 8), epitélio glandular ( FIGURA 9) e no tecido conjuntivo (FIGURA 10) .

Nas regiões marcadas observou-se uma coloração de cor castanha, e onde não houve marcação a coloração obtida é de tonalidade azulada.

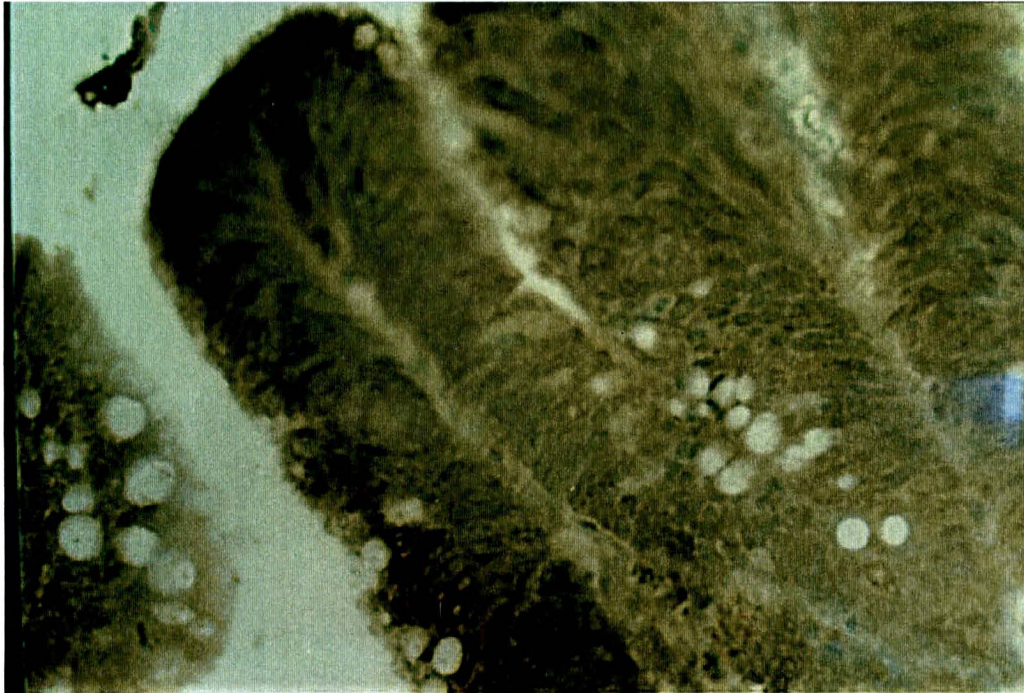


FIGURA 8: FOTOMICROGRAFIA DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DA GALECTINA-1 NO EPITÉLIO DE REVESTIMENTO, OBSERVAÇÃO 34, AUMENTO 200 X.

NOTA: HOUE MARCAÇÃO TANTO DOS NÚCLEOS COMO DO CITOPLASMA, QUE APRESENTAM COLORAÇÃO CASTANHA. SENDO QUE AS ESTRUTURAS NÃO MARCADAS COM O ANTICORPO ANTI-GALECTINA-1 FORAM CORADAS COM A HEMATOXILINA E APRESENTAM-SE COM COLORAÇÃO AZUL

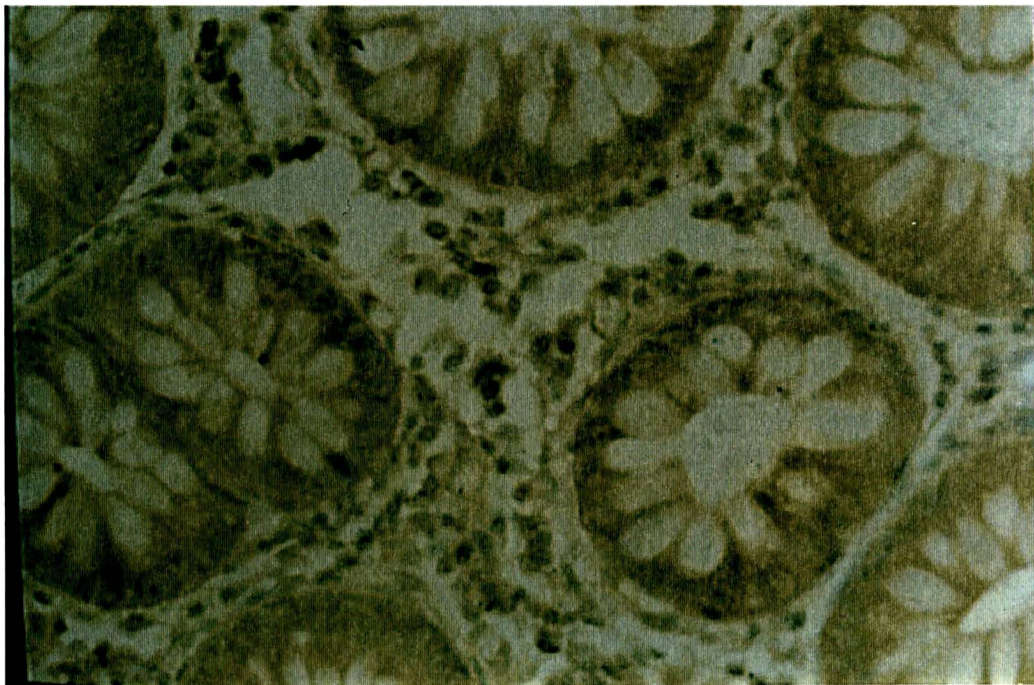


FIGURA 9: FOTOMICROGRAFIA DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DA GALECTINA-1 NO EPITÉLIO GLANDULAR, OBSERVAÇÃO 43, AUMENTO 200 X.

NOTA: PRESENÇA DE CÉLULAS CALICIFORMES. HOUE A MARCAÇÃO TANTO DOS NÚCLEOS DAS CÉLULAS COMO DO CITOPLASMA, QUE APRESENTAM COLORAÇÃO CASTANHA. SENDO QUE AS ESTRUTURAS NÃO MARCADAS COM O ANTICORPO ANTI-GALECTINA-1 FORAM CORADAS COM A HEMATOXILINA E APRESENTAM-SE COM COLORAÇÃO AZUL.

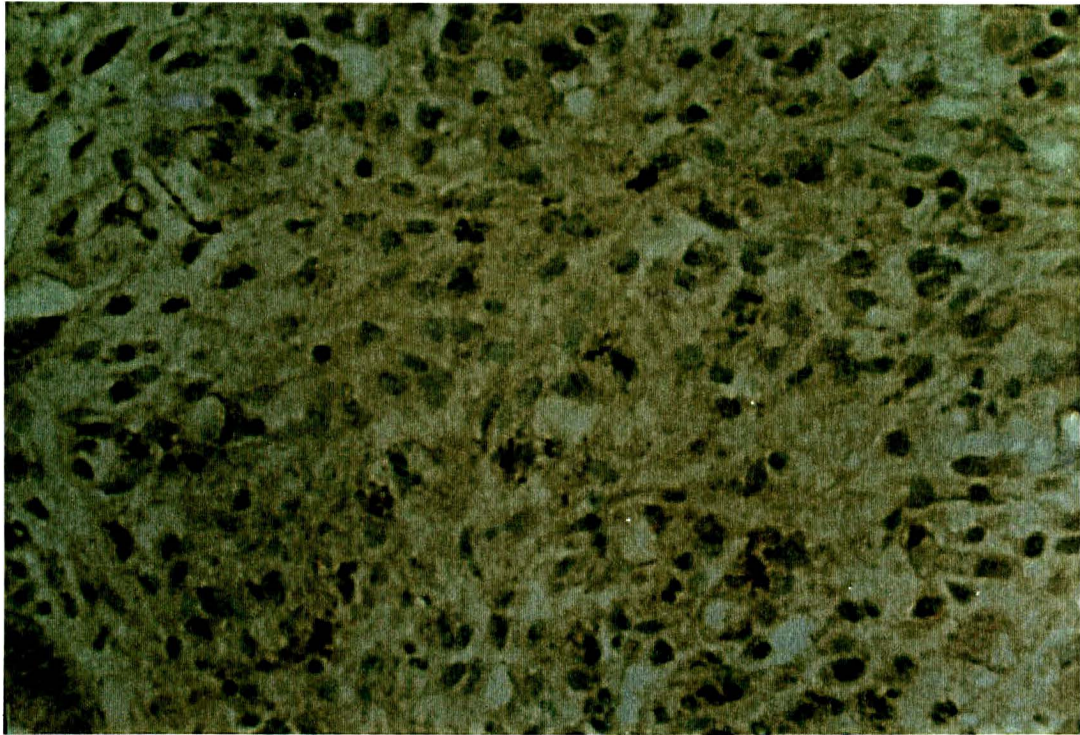


FIGURA 10: FOTOMICROGRAFIA DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DA GALECTINA-1 NO TECIDO CONJUNTIVO, OBSERVAÇÃO 52, AUMENTO 200 X.

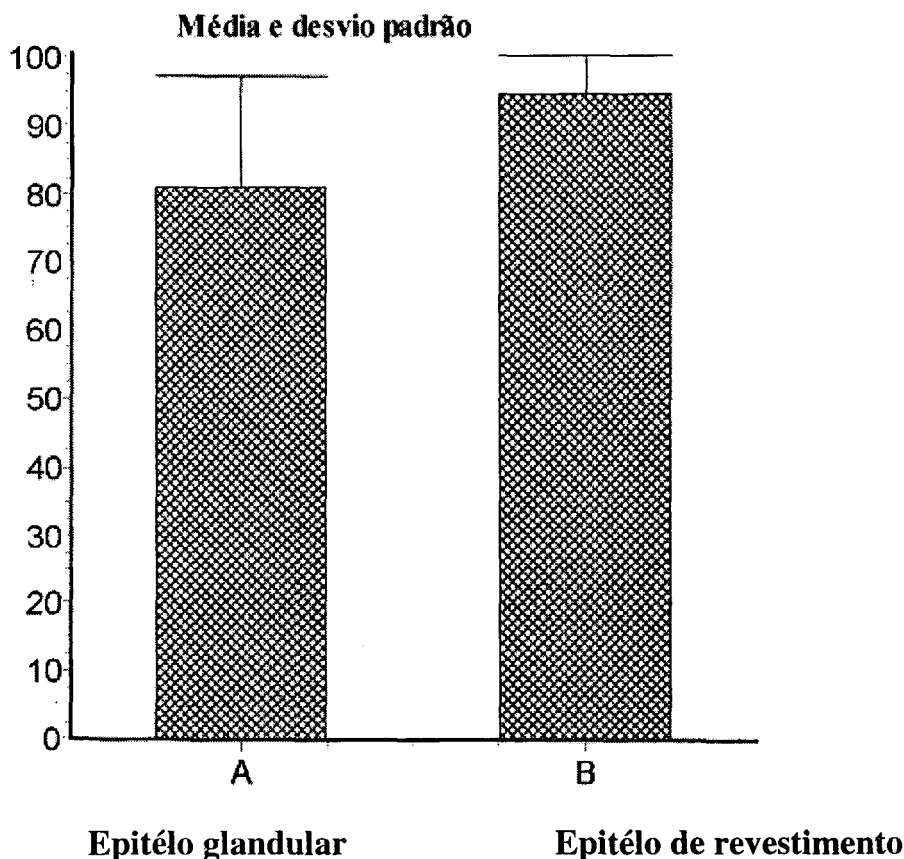
NOTA: HOUVE A MARCAÇÃO TANTO DOS NÚCLEOS DAS CÉLULAS COMO DO CITOPLASMA, QUE APRESENTAM COLORAÇÃO CASTANHA. SENDO QUE AS ESTRUTURAS NÃO MARCADAS COM O ANTICORPO ANTI-GALECTINA-1 FORAM CORADAS COM A HEMATOXILINA E APRESENTAM-SE COM COLORAÇÃO AZUL.

4.2 NÍVEL DE EXPRESSÃO DA GALECTINA-1 EM RELAÇÃO AO ÍNDICE DE MARCAGEM NO ESÔFAGO DE BARRETT SEM DISPLASIA

A média do índice de marcagem no epitélio de revestimento (93,459 %) foi significativamente maior que no epitélio glandular ( 80,916 %), sendo o valor de p igual a 0,0004. Na análise dos índices de marcagem o desvio padrão foi de 15,455 no epitélio de revestimento e 16,304 no epitélio glandular. A diferença entre as médias foi igual a 12,543, sendo que o intervalo de confiança da diferença de 95% ficou entre 5,773 e 19,313 (Gráfico 1).

GRÁFICO 1 : MÉDIA E DESVIO PADRÃO EM PORCENTAGEM DO ÍNDICE DE MARCAGEM COM ANTICORPO ANTI-GALECTINA-1 DO EPITÉLIO GLANDULAR (A) E EPITÉLIO DE REVESTIMENTO (B) NO ESÔFAGO DE BARRETT MOSTRANDO QUE A INTENSIDADE DE MARCAGEM NO EPITÉLIO DE REVESTIMENTO FOI SIGNIFICATIVAMENTE MAIOR QUE NO EPITÉLIO GLANDULAR.

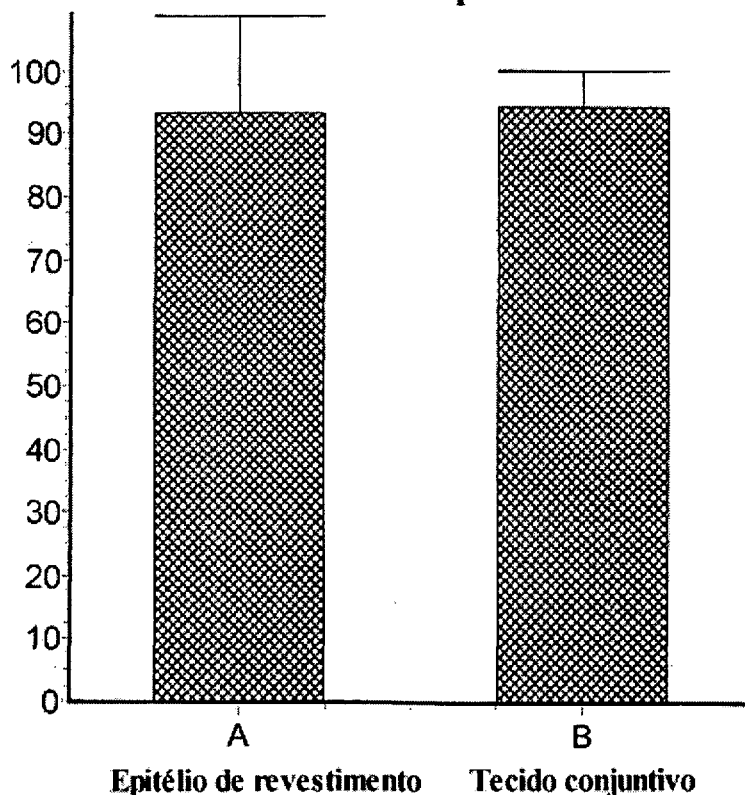
ÍNDICE DE MARCAGEM (LI%) GALECTINA-1 .



A média do índice de marcagem no epitélio de revestimento (93,459 %) e no tecido conjuntivo (94,637 %) não apresentou diferença significativa sendo o valor de  $p=0,6102$ . Na análise destes índices de marcagem o desvio padrão foi de 15,455 no epitélio de revestimento e 5,761 no tecido conjuntivo. A diferença entre as médias foi igual a 1,178 sendo que o intervalo de confiança da diferença de 95% ficou entre -3,397 e 5,753 (Gráfico 2).

GRÁFICO 2: MÉDIA E DESVIO PADRÃO EM PORCENTAGEM DO ÍNDICE DE MARCAGEM COM ANTICORPO ANTI-GALECTINA-1 DO EPITÉLIO DE REVESTIMENTO (A) E TECIDO CONJUNTIVO (B) NO ESÔFAGO DE BARRETT MOSTRANDO QUE NÃO HOUVE DIFERENÇA NA INTENSIDADE DE MARCAGEM ENTRE EPITÉLIO DE REVESTIMENTO E TECIDO CONJUNTIVO.

### ÍNDICE DE MARCAGEM (LI %) GALECTINA - 1 Média e desvio padrão

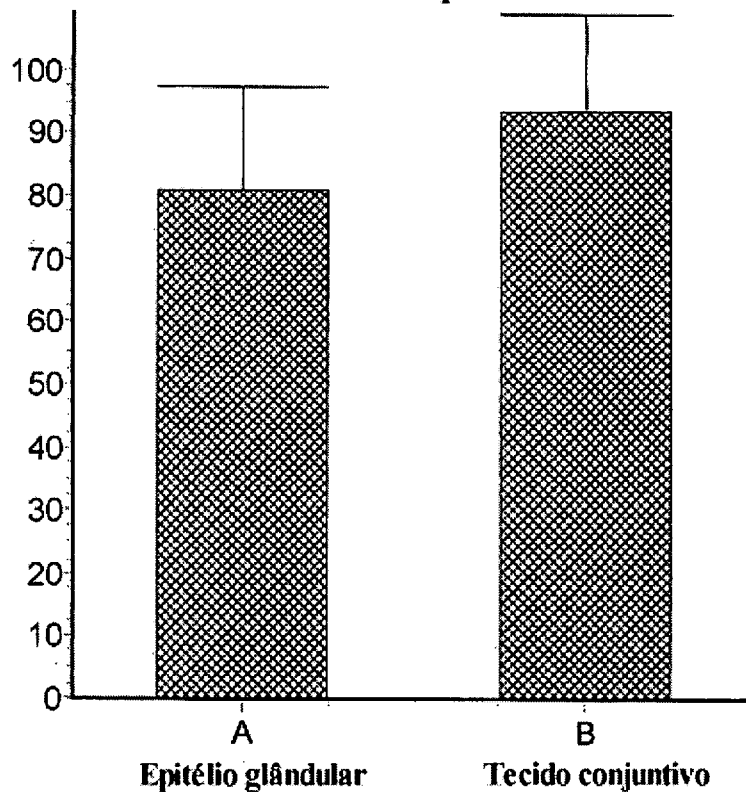


A média do índice de marcagem no tecido conjuntivo (94,637 %) foi maior que no epitélio glandular (80,916 %), sendo o valor de  $p<0,0001$ . Na

análise dos índices de marcação o desvio padrão foi de 5,761 no tecido conjuntivo e 16,304 no epitélio glandular. A diferença entre as médias foi igual a 13,721, sendo que o intervalo de confiança da diferença de 95% ficou entre 5,773 e 19,313 (Gráfico 3).

GRÁFICO 3: MÉDIA E DESVIO PADRÃO EM PORCENTAGEM DO ÍNDICE DE MARCAGEM DO EPITÉLIO GLANDULAR (A) E TECIDO CONJUNTIVO (B) MARCADOS COM ANTICORPO ANTI-GALECTINA-1 NO ESÔFAGO DE BARRETT MOSTRANDO QUE A INTENSIDADE DE MARCAGEM NO TECIDO CONJUNTIVO FOI SIGNIFICATIVAMENTE MAIOR QUE NO EPITÉLIO GLANDULAR.

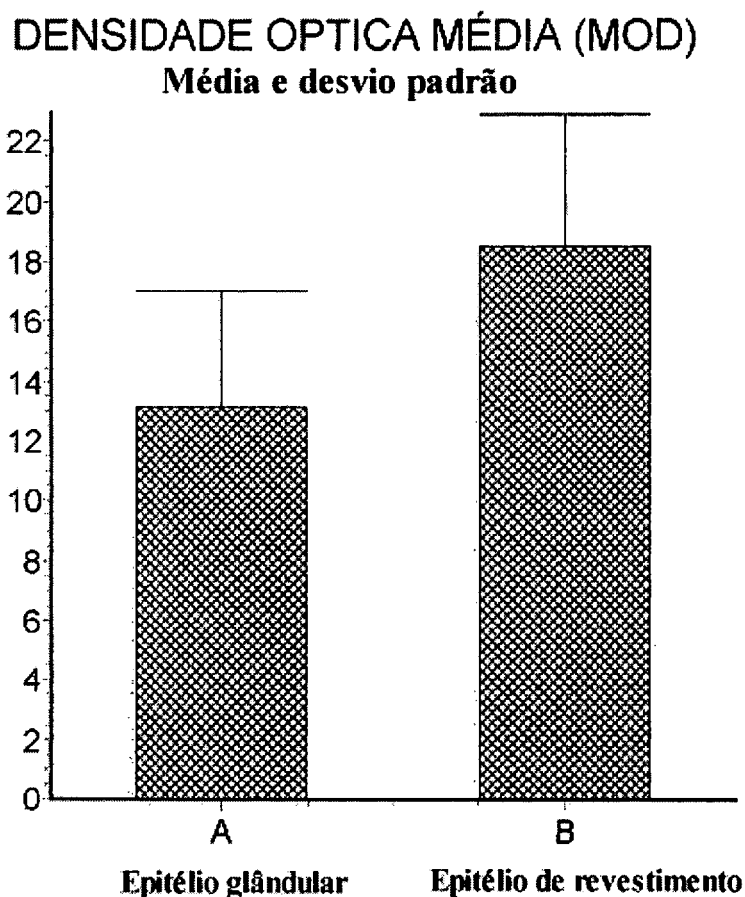
**ÍNDICE DE MARCAGEM (LI%) GALECTINA-1**  
**Média e desvio padrão**



### 4.3 NÍVEL DE EXPRESSÃO DA GALECTINA-1 EM RELAÇÃO A DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA NO ESÔFAGO DE BARRETT SEM DISPLASIA

A média da densidade óptica média no epitélio de revestimento (17,889) foi maior que no epitélio glandular (13,157), havendo diferença significativa com  $p < 0,0001$ . Na análise das densidades ópticas médias o desvio padrão foi de 4,558 no epitélio de revestimento e 3,824 no epitélio glandular. A diferença entre as médias foi igual a 4,732, sendo que o intervalo de confiança da diferença de 95% ficou entre 2,978 a 6,486 (Gráfico 4).

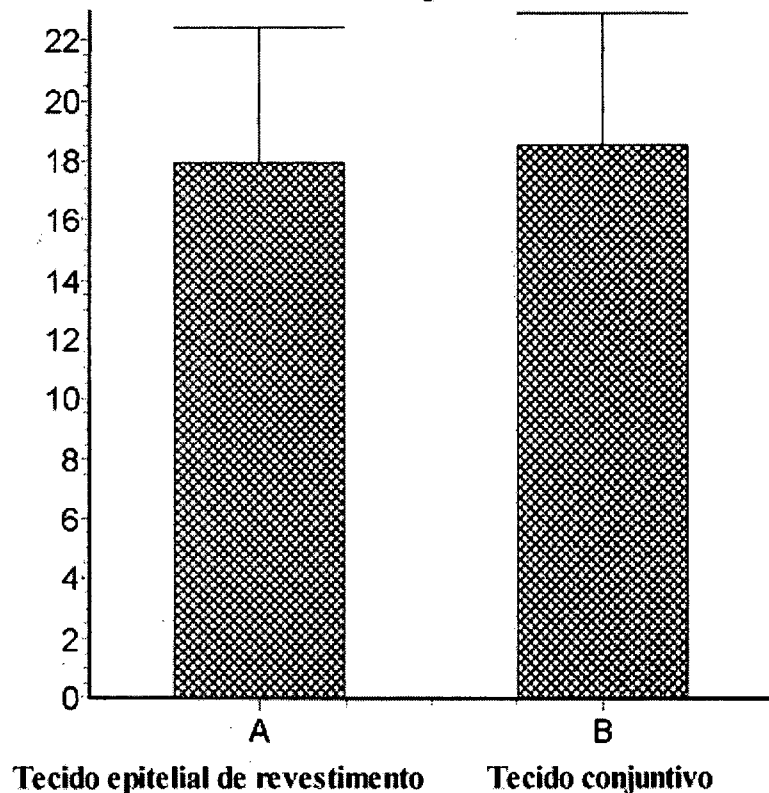
GRÁFICO 4: MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA DO EPITÉLIO GLANDULAR (A) E EPITÉLIO DE REVESTIMENTO (B) MARCADOS COM ANTICORPO ANTI-GALECTINA-1 NO ESÔFAGO DE BARRETT MOSTRANDO QUE A MÉDIA DA DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA NO EPITÉLIO DE REVESTIMENTO FOI SIGNIFICATIVAMENTE MAIOR QUE NO EPITÉLIO GLANDULAR.



A média da densidade óptica média no epitélio de revestimento (17,889) foi semelhante a média da densidade óptica média no tecido conjuntivo (18,509) sendo o valor de  $p=0,5174$ . Na análise das densidades ópticas médias o desvio padrão foi de 4,558 no epitélio de revestimento e 4,416 no tecido conjuntivo. A diferença entre as médias foi igual a 0,620 sendo que o intervalo de confiança da diferença de 95% ficou entre -1,277 e 2,518 (Gráfico 5).

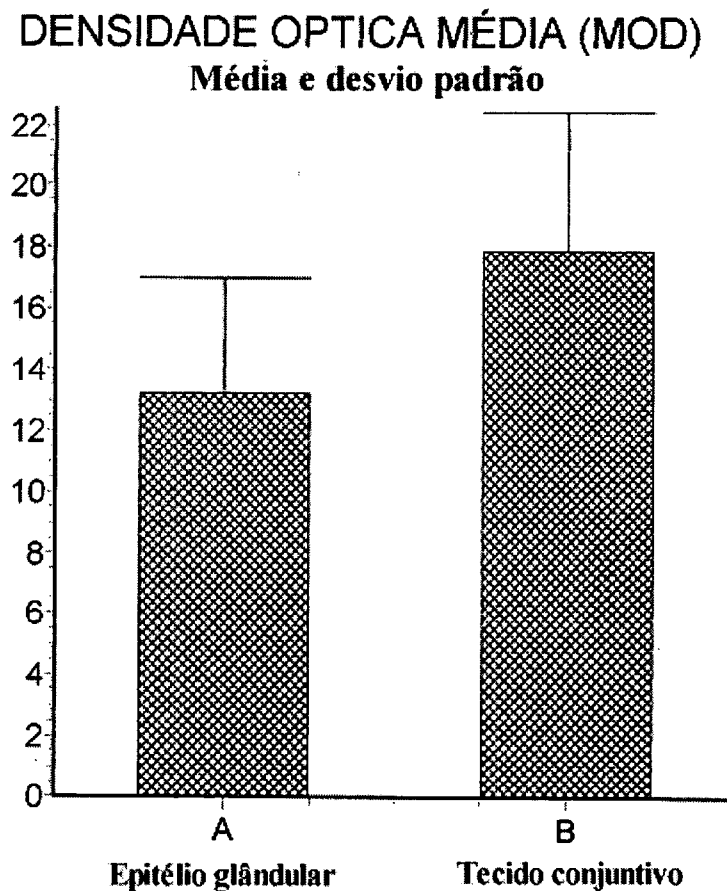
GRÁFICO 5: MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA DO EPITÉLIO DE REVESTIMENTO (A) E TECIDO CONJUNTIVO (B) MARCADOS COM ANTICORPO ANTI-GALECTINA-1 NO ESÔFAGO DE BARRETT MOSTRANDO QUE NÃO HOUVE DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE AS MÉDIAS DA DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA.

### DENSIDADE OPTICA MÉDIA (MOD) GALECTINA-1 Média e desvio padrão



A média da densidade óptica média no tecido conjuntivo (18,509) foi maior que no epitélio glandular (13,157), havendo diferença significativa com  $p < 0,0001$ . Na análise das densidades ópticas médias o desvio padrão foi de 4,416 no tecido conjuntivo e 3,824 no epitélio glandular. A diferença entre as médias foi igual a 5,352, sendo que o intervalo de confiança da diferença de 95% ficou entre 9,055 e 18,386 (Gráfico 6).

GRÁFICO 6: MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA DO EPITÉLIO GLANDULAR (A) E TECIDO CONJUNTIVO (B) MARCADOS COM ANTICORPO ANTI-GALECTINA-1 NO ESÔFAGO DE BARRETT MOSTRANDO QUE A MÉDIA DA DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA NO TECIDO CONJUNTIVO FOI SIGNIFICATIVAMENTE MAIOR QUE NO EPITÉLIO GLANDULAR.



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 ESÔFAGO DE BARRETT

O esôfago de Barrett sem displasia, é definido como uma lesão pré-maligna onde o epitélio escamoso estratificado é substituído pelo epitélio colunar intestinal metaplásico, com a presença de células caliciformes tanto na mucosa como na porção glandular (TOLENTINO et al., 1998).

O processo pelo qual o epitélio escamoso é substituído pela metaplasia intestinal é pouco compreendido. A esofagite estaria associada com inflamação e morte celular, sendo que a adaptação inicial ocorreria através da hiperplasia, a qual compensaria a morte celular causada pelos danos químicos do refluxo. A resposta adaptativa inicial levaria ao aumento na altura da zona de proliferação e na extensão das papilas da camada basal. Como resultado destas modificações, as células desta camada ficariam mais superficiais e expostas aos fatores nocivos, passando então a expressar o fenótipo do epitélio de Barrett. Outra teoria sugere que a origem do desenvolvimento do epitélio de Barrett aconteceria a partir de alterações de células pluripotentes das próprias glândulas submucosas do esôfago que colonizariam o epitélio estratificado danificado, ou ainda a partir da presença de tecido heterotópico no esôfago (FITZGERALD e TRIADAFILOPOULOS, 1998).

A incidência tanto do adenocarcinoma de esôfago como do esôfago de Barrett tem aumentado rapidamente nas últimas duas décadas. Na metaplasia do tipo intestinal, o risco de malignidade para transformação do esôfago de Barrett

em adenocarcinoma é de 1 para 55 a 208 pacientes por ano, sendo pelo menos 40 vezes maior do que a população em geral (TSELEPSIS et al., 2000).

O prognóstico do paciente com este tumor pode melhorar com sua detecção precoce, porém a realização de biópsias endoscópicas regulares para avaliação histológica, não tem apresentado resultados satisfatórios. Em parte, devido as controvérsias em relação a frequência com que elas devem ser realizadas ou pelas divergências interobservador e intraobservador na definição dos graus de displasia. Sendo assim, é necessário definir novos parâmetros que auxiliem no diagnóstico precoce e permitam melhor prognóstico.

As evidências parecem mostrar que o esôfago de Barrett e o adenocarcinoma de esôfago apresentam suas evoluções relacionadas com o refluxo ácido e biliar para o esôfago. Entretanto não está bem claro, qual a extensão da contribuição do refluxo na progressão neoplásica da doença. Os componentes do refluxo podem ser significativamente diferentes, podendo ser constituídos de hipersecreção gástrica, refluxo do suco biliar e pancreático como também do suco duodenal, que tem importante papel na carcinogênese do cólon e do estômago (JANKOWSKI et al., 1999).

Também tem sido demonstrado experimentalmente, que a combinação da bile com a secreção ácida é mais tóxica para as células esofágicas aumentando a possibilidade de anormalidades nucleares e apresentando importantes alterações genéticas a nível celular (FITZGERALD e TRIADAFILOPOULOS, 1998).

Ocorrendo danos celulares, inicia-se uma seqüência de eventos que evoluiriam do epitélio normal para esofagite e desta para a seqüência metaplasia/displasia/carcinoma *in situ*/ carcinoma invasivo. Assim o epitélio de Barrett constitui um excelente modelo para estudo do desenvolvimento molecular do processo evolutivo da metaplasia ao carcinoma (FITZGERALD e TRIADAFILOPOULOS, 1998).

A heterogeneidade da lesão afetando a zona de junção gastroesofágica, associada a alterações moleculares, instabilidade microsatélite, ao aparecimento de clones pré-malignos, a presença de mutação do p53, p16, aneuploidia, inapropriada produção e resposta aos fatores de crescimento e diferenciação celular, aumento dos níveis de ciclo oxigenase resultaria em apoptose reduzida, anormalidade de expressão nas moléculas de adesão que poderiam levar a fenômenos de invasão (JANKOWSKI et al., 1999; TSELEPIS et al., 2000).

O exato mecanismo desta progressão ainda não está totalmente esclarecido. Estas alterações são mais acentuadas nos adenocarcinomas de Barrett, o que suporta uma possível progressão sequencial destes eventos.

Enquanto se tenta determinar os fatores que levariam ao desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago, tem ficado bastante claro que existe um acúmulo de anormalidades genéticas as quais causam desregulada proliferação celular, maior acúmulo de mutações genéticas, formando um círculo vicioso, até que um clone de células desenvolveria a capacidade de invasão.

Este modelo de carcinogênese, explicaria a dificuldade encontrada em se definir um marcador biológico específico para predizer o potencial maligno do esôfago de Barrett.

## 5.2 PAPEL DA GLICOIMUNO-HISTOQUÍMICA

Existem contínuos debates em relação ao valor das biópsias endoscópicas na detecção precoce da malignidade ainda em estágios de cura potencial no adenocarcinoma de Barrett e, até o momento, a evolução histopatológica para displasia permanece como padrão ouro em determinar o potencial neoplásico do esôfago de Barrett (FITZGERALD e TRIADAFILOPOULOS, 1998).

A rápida evolução da metaplasia para o carcinoma metastático pode ocorrer, já que a progressão da metaplasia para o câncer é descrita muitas vezes sem a displasia poder ser observada (TEODORI et al, 1998).

O entendimento das alterações genéticas e moleculares que levam a esofagite progredir para a metaplasia pode auxiliar no esclarecimento de várias dúvidas, tais como a origem das células na metaplasia de Barrett; de como o refluxo ácido ou biliar está relacionado com a frequência do desenvolvimento do neo epitélio; como identificar a natureza do mecanismo que controla a expansão das áreas com metaplasia; como é a história natural da evolução para a displasia; como reconhecer quais os processos biológicos que seriam determinantes essenciais na evolução para os processos de invasão (JANKOWSKI et al.,1999).

Desde a introdução das provas imuno-histoquímicas no início de 1940, estas técnicas estão se desenvolvendo de maneira inquestionável. São métodos relativamente econômicos, adequados a múltiplas propostas da investigação laboratorial e também atrativos pelo fato de permitirem avaliar concomitantemente a localização do antígeno e a morfologia do tecido.

A glicohistoquímica moderna é certamente um domínio da pesquisa que permite o reconhecimento de fenômenos celulares intervindo nos resíduos glicânicos de glicoconjugados (MONSIGNY,1994).

A utilização de marcadores glicoimuno-histoquímicos sobre cortes de tecidos fixados e emblocados em parafina, permite medidas das diferentes expressões dos receptores glicânicos.

O diagnóstico de tumores utilizando a localização imuno-histoquímica das galectinas, de acordo com DANGUY et al. (1998), foi introduzido por GABIUS em 1986. Segundo estes mesmos autores a lectinologia tem contribuído de maneira considerável no estudo da progressão do câncer em outros órgãos.

O interessante na utilização das lectinas, como reagentes glicohistoquímicos, além do alto grau de especificidade também se deve ao fato

de sua análise ser possível, tanto na microscopia óptica como na microscopia eletrônica e computadorizada.

Recentes trabalhos tem caracterizado a possibilidade de se distinguir diferentes subtipos de várias neoplasias através do estudo destas proteínas ligantes a carboidratos. Na área da pesquisa parece existir evidentes benefícios na correlação glicohistoquímica com o diagnóstico, prognóstico e identificação de potencial capacidade metastática dos tumores através de medidas de quantificação destes marcadores (DANGUY et al., 1998).

Análise dos glicoconjugados no epitélio de Barrett e seus diferentes padrões de expressão poderão ser utilizados como marcadores biológicos para diferenciação nas etapas de evolução desta doença.

O estudo das galectinas seria uma interseção entre a glicobiologia e a imunologia e novas estratégias baseadas no reconhecimento dos carboidratos implicarão em respostas que possibilitarão o tratamento de desordens autoimunes, processos inflamatórios, reações alérgicas e disseminação tumoral.

A importância no estudo das moléculas de adesão, está na possibilidade de avaliação da ligação célula-célula e célula-matriz sendo que a expressão anormal destas moléculas, além de relacioná-las com a dissociação celular, levaria a aberração da motilidade e a um favorecimento da carcinogênese e desenvolvimento de metástases.

Para que um marcador possa ser útil clinicamente existe a necessidade da técnica de realização ser simples, não invasiva, ter custo efetivo, alta sensibilidade e especificidade.

Embora uma grande quantidade de marcadores esteja sendo investigada, até agora, nenhum é utilizado de rotina na prática clínica para auxílio na identificação diagnóstica das metaplasias e displasias de baixo e alto grau do esôfago de Barrett.

O princípio dos métodos de coloração glicoimuno-histoquímica são simples, porém a técnica é bastante minuciosa e envolve várias etapas de

incubação, cujos passos devem ser cuidadosamente realizados. É de grande importância o planejamento da seqüência dos reagentes relatados na metodologia para que se evite reações cruzadas (BRANDTZAEG,1998).

A padronização das técnicas permite a obtenção de amostras com distribuição homogênea do marcador, o que possibilita uma melhor análise dos parâmetros avaliados.

O estudo do entendimento da biologia molecular desta doença, pode ser realizado com uma série de outros marcadores. A dificuldade encontrada está em compararem-se os resultados da pesquisa de vários laboratórios e trazê-los para a prática clínica. A razão disto, também se deve ao fato de haver grande variedade nos tipos de tecidos estudados, como por exemplo as diversas formas de obtenção do material provenientes de arquivo, tecido congelado ou células de cultura.

Muitas vezes as pesquisas são realizadas com pequenas amostras, tendo a necessidade de se estabelecer um banco central de dados e a realização de estudos multicêntricos bem definidos.

### 5.3 ESCOLHA DA MICROSCOPIA COMPUTADORIZADA ASSISTIDA

A ciência da anatomia patológica tem evoluído em vários campos, e um dos objetivos é a caracterização da evolução de lesões com comportamento de progressão tumoral. A citometria de imagem, é especialmente útil pois permite a combinação de informações tanto da observação histológica como molecular.

A história da citometria de imagem está associada com a história da evolução da patologia, hoje com um interesse especial no estudo da especificidade e sensibilidades de novos marcadores. Estes passam a ser quantificados de maneira precisa e dinâmica contrapondo-se com as técnicas anteriores, estáticas, apenas baseadas na análise morfológica .

A citometria de imagem teve desenvolvimento significativo depois dos primeiros trabalhos de CASPERSON (1936, 1950), que a partir da coloração específica do ADN que FEULGEN E ROSENBECK desenvolveram em 1924, pôde-se quantificar o ADN nuclear por meio de microfotômetro de luz visível.

As restrições encontradas no desenvolvimento desta técnica nos anos de 60 a 70 estavam relacionados com o alto custo dos aparelhos de informática e com a falta de *software* de aplicabilidade prática.

A partir de 1980 técnicas de computação permitiram que a imagem captada fosse transformada em imagem numérica com maior velocidade, custo razoável e tratamento estatístico dos dados. Nos últimos dez anos existe uma proposta de se utilizar as técnicas de análises informatizadas de imagem como método auxiliar nas definições de diagnóstico, terapêutica e tratamento (SCHULERUD et al., 1998).

No campo do diagnóstico, permite detecção precoce dos tumores através da análise nuclear e estudos de ploidia. No prognóstico, através da observação do comportamento biológico do tumor utilizando-se ferramentas como por exemplo técnicas imuno-histoquímicas.

Estas classificações estão sujeitas a uma série de variáveis como técnica artesanal na confecção do material anátomo-patológico, diferenças conceituais de classificação e habilidade dos patologistas que utilizam-se de critérios subjetivos de avaliação.

Encorajados pelos problemas de subjetividade nos diagnósticos histopatológicos, grupos de pesquisa procuram encontrar novos e objetivos métodos de análise (FITZGERALD e TRIADAFILOPOULOS, 1998; BRONCKART et al., 1999; JANKOWSKI et al., 1999).

A citometria pode ser de grande utilidade no afastamento do caráter subjetivo da interpretação de cortes histológicos onde existe a dificuldade de se obter uma classificação. A técnica permite real ajuda, por exemplo, quando utilizam-se programas que quantificam em porcentagem áreas marcadas por

técnicas imuno-histoquímicas.

A amostra pode ser analisada e medida repetidamente como também observada a relação espacial dos componentes do tecido, os quais podem ser analisados separadamente (COHEN et al., 1992; OBERHOLZER et al., 1996).

A possibilidade de preservar o padrão de arquitetura dos tecidos, é uma das vantagens da citometria de imagem, particularmente importante na análise de espécimes com pequenas áreas de tecidos doentes ou com variados padrões histológicos na mesma região, como ocorre nas lesões pré-malignas ou nos carcinomas in situ (SUSNIK et al., 1995)

A citometria de imagem permite rapidez no processo de leitura das lâminas e a realização de métodos estatísticos de alta performance.

O aprendizado para leitura das observações é necessário para se conhecer os comandos do programa utilizado, e possibilitar a interpretação dos resultados.

É preciso que se entenda a importância dos processos de padronização da leitura, do controle de qualidade e da reprodutibilidade do padrão das análises para obtenção de resultados fidedignos.

A análise computadorizada baseada na imagem de lesões pré-malignas, ainda encontra-se em fase de investigação e é claramente necessário definir os métodos de avaliação utilizados para que se possa comparar resultados. Estes passos foram realizados neste estudo, já que se tratava da implantação do *software Imunno* no Instituto de Pesquisas Médicas do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba/Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná. Seguiram-se todas as recomendações do Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade Livre de Bruxelas, onde a autora fez estágio sob orientação do Prof. Robert Kiss.

O desenvolvimento de protocolos para utilização do *software Imunno* permitirá que se execute estudos com ótima padronização, o que simplifica a reprodutibilidade e permite maior objetividade.

O sistema computadorizado de análise de imagem microscópica é de fácil instalação, funcionabilidade, manutenção e ainda permite a possibilidade de realizar-se a telecitologia e telepatologia, através da qual se transmite as imagens captadas para outros centros, com o propósito de diagnóstico, consultas ou educação a distância. O Instituto de Pesquisas Médicas do HUEC/FEMPAR está com esta tecnologia em fase de implantação. Será possível obter modelos de padronizações ideais, arquivos de documentação com grande número de dados, protocolos através de teleconsultas, salvaguardando a ética e a confidencialidade.

#### 5.4 UTILIZAÇÃO DOS BLOCOS DE PARAFINA

É importante reconhecer que o sucesso no campo da glicoimuno-histoquímica, não é meramente um problema de técnica de coloração.

É fator determinante para a realização das provas histológicas, que a antigenicidade do corte de tecido ou da preparação celular seja preservada. O resultado final da reação imuno-histoquímica é dependente da maneira como o material é manuseado.

Os vários passos da obtenção do tecido, bem como as condições de fixação são extremamente importantes pois podem alterar os componentes que serão analisados (GIMÉNEZ et al., 1998).

No planejamento das coletas das amostras, deve-se seguir técnica adequada de conservação para que o tecido biopsiado permaneça o mais íntegro possível, as biópsias devem ser em quantidades suficientes para permitir execução das técnicas de coloração glicoimuno-histoquímica, devendo-se ter cuidado no controle de qualidade dos produtos utilizados nas técnicas.

O mecanismo de fixação pela formalina é lento, mesmo havendo penetração rápida nos tecidos. Para completa fixação é necessário um período de

24 horas. Recomenda-se que seja padronizado ao máximo a solução tampão, inclusive seu pH (formol tamponado) e que o tempo de fixação do tecido seja adequado, não sendo inferior a 24 horas nem superior a 48 horas.

O procedimento de conservação adequado deve permitir a imobilização dos antígenos, preservação da sua antigenicidade, possibilitar ótimo acesso dos anticorpos reagentes, manter as estruturas dos tecidos e células íntegras para a análise tanto a nível de microscopia óptica, eletrônica como na imagem computadorizada (BRANDTZAEG et al., 1998).

Nos laboratórios de patologia, os cortes histológicos fixados em formalina e embebidos em parafina, tem-se constituído padrão ouro por mais de cem anos, como material para realização de várias técnicas de coloração, inclusive imuno-histoquímicas.

A metodologia utilizada no manuseio dos blocos de parafina neste estudo, obedeceu a rotina baseada em serviço de excelência na área de glicoimuno-histoquímica e citometria de imagem no Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade Livre de Bruxelas (BRONCKART et al., 1999; DANGUY et al., 1999; CAMBY et al., 1999; FRANÇOIS et al., 1999).

## 5.5 ANÁLISE DA GALECTINA-1 NO ESÔFAGO DE BARRETT SEM DISPLASIA

Na literatura consultada não havia nenhuma publicação sobre a expressão da galectina-1 no esôfago de Barrett.

A expressão da galectina-1, foi observada no epitélio de revestimento, epitélio glandular e no tecido conjuntivo do esôfago de Barrett sem displasia, apresentando uma forte expressão no tecido epitelial de revestimento e no tecido conjuntivo.

Nos últimos anos as funções intracelulares das proteínas ligantes a galactosídeos tem sido ampliadas, e não estão limitadas apenas à superfície celular, mas também ao meio extra-celular o que sugere que as galectinas podem ser externalizadas por mecanismos de secreção não clássicos.

Embora outros estudos mostrem que o principal sítio de localização da galectina-1 seja o tecido conjuntivo, a possibilidade de contribuição das células epiteliais deve ser considerada .

Com outro método de análise da presença de galectina-1, AKIMOTO et al. (1995), utilizando microscopia óptica e eletrônica observaram a expressão de galectina-1 na pele humana, localizada na epiderme e derme. Concluiu que a pele humana normal produz galectina-1. Este estudo sugeriu que a galectina é importante na interação entre as células e a matriz celular. Define-se aqui a perspectiva de que as células epiteliais produzam galectina-1, o que deverá ser comprovado por outros estudos.

#### 5.6 NÍVEL DE EXPRESSÃO DA GALECTINA-1 EM RELAÇÃO AO ÍNDICE DE MARCAGEM NO ESÔFAGO DE BARRETT SEM DISPLASIA

A porcentagem da área tecidual que expressou o marcador apresentou uma diferença significativa ( $p = 0,0004$ ) entre a média do índice de marcagem do epitélio de revestimento que teve maior porcentagem de área marcada do que o epitélio glandular. O mesmo foi observado na avaliação da diferença do índice de marcagem entre tecido conjuntivo, com maior porcentagem de superfície marcada que o epitélio glandular ( $p < 0,0001$ ). Isto indica que as áreas com maior superfície de marcação no esôfago de Barrett sem displasia ocorreu no epitélio de revestimento e no tecido conjuntivo da amostra analisada.

A comparação entre estudos que avaliam o índice de marcação em porcentagem da galectina-1 nos tecidos, requer a utilização de sistema informatizado de imagem para obtenção numérica desses valores. Isto foi possível com a metodologia empregada não havendo estudos que tenham sido realizados no esôfago de Barrett.

Utilizando uma metodologia semelhante, CINDOLO et al. (1999) observaram o índice de marcação aumentado da galectina-1 nas células de tumores de próstata com diferentes graus de diferenciação quando comparado com o epitélio normal. Embora também estudando outros tecidos, SCHWARZ JR. et al. (1999) utilizaram a citofotometria de imagem para o estudo de leiomioma e leiomiossarcoma não observando diferenças comparativas na expressão da galectina-1 no tecido muscular liso.

#### 5.7 NÍVEL DE EXPRESSÃO DA GALECTINA-1 EM RELAÇÃO A DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA NO ESÔFAGO DE BARRETT SEM DISPLASIA

O estudo nessa fase objetivou avaliar a revelação da intensidade de expressão do marcador no tecido analisado, no epitélio de revestimento, epitélio glandular e tecido conjuntivo do esôfago de Barrett.

Assim constatou-se a diferença da média da densidade óptica média entre epitélio de revestimento, que apresentou maior intensidade de marcação que o epitélio glandular, de forma significativa ( $p < 0,0001$ ). Na comparação entre a marcação do tecido conjuntivo e epitélio glandular, houve maior intensidade de marcação no tecido conjuntivo ( $p < 0,0001$ ). Esta constatação foi realizada em amostras homogêneas de biópsias de esôfago de Barrett, pois o critério de inclusão no estudo, definia a amostra tecidual com ausência de displasia.

Utilizando técnica glicoimuno-histoquímica e a análise com sistema

informatizado de imagem, a semelhança do presente estudo, CINDOLO et al. (1999) observaram a expressão aumentada da galectina-1 nos tumores de próstata quando comparado com o epitélio prostático normal e SCHWARZ JR. et al. (1999) não observaram diferenças na expressão da galectina-1 quando compararam em tecido muscular liso de leiomiomas e leiomiossarcomas no útero humano.

Analisando a intensidade de marcação em outros tecidos, SANJUAN et al. (1997) consideraram que a expressão da galectina-1 no aparelho digestório é pouco conhecida. Ao estudar a progressão do câncer colorretal, observou através da imuno-histoquímica com microscopia óptica que esta proteína tinha pouca ou nenhuma expressão nas células epiteliais do cólon, mas estava presente nas células do tecido conjuntivo da mucosa do cólon. Havia uma progressiva expressão da galectina-1 no tecido conjuntivo a medida que avaliava-se a mucosa normal, adenoma e o carcinoma de cólon. O papel da super expressão da galectina-1 no tecido conjuntivo, na evolução do câncer colorretal é desconhecido. Estas conclusões, embora em tecidos de órgão diferente da análise do autor, referendam a necessidade de se aumentarem as pesquisas na identificação da localização da presença da galectina-1 nos tecidos e órgãos.

A super expressão desta galectina também foi observada em alguns carcinomas de tireóide, quando comparadas com lesões benignas de tireóide e tecido tireoideano normal (CHIARIOTTI et al., 1995).

Nos estudos de XU et al. (1995) não foi observada a expressão da galectina-1 no tecido tireoideano normal e adenomas benignos de tireóide e houve forte e uniforme expressão nos tumores malignos de origem epitelial, isto é carcinomas foliculares e papilares da tireóide. Os autores consideraram expressivo no estudo o fato do aumento da galectina-1 estar associado ao aumento da malignidade do tumor. Entretanto, não ficou claro se o aumento da expressão da galectina-1 ocorreu em consequência da transformação neoplásica, ou se a galectina exerceu papel na transformação do fenótipo.

Resultados controversos tem sido relatados, em relação a galectina-1 exercer papel com efeito positivo ou negativo sobre a adesão celular. (PERILLO et al., 1997)

Serão necessários estudos para elucidar o papel preciso desta molécula na progressão do fenômeno metaplasia-displasia- adenocarcinoma do esôfago de Barrett.

## 5.8 PERSPECTIVAS FUTURAS

A identificação de novos marcadores seria útil na prática clínica, pois permitiriam estratificar os pacientes de alto ou baixo risco de transformação maligna para adenocarcinoma. Seria assim possível obterem-se programas de acompanhamento mais efetivos, os quais reduziriam os riscos da progressão tumoral, minimizariam o desconforto dos pacientes e teriam custos menores.

As funções antagônicas entre a galectina-1 e a galectina -3 tem sido assinaladas através de estudos que mostram o papel indutor de apoptose das células T e a prevenção da morte celular exercida pela galectina-3. Embora este paradigma seja interessante ele não deve ser considerado como um princípio geral. Além disso a participação de outros membros da família das galectinas estão envolvidos no controle da morte celular e devem ser considerados .

A elucidação de mecanismos moleculares envolvendo a função das galectinas irá promover novas perspectivas na pesquisa médica, no diagnóstico e prognóstico de doenças como também na terapêutica clínica. A possibilidade de regular a apoptose das células T seria benéfico na auto-imunidade e utilizando-se anti-corpos que inibissem a expressão da galectina-1 poderia ser possível diminuir o potencial metastático das células tumorais (RABINOVICH et al., 1998).

## 6 CONCLUSÕES

1. A expressão da galectina- 1 no epitélio de Barrett, sem displasia, foi observada no epitélio de revestimento, epitélio glandular e tecido conjuntivo.

2. A quantificação da porcentagem de marcação da galectina-1 no esôfago de Barrett mostrou uma diferença significativa entre o índice de marcagem do epitélio de revestimento e do tecido conjuntivo quando comparados com o epitélio glandular. Apresentando também diferença significativa entre a média da densidade óptica média do tecido conjuntivo e do tecido epitelial de revestimento quando comparados com o tecido glandular.

3. A metodologia desenvolvida permite a aplicação desta técnica em rotinas diagnósticas para quantificar marcadores imuno-histoquímicos no esôfago de Barrett.

## ANEXO 1- DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA

TABELA 1. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA COM AS INICIAIS DOS PACIENTES, IDADE E SEXO.

OBSERVAÇÃO	INICIAIS PACIENTES	IDADE EM ANOS	SEXO
01	L.M.L.C	43	F
02	L.C.M.A	31	F
03	E.C.B.M	26	F
04	M.R	20	M
05	E.L.O	51	F
06	C.V.P	70	F
07	F.M.C	30	F
08	M.R.Z	15	F
09	E.V	33	M
10	P.M.A	28	M
11	L.J.M	35	M
12	M.P.T	43	F
13	M.N.F	71	F
14	T.H.O	22	M
15	H.I	53	M
16	E.L.P	41	F
17	D.A	63	F
18	N.P.O	30	F
19	M.B	28	F
20	A.A.M	34	M
21	E.L.P	38	M
22	W..H.G	27	M
23	R.S	67	M
24	F.A.S	38	M
25	C.M.V	46	F
26	E.L	40	M
27	C.V	41	M
28	C.D.B	42	F
29	N.J.A	57	M
30	H.A	36	M
31	M.S	57	M
32	T.C.B	58	F
33	E.L.V	25	M
34	R.R	36	M
35	L.B	50	F
36	V.F	43	M
37	M.A.G	50	M
38	F.H	55	M
39	S.C.V	48	F
40	M.R.V	65	F
41	A.A	34	M
42	U.J	39	M
43	D.R.A	53	M
44	S.G	46	F
45	N.S.C	47	M
46	B.Z	54	M
47	V.S.C	50	F
48	T.P	60	M

TABELA 1. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA COM AS INICIAIS DOS PACIENTES, IDADE E SEXO.(CONT.)

OBSERVAÇÃO	INICIAIS PACIENTES	IDADE EM ANOS	SEXO
49	M.C.M	39	M
50	N.P1	50	M
51	R.A.A	49	M
52	D.B	45	F
53	L.F.K	39	M
54	V.L.O	31	F
55	C.F.S	49	M
56	G.A	44	F
57	B.M.L	25	M
58	C.M.L	33	F
59	M.V.O	26	M
60	C.A.L	25	M

## ANEXO 2

## TABELAS DOS PARÂMETROS ANALISADOS

## ÍNDICE DE MARCAGEM

TABELA 1: ÍNDICE DE MARCAGEM

ESTRUTURAS	Nº CASOS	MÉDIA (%)	ERRO PADRÃO	DESVIO PADRÃO
EPITÉLIO	37	93,459	2,541	15,455
REVESTIMENTO				
EPITÉLIO	54	80,916	2,219	16,304
GLANDULAR				
TECIDO	54	94,637	0,784	5,761
CONJUNTIVO				

## DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA

TABELA 2 : DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA

ESTRUTURAS	Nº CASOS	MÉDIA(%)	ERRO PADRÃO	DESVIO PADRÃO
EPITÉLIO	37	17,889	0,749	4,558
REVESTIMENTO				
EPITÉLIO	54	13,157	0,520	3,824
GLANDULAR				
TECIDO	54	18,509	0,600	4,416
CONJUNTIVO				

### ANEXO 3 – VALORES DO ÍNDICE DE MARCAGEM

QUADRO 1: ÍNDICE DE MARCAGEM

OBS	EPITÉLIO GLANDULAR	EPITÉLIO REVESTIMENTO	TECIDO CONJUNTIVO
1	60,6	96,4	98,6
2	87,5		95,4
3	84,8	98,8	97,6
4	94,8	99,4	97,9
5	88,9	97,1	96,1
6	74,2	97,5	91,4
7	86	99,1	97,5
8	84		97,1
9	79,3	97,6	92,6
10	81,2		98,1
11	73,4	98,9	98,7
12	75,3		98,3
13	99,2	99,4	99,1
14	93,5		96
15	92,6	99,2	94,4
16	93,1		99,4
17	89	98,8	98,7
18	94,6	98,3	96,9
19	98		90,2
20	98,8	99,4	98,4
21	92,9		97,5
22	98	99,3	98,4
23	95,9	98,4	99,4
24	75,2	95,9	90,6
25	86,1	94,4	97,2
26	81,9		94,9
27	69,7		97,6
28	88,3	97,6	97,6
29	78,8	98,6	94,7
30	93,9	99,3	98,3
31	79,42	95,2	95,4
32	78,3	97	91,6
33	97,2		98,8
34	84,2	99	99,1
35	51,2	96,8	74,4
36	92,8	99,2	98,8
37	94	98,2	97,7
38	90,3	89,8	92,1
39	61,3		88,8

---

40	77,6	92,3	91,9
41	44,7	9,2	96,6
42	80,1	96,4	94,8
43	65,2	99,3	69,5
44	59		94,5
45	77,4		95,9
46	91	98	95,3
47	94,6		98,6
48	77,4	70,3	87
49	34	79	88,8
50	59,6	87,5	89,6
51	99,6		98,8
52	70	97,9	86,3
53	95,4		98
54	28,8	88,8	87,4

## ANEXO 4 – VALORES DA DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA

QUADRO 2: DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA

OBS	EPITÉLIO GLANDULAR	EPITÉLIO REVESTIMENTO	TECIDO CONJUNTIVO
1	12,5	25,6	26,4
2	13		20,4
3	16	17,7	22,4
4	18,8	22,9	22,8
5	12	13,5	16,2
6	13,3	17,2	16
7	10,6	19,6	17,7
8	13		19,8
9	12,9	18,6	15,4
10	18		19,3
11	17,3	20,6	26,7
12	9,1		12,1
13	18,4	22,8	16,5
14	16,9		16,1
15	15,8	21,1	17,6
16	12,5		21,5
17	8	13,8	21,3
18	15,6	22,7	19,3
19	17,5		17,4
20	16,1	19,7	20,7
21	15,3		18,1
22	17,3	18,9	21,4
23	20,9	24	27,5
24	11	15,3	18,4
25	12,9	20,5	16,8
26	11,7		22,8
27	8,7		11
28	6,2	13	15,6
29	11	22	20,7
30	11,6	15,2	17,7
31	3,1	7,1	9
32	12	12,8	16,5
33	13,1		21
34	11,5	11,2	11,3
35	21,8	24,9	25,9
36	14,3	21,7	25,6
37	14,7	17,6	18,5
38	14,4	15,5	19,4
39	9,1		18,1
40	12,3	14,9	22

---

41	11,2	10,9	14,1
42	12,1	22,87	10,2
43	16,4	19,6	19,6
44	12,6		19,7
45	7,1		15,8
46	15	19,5	14,6
47	16,2		19,1
48	10,8	16,3	16,3
49	11,4	14,8	17
50	12,7	8,7	9,3
51	16,3		27,8
52	6,2	21,7	13,9
53	13,5		19,8
54	14,3	17,2	19,3

## GLOSSÁRIO

BALB	linha celular de cultura de fibroblastos derivados do embrião de ratos.
Biotina	composto de baixo peso molecular utilizado como coenzima. Muito útil em técnicas de laboratório, como marcador covalente para proteínas, permitindo sua detecção usando a avidina, uma proteína do ovo, que se liga fortemente a biotina.
<i>Blotting</i>	técnica bioquímica na qual macromoléculas (proteínas, ADN ou ARN ) separadas em géis de agarose ou poliacrilamida são transferidas e imobilizadas em uma membrana de papel para subsequente análise.
Células HeLa	linha de células epiteliais humanas que crescem intensamente em cultura, derivadas de um carcinoma cervical humano.

<i>Chimera</i>	composto que apresenta dois ou mais diferentes genótipos. A palavra deriva da mitologia grega que se refere a um monstro cujos pais eram <i>Typhon</i> e <i>Echidna</i> e era constituído por três partes: cabeça de leão, corpo de cabra, e um rabo de cobra.
Dalton	unidade de massa molecular. Aproximadamente igual a massa do átomo de hidrogênio ( $1,66 \times 10^{-24}$ gr).
Determinante	antigênico (epítopo) : região específica de uma molécula que se liga a um anticorpo ou a um receptor de células T.
Dímero	composto produzido pela combinação de duas moléculas semelhantes.
Domínio	porção de uma proteína que possui uma estrutura terciária particular. Em grandes proteínas a cadeia de domínio está conectado a outros domínios através de pequenas regiões flexíveis de polipeptídeos.

Exon	segmento de um gene eucarioto que consiste da ADN que codifica para uma seqüência de nucleotídeos no ARN mensageira; um exon pode codificar aminoácidos de uma proteína. Geralmente adjacente a um segmento de ADN não codificante chamado de íntron.
Expressão	produção de um fenótipo, que pode ser observado, por um gene normalmente pela síntese de uma proteína.
Glicoproteína	qualquer proteína contendo uma ou mais cadeias de oligossacarídeo ligadas covalentemente.
Glicosaminoglicana	polissacarídeo longo linear, composto pela repetição de um par de açúcares, dos quais um açúcar é sempre aminado ligado a um núcleo protéico na matriz extra celular, as proteoglicanas. Ex. ác. hialurônico e heparina.
Integrina	membro de uma grande família de proteínas transmembranas envolvidas na adesão de células à matriz extracelular.
Lectina	proteína que se liga fortemente a um açúcar específico.

Ligação covalente	ligação química estável entre dois átomos, produzida pelo compartilhamento de um ou mais pares de elétrons.
Ligante	qualquer molécula que se liga a um sítio específico em uma proteína ou em outra molécula.
Marcador	grupo químico ou átomo radioativo adicionado a uma molécula, para permitir o acompanhamento desta através de uma reação bioquímica ou para localizá-la espacialmente.
Molécula de adesão celular	proteína na superfície de uma célula animal que medeia ligação célula-célula.
Peso molecular	numericamente o mesmo que massa molecular relativa de uma molécula, expressa em daltons.
Ponte de dissulfeto	ligação covalente formada entre dois grupos sulfidril de cisteína. É uma maneira comum de unir duas proteínas ou porções diferentes da mesma proteína no espaço extracelular. (-S-S)
Proteoglicana	moléculas que consiste de uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanas (GAG) ligadas ao núcleo de uma proteína.

Proto	primeiro de uma série.
<i>Tandem</i>	seqüências adjacentes alinhadas na mesma orientação, como os vagões de um trem.
Transfecção	introdução de uma molécula de DNA estranha em uma célula eucariótica, normalmente seguida pela expressão de um ou mais genes presentes no DNA recém introduzido.
<i>Xenopus laevis</i>	(sapo com garras da África do Sul), espécie de sapo muito empregado em estudos de desenvolvimento inicial de vertebrados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHMED, H.; POHL, J.; FINK, N.E.; STROBEL, F.; VASTA, G.R. The primary structure and carbohydrate specificity of a beta-galactosyl-binding lectin from toad (*Bufo arenarum* Hensel) ovary reveal closer similarities to the mammalian galectin-1 than to the galectin from the clawed frog *Xenopus laevis*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.271, n.51, p. 33083-33094, 20 Dec. 1996.
2. AKIMOTO, Y.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; HIRANO, H. Expression of the endogenous 14-kDa beta-galactoside-binding lectin galectin in normal human skin. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v.280, n.1, p.1-10, Apr. 1995.
3. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. A superfície celular é recoberta com resíduos de açúcares. In\_\_\_\_\_. **Biologia molecular da célula**. 3.ed. Porto Alegre : Artes Médicas, 1997.
4. BAUM, L.G.; PANG, M.; PERILLO, N.L.; WU, T.; DELEGEANE, A.; UITTENBOGAART, C.H.; FUKUDA, M.; SEILHAMER, J.J. Human thymic epithelial cells express and endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. **J. Exp. Med.**, New York, v.181, n.3, p. 877-887, 1 Mar. 1995.
5. BAUM, L.G.; SEILHAMER, J.J.; PANG, M.; LEVINE, W.B.; BEYNON, D.; BERLINER, J.A. Synthesis of an endogenous lectin, galectin-1, by human endothelial cells is up-regulated by endothelial cell activation. **Glycoconj. J.**, London, v.12, n.1, p. 63-68, Feb. 1995.
6. BRANDTZAEG, P. The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 216, p. 49-67, 1998.
7. BRINCK, U.; KORABIOWSKA, M.; BOSBACH, R.; GABIUS, H.J. Detection of inflammation-and-neoplasia-associated alterations in human large intestine using plant/invertebrate lectins, galectin-1 and neoglycoproteins. **Acta Anat.**, Basel, v.161, n.1-4, p.219-233, 1998.
8. BRONCKART, Y.; NAGY, N.; DECAESTECKER, C.; BOUCKAERT, Y.; REMMELINK, M.; GIELÉN, I.; HITTELET, A.; DARRO, F.; PECTOR, J.C.; YEATON, P.; DANGUY, A.; KISS, R.; SALMON, I. Grading dysplasia in colorectal adenomas by means of the quantitative binding pattern determination of *Arachis hypogaea*, *Dolichos biflorus*, *Amaranthus caudatus*, *Maackia amurensis*, and *Sambucus nigra* agglutinins. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v.30, n.10, p. 1178-1191, Oct. 1999.

9. BRUGAL, G.; CHASSERY, J.M. Un nouveau système d'analyse densitométrique et morphologique des préparations microscopiques. **Histochemistry**, Berlin, v.52, p. 241-258, 1997
10. BRÜLE, F.A. VAN DEN; BUICU, C.; BERCHUCK, A.; BAST, R.C.; DEPRez, M.; LIU, F.T.; COOPER, D.N.; PIETERS, C.; SOBEL, M.E.; CASTRONOVO, V. Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1 and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v.27, n.11, p. 1185-1191, Nov.1996.
11. BRULE, F.A. VAN DEN.; BUICU, C.; BALDET, M.; SOBEL, M.E.; COOPER, D.N.; MARSCHAL, P.; CASTRONOVO, V. Galectin-1 modulates human melanoma cell adhesion to laminin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.209, n.2, p. 760-767, 17 Apr. 1995.
12. BRULE, F.A. VAN DEN; FERNANDEZ, P.L.; BUICU, C.; LIU, F.T.; JACKERS, P.; LAMBOTTE, R.; CASTRONOVO, V. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis. **Dev. Dyn.**, New York, v.209, n.4, p.399-405, Aug. 1997.
13. CAMBY, I.; NAGY, N.; LOPES, M.B.; SCHÄLER, B.W.; MAURAGE, C.A.; RUCHOUX, M.M.; MURMANN, P.; POCHET, R.; HEIZMANN, C.W.; BROTHL, J.; SALMON, I.; KISS, R.; DECAESTECKER, C. Supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas are characterized by a differential expression of S100 proteins. **Brain Pathol.**, Zurich, v.9, p.1-9, 1999.
14. CASPERSON, T. A universal ultramicrospectograph for the optical range. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v.1, p. 595-612, 1950.
15. CASPERSON, T. Über den Chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes. **Skand. Arch. Physiol.**, v.73, suppl.8, p.1-151, 1936.
16. CHAMMAS, R. Aspectos fisiopatológicos da disseminação de sarcomas. **Acta Oncol. Bras.**, 1999. [http:// www.hcanc.org.br](http://www.hcanc.org.br)
17. CHIARIOTTI, L.; BERLINGIERI, M.T. ; BATTAGLIA, C.; BENVENUTO, G.; MARTELLI, M.L.; SALVATORE, P.; CHIAPPETTA, G.; BRUNI, C.B.; FUSCO, A. Expression of galectin-1 in normal human thyroid gland and in differentiated and poorly differentiated thyroid tumors. **Int. J. Cancer**, New York, v.64, n.3, p. 171-175, 22 Jun. 1995.
18. CHO, M.; CUMMINGS, R.D. Characterization of monomeric forms of galectin-1 generated by site-directed mutagenesis. **Biochemistry**, Washington, D.C., v.35, n.40, p. 13081-13088, 8 Oct.1996.
19. CHO, M.; CUMMINGS, R.D. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.270, n.10, p.5207-5212, 10 Mar. 1995.

20. CINDOLO, L.; BENVENUTO, G.; SALVATORE, P.; PERO, R.; SALVATORE, G.; MIRONE, V.; PREZIOSO, D.; ALTIERI, V.; BRUNI, C.B.; CHIARIOTTI, L. Galectin-1 and galectin-3 expression in human bladder transitional-cell carcinomas. **Int. J. Cancer**, New York, v.84, n.1, p. 39-43, Feb.19, 1999.
21. COHEN, C.; WALKER, B. F. ; SOLOMON, A. R.; DEROSE, P. B. DNA ploidy and cell cycle analysis in ear malignant melanoma by flow and image cytometry. **Anal. Quant. Cytol. Hystol.**, v.14, n.2, p. 81-88, Apr. 1992.
22. COOPER, D.N.W. Galectin-1: secretion and modulation of cell interactions with laminin. **Trends Glycosci. Glycotechnol.**, v.9, n.45, p. 57-67, Jan. 1997.
23. CORNILLOT, J.D.; PONTET, M.; DUPUY, C.; CHADLI, A.; CARON, M.; JOURBERT-CARON, R.; BOURIN, P.; BLADIER, D. Production and characterization of a monoclonal antibody able to discriminate galectin-1 from galectin-2 and galectin-3. **Glycobiology**, Oxford, v.8, n.5, p.425-432, May 1998.
24. DANGUY, A. Perspectives in modern glycohistochemistry. **Eur. J. Histochem.**, Pavia, v.39, n.1, p. 5-14, 1995.
25. DANGUY, A.; DECAESTECKER, C.; GENTEN, F.; SALMON, I.; KISS, R. Applications of lectins and neoglycoconjugates in histology and pathology. **Acta Anat.**, Basel, v.161, n.1-4, p. 206-218, 1998.
26. FERRANDO I.; FERRANDO, J.; REIG, G.' NAVARRO, P.; LLOMBART, A.; MINGUEZ, M.; MORA, F.; BENAGES, A. Esôfago de Barrett. Marcadores para diferenciar grupos de riesgo. **Rev. Esp. Enferm. Dig.**, Madrid, v. 90, n.6, p. 431-435, 1998.
27. FITZGERALD, R.C.; TRIADAFILOPOULOS, G. Recent developments in the molecular characterization of Barrett's esophagus. **Dig. Dis** , Basel, v.16, p. 63-80, 1998.
28. FRANÇOIS, C.; DECAESTECKER, C ; DE LATHOUWER, O.; MORENO, C.; PELTIER, A.; ROUMEGUERE, T.; DANGUY, A.; PASTEELS, J.L.; WESPES, E.; SALMON, I.; VAN VELHOVEN, R.; KISS, R. Improving the prognostic value of histopathological grading and clinical staging in renal cell carcinomas by means of computer-assisted microscopy. **J. Pathol.**, Chichester, v.187, n.3, p. 313-320, Feb. 1999.
29. GABIUS, H.J.; GABIUS, S. **Glycosciences**; status and perspective. Weinheim : Chapman & Hall, 1996.
30. GIMÉNEZ, A.; MINGUELA, A.; PARRILLA, P.; BERNEJO, J.; PÉREZ, D.; MOLINA, J.; GARCIA, A.M.; ORTIZ, M.A.; ÁLVAREZ, R.; de HARO, L.M. Flow cytometric DNA analysis and p53 protein expression show a good correlation with histologic findings in patients with Barrett's esophagus. **Cancer**, New York, v.83, n.4, p. 641-651, Aug.15, 1998.

31. HAFER-MACKRO, C.; PANG, M.; SEILHAMER, J.J.; BAUM, L.G.  
Galectin-1 is expressed by thymic epithelial cells in myasthenia gravis.  
**Glycoconj. J.**, London, v.13, n.4, p.591-597, Aug. 1996.
32. HASSID, S. **Contribution de la microscopie assistee par ordinateur a l'identification d'entites anatomo-cliniques au sein des polypes nasaux.** Bruxelles, 1996. Manuscrito (Titre d'Agrégé de l'Enseignement supérieur) – Laboratoire d'Histologie, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles.
33. HIRABAYASHI, J. Recent topics on galectins. **Trends Glycosci. Glycotechnol.**, v.9, p.45, Dec.15, 1997.
34. HUGHES, R.C. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v.25, n.4, p.1194-1198, 1997.
35. IGLESIAS, M.M.; RABINOVICH, G.A.; IVANOVIC, V.; SOTOMAYOR, C.; WOLFENSTEIN-TODEL, C. Galectin-1 from ovine placenta-amino-acid sequence, physicochemical properties and implications in T-cells death. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.252, n.3, p.400-407, 15 Mar. 1998.
36. ITZKOWITZ, S.H. Galectins: multipurpose carbohydrate-binding proteins implicated in tumor biology. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.11, n.6, p.2003-2005, Dec. 1997.
37. JANKOWSKI, J.A.; WRIGHT, N.A.; MELTZER, S.J.; TRIADAFILOPOULOS, G.; GEBOES, K.; CASSON, A.G.; KERR, D.; YOUNG, L.S. Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in esophagus. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.154, n.4, p. 965-973, Apr. 1999.
38. KALTNER, H.; STIERSTORFER, B. Animal lectins as cell adhesion molecules. **Acta Anat.**, Basel, v.161, p. 162-179, 1998.
39. KASAI, K.; HIRABAYASHI, J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. **J. Biochem.**, Tokyo, v.119, n.1, p.1-8, Jan. 1996.
40. KATEMENTSKY, L.A.; BURGER, D.E.; GERSHMAN, R.J.; KATEMENTSKY, L.D.; LUTHER, E. Slide-based scanning cytometry. **Acta Cytol.**, St. Louis, v. 41, n.1, p.123-143, Jan.-Feb.1997.
41. LIS, H.; SHARON, N. Protein glucosilation; structural and junctional aspects. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.218, p.1-27, 1993.
42. MEIJER, G.A.; BELIËN, J.A.M.; VAN DIEST, P.J.; BAAK, J.P.A. Image analysis in clinical pathology. **J. Clin. Pathol.**, London, v.50, p. 365-370, 1997.
43. MONSIGNY, M. Les glycoprotéines et les lectines endogènes : le yin-yang sucré. **Med. Sci.**, v.10, p.9-11, 1994.

44. NAZERAN, H.; RICE, F.; MORAN, W.; SKINNER, J. Biomedical image processing in pathology : a review. **Australas Phys. Eng. Sci. Med.**, Melbourne, v.18, n.1, p. 26-38, Mar. 1995
45. NOMINA anatomica . 2.ed. Barcelona : Editorial Aedos, 1985.
46. OBERHOLZER, M.; ÖSTREICHER, M.; CHRISTEN, H.; BRÜHLMANN, M. Methods in quantitative image analysis. **Histochem. Cell Biol.**, Berlin, v.105, p. 333-355, 1996.
47. OHANNESIAN, D.W.; LOTAN, D.; THOMAS, P.; JESSUP, J.M.; FUKUDA, M.; GABIUS, H.J.; LOTAN, R. Carcinoembryonic antigen and other glycoconjugates act as ligands for galectin-3 in human colon carcinoma cells. **Cancer Res.**, Baltimore, v.55, n.10, p. 2191-2199, 15 May 1995.
48. OZEKI, Y.; MATSUI, T.; YAMAMOTO, Y.; FUNAHASHI, M.; HAMAKO, J.; TITANI, K. Tissue fibronectin is an endogenous ligand for galectin-1. **Glycobiology**, Oxford, v.5, n.2, p.255-261, Mar. 1995.
49. PARANÁ, Governo do Estado. **Normas para apresentação gráfica de dados - tabelas**. Curitiba : IPARDES, 1995. 57 p.
50. PERILLO, N.L.; MARCUS, M.E.; BAUM, L.G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation and cell death. **J. Mol.Med.**, Berlin, v.76, n.6, p.402-412, May 1998.
51. RABINOVICH, G.A.; IGLESIAS, M.M.; CASTAGNA, L.F.; WOLFENSTEIN-TODEL, C.; RIERA, C.M.; SOTOMAYOR, C.E. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells : biochemical and functional characterization. **J. Immunol.**, Baltimore, v.160, n.10, p. 4831-4840, May 15, 1998
52. SANJUÁN, X.; FERNÁNDEZ, P.L.; CASTELLS, A.; CASTRONOVO, V.; BRULE, F.V.D.; LIU, F.T.; CARDESA, A.; CAMPO, E. Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.113, n.6, p. 1906-1915, Dec. 1997.
53. SCHULERUD, H.; KRISTENSEN, G.B.; LIESTOL, K.; VLATKOVIC, L.V.; REITH, A.; ALBREGTSEN, F.; DANIELSEN, H.E. A review of caveats in statistical nuclear image analysis. **Anal. Cell. Pathol.**, Amsterdam, v.16, p.63-82, 1998.
54. SCHWARZ JR., G.; REMMELINK, M.; DECAESTECKER, C.; GIELEN, I.; BUDEL, V.; BURCHERT, M.; DARRO, F.; DANGUY, A.; GABIUS, H.J.; SALMON, I.; KISS, R. Differential expression of galectin-3 and galectin-3 binding sites, but not galectin-1, in benign vs malignant uterine smooth muscle tumors. **Am. J. Clin. Pathol.**, Chicago, v.111, p. 623-631, 1999.

55. SORENSEN, F.B. Unbiased stereologic techniques for practical use in diagnostic histopathology. **Pathologica**, Pisa, v.87, n.3, p. 263-278, Jun. 1995.
56. SUSNIK, B.; POULIN, N.; PHILLIPS, D.; LeRICHE, J.; PALCIC, B. Comparison of DNA measurement performed by flow and image cytometry of embedded breast tissue sections. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v.17, n. 3, p. 163-171, Jun. 1995.
57. TEODORI, L.; GÖHDE, W.; PERSIANI, M.; FERRARIO, F.; DANESI, D.T.; SCARPIGNATO, C.; DI TONDO, U.; ALO, P.; CAPURSO, L. DNA/protein flow cytometry as a predictive marker of malignancy in dysplasia-free Barrett's esophagus: thirteen-year follow-up study on a cohort of patients. **Cytometry**, New York, v. 34, p. 257-263, 1998.
58. TOLENTINO, M.M.; FAIFER, J.G.; TRENTINI, E.A.; TOLETINO, E.C. Esôfago de Barrett: métodos de diagnóstico. In: CASTRO, L.P.; SAVASSI-ROCHA, P.R.; LIMA, D.C.; TANURE, J.C. **Tópicos em gastroenterologia 8: diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro : Medsi, 1998. p.59-76.
59. TRUE, L.D. Morphometric applications in anatomic pathology. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v.27, n.5, p. 450-467, May 1996.
60. TRUE, L.D.; HERMAN, C.J. Principles and practice of quantitative histopathology : an introduction. In: ANNUAL MEETING OF THE U.S. CANADIAN ACADEMY OF PAHOLOGY (Mar.1993) **Workshop...** New Orleans, LA., 1993. 31p.
61. TSELEPIS, C.; PERRY, I.; JANKOWSKI, J. Barrett's esophagus: dysregulation of cell cycling and intercellular adhesion in the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. **Digestion**, Basel, v.61, p. 1-5, 2000.
62. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas para apresentação de trabalhos**. 3.ed. Curitiba : Ed. da UFPR, 1996. 8v.
63. WASANO, K.; HIRAKAWA, Y. Recombinant galectin-1 recognizes mucin and epithelial cell surface glycocalyxes of gastrointestinal tract. **J. Histochem.Cytochem.**, New York, v.45, n.2, p. 275-283, Feb. 1997.
64. WEINSTEIN, W.M. Predicting who will develop cancer : role of biopsy, flow cytometry, cell and genetic markers. **Gastrointest. Endosc.**, St. Louis, v.49, n. 3, part 2, p. s9-11, Mar. 1999.
65. WILIAMSON, W.; ELLIS, F.H.; GIBB, S.P. Barrett's esophagus: prevalence and incidence of adenocarcinoma. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.151, p. 2212-2216, 1991.
66. XU, X.C.; EL-NAGGAR, A.K.; LOTAN, R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.147, n.3, p.815-822, Sep. 1995.

67. YAMAOKA, K.; INGENDO, A.; TSUBUKI, S.; NAGAI, Y.; SANAI, Y. Structural and functional characterization of a novel tumor-derived rat galectin-1 having transforming growth factor (TGF) activity: the relationship between intramolecular disulfide bridges and TGF activity. **J. Biochem.**, Tokyo, v.119, n.5, p.878-886, May 1996.