

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM ANATOMIA PATOLÓGICA**

MÁRIO RIBEIRO DE MELO JÚNIOR

**HISTOQUÍMICA E ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS
EM NEOPLASIAS CUTÂNEAS**

Recife, 2003

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM ANATOMIA PATOLÓGICA**

MÁRIO RIBEIRO DE MELO JÚNIOR

**HISTOQUÍMICA E ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS EM
NEOPLASIAS CUTÂNEAS**

Dissertação apresentada ao
Mestrado em Anatomia Patológica
do Centro de Ciências da Saúde
da Universidade Federal de
Pernambuco para obtenção do
título de Mestre em Patologia.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Co-orientadores:

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Prof. Dr. José Figuerêdo Silva

GRATIDÃO

" O importante, na vida, não é realizar grandes obras, mas realizar pessoas, deixando a marca da nossa bondade no canteiro de muitos corações. Por isso às pessoas especiais que realizei e que me realizaram durante esta etapa de vida, quero expressar minha imensa gratidão a ...

... Adriana Telles, Ana Brito, Ana Paula Galvão, Carmelita de Lima, Cláudia Batista, Cynarha Daysy, David Neri, Eduardo Beltrão, Elizabeth Chaves, Fábio Sérgio, Givanildo Bezerra, Ian Porto, Ilma Maria, Jaqueline Rodrigues, Jorge Luiz Araújo, José Figuerêdo, José Luiz, Lenniê Maia, Luciana Alves, Luciano Albuquerque, Luciano Montenegro, Luiz de Carvalho, Maria da Conceição, Mariana Tavares, Nereide Magalhães, Nicodemos Teles, Raquel Coêlho, Renato dos Anjos, Rodrigo Bacelar, Renata Veiga, Roberto José Vieira, Sônia Carvalho, Susan Kelly, Paulina Albuquerque, Valdir Bandeira, Vasco Malta, Vera Santana, Zenaide Brito ... entre outros.

E DEDICO ...

**Aos meus pais Lúcia Helena e Mário Ribeiro
E com todo amor a minha "flor do campo" Taciana Souza.**

ÍNDICE

	Pág
RESUMO	05
ABSTRACT	06
INTRODUÇÃO	07
▪ Histofisiologia da Pele	08
▪ Imunologia Cutânea	09
▪ Câncer - Sítio de Transformações	12
▪ Neoplasias cutâneas	14
▪ Lectinas - Ferramentas Biotecnológicas	17
▪ Análise Computadorizada de Imagens em Patologia	21
RELEVÂNCIA DO ESTUDO	24
OBJETIVOS	25
MATERIAL E MÉTODOS	26
RESULTADOS	28
DISCUSSÃO	34
CONCLUSÕES GERAIS	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXOS	55

RESUMO

Este trabalho avaliou as alterações na expressão de carboidratos e a densidade populacional de células tumorais e Células de Langerhans (CL) a partir da análise computadorizada de imagens comparando as marcações de diferentes lectinas vegetais e imunohistoquímica sobre tecidos neoplásicos cutâneos. Foram selecionados fragmentos teciduais de pele, obtidos cirurgicamente por biópsia excisional, diagnosticados como carcinoma basocelular (CBC, n=35), carcinoma epidermóide (CEp, n=18), tricoepitelioma (TE, n=12), ceratoacantoma (KA, n=19), ceratose seborréica (CS, n=16) e ceratose actínica (CA, n=18), de ambos os sexos com idade média 59,7 anos. Foram testadas as lectinas Concanavalina A (Con A), Wheat germ agglutinin (WGA), Peanut agglutinin (PNA) *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-I) e *Tetragonolobus purpurea* agglutinin (LTA), todas conjugadas a peroxidase. No estudo imunohistoquímico, a proteína S 100 foi marcada para análise das CL. Os resultados mostram que em relação as neoplasias benignas, observou-se que o KA exibiu padrões aberrantes de expressão dos carboidratos glucose/manose, α -fucose e D-galactose, evidenciados pela intensa marcação pelas lectinas Con A (94,7%), LTA (84,2%) e PNA (89,4%), respectivamente. Os tumores malignos expressaram padrões de marcação distintos que os diferenciou das outras neoplasias cutâneas; o EpC exibiu marcação significativa apenas para lectina PNA, sendo incipiente para as outras lectinas. O CBC exibiu padrões de marcação diferentes daqueles observados nas lesões benignas principalmente, os casos de TE. Não foram observadas variações numéricas estatisticamente significativas das CL entre os tumores malignos, como CBC ($19,85 \pm 5,81$) e CEp ($20,08 \pm 4,24$). Contudo, houve maior número de CL nas lesões benignas; ($102,04 \pm 17,11$), TE ($79,74 \pm 9,35$), CS ($122,38 \pm 9,92$) e KA ($110,62 \pm 31,4$), que também mostraram diferenças entre si e quando comparadas as populações existentes nos tumores malignos e epiderme normal ($p < 0,05$). As células de Langerhans não demonstraram diferenças significativas quanto à média das áreas e volumes das celulares entre as neoplasias benignas e malignas. Desta forma, de acordo com os dados qualitativos e quantitativos obtidos pode-se constatar que ocorrem alterações bioquímicas e populacionais celulares importantes que podem servir como parâmetros adicionais na distinção de tipos histológicos de neoplasias cutâneas.

ABSTRACT

This work evaluated alterations in the expression of carbohydrates and the density of tumour cells and Langerhans cells (LC) using lectin histochemistry, immunohistochemistry and computer image analysis in neoplastic cutaneous tissues. Biopsies of basal cell carcinoma (BCC, n=35), epidermoid carcinoma (EpC, n= 18), tricoepithelioma (TE, n=12), keratoacanthoma (KA, n=19), seborrheic keratosis (SK, n=16) and actinic keratosis (AK, n=18) were used. Patients were from both Sex and the average age was of 59.7 year-old. Thelectins Concanavalin A (Con A), Wheat germ agglutinin (WGA), Peanut agglutinin (PNA), *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-I) and *Tetragonolobus purpurea* agglutinin (LTA) were used conjugated with peroxidase. In the immunohistochemistry study the S-100 protein was used to analyse the epidermal LC. The results showed that in the benign lesions, KA presented a pattern of aberrant expression of glucose/mannose, α -fucose e D-galactose residues, evidenced by the intense by Con A (94.7%), LTA (84,2%) and PNA (89,4%), respectively. The malign tumours presented distinct patterns of staining when compared to the benign lesions. It was not observed significant variations LC population among the malign tumours BCC (23.25 ± 5.81) e EpC (20.88 ± 4.24). However, it was observed a higher number of LC in studied benign lesions AK ($102,04\pm 17,11$), TE ($79,74\pm 9,35$), SK ($122,38\pm 9,92$) and KA ($110,62\pm 31,4$), when compared to the malign tumours and their normal counterpart ($p<0.05$). LC did not show significant difference related to the area and volume of LC in both benign and malign tissue. Despite the qualitative and quantitative data obtained in this study it is observed that biochemical and cell number alterations occurred becoming important additional parameters for distinction of histological features of cutaneous neoplasms.

INTRODUÇÃO

As neoplasias são desordens do crescimento e da diferenciação celulares que se manifestam como tumores formados por uma massa de células atípicas, resultantes de uma série de mudanças bioquímicas no ambiente celular (Andrade, 1999).

Em muitos casos, no entanto, não se definiram ainda critérios morfológicos para estabelecer um julgamento preciso quando ambigüidades são observadas no tecido tumoral, considerando não haver marcadores histológicos prioritários, excludentes, que possam por si só servir de referencial para um estágio lesional específico ou para prever o comportamento de um determinado tumor (Wakimoto *et al.*, 1996).

Atualmente, sugere-se que uma das prováveis estruturas associadas a proteção dos tumores contra os mecanismos de defesa imunológica do hospedeiro são glicoproteínas superficiais, componentes determinantes da habilidade de sobrevivência e metastatização das células tumorais (Dalziel *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000). Além disso, o reconhecimento proteína-carboidrato está relacionada a diversos eventos celulares dentre os quais destacam-se o controle do crescimento, a sinalização e a motilidade das células (Klein *et al.*, 1981; Loris *et al.*, 1998; Santos, 2001).

O fenômeno das variações na expressão de carboidratos superficiais em células transformadas têm sido amplamente estudado através da histoquímica com lectinas (Mitchell & Schumacher, 1999; Herling *et al.*, 2000; Thies *et al.*, 2001). As lectinas ao reconhecerem resíduos específicos de glicoproteínas tornam-se potenciais ferramentas da histopatologia seja para a identificação dos diferentes graus de diferenciação que acometem as células neoplásicas ou para análise patobioquímica dos tipos celulares transformados (Basarad *et al.*, 1998; Herling *et al.*, 2000).

Apesar de todas as interações feitas entre a histoquímica com lectinas e células tumorais, existem poucos trabalhos demonstrando a eficiência do emprego desta técnica na marcação de tumores de pele, benignos ou malignos, havendo ainda muitas aplicações reservadas para este promissor campo de investigação.

Assim, buscamos neste trabalho estudar as alterações na expressão de carboidratos em células tumorais e de vigilância imunológica (Células de Langerhans) a partir da análise computadorizada de imagens comparando as marcações de diferentes lectinas vegetais e imunohistoquímica sobre tecidos neoplásicos cutâneos.

HISTOFISIOLOGIA DA PELE

A epiderme é um tecido epitelial estratificado córneo; nela encontramos as células do sistema ceratínico e seus anexos (pêlos, unhas e glândulas), as do sistema melânico, as dendríticas indeterminadas, as de Merkel e células de Langerhans. O sistema ceratínico é constituído, na sua parte mais profunda, pela camada basal formada por células mais jovens, colunares, justapostas umas às outras e em constante multiplicação, chamadas ceratinócitos (células basais). Estas com citoplasma basófilo e núcleo grande e oval, que vão se orientando no sentido da exteriorização, sofrendo modificações morfológicas e histoquímicas importantes, passando a ser poligonais e de citoplasma acidófilo recebendo a denominação células espinhosas de Malpighi. Estas células à medida que se exteriorizam podem até perder o núcleo e formar uma camada acidófila anucleada chamada de camada córnea (Azulay & Azulay, 1997).

As células da epiderme estão unidas por placas de aderência (desmossomos e hemidesmossomos) e glicocálice. A epiderme e a derme unem-se de maneira sinuosa e interpenetrante, desta forma, a epiderme penetra na derme por cones interpapilares e a derme invade a epiderme através de papilas dérmicas, existindo entre elas uma camada basal, rica em polissacarídeos neutros, com a função de agir como suporte mecânico, promovendo adesão, crescimento, diferenciação e migração de células basais (Bucana *et al.*, 1992).

O sistema melanocítico é constituído pelos melanócitos, produtores de pigmentos, localizados predominantemente na camada basal na proporção de 1 melanócito para 10 ceratinócitos basais. Os melanócitos são células que através dos seus dendrítos injetam grânulos de melanina nos ceratinócitos (Azulay & Azulay, 1997).

Ainda na pele encontram-se glândulas sudoríparas écrinas e apócrinas, e as glândulas sebáceas. As unidades celulares secretoras das glândulas são formadas por um epitélio simples constituído por células claras que apresentam acúmulos de glicogênio e células escuras (mucóides), que possuem grânulos secretores com conteúdo glicoprotéico (Gartner & Hiatt, 1999).

As células da derme, ricas em proteoglicanos e glicoproteínas, são representadas por células mesenquimais primitivas, que se diferenciam posteriormente em fibroblastos, histiócitos e mastócitos (Wang & Su, 1995).

A hipoderme ou panículo adiposo é a camada mais profunda da pele sendo constituída de lóbulos de lipócitos delimitados por septos de colágeno com vasos sangüíneos (Azulay & Azulay, 1997).

A função protetora da pele se dá através de seu sistema melânico, impedindo a entrada ou absorvendo as radiações ultravioletas e ionizantes. Há outros tipos de proteção físico-químicas presentes na epiderme, como a manutenção do pH ácido da camada córnea e do manto lipídico com atividades antimicrobiana e imunológica, através das células de Langerhans. Na derme, as células envolvidas na resposta imune são os macrófagos, linfócitos e mastócitos (Salmon *et al.*, 1994).

IMUNOLOGIA CUTÂNEA

O sistema imunológico pode sofrer especializações à medida que é solicitado a se expressar nos diferentes órgãos e tecidos do corpo, fenômeno conhecido como "*esferas regionais de influência imunológica*" (Steinman *et al.*, 1995). Na pele, os elementos básicos para resposta imune estão agrupados no tecido linfóide associado à pele (SALT - *Skin Associated Lymphoid Tissue*) constituído de: (I) um grupo de células epidérmicas, especializadas na captura, processamento e apresentação de antígenos (células de Langerhans); (II) subpopulações de linfócitos T circulantes, com afinidade especial pela pele; (III) queratinócitos, células-chave na imunologia cutânea, capazes de expressar moléculas de adesão e coestimuladoras; (IV) células endoteliais, responsáveis pelo tráfego de entrada e saída das células na epiderme (Wright-Browne *et al.*, 1997).

No SALT, as células de Langerhans são células dendríticas apresentadoras de antígenos que residem predominantemente na epiderme (Holikova *et al.*, 2000) e ocupam o posto mais avançado na ativação da resposta imune, trabalhando para prover à pele proteção contra toxinas ambientais, infecções e desenvolvimento de neoplasias (Salmon *et al.*, 1994; Martinez, 1998).

Em 1968, Paul Langerhans descreveu uma população de células dendríticas na epiderme humana, posteriormente chamadas de Células de Langerhans (CL); oriundas da medula óssea tendo portanto origem mesodérmica (Bergfelt, 1993). Estas apresentam como característica peculiar uma organela em forma de disco com uma vesícula na extremidade, a qual recebe a denominação de grânulos de Birbeck (Pereira, 1999).

As CL expressam moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC), moléculas CD4+, e vários marcadores de membrana, como o CD1 e CD11. Na

epiderme normal, as CL constituem de 2 a 6% do total das células, formando uma rede facilitadora para interação com as moléculas e substâncias antigênicas que se encontram no estroma da pele (Wang & Su, 1995). Sua participação na resposta imune é fundamental e inclui o papel de sentinela, captura e processamento de pequenos fragmentos peptídicos imunogênicos, além da ativação e coestimulação da proliferação de células T (Ardavín, 1997).

Ao fagocitarem o antígeno, as CL produzem nele modificações físico-químicas e em seguida o expõem. Da produção de RNA pelas CL são derivadas duas frações, uma fração contendo porções do antígeno original (superantígeno), enquanto a outra fração seria totalmente livre do antígeno e teria o papel de RNA mensageiro, induzindo a produção seletiva de IgM (Pereira, 1999).

As CL ocupam o posto mais avançado do sistema imunológico, possuem especializações que favorecem a execução de suas funções, como grânulos intracitoplasmáticos que aparecem como resultado da internalização de moléculas de superfície celular do MHC-II, moléculas estas necessárias para estimular a resposta imune das células T dependentes (Roitt *et al.*, 1997).

A eficiência das CL para funcionar como células apresentadoras de antígeno depende não somente da expressão das moléculas de superfície do MHC-II, mas também das moléculas de adesão de membrana (galectinas, glicoproteínas e glicolípídeos), permitindo o contato físico direto entre as CL e células T (Udey, 1997).

As respostas imunes cutâneas envolvem ações coordenadas das células da derme e epiderme em conjunto com a rede intrínseca de citocinas trabalhando para prover à pele proteção imune contra toxinas ambientais, infecções e desenvolvimento de neoplasias (Salmon *et al.*, 1994). Estudos indicam haver relação entre a supressão do sistema imunológico e a tendência que alguns indivíduos tem em desenvolver formas mais agressivas de tumores de pele (Oram *et al.*, 1995).

Sabe-se que, a pele, através do SALT, é capaz de exercer uma vigilância imunológica sobre as células tumorais. Dentre as inúmeras alterações que acompanham o crescimento tumoral, é sabido que as células de Langerhans epidérmicas tem um papel importante nos mecanismos de defesa contra neo-antígenos (Tilman & Scheriner, 1995). Por exemplo, CL sofrem uma diminuição numérica e mudanças imunofenotípicas significativas nas lesões de pele com sarcoma de Kaposi em pacientes aids (Valcuende *et al.*, 1994). Contudo, alguns estudos são conflitantes quanto às variações

na densidade e distribuição deste tipo celular em diferentes neoplasias cutâneas (Bergfelt, 1993; De Carli, 1996).

A função do sistema imune local na patogênese destes tumores tem sido bastante estudada devido ao fato das células CD4+, CD8+ e CL exercerem uma resposta imune anti-tumor mediada por células T podendo até ocorrer regressão espontânea (Hunt *et al.*, 1994).

Berman e colaboradores (1995), estudando 58 casos de carcinoma basocelular, verificaram que o aumento no número de células de Langerhans varia com a região do corpo estudada e idade do paciente. Entretanto, estudos imunohistoquímicos e de microscopia eletrônica mostraram diminuição do número de CL à medida que aumentava o potencial de malignidade (De Carli, 1996).

Estudos em humanos demonstraram alterações quantitativas das CL em lesões epidérmicas (Santos & Pereira, 1997; Robson *et al.*, 2001; Myagi *et al.*, 2001). Também concluiu-se que as CL encontram-se diminuídas nas lesões de pele no sarcoma de Kaposi (Vacuende & Ramirez, 1994), na dermatite de contato provocada pelo Sulfato Lauril-sódico (Mikulowska & Falk, 1994) e quando expostas diretamente à luz ultravioleta, um dos fatores ambientais responsáveis pelo surgimento de neoplasias (Bernerd *et al.*, 1999).

Anteriormente estudou-se a presença das CL em carcinomas basocelulares contudo, os resultados sobre a densidade e distribuição deste tipo celular foram bastante conflitantes (Azizi *et al.*, 1987; Tilmam *et al.*, 1995; De Carli, 1996). Mesmo assim, a quantificação da densidade de CL, a partir de testes imunohistoquímicos pode servir como um indicador de defesa contra neoplasias malignas (Maceira & Magalhães, 1998).

Alterações na expressão de carboidratos e na distribuição de proteoglicanos pelas células epidérmicas ocorrem durante os diferentes estágios de desenvolvimento e progressão tumoral (Rolim, 2000; Lytinska *et al.*, 2001). Fatos estes que estimularam diversos estudos envolvendo tumores de pele, mais especificamente tipos celulares epidérmicos, como por exemplo linfócitos e CL, à luz da histoquímica de lectinas (Sames *et al.*, 1999a; 1999b).

Lectinas endógenas, como a Galectina-3 e Galectina-7 das CL, evidenciam funções imunorreguladoras correlacionadas a várias doenças de pele (Bernerd *et al.*, 1999). Atualmente, os carboidratos superficiais das CL tem sido estudados tanto na pele normal (Condaminet *et al.*, 1998), como nas formações tumorais cutâneas (Holikova *et al.*, 2001).

Vários trabalhos têm utilizado lectinas como marcadores de CL (Condaminet *et al.*, 1998; Holikova *et al.*, 2001), como por exemplo, no diagnóstico de granulomas eosinofílicos (Hadju *et al.*, 1986) e lesões histiocíticas da pele (Kanitakis *et al.*, 1988), correlacionando os padrões de ligação lectina-carboidrato com o aumento da densidade deste tipo celular.

CÂNCER - SÍTIO DE TRANSFORMAÇÕES

Embora o estudo histoquímico dos tumores possa ser visto como um exercício acadêmico, assume grande importância prática no momento de decidir sobre o tratamento de cada paciente. Embora um câncer possa ser fortemente sugerido clínica e radiologicamente, seu diagnóstico não pode ser definido até que se obtenha confirmação citológica ou histológica. Sem a prova anatomopatológica de malignidade, o tratamento não pode ser adequadamente planejado, procedimentos terapêuticos não podem ser comparados, nem qualquer prognóstico pode ser feito de maneira precisa (Faria, 1999).

A histopatologia é de extremo valor na confirmação do diagnóstico do câncer como também na determinação da diferenciação (grau) e na invasividade tumoral (estádio). O tecido a ser analisado é obtido a partir de uma amostra do tumor (biópsia incisional) ou da peça completa (biópsia excisional) (Bacchi *et al.*, 1999).

A maioria dos tumores ainda retém algumas das características estruturais das células das quais se originaram e isto permite ao patologista estabelecer, a grosso modo, o grau de malignidade pela extensão com que o tumor se distancia do normal (gradação). Mas ainda há problemas, pois alguns podem ser tão indiferenciados que não mais retêm qualquer estrutura indicativa do tecido de origem. Em outros, algumas células podem se desenvolver de maneira anormal. É comum que as células tumorais de um órgão glandular tal como a mama, que tem normalmente uma estrutura colunar, possam originar células escamosas semelhantes às aquelas encontradas em tumores de pele. Este processo é conhecido como metaplasia (Montenegro & Franco, 1999).

A União Internacional contra o Câncer propôs um sistema para estadiamento dos cânceres chamado TNM, onde o T se refere ao tumor (tamanho da neoplasia), N aos nódulos linfáticos (número de nódulos comprometidos em relação ao tumor primitivo) e M às metástases (extensão e número de órgãos atingidos). O sistema não utiliza os

mesmos critérios para todas as neoplasias e baseia-se em padrões morfológicos arbitrários (Bachi *et al.*, 1999).

Os tumores de pele ou de órgãos que podem ser facilmente examinados freqüentemente se apresentam como um nódulo. Pode-se também observar, por exemplo, na epiderme, a formação de úlceras que não cicatrizam, resultantes da destruição de tecidos por enzimas liberadas de células tumorais mortas (Murphy & Mihm, 1994).

Os possíveis fatores desencadeantes das neoplasias são os estímulos ambientais e/ou mutações genômicas, resultando na ativação de oncogenes, responsáveis pelo crescimento celular e regulação da apoptose, além de ocorrer a inativação dos genes supressores. Com isso, a expansão clonal ocasiona mutações adicionais (progressão), induzindo heterogeneidade celular e conseqüente formação de um neoplasma maligno (Robins *et al.*, 1996).

No tocante às funções bioquímicas dos genes supressores de tumor, as vias de transdução dos sinais de inibição do crescimento tumoral são menos compreendidas que aquelas para progressão tumoral. Daí, a sinalização inibitória do crescimento provavelmente origina-se na superfície celular com a participação de receptores, moléculas transdutoras de sinais e reguladoras transcricionais de origem celular (Graubert & Lay, 1996).

As proteínas normais codificadas pelos proto-oncogenes (genes que regulam a proliferação celular) desempenham funções iniciais no núcleo, no citoplasma e membrana plasmática das células durante o desenvolvimento das neoplasias. Dentre estas moléculas, destacam-se os fatores de crescimento, proteínas envolvidas na recepção e tradução de sinais localizados na superfície celular (Robins *et al.*, 1996).

Os diferentes tipos de carboidratos na superfície celular apresentam uma importante função no controle de vários processos fisiológicos e patobioquímicos no organismo (Sharon & Lis, 1989). Mudanças quantitativas e/ou qualitativas nos componentes lipídicos e protéicos das membranas e organelas celulares também são evidentes durante o desenvolvimento dos processos patológicos (Astoul *et al.*, 2000).

O mecanismo de reconhecimento molecular na superfície da célula, o que a torna capaz de reconhecer células semelhantes e assim interagir com as mesmas mantendo a homeostase, é afetado quando células normais sofrem neoplasia. O resultado é um crescimento e divisão incontrolados, devido às alterações nos

mecanismos de reconhecimento que agem na membrana celular (De Robertis & De Robertis, 1993; Devlin, 1998).

Estudos com extratos de tumores realizados por Hirschfeldt & Thonsen na década 30 foram os primeiros a demonstrar alterações bioquímicas nas células tumorais, o que foi posteriormente confirmado como padrões de glicosilação aberrantes associados ao tumor (Dabelsteen *et al.*, 1992).

Alterações na glicosilação são agora modelos universais em células cancerosas e certamente estruturas formadas por carboidratos são marcadores bem conhecidos na progressão de tumores. Como as células normais durante a embriogênese, as células tumorais também sofrem ativação e rápido crescimento, aderem a uma variedade de outros tipos de células e invadem tecidos. O desenvolvimento embrionário e a ativação celular são acompanhados por mudanças no perfil de glicosilação celular (Narita, 1989; Gheri *et al.*, 1999).

As últimas evidências confirmatórias destes conceitos podem ser encontradas no aumento das ligações das lectinas *Canavalia ensiformes* (Con A) e Wheat germ agglutinin (WGA) em tumores de células animais. Essas transformações celulares são freqüentemente acompanhadas por um aumento geral no tamanho dos glicolipídeos do metabolismo. E com o advento da tecnologia de anticorpos monoclonais, descobriu-se que muitos dos anticorpos "tumor-específicos" reconhecem os epítomos carboidratados especialmente em glico-esfingolipídeos. Além do que, correlações significativas entre certos tipos de glicosilação alterada e o atual prognóstico de tumores referidos de animais experimentais ou humanos aumentam o interesse sobre essas mudanças bioquímicas específicas (Leboit & Sexton, 1993; Mitchell & Schumacher, 1999; Villanueva, 2002).

NEOPLASIAS CUTÂNEAS

Os tumores benignos são de crescimento lento, expansivo e são bem tolerados pelo organismo do hospedeiro. Suas células se dispõem de forma harmônica em relação ao estroma além de serem raramente sujeitos a processos degenerativos importantes como necrose ou hemorragia (Hart & Suini, 1992).

Dados recentes mostram que as neoplasias mais frequentes no Brasil são as de pele, tanto nos homens como nas mulheres. A maioria dos neoplasmas de pele ocorre

em áreas do corpo expostas ao sol e ,consequentemente, são facilmente diagnosticados (Kligerman, 2001).

Dentre os tumores benignos de pele, os mais frequentes são cistos epidermóides ou sebáceos, com localização preferencial na face e pescoço apresentando revestimento epitelial semelhante ao da epiderme, resultando muitas vezes em cornificação da lesão; ceratose seborréica, com proliferação predominantemente de células basalóides sem atipia e com pigmentação melânica variável; e ceratoacantoma, resultante de uma proliferação de células escamosas e excessiva produção de queratina (Fonseca & Lopes de Faria, 1981; Franks, 1990; Gheri *et al.*, 1999).

Atualmente admite-se que os tumores malignos de pele se originam de células embrionárias da epiderme, anexos e da derme. Cerca de 70% correspondem a carcinoma basocelular (CBC), 20% a carcinoma epidermóide e 4% a melanomas (Faria, 1999; Wennberg, 2000).

O carcinoma de células escamosas nasce nos ceratinócitos da epiderme, é localmente invasivo e pode sofrer metástase. É caracterizado por uma placa ou nódulo descamativo hiperkeratótico, que frequentemente sangra ou sofre ulceração. Ele invade profundamente a derme, comprometendo os tecidos adjacentes (Gartner & Hiatt, 1999; Petter & Haustein, 2001).

Os CBC são tumores malignos cutâneos, que se desenvolvem a partir de estruturas epiteliais epidérmicas, similares às células da camada basal ou anexiais (Grosshans, 1992). Devido à extensa sinonímia utilizada para denominar este tipo de lesão, chegou-se a um consenso no uso das expressões *carcinomas* ou *epiteliomas basocelulares* (Mehregan *et al.*, 1995). Podem surgir em toda área tegumentar, sendo mais comum nas áreas expostas à radiação solar, principalmente cabeça (região nasal) e pescoço (Champion *et al.*, 1992; Burdgerman-Shah, 1995). Manifesta-se sob vários tipos histológicos como nodular, desmoplásico (esclerodermiforme), superficial e fibroepitelioso (Garcia *et al.*, 1995; Elder *et al.*, 1997).

Muitos fatores estão relacionados com o surgimento do CBC, como alterações cromossomiais (Stanley, 1991), xeroderma pigmentar (Itoh *et al.*, 1995), imunossupressão e AIDS (Wang & Su, 1995). Dados epidemiológicos mostram que a radiação ultravioleta solar é o mais frequente agente causador do câncer de pele (Porto, 1995; Karrer *et al.*, 1997).

A radiação ionizante e os raios ultravioletas (UV) induzem transformação neoplásica em vários tecidos no homem. Em geral, as células são sensíveis à energia

radiante na proporção direta de sua atividade mitótica e proliferativa e sendo inversa ao seu grau de diferenciação. Os efeitos oncogênicos da radiação resultam da ação direta ou indireta sobre o DNA. Por outro lado, alterações de membranas, proteínas, enzimas e outros componentes do citosol também podem ocorrer (Montenegro & Franco, 1999; Bernerd *et al.*, 1999).

Histologicamente, o CBC apresenta células com núcleo grande e oval, ausência de figuras de mitose e pouco citoplasma, assemelhando-se às células da camada basal da epiderme. O estroma do tecido conjuntivo prolifera com o tumor, além de evidenciar quase sempre pequeno infiltrado linfocitário nas proximidades (Elder *et al.*, 1997).

Os CBC são tumores que evoluem lenta e indefinidamente com suas células apresentando um ciclo de duplicação em 217 horas, com fase S em 20 horas (Miller, 1991). Santos e colaboradores (1994) mostraram que carcinomas basocelulares com padrão histológico esclerodermiforme tem maior potencial invasivo, enquanto os de padrão basoescamoso, maior potencial metastático.

Estudos histoquímicos das regiões de organização nucleolar marcados pela prata (AgNOR) e imunohistoquímicos do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) através da análise digital de imagens, têm sido considerados bons marcadores morfológicos da atividade proliferativa celular em diferentes tumores (Mello *et al.*, 1995; Ishida *et al.*, 2001). No Brasil, Di Chiacchio & Cucé (1997), também estudaram tipos histológicos de CBC quanto à proliferação celular e malignidade através dos AgNOR.

Clinicamente, tumores epiteliais benignos às vezes são confundidos com lesões malignas, particularmente quando exibem lesões pigmentadas e inflamadas (Murphy & Mihm, 1994; Garcia *et al.*, 1995). Nenhuma característica clínica ou histológica isolada pode ser confiável na diferenciação entre carcinoma de células escamosas e ceratoacantoma. Os carcinomas de células escamosas são tumores de pele relativamente comuns que geralmente, quando não tratados, evoluem e metastatizam, enquanto que o ceratoacantoma frequentemente regride espontaneamente (Patel *et al.*, 1994). As tentativas em distinguir esses tumores através, por exemplo, da análise do conteúdo de fibras elásticas, glicogênio citoplasmático e alterações no DNA, têm se mostrado infrutíferas como ferramentas diagnósticas devido à considerável semelhança entre esses tumores (Kwa *et al.*, 1992).

Na histologia de rotina, não há um padrão nítido e preciso de demarcação para diferenciar todos os tumores de pele. Diversas lesões neoplásicas epidérmicas como,

carcinoma de células escamosas e ceratoacantoma são muitas vezes difíceis de se distinguir através do exame histológico de rotina (Cribier *et al.*, 1999), bem como, a diferenciação histológica entre tricoepitelioma e carcinoma basocelular; ou doença de Bowen, ceratose actínica e ceratose seborréica, pode ser bastante dificultada em pequenas amostras teciduais (Ishida *et al.*, 2001; Petter & Haustein, 2001).

Uma íntima relação entre tricoepitelioma e CBC evidencia uma possível origem comum a partir de linhagens de células epiteliais germinativas. Todavia, os dois tipos de tumores diferem principalmente quanto ao grau de maturidade e diferenciação de suas células, o que nem sempre é possível constatar pelas técnicas histológicas usuais (Elder *et al.*, 1997). Desde então, diversas metodologias e ferramentas, como a imunohistoquímica, imunofluorescência e histoquímica com lectinas (Smoller *et al.*, 1995; Basarad *et al.*, 1997; Sames *et al.*, 1999b; Plzak *et al.*, 2000; Minwalla *et al.*, 2001), vem sendo testadas a fim de diferenciar, por exemplo, ceratoacantomas, ceratose actínica, carcinoma de células escamosas, casos de tricoepitelioma e carcinoma basocelular (Smoller *et al.*, 1995; Poniecka & Alexis, 1999).

LECTINAS - FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS

Proteínas e lipídeos polares constituem quase toda a massa das membranas biológicas. A pequena quantidade de carboidratos presentes é geralmente constituinte de glicoproteínas ou glicolipídeos. As proporções relativas destes glicoconjugados são distintas em diferentes membranas refletindo a diversidade de seus papéis biológicos (Nelson & Cox, 2000).

As proteínas das membranas se dividem em duas classes: proteínas periféricas ou integrais. Fazendo parte das proteínas integrais estão as glicoproteínas, cada uma com sua própria composição em carboidratos (Stryer, 1996).

Os açúcares encontrados em glicoproteínas e glicolipídeos incluem glucose, galactose, manose, fucose, arabinose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina, ácido idurônico e siálico. Em geral as glicoproteínas contêm resíduos de açúcares na forma D, com exceção de L-fucose, L-arabinose e ácido L-idurônico (Devlin, 1998).

Os resíduos de carboidratos dos glicoconjugados podem possuir uma grande quantidade de informações codificadas por unidades de monômeros, diferindo no número e tipo de resíduos de açúcares, sua sequência, tipo de ligação anomérica, presença ou ausência de ramificação, contribuindo, desta forma, para uma micro-

heterogeneidade estrutural. Por causa da sua complexidade e variação molecular, os carboidratos presentes na superfície celular servem como sinais de reconhecimento (Sharon & Lis, 1993; Nelson & Cox, 2000).

Esses sinais, codificados por estas diversidades estruturais, são reconhecidos por lectinas divalentes ou polivalentes na superfície de contato das células em um caminho complementar e análogo à interação ligante-receptor (Spicer & Schulte, 1992).

Lectinas são uma classe de proteínas de origem não imunológica, de distribuição ubíqua na natureza e que reconhecem carboidratos livres ou ligados às superfícies celulares através de sítios de ligação a carboidratos, nos quais a hidrofobicidade é a principal força de interação (Kennedy *et al.*, 1995; Nishimura *et al.*, 2000).

As lectinas só vieram despertar maior interesse a partir de 1960, sendo descobertas duas novas aplicações. A primeira descrita por Nowel (1960) que verificou a atividade mitogênica da lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) sobre linfócitos. A segunda, através dos estudos de Aub (1963) ao verificar que a lectina do germe do trigo (WGA) aglutinava muito mais intensamente células transformadas do que células normais, concluindo que alterações malignas eram acompanhadas por mudanças nas superfícies celulares (Mota, 2001).

Lectinas atuam como mediadores no reconhecimento celular em uma vasta linha de sistemas biológicos (Katink-Prastowska, 1999). Desta forma, as diversas atividades biológicas das lectinas têm favorecido a utilização dessas proteínas em variadas funções como ativação de respostas celulares específicas relevantes na imunidade relativa aos fenômenos próprios da relação parasita-hospedeiro (Eichinger, 2001), como agentes mitogênicos e aglutinantes celulares (Kabin, 1998; Haas *et al.*, 1999), na determinação de grupos sanguíneos humanos (Cummings, 1997), como citotoxinas na terapia do câncer (Thrush *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000), no reconhecimento celular (Sharon & Lis, 1989; Sames *et al.*, 2001), na inibição do crescimento do número de células tumorais (Abdullaev & De Mejia, 1997; Rolim *et al.*, 2001) e na indução de apoptose (Costa-Barbosa, 1997).

As lectinas mais comumente utilizadas como mitógenos são a PHA, Con A e jacalina (*Artocarpus heterophyllus*), usadas na rotina de cariotipagem e avaliação da imunocompetência (Kabir, 1998; Janeway *et al.*, 2000).

Muitas lectinas de origem vegetal são glicoproteínas. E neste caso a sua biossíntese é complementada por uma N-glicosilação, co-tradução e uma modificação do N-glicano pós-tradução (Peumans & Van Damme, 1998). Sua estrutura pode conter

até 10% de carboidratos na forma de um pequeno número de unidades N-glicosídeos; que podem ser de dois tipos, um grupo apresentando N-acetilglicosamina e manose, e outro contendo β 1-2 xilose e α 1-3 L-fucose (Beltrão, 2001).

Cátions divalentes, como Ca^{2+} , Mn^{2+} , são requeridos pela maioria das lectinas para o reconhecimento do seu carboidrato específico. Para essas lectinas, o cátion divalente participa de uma forma indireta para ligação ao carboidrato, pois estabiliza a ligação ao sítio-receptor e fixa as posições dos aminoácidos que interagem com o açúcar ligante (Weis & Drickamer, 1996).

A interação lectina-carboidrato ocorre através de uma porção limitada da molécula protéica. É o segmento chamado de Domínio de Reconhecimento de Carboidrato ou CRD (*Carbohydrate-Recognition Domain*) que consiste em um domínio globular com uma alta conservação de resíduos de aminoácidos. Os carboidratos interagem com lectinas através de pontes de hidrogênio propiciadas pela disponibilidade de um grande número de hidroxilas nos açúcares, que agem como doadores ou receptores de hidrogênio. Também participam da interação lectina-carboidrato, interações hidrofóbicas e forças de Van Der Waals (Elgavish & Shannan, 1997; Loris *et al.*, 1998; Santos, 2001).

Com o passar do tempo, a disponibilidade de um número cada vez maior de lectinas com diferentes especificidades para carboidratos resultou em uma crescente utilização dessas versáteis proteínas como instrumentos de pesquisas biomédicas (Shinagawa & Andreson, 2000).

Tumores malignos freqüentemente demonstram padrões aberrantes na glicosilação de glicoconjugados em suas células. As lectinas com suas afinidades para determinados açúcares, tem sido empregadas como marcadores histoquímicos para glicoconjugados da superfície celular de células normais e transformadas (Muramatsu, 1993).

Os primeiros estudos de cânceres com a técnica da histoquímica de lectinas originaram-se dos trabalhos de Klein e colaboradores (1981; 1983). Desde então várias pesquisas tem sido desenvolvidas no intuito de demonstrar a viabilidade e eficiência das lectinas como marcadores de células transformadas (Beltrão *et al.*, 1998; Beltrão, 2001). O reconhecimento de uma lectina ao seu grupo de carboidratos é análogo a do anticorpo em relação ao antígeno e os detalhes da técnica imunohistoquímica são semelhantes (Leathem, 1995; Rolim, 2001).

Um número crescente de trabalhos tem demonstrado que os carboidratos da superfície celular são modificados durante as transformações malignas, em tumores de células diferenciadas e metástases (Xu *et al.*, 2000). Consequentemente as proteínas ligantes de carboidratos da superfície celular (lectinas endógenas) sofrem modificações tanto funcionais quanto na sua estrutura molecular (Shinagawa & Anderson, 2000).

Modificações estruturais das glicoproteínas de membrana durante a divisão celular têm sido associadas com o potencial de malignidade dos tecidos. As variações na topografia da superfície celular podem estar relacionadas a um estágio específico da doença e as lectinas podem ser ferramentas úteis no diagnóstico e prognóstico (Dall'Olio, 1996). A caracterização dos glicoconjugados contidos em uma variedade de tumores, através de lectinas, tem sido utilizada, por exemplo, no prognóstico de câncer gástrico (Kakeji *et al.*, 1991) e pulmonar (Matsumoto *et al.*, 1992).

Lorea e colaboradores (1997) investigando o efeito *in vitro* das lectinas PNA, WGA, Con A, PHA e GSA (*Griffonia simplicifolia* agglutinin), na proliferação de linhagem de células de melanoma, observaram que, das lectinas utilizadas quatro determinaram um significativo efeito tóxico do tipo dose-dependente na proliferação celular do melanoma. Baixas doses de PNA obtiveram um efeito estimulatório induzindo aumento da proliferação celular.

Os glicoconjugados da superfície de células tumorais representam um elemento crítico na expressão das estruturas de carboidratos durante os processos de progressão de células malignas no câncer de cérebro (Bardosi *et al.*, 1988; Costa *et al.*, 2001). Métodos histoquímicos utilizando glicoproteínas marcadas com biotina foram usados para caracterizar receptores endógenos de lectinas em células de meningiomas bem como, diferentes padrões de marcação de lectinas também foram avaliados em vários subtipos de tumores cerebrais (Bardosi, 1988). Além disso, culturas de células da glia do córtex cerebral de ratos foram marcadas intensamente com as lectinas de GSA, WGA, Con A e RCA (*Ricinus communis* agglutinin) (Colton *et al.*, 1992).

Investigações sobre as mudanças de expressão de oligossacarídeos complexos durante o desenvolvimento de carcinoma invasivo de células escamosas do colo uterino através da ligação da lectina purificada de JFL (*Artocarpus integrifolia*), conjugada a peroxidase e comparada com controles normais, mostraram intensa marcação dessa lectina nos tecidos neoplásicos (Sames *et al.*, 2001). O uso das lectinas RCA, GSA, LTA (*Lotus tetragonolobus* agglutinin) e UEA-1 (*Ulex europaeus* agglutinin) em histoquímica, tanto do epitélio do colo uterino normal como em carcinomas

demonstraram modificações nas terminações das estruturas dos oligossacarídeos (Valentiner *et al.* 2002). A HPA (*Helix pomatia* agglutinin) tem sido bastante usada no prognóstico de neoplasias epiteliais (Schumacher *et al.*, 1996; Mitchell & Schumacher, 1999; Thies *et al.*, 2001).

A UEA-1 é uma lectina que reage especificamente com a α -L-fucose presente nas células endoteliais, ceratinócitos e células das glândulas ecrínas da pele, tanto no estado normal como durante estresses químicos e físicos variados, constituindo portanto, em um bom marcador para evidenciar proliferação ou depleção de tipos celulares específicos (Elder *et al.*, 1997).

A maioria dos estudos histoquímicos com lectinas utilizando material cirúrgico se refere a tumores derivados de tecidos epiteliais e mesenquimais, todos mostrando diferenciação glandular, não somente pelo fato destes tumores serem de grande importância clínica mas, também porque a marcação com lectinas é particularmente satisfatória nas investigação desses tumores (Schumacher *et al.*, 1996; Mota, 2001).

A partir destes fatos, nos últimos anos, a utilização de extratos naturais ou componentes purificados, como as lectinas vegetais, tornou-se um meio viável para o estudo de várias características bioquímicas do câncer (Abdullaev & DeMejia, 1997; Katnik-Prastowska, 1999; Wang *et al.*, 2000).

Embora a interação seletiva de lectinas com células malignas tenha sido reportada há muito tempo, a utilização das lectinas como instrumentos auxiliares no estudo de tumores, necessita de maiores estudos, principalmente para suprir a pouca disponibilidade de marcadores ou de sondas específicas para alguns tipos de neoplasias (Kannan *et al.*, 1993; Nakanish *et al.*, 1993). Além do que, melhores resultados tem sido obtidos com a combinação de outras ferramentas e técnicas, tais como a análise lectina-carboidrato em paralelo com métodos imunológicos, análise quantitativa (estudo morfométrico de imagens) e técnicas de genética molecular (Brooks *et al.*, 1993; Sakamoto *et al.*, 1993; Denirkaia *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Novik, 2000; Phillips *et al.* 2001; Villanueva, 2002).

ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE IMAGENS EM PATOLOGIA

A computação digital tem trazido grandes benefícios na armazenagem, discriminação e estudo estatístico de dados numéricos. A possibilidade do computador construir gráficos complexos, avaliar padrões de cor e armazenar imagens, tem sido

amplamente utilizada nas análises morfométricas de padrões histológicos e citológicos (Hamilton, 1997; Lambert *et al.*, 2001).

Várias técnicas morfométricas foram elaboradas durante as últimas décadas com a expectativa de introduzir na prática da patologia critérios objetivos e reproduzíveis concernentes ao diagnóstico e ao prognóstico de doenças. Todavia, os estudos quantitativos não foram inicialmente considerados práticos face, a complexidade das técnicas e o longo tempo envolvido no processo (Bartels, 1994; Ferreira-Gonzalez & Garret, 1996).

O desenvolvimento de métodos para processamento de imagens tem facilitado aos interessados em extrair cada vez mais informações devido a capacidade de se realçar, excluir e delimitar certas características obtidas pela imagem digital. Estas imagens digitais são representadas por uma matriz cujos elementos são chamados pixels (*picture elements*) que representam a unidade fundamental de análise de uma figura através de tonalidades específicas de cor (Erler & Marchevsky, 1994; Synopsis, 1996; Phillips *et al.*, 2001).

Com o advento dos programas computacionais especializados em análise de parâmetros microscópicos, cada vez mais esta prática tem se tornado freqüente nos laboratórios seja para pesquisa ou diagnóstico de rotina (Hamilton, 1997; Barbosa-Júnior, 2001).

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

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

Avaliações histológicas através da imunohistoquímica (Weinberg, 1994), imunofluorescência (Waggoner *et al.*, 1996), densitometria do DNA (Cohen, 1996) e reconstrução tri-dimensional de estruturas (Whinster & Cookson, 1995) conjugadas a métodos morfométricos computadorizados, tanto no modelo experimental murino (Figueirêdo-Silva *et al.*, 1999), como em seres humanos (Maia *et al.*, 1999) tem fornecido resultados mais precisos e completos para os mais diversos tipos de alterações morfológicas nos tecidos.

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

A seleção de imagens histológicas registradas pelo computador tem servido para o ensino através da criação de sistemas de instrução computadorizada como, por exemplo, roteiros de apoio ao diagnóstico do melanoma, carcinomas basocelulares e sistema de estadiamento de tumores segundo o critério TNM (Massad *et al.*, 1998).

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

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

A avaliação de tumores cutâneos utilizando-se análise computadorizada de imagens trouxe novas luzes para o melhor entendimento dos processos neoplásicos. Como por exemplo, na análise histomorfométrica de duas categorias de carcinomas basocelulares (De Rosa *et al.*, 1990); a quantificação imunohistoquímica para proteína S-100 e enolase em melanomas malignos e nevus intradérmicos comuns (Rode *et al.*, 1990); tecidos marcados com anticorpos para células endoteliais de lesões benignas de pele e melanoma maligno metastático (Smolle *et al.*, 1989). Além disso, análises

estereológicas têm fornecido as bases anátomo-quantitativas para distinguir tumores de pele morfologicamente assemelhados (Binder *et al.*, 1992).

Somando-se a tudo isso, a tecnologia da análise computadorizada de imagens de biópsias de pele e tumores epidérmicos tem demonstrado um enorme avanço no entendimento da biologia e patobioquímica das neoplasias cutâneas, bem como fornecendo diretrizes para novas formas diagnósticas e terapêuticas (Contet-Audonneau, Jean marie & Pauly, 1999; Kivinen *et al.*, 1999; Menzies, 1999, 2001; Gutkowicz-Krusin *et al.*, 2000; Hasan *et al.*, 2001; Bystryń, 2001).

RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A dificuldade no diagnóstico de muitas neoplasias cutâneas está relacionada a vários fatores, tais como a ampla variedade de tumores e seus subtipos morfológicos (Weyers *et al.*, 1993). Outro fator importante, diz respeito aos processos de diferenciação, uma vez que, os estudos ainda são inconclusivos sobre se a origem celular de algumas lesões malignas é apenas devido a diferenciações de tumores benignos ou se surgem de linhagens celulares normais (Thies *et al.*, 2001).

Com isso, técnicas histoquímicas utilizando anticorpos (Poniecka & Alexis, 1999) e lectinas vegetais (Basarad *et al.*, 1998; Minwalla *et al.*, 2001), têm sido testadas como ferramentas de apoio para o diagnóstico diferencial de tumores das mais variadas origens.

A utilização de lectinas para este tipo de abordagem baseia-se no princípio de que as interações lectina-carboidratos favorecem o entendimento sobre a origem histogenética e comportamento dos tumores durante sua progressão (Herling *et al.*, 2000). Evidenciando que a expressão de glicoconjugados está geralmente alterada nas células tumorais em comparação com sua contraparte normal (Rudiger *et al.*, 2000; Plzak *et al.*, 2000; Lytinska *et al.*, 2001).

Por outro lado, no apoio à interpretação dos resultados obtidos pela histoquímica, os sistemas computadorizados de análise de imagens têm fornecido dados qualitativos e quantitativos mais refinados esclarecendo assim, vários aspectos histomorfológicos das neoplasias (Demirkaya *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000).

Desta forma, devido ao fato de que são escassos os estudos sobre a expressão de carboidratos pelos diferentes tipos histológicos de neoplasias cutâneas (Chan *et al.*, 2001), pareceu-nos oportuno investigar esta correlação à luz da histoquímica com lectinas, imunohistoquímica e análise digital de imagens. E para tal finalidade, propomo-nos avaliar o perfil dos carboidratos expressos pelas células tumorais e células da vigilância imunológica (Células de Langerhans), bem como os distúrbios na densidade populacional nos tumores mais frequentes que acometem a epiderme.

OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a eficiência da histoquímica com lectinas e imunohistoquímica, conjugadas a análise computadorizada de imagens, como instrumentos auxiliares no diagnóstico diferencial de lesões malignas e benignas da pele.

ESPECÍFICOS

- Obter dados quantitativos dos padrões de marcação das lectinas (WGA, Con A, LTA, PNA e UEA-I) entre tumores benignos (Tricoepitelioma, Ceratose seborréica, Ceratose actínica e Ceratoacantoma) e malignos (Carcinoma basocelular e Carcinoma epidermóide) de pele;
- Evidenciar, através da análise de imagem da histoquímica com lectinas, a expressão de carboidratos nas células de Langerhans em diferentes tipos de neoplasias cutâneas.
- Comparar as alterações quantitativas e padrão de distribuição das populações de células de Langerhans entre neoplasias cutâneas e epiderme normal

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS DE TECIDOS

Foram selecionados fragmentos teciduais de pele, obtidos cirurgicamente por biópsia excisional, diagnosticados como carcinoma basocelular (n=35), carcinoma epidermóide (n=18), tricoepitelioma (n=12), ceratoacantoma (n=19), ceratose seborréica (n=16) e ceratose actínica (n=18), de ambos os sexos, de cor branca e com idade média 59,7 anos, provenientes de vários hospitais e postos de saúde e enviados para análise histopatológica de rotina no setor de patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), órgão suplementar da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Amostras de pele normal (n=20) foram selecionadas de elipses cutâneas (diâmetro > 5 cm), com bordas amplas e distantes da massa tumoral.

ESTUDO HISTOLÓGICO

O material colhido foi fixado em formalina a 10%, tamponada, após a descrição macroscópica dos tumores, os fragmentos de pele selecionados foram submetidos à rotina histológica e incluídos em parafina, obtendo-se cortes com espessura de 4µm, em micrótomo horizontal (Yamato, Japão) e colocados em lâminas previamente limpas e preparadas com adesivo a base de 3-amino-propyltriethoxy-silano (Sigma, USA).

HISTOQUÍMICA COM LECTINAS

Foram testadas as lectinas Concanavalina A (Con A), Wheat germ agglutinin (WGA), Peanut agglutinin (PNA), *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-I) e *Tetragonolobus purpurea* agglutinin (LTA), todas conjugadas a peroxidase (Sigma, USA). Os tecidos foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool (70-100%). As lâminas com os tecidos foram tratadas com solução de tripsina (0,1%) a 37°C por 2 min, em seguida colocados em metanol-H₂O₂ por 20 min e incubados com as lectinas (UEA-I, LTA e WGA - 80µg/ml; PNA e Con A - 100µg/ml) a 4°C por 2 h. As lâminas foram mergulhadas (10 min) em 10 mM de tampão fosfato (PBS) pH 7.2. A peroxidase foi visualizada pela incubação por 3 min em PBS contendo diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂. Os cortes foram contracorados com hematoxilina rápida e analisadas em

microscópio óptico (Olympus BH-2, Japão). Para controle, as ligações das lectinas foram inibidas utilizando-se methyl- α -D-manose para Con A, α -L-fucose para UEA-I e LTA, D-galactose para PNA e N-acetilglicosamina para WGA (Sigma, USA).

IMUNOHISTOQUÍMICA

No estudo histoquímico, a proteína S 100 foi marcada de acordo com o protocolo de Murphy *et al.* (1981), para análise das células de Langerhans epidérmicas (CL). A detecção dos antígenos foi realizada com o auxílio da técnica da Streptavidina-Biotina-Peroxidase, com anticorpo primário *anti-S 100* (Z311/DAKO) e soro normal de porco para bloqueio da reação cruzada (X901/DAKO). As lâminas foram incubadas *Overnight* (16 h), sendo em seguida adicionado ao tecido o anticorpo secundário biotilado (Z196/DAKO). Para revelação foi utilizada solução cromógena de DAB-H₂O₂. Para o controle negativo, omitiu-se o anticorpo primário. Formam consideradas positivas apenas as células marcadas que exibiram ramificações dendríticas e núcleo visível.

ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE IMAGENS

As imagens dos cortes histológicos foram captadas por vídeo-câmera digital (Sony, Japan) acoplada ao microscópio, em seguida processadas pelo programa de análise de imagens OPTIMASTM versão 6.1 (Optimas Corporation, USA). Os padrões de marcação das lectinas (magnificação 200x) e imunohistoquímica para proteína S100 (magnificação 1000x) revelados pela reação do DAB+Peroxidase foram captados pelo ajuste do contraste do nível de cinza (gray value). A partir da captura das imagens dos tecidos marcados com as lectinas inibidas e controle negativo da imunohistoquímica, padronizou-se a margem de variação (threshold range).

Para minimizar distorções nos valores das medições devido a presença de células não marcadas, aplicou-se um Fator de Correção (FC) de acordo com a equação $FC=s/S$, onde s é o valor da área superficial marcada e S , a área total medida (Van Bommel & Musen, 1997). A partir desse controle, foram feitas aleatoriamente as análises de quatro setores das lâminas calculando-se área (μm^2), volume médios (μm^3) e número de células marcadas por campo. Ambos, espaços vasculares e hipoderme foram omitidos.

Os valores obtidos em cada caso foram comparados utilizando-se o teste-U de Mann-whitney e Teste t de Student, para um nível de significância $p < 0,05$.

RESULTADOS

A casuística utilizada neste trabalho mostrou-se homogênea quando comparadas as diferenças morfológicas dos tumores, idade e sexo dos pacientes (Tabela 1). A maioria das lesões analisadas foram da região da cabeça e pescoço apresentando no geral formato nodular, margens bem definidas e tamanho médio $0,95 \text{ cm}^2$.

As lectinas utilizadas exibiram padrões variados de marcação. Observou-se um padrão de marcação superficial e paranuclear pelas lectinas Con A, WGA e PNA (Figura 3A) e um padrão difuso para a LTA e UEA-1 (Figura 3B). Na camada córnea epidérmica, as amostras analisadas foram uniformemente marcadas por todas as lectinas testadas.

Em relação as neoplasias benignas, observou-se que o KA exibiu padrões aberrantes de expressão dos carboidratos glucose/manose, α -fucose e D-galactose, evidenciados pela intensa marcação das lectinas Con A (94,7%), LTA (84,2%) e PNA (89,4%), respectivamente. A AK exibiu marcação positiva pela PNA e WGA, sendo negativa ou incipiente (<5%) para as demais lectinas testadas. Enquanto que, o TE demonstrou as menores intensidades de marcação (Figura 1).

Os tumores malignos expressaram padrões de marcação distintos que os diferenciou das outras neoplasias cutâneas. O carcinoma epidermóide exibiu marcação significativa apenas para a lectina PNA, sendo incipiente para as outras lectinas. O carcinoma basocelular exibiu padrões de marcação significativamente diferentes daqueles observados nas lesões benignas como por exemplo, nos casos de TE (Figura 1).

Uma intensa marcação da lectina PNA na maioria dos tumores testados (84,86%), obteve-se a comprovação de uma expressão significativa de D-galactose nas neoplasias epidérmicas quando comparada aos demais grupos de carboidratos (Figura 3C).

Os valores médios da área e número de células neoplásicas, embora não sendo significativos estatisticamente, demonstraram haver uma maior celularidade nos tumores benignos, que ao mesmo tempo exibiram menores áreas celulares marcadas pelas lectinas (Tabela 2).

A marcação pela histoquímica com lectinas mostrou-se ineficaz para a identificação das células de Langerhans, não havendo diferenças entre CL associadas às neoplasias e as contidas nas amostras de epiderme normal.

A análise de imagens das células de Langerhans epidérmicas foram realizadas pelo ajuste do equipamento onde foram apenas consideradas células positivas aquelas que apresentavam núcleo e processos dendríticos visíveis (Figura 4A).

Não foram observadas variações numéricas estatisticamente significativas das CL entre os tumores malignos, como CBC ($19,85 \pm 5,81$) e CEp ($20,08 \pm 4,24$). Contudo, houve maior número de CL nas lesões benignas; CA ($102,04 \pm 17,11$), TE ($79,74 \pm 9,35$), CS ($122,38 \pm 9,92$) e KA ($110,62 \pm 31,4$), que também mostraram diferenças entre si ($p < 0,05$) e quando comparadas com a densidade os tumores malignos e epiderme normal (Figura 2).

As células de Langerhans não demonstraram diferenças significantivas quanto a média das áreas e volumes celulares entre as neoplasias benignas e malignas (Tabela 3).

Nos tumores benignos estudados, as CL mostraram um padrão de distribuição uniforme dentro do estroma tumoral enquanto que nos malignos, as CL apresentavam-se preferencialmente na periferia dos tumores (Figura 4B e 4C); observou-se também, uma grande quantidade de células S100 positivas atreladas aos grupamentos linfóides próximos às células neoplásicas.

Tabela 1. Média de idade dos pacientes e diâmetro médio da área tumoral

	Homens	Mulheres	<i>p</i>
Idade (anos)	61,3±5,8	58,1±3,7	NS
Área tumoral (cm ²)	0,86±0,21	0,83±0,16	NS
Total de amostras	66	59	-

NS, não significante.

Tabela 2. Análise de imagens da área e número de células tumorais epidérmicas marcadas pela histoquímica com lectinas

Tumor	Número de Células*	Área celular (µm ²)*
Carcinoma basocelular	388,2±58,2	49,2±11,6
Tricoepitelioma	403,7±80,6	31,7±7,90
Ceratose seborréica	435,1±82,6	30,6±7,63
Ceratoacantoma	410,0±65,6	36,6±9,01
Ceratose actínica	390,2±54,6	40,0±11,2
Carcinoma epidermóide	375,3±37,5	42,8±8,10

* Média±Desvio Padrão

Tabela 3. Área e volume médios das células de Langerhans em tumores de pele

Parâmetro**	Neoplasia*	
	Benigno (n=65)	Maligno (n=53)
Área (µm ²)	15,66±4,5	16,02±3,8
Volume (µm ³)	65,457±7,091	61,552±8,361

**Tumores benignos*: Tricoepitelioma, Ceratose actínica, Ceratoacantoma, Ceratose seborréica; *Tumores malignos*: Carcinoma basocelular, Carcinoma epidermóide.

**Resultados expressos em Média±DP.

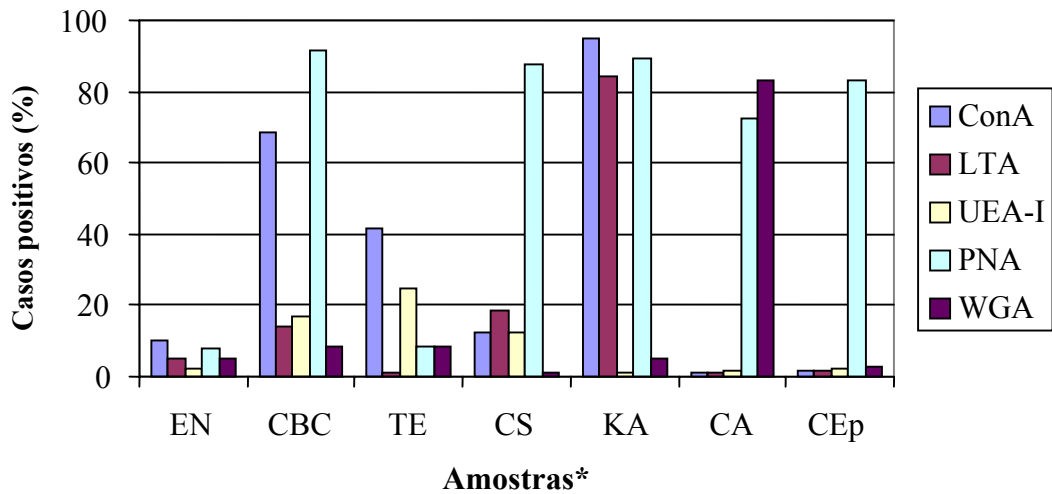


Figura 1. Histoquímica com lectinas em neoplasias cutâneas (*EN, Epiderme normal; CBC, Carcinoma basocelular; TE, Tricoepitelioma; CS, Ceratose seborréica; KA, Ceratoacantoma; CA, Ceratose actínica; CEp, Carcinoma epidermóide). Lectinas: Con A (Concanavalina A), LTA (*Tetragonolobus purpureae* agglutinin), UEA-I (*Ulex europaeus* agglutinin), PNA (Peanut agglutinin) e WGA (Wheat germ agglutinin).

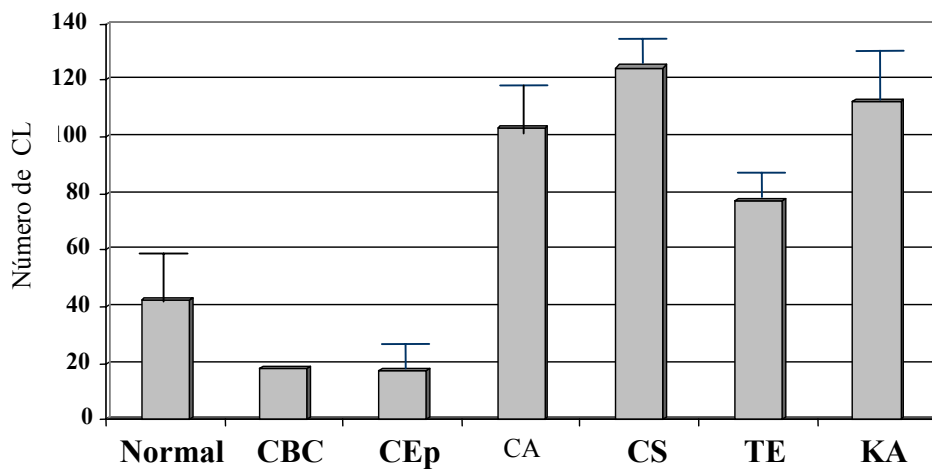


Figura 2. Análise de imagens da densidade de células de Langerhans (CL) em epiderme normal e com neoplasias (área total por campo = 12234 μm^2). Tumores epidérmicos: CBC (Carcinoma basocelular), CEp (Carcinoma epidermóide), CA (Ceratose actínica), CS (Ceratose seborréica), TE (tricoepitelioma) e KA (Ceratoacantoma)

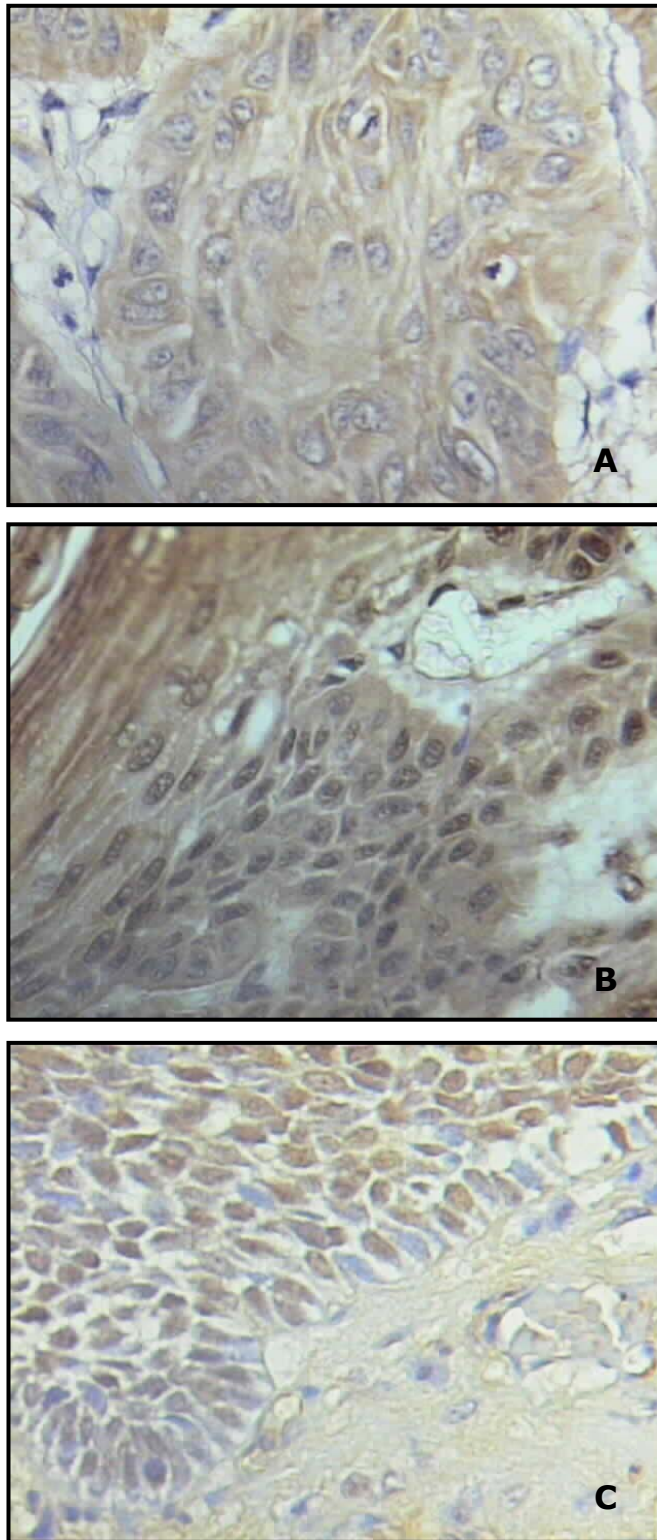


Figura 3. Histoquímica com lectinas em tumores de pele. (A) padrão de marcação da lectina WGA em ceratose actínica; (B) marcação difusa para lectina UEA-I em tricoepitelioma e (C) marcação específica (paranuclear) da lectina PNA em amostra de carcinoma basocelular (Magnificação 200x).

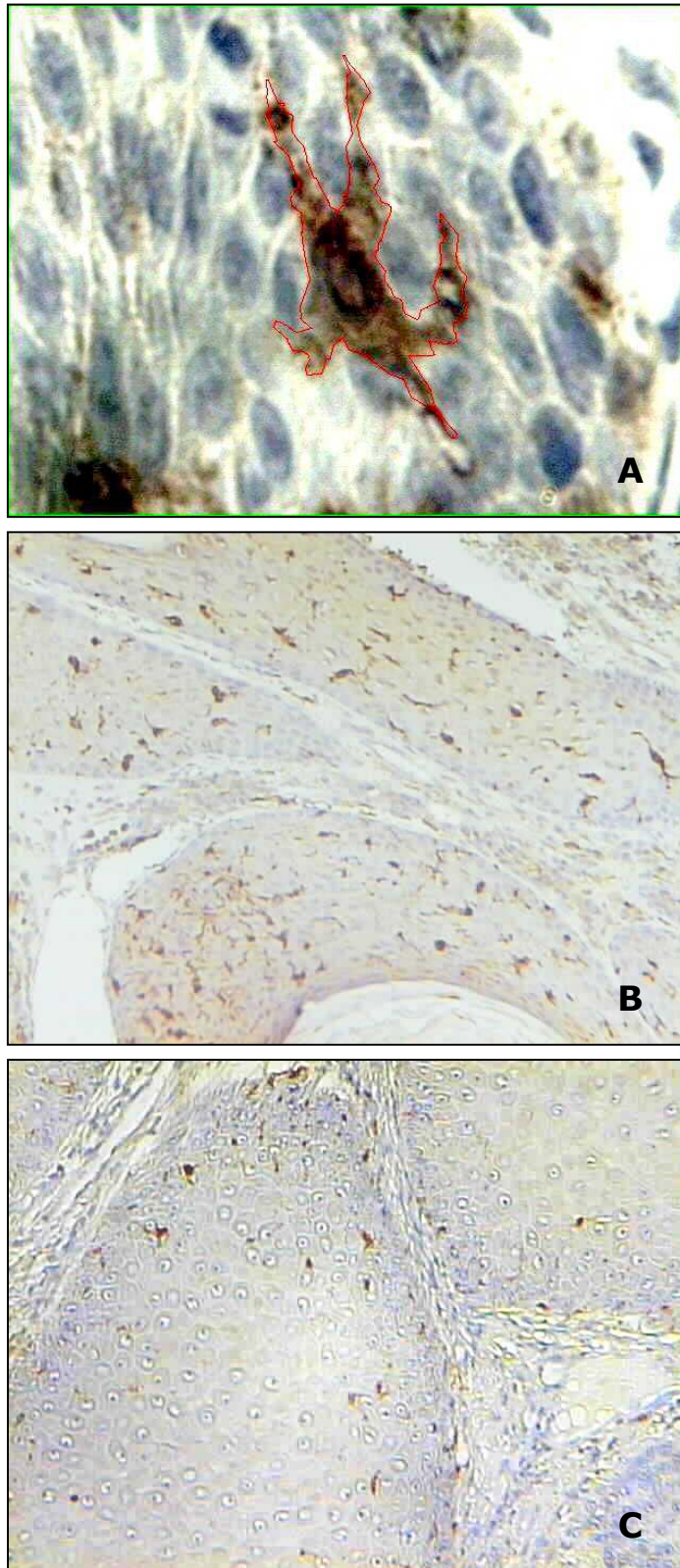


Figura 4. Imunohistoquímica com proteína S100 em células de Langerhans epidérmicas (CL). (A) Análise de imagens evidenciando núcleo e dendritos, magnificação 1000x; (B) Amostra de Tricoepitelioma exibindo grande número de CL, enquanto que no carcinoma epidermóide houve uma menor densidade de CL (C), magnificação 400x.

DISCUSSÃO

Mudanças qualitativas e quantitativas nos componentes glicoprotéicos das membranas celulares são altamente significantes no desenvolvimento e progressão de muitos processos neoplásicos (Yu *et al.*, 2001). Em células tumorais o aumento no conteúdo e/ou expressão de carboidratos superficiais tem sido amplamente documentado através da histoquímica com lectinas (Herling *et al.*, 2000). As lectinas, particularmente, são ferramentas sensíveis, estáveis e de fácil utilização para distinguir células transformadas e não-transformadas (Schumacher *et al.*, 1996; Elder *et al.*, 1997; Litynska *et al.*, 2001).

Estudos indicam que a carcinogênese cutânea está associada a padrões de glicosilação alterados nos glicoconjugados da superfície celular. Por exemplo, na doença de Bowen e em muitos casos de carcinoma de células escamosas, ocorrem distribuição distinta desses antígenos carboidratados enquanto outros mostram uma completa ausência (Schaumburg-Lever, 1990; Dabelsteen *et al.*, 1992). Recentemente, lectinas foram testadas em tumores malignos e benignos de pele, demonstrando a ausência ou mascaramento de alguns carboidratos no tecido normal e a presença dos mesmos carboidratos em muitas células tumorais, como por exemplo, o antígeno T de Thomsen-Friedenreich (Hassanein *et al.*, 2001; Bonkobara *et al.*, 2001; Morita *et al.*, 2001).

No presente trabalho, as lectinas (WGA e PNA) marcaram de forma similar a camada córnea e tecido colágeno envolta da massa tumoral benigna e maligna. Estudos anteriores demonstraram haver presença de glicoproteínas nesses tecidos (Holt *et al.*, 1979; Herling *et al.*, 2000).

Várias lectinas como a HPA e PNA, marcam as células tumorais de melanomas malignos (Thies *et al.*, 2001), demonstrando a associação dos carboidratos superficiais com o potencial metastático de cânceres de pele (Zebda *et al.*, 1994). A expressão diferenciada destes açúcares durante a transformação dos melanócitos para ceratinócitos serve como marcador distinto entre lesões benignas e malignas da pele (Monastirli *et al.*, 2000; Minwalla *et al.*, 2001).

Neste estudo, o perfil de marcação mais intenso para PNA foi observada nas amostras de CBC, CEp, CS e KA. Trabalhos anteriores concluíram que o padrão de marcação da PNA foi mais intenso no ceratoacantoma do que no carcinoma de células escamosas (Kannon & Park, 1990; Kanitakis *et al.*, 1992). Em ambos os casos, padrões

aberrantes de glicosilação podem estar associados com a expressão diferencial de receptores da matriz extracelular na membrana das células transformadas (Chammas *et al.*, 1994).

A distinção entre o carcinoma basocelular (CBC) e o tricoepitelioma (TE) torna-se algumas vezes dificultada devido a semelhança histológica destas lesões (Miller, 1991). Essa distinção é de suma importância clínica, pois enquanto o CBC deve ser totalmente extirpado devido ao seu comportamento agressivo a alta possibilidade de recorrência local, o TE é um tumor benigno que quando removido por biópsia superficial, não requer novo tratamento e intervenção (Smoller *et al.*, 1994). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que, principalmente, Con A e PNA podem servir como marcadores na distinção entre CBC e TE sinalizando as alterações patobioquímicas específicas originadas destas neoplasias.

Nossos resultados confirmaram perfis de marcação da Con A, PNA, WGA e UEA-I semelhantes a outros estudos utilizando lectinas que demonstraram a presença de aceptores para estas lectinas no parênquima tumoral em CBC (Krüger *et al.*, 1999), padrão de marcação citoplasmático similar das lectinas WGA e PNA na doença de Paget (Tamaki *et al.*, 1985) e forte ligação da UEA-I em casos de hemangioendotelioma epitelióide (Arnold *et al.*, 1986).

A glicosilação aberrante é uma característica bioquímica comum de malignidade em células epidérmicas. Alterações nos carboidratos superficiais acompanham as transformações malignas, resultando no aumento da síntese de antígenos associados ao tumor, o que influencia no desenvolvimento tumoral (Freije *et al.*, 1989; Lalwani *et al.*, 1996). Como a parte terminal dos carboidratos é fortemente imunogênica, essas mudanças podem facilmente ser detectadas por marcadores específicos, através da marcação de células apresentadoras de antígenos, como no caso das CL, baseados na sua reatividade por glicolipídeos bem caracterizados bioquimicamente (Dabelsteen *et al.*, 1992).

O SALT é um potencial candidato para regulação do comportamento dos tumores que acometem a pele (Smolle & Wolf, 1997). E neste contexto, as células de Langerhans (CL) tornam-se importantes elementos da vigilância imune da epiderme humana, através de uma certa relação numérica e topográfica com outras células epidérmicas. Na epiderme normal a proporção é de 1 célula de Langerhans para 53 outras células epidérmicas, constatando-se assim, que as CL representam 1,86% de todas as células epidérmicas (Bauer *et al.*, 2001).

A análise dos carboidratos superficiais das CL provou existir mais aceptores para os açúcares manose e fucose do que para os açúcares N-acetilglucosamina (GlcNac) e N-acetilgalactosamina (GalNac), sendo estas proporções alteradas dependendo do estímulo imunogênico envolvido (Condaminet *et al.*, 1998). Fato este, não corroborado por este estudo que demonstrou um padrão de marcação ineficaz e inespecífico para LTA/UEA-I e Con A que reconhecem porções de L-fucose e manose, respectivamente.

Concluímos que as lectinas testadas falharam na identificação das CL em neoplasias cutâneas apesar de que, em outros trabalhos a marcação com a lectina PNA e anticorpo policlonal para proteína S-100 terem sido recomendados como métodos adicionais no diagnóstico da histiocitose das células de Langerhans (Rabkin *et al.*, 1990; Bouloc *et al.*, 2000), além de exibirem uma forte marcação citoplasmática em células epitelíoides em xantogranuloma juvenil (Kanitakis *et al.*, 1988).

A explicação para os padrões de marcação incipientes para as lectinas utilizadas, pode ser devido aos diferentes estágios de maturação das CL ou simplesmente a perda dos carboidratos superficiais devido a mudanças metabólicas induzidas por substâncias produzidas pelas células tumorais (Hadju *et al.*, 1986; Bergfelt *et al.*, 1994).

Através da microscopia eletrônica, a análise das populações de CL na pele tem sido amplamente utilizada como um dos parâmetros para monitorar a reatividade imunológica da pele (Scheynius *et al.*, 1992; Bergfelt *et al.*, 1994; Emilson & Scheynius, 1995). Infiltrações de CL reconhecidas imunohistoquimicamente como células S-100 positivas (Matsuda *et al.*, 1990) ou através da análise computadorizada de imagens (Emilson & Scheynius, 1995) são consideradas componentes chave na imunidade contra a malignização das lesões cutâneas.

A fim de quantificar as populações de CL vários estudos tem sido realizados utilizando-se métodos bidimensionais em secções verticais profundas ou cortes superficiais da epiderme normal (Bauer *et al.*, 2001) e tumoral (Robson *et al.*, 2001). Devido a eficiência do *confocal laser scanning microscopy* (Bergfelt *et al.*, 1994) e dos sistemas de análise computadorizada de imagens na contagem das CL (Emilson & Schemius, 1995), os dados podem ser digitalmente armazenados permitindo os mais diversos estudos a partir das imagens dos tecidos até a reconstrução tri-dimensional (3D) das células.

As alterações na densidade de CL mostra-se de grande importância pois estão correlacionadas diretamente com as reações imunológicas dentro da epiderme, como na

indução de sensibilização e imunossupressão (Emilson & Schemius, 1995). Principalmente quando se sabe que a imunossupressão pode levar ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer de pele (Wennberg, 2000).

O aumento estatisticamente significativo na densidade de CL em tumores benignos quando comparados com os tumores malignos e epiderme normal obtidos neste estudo, foi similar aquele observado em outro trabalho sobre sarcoidiose e reação tuberculóide da pele (Chambers *et al.*, 1990). Estes resultados aumentam a possibilidade de haver uma patogênese diferenciada para os tumores benignos e ao mesmo tempo um efeito imunossupressivo das células tumorais malignas sobre as CL. Estudos recentes, mostram que devido a distúrbios na produção local de citocinas, ocorre uma aparente inativação/ativação das CL, resultando em alterações numéricas deste tipo celular tanto durante as infecções virais por HPV (Arrese *et al.*, 2001; Miyagi *et al.*, 2001), durante a utilização de imunógenos cutâneos (Santos & Pereira Jr, 1997), quanto em neoplasias malignas (Smolle *et al.*, 1997; McNiff *et al.*, 1999).

Dados da literatura comprovam que há uma maior densidade média de LC em ceratoacantoma quando comparados ao carcinoma de células escamosas (Stephenson *et al.*, 1987). Por outro lado, outros estudos imunohistoquímicos exibiram marcação intensa em 80% dos carcinomas basocelulares e negativa para os tricoepiteliomas (Smith *et al.*, 2001). Outro fator que explica a menor densidade, área e volume das CL são os efeitos crônicos da exposição solar, através da radiação ultravioleta, acarretando alterações morfológicas na área e volume celulares e comprimento dos dendritos (Yu *et al.*, 1994; Cho *et al.*, 1999). Contudo, de acordo com os dados da análise de imagens obtidas neste trabalho, mesmo a maioria dos tumores sendo de áreas expostas ao sol (cabeça/pescoço), não se observaram diferenças significantes na área e volume das CL nos tumores estudados.

Desta forma, os resultados conflitantes quanto a densidade de CL epidérmicas, através de métodos morfométricos convencionais, pode ser explicada pela distribuição casualizada das CL, os diferentes métodos de marcação e medição bem como a ampla variedade de procedimentos de preparação do material histológico (Bauer *et al.*, 2001).

Células dendríticas S-100 positivas (CL) são reconhecidas como as mais efetivas na indução da resposta imune primária, além de serem o melhor veículo para captura de antígenos tumorais específicos (Okuyama *et al.*, 1998). Devido a este fato, a imunomarcação para proteína S-100 é bastante recomendada como instrumento de apoio no diagnóstico de algumas lesões (Robson *et al.*, 2001). Com isso, a proteína S-

100, expressa por estas células, também desempenha funções importantes na regulação de proteínas efetoras específicas de sinalização celular (Donato, 2001).

Células de Langerhans tem sido implicadas como ativadoras dos linfócitos T em carcinomas basocelulares (Hunt *et al.*, 1994). Nos tumores analisados neste trabalho observou-se também grande quantidade de LC associadas com agregados linfóides adjacentes às células neoplásicas, fato este que pode evidenciar uma migração das CL para regiões próximas aos tumores benignos e não propriamente um aumento na proliferação deste tipo celular (Robson *et al.*, 2001).

O sistema de análise de imagens utilizado no presente trabalho demonstrou ser eficiente na quantificação das CL marcadas pela imunohistoquímica, corroborando com a idéia de que sistemas como este podem contribuir substancialmente como ferramentas auxiliares no prognóstico e diagnóstico de diversos estados patológicos, principalmente o estudo de tumores (Borley & Warren, 2000; Lin *et al.*, 2001).

Nossos resultados contribuem demonstrando diferenças na imunogenicidade dos tumores confirmando que a densidade populacional de CL pode estar associada com um melhor prognóstico de malignidade (Matsuda *et al.*, 1990) bem como, fornecem parâmetros quantitativos complementares na distinção entre neoplasias benignas e malignas da pele.

Pode-se concluir também que, em geral, quanto mais anaplásica torna-se uma célula, mais intensa é a sua marcação por determinadas lectinas. O que indica que a distribuição e natureza dos glicoconjugados superficiais foram alteradas (Lalwani *et al.*, 1996; Okuyama *et al.*, 1998). Desta forma, de acordo com os dados qualitativos (histoquímica com lectinas) e quantitativos (análise digital de imagens) obtidos neste trabalho, pode-se constatar que as lectinas vegetais podem servir como potenciais sinalizadores das alterações bioquímicas nas células tumorais, com isso auxiliando na distinção de tipos histológicos de neoplasias cutâneas.

CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ Os tumores malignos (Carcinoma Basocelular e Carcinoma Epidermóide) expressaram padrões distintos de marcação com lectinas que os diferenciaram das neoplasias benignas de pele (Ceratoacantoma, Tricoepitelioma, Ceratose actínica, Ceratose seborréica);
- ✓ Não houve diferenças estatisticamente relevantes na área e número médio das células neoplásicas malignas e benignas marcadas pelas lectinas;
- ✓ A marcação pela histoquímica com lectinas mostrou-se ineficaz para a identificação das células de Langerhans (CL), não havendo marcação celular distintiva entre os casos de neoplasias e as amostras de epiderme normal;
- ✓ A forte marcação dos tumores pela lectina PNA evidencia uma maior expressão de D-galactose em neoplasias cutâneas quando comparada a outros tipos de carboidratos celulares;
- ✓ Houve redução numérica significativa na densidade de CL nos tumores malignos (50,6%) e um aumento médio de CL nos tumores benignos (115,8%) quando comparados a epiderme normal. Contudo, áreas e volumes celulares médios das CL entre as neoplasias benignas, malignas e epiderme normal não exibiram diferenças;
- ✓ O sistema de análise de imagens utilizado (OPTIMAS™ 6.1) demonstrou ser eficiente na quantificação das CL identificadas pela imunohistoquímica e células neoplásicas epidérmicas marcadas pela histoquímica com lectinas.

REFERÊNCIAS

Abdullaev FI, DeMejia EG (1997) Antitumor activity of natural substances: lectins and saffron. *Arch. Latino. Nutr.* **47**(3): 195-202.

Andrade LA (1999) Carcinogênese. **In:** *Patologia Especial com Aplicações clínicas*. Faria JL (Ed.) 2º Edição, Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 650p.

Ardavín C (1997) Thymic dendritic cells. *Immunol. Today.* **18**: 350-361.

Arnold G, Klein PJ, Fisher R (1986) Epithelioid hemangioendothelioma. Report of a case with immuno-lectin histochemical and ultrastructural demonstration of its vascular nature. *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)*, 408:435-43.

Arrese JE, Paquet P, Claessens N, Pierard-Franchimont C, Pierard GE (2001) Dermal dendritic cells in anogenital warty lesions unresponsive to an immune-response modifier. *J. Cut. Pathol.* **28**(3): 131-34.

Astoul CH, Peumans WJ, van Damme EJ (2000) Accessibility of the high-mannose glycans of glycoprotein gp120 from human immunodeficiency virus type 1 probed by *in vitro* interaction with mannose-binding lectins. *Biochem. Biophys. Commun.* **274**(2): 455-460.

Azizi E & Bucana C (1987) Perturbation of epidermal Langerhans cells in basal cell carcinoma. *Am. J. Dermatopathol.* **9**: 465-473.

Azulay RD, Azulay DR (1997) A pele - Embriologia, Estrutura e Fisiologia. **In:** *Dermatologia*. (Azulay RD), 2º Edição. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. **1-4**.

Bacchi CE, Almeida PCC, Franco M (1999) Manual de padronização de laudos histopatológicos (Sociedade Brasileira de Patologia), 2ª Edição, Reichmann & Affonso (Ed.), Rio de Janeiro. 266p.

Barbosa-Júnior AA (2001) Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. *J. Bras. Patol.* **37**(3): 197-200.

Bardosi A, Dimitri T, Gabius HJ (1988) Neo-glycoproteins as tool in neuropathology: histochemical patterns of the extent of expression of endogenous carbohydrate-binding receptors like lectins in meningiomas. *Virch. Arch. Pathol.* **56**:35-43.

Bartels PH & Thompson D (1994) The video photometer. **In:** *Image Analysis. A primer for pathologists*. Marchevsky AM & Bartels PH (Ed.) Raven Press Ltd. New York. p. **29-56**.

Bartels PH (1994) Quantification in Histopathology: Objectives, origins, Digital image analysis and unresolved issues. **In:** *Image Analysis. A primer for pathologists*. Marchevsky AM & Bartels PH (Ed.) Raven Press Ltd. New York. p. **1-28**.

Basarab T, Orchard G, Russell-Jones R (1998) The use of immunostaining for bcl-2 and CD 34 and the lectin peanut agglutinin in differentiating between basal cell carcinomas and trichoepitheliomas. *Am. J. Dermatopathol.* 20(5): 448-452.

Basarad T, Orchard G, Jones RR (1997) The use of immunohistochemistry to differentiate between trichoepitheliomas and basal cell carcinoma. *J. Pathol.* 181(suppl V): A61.

Bauer J, Bahmer FA, Worl J, Newhuber W, Schuler G, Fartash M (2001) A strikingly constant ratio exists between Langerhans cells and other epidermal cells in human skin. A stereologic study using the optical disector method and the confocal laser scanning microscope. *J. Inv. Dermatol.* 116(2): 313-18.

Beltrão EIC, Figuerêdo-Silva J, Carvalho Jr LB (1998) Infiltrating ductal mammary carcinoma: Lectin histochemistry study. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb.* 46(1): 32-35.

Beltrão EIC (2001) Caracterização parcial e aplicação da lectina de sementes de *Parkia pendula* (visgueiro). (**Tese de Doutorado**) CCB-UFPE, Brasil, 126p.

Bergfelt L (1993) Langerhans cells immunomodulation and skin lesions. A quantitative, morphological and quimical study. *Acta Dermatol. Venereol.* **Suppl. 180**.

Bergfelt L, Emilson A, Lindberg M, Scheynius A (1994) Quantitative and 3-dimensional analysis of Langerhans cells in basal cell carcinoma. A comparative study using light microscopy and confocal laser scanning microscope. *Br. J. Dermatol.* 130: 273.

Bernerd F, Sarasin A, Magnaldo T (1999) Galectin-7 over expression in associated with the apoptotic process in UVB induced sunburn Keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(20): 11329-11334.

Bigler C, Feldman J, Hall E, Padilha RS (1996) Pigmented basal cell carcinoma in Hispanics. *J. Am. Acad. Dermatol.* 34: 751-752.

Binder M, Dolezal I, Wolff K, Pehamberger H (1992) Stereologic estimation of volume-weighted mean nuclear volume as a predictor of prognosis in "thin" malignant melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 99: 180-183.

Bonkobara M, Zukas PK, Shikano S, Nakamura S, Cruz PD, Ariizumi K (2001) Epidermal Langerhans cell-targeted gene expression by a dectin-2 promoter. *J. Immunol.* 167(12): 6893-900.

Borley NR & Warren BF (2000) Simple self-contained desk-top image analysis for the non-specialist. *Histopathol.* 37(5): 479-81.

Bouloc A, Boulland ML, Geissmann F, Fraitag S, andry P, Teillac D, bensussan A (2000) CD101 expression by Langerhans cell histiocytosis cells. *Histopathol.* 36(3): 229-32.

Brooks SA, Leathem AJ, Camplejohn RS, Gregory W (1993) Markers of prognosis in breast cancer : The relationship between binding of the lectin HPA and histological grade, SPF and ploidy. *Breast Cancer Res Treat.* **25** (30) : 247-256.

Bucana CD (1992) Internalization of molecules into Birbeck granule - Like structures in murine dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* **99**: 365-373.

Burdgerman-Shah L (1995) Basal cell carcinoma presenting as finger mass. *Am. J. Clin. Oncol.* **18**(2): 176-179.

Bystryn JC (2001) Epiluminescence microscopy: A reevaluation of its purpose. *Arch. Dermatol.* **137**(3): 377-378.

Chambers B, Milligan A, Fletcher A (1990) Epidermal dendritic S100 positive cells in necrobiosis lipoidica and granuloma annulare. *Brit. J. Dermatol.* **123**: 765-68.

Chammas R, Jasiulionis MG, Jin F, Villa-Verde DMS, Reinhold VN (1994) Carbohydrate-binding proteins in cell-matrix interactions. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**: 2169-79.

Champion RH, Burton JL, Ebling FJ (1992) *Textbook of Dermatology*. 5^a ed. Blackwell (editors), pp. **1488-1494**.

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

Cho CG, Jo HY, Choi HC, Kim IH, Song HJ, Oh CH (1999) A study of the solar effect on actinic keratoses by quantification of elastic fibres using an image analysis system. *Acta Derm. Venereol.* **79**: 278-80.

Cohen C (1996) Image Cytometry Analysis in Pathology. *Hum. Pathol.* **27**: 428-493.
Colton CA, Abel C, Patchett J, Keri J, Yao JB (1992) Lectin staining of cultured microglia. *J. Histochem. Cytochem.* **40**(4): 505-512.

Condaminet B, Péguet-Navarro J, Stahl PD, Schmitt D, Berthier-Vergnes O (1998) Human epidermal Langerhans cells express the mannose-fucose binding receptor. *Eur. J. Immunol.* **28**(11): 3541-3551.

Content-Audonneau JL, Jean marie C & Pauly G (1999) A histological study of human wrinkle structures: Comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles and sun-protected areas. *Brit. J. Dermatol.* **140**(6): 1038-1047.

Costa AM, Figuerêdo-Silva J, Vieira-Melo RJ, Coelho LCBB (2001) Binding evaluation of a leaf lectin from *Bauhinia monandra* to neoplastic cells of astrocytic origin. *XXX Reunião Anual da SBBq*, p. **96** (H-100).

Costa-Barbosa T (1997) Ativação linfocitária e apoptose em linfonodos de camundongos BALB/c tratados com lectinas. (**Dissertação de Mestrado**). Universidade Federal da Bahia. Salvador. 70p.

Cribier B, Asch PH, Grosshans E (1999) Differentiating squamous cell carcinoma from keratoacanthoma using histopathological criteria. Is it possible ? A study of 296 cases. *Dermatol.* 199(3): 208-212.

Cunnings RD (1997) Lectins as tool for glycoconjugate purification and characterization. In: *Glyco-sciences, status and perspectives*. Capítulo 10, Edited by Gabius HJ. Weinheim, Germany, **191-199**.

Dabelsteen E, Clausen H, Mandel U (1992) Carbohydrate changes in squamous cell carcinomas. *APMIS* (Suppl. 27) **100**: 130-38.

Dall'Olio F (1996) Protein glycosylation in cancer biology: an overview. *J. Clin. Pathol: Mol Pathol.* **49**: M126-135.

Dalziel M, McFarlane I, Axford JS (1999) Lectin analysis of human immunoglobulin G N-glycan sialylation. *Glycoconj. J.* **16**(12): 801-807.

De carli ZV (1996) Aspectos imunológicos del epiteloma basocelular. *Rev. Chil. Dermatol.* **12**(2): 85-90.

De Robertis EDP, De Robertis EMF (1993) *Bases da Biologia Celular e Molecular*. 2ª edição, Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 270p.

De Rosa G, Vetrani A, Zeppa P, Zabatta A, Barra E, Gentile R, Fulcinite F, Troncone G, di Benedetto G, Palombini L (1990) Comparative morphometric analysis of aggressive and ordinary basal cell carcinoma of the skin. *Cancer.* **65**: 544-549.

Demartines N, Battegay E, Liebermann J, Oberholzer M, Rufli T, Harder F (2000) Telemedicine: Perspectives and multidisciplinary approach. *Schweiz. Med. Wochensch.* **130**(9): 314-323.

Demirkaya O, Cothren RM, Vince DG, Cornhill JF (1999) Automated identification of stained cells in tissue sections using digital image analysis. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **21**(2): 93-102.

Di Chiacchio N, Cucé LC (1997) Carcinoma basocelular: estudo comparativo dos três tipos histológicos mais frequentes em relação à proliferação celular. *An. Bras. Dermatol.* **72**(5): 427-431.

Donato R (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**(7): 637-68.

Eichinger D (2001) A role for a galactose lectin and ligands during encystment of Entamoeba. *Histol. Histopathol.*, **14**(1): 217-226.

Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, Jonnson-Jr. B (1997) Laboratory Methods. In: *Lever's Histopathology of the skin*. Capítulo 4, 8ª Edição, Lippincort-raven (Ed.) New York, 1073pp.

Elgavish S, Shannan B (1997) Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 462-467.

Emilson A, Schenius A (1995) Quantitative and three-dimensional analysis of human Langerhans cells in epidermal sheets and vertical skin sections. *J. Histochem. Cytochem.* **43**(10): 993-998.

Erler BS & Marchevsky AM (1994) Microphotometry in Pathology. In: *Image Analysis. A primer for pathologists*. Marchevsky AM & Bartels PH (Ed.) Raven Press Ltd. New York. p. **181-206**.

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

Faria JL (1999) Carcinomas. **In:** *Patologia Especial com aplicações clínicas*. 2^a ed. Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro. 687p.

Ferreira-Gonzalez A, Garrett CT (1996) Pitfalls in establishing a molecular diagnostic laboratory. *Hum. Pathol.* **27**: 437-440.

Figuerêdo-Silva J, Pontes-Filho NT, Montenegro LT, Santana JW, Freitas SB (1999) Esquistossomose mansônica experimental: Estudo morfológico e experimental das células caliciformes intestinais. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pe.* **44**: 21-25.

Fonseca A & Lopes de Faria J (1981) Nevos, tumores de pele, dermatoses cancerizáveis. Atheneu Editora. São Paulo. 185p.

Franks LM (1990) Cancer treatment. **In:** *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*. 1st Ed. Chapter 16. Oxford University Press. 423p.

Freije AS, Mostofi RS, Bostwick DG (1989) Alterations in glycoconjugate expression following malignant transformation of human oropharyngeal squamous mucosa. *Laryngoscope.* **99**: 197-203.

Furness P & Rashbass J (2000) The virtual double-headed microscope: telepathology for all? *Histopathol.* **36**(2): 182-183.

Garcia JA et al. (1995) Pleomorphic basal cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **32**(5): 740-746.

Gartner LP & Hiatt JL (1999) Tegumento. In: *Tratado de Histologia* WB Saunders Company, Guanabara-Koogan (Ed.) Cap. 14, Rio de Janeiro, RJ. 426p.

Gheri G, Russo G, Cappugi P, Sgambati E, Bryk SG (1999) The oligosaccharidic component of the glycoconjugates in lichen planus, granuloma annulare, seborrheic keratosis and palmoplantar keratoderma: lectin histochemical study. *Histol. Histopathol.* **14**(3): 697-704.

Graubert TA & Lay TJ (1996) How do lymphocytes kill tumor cells? *Clin. Cancer. Res.* **2**: 785-789.

Grosshans E (1992) Les épithéliomas cutanés. **In:** *Encyclopédie medico-chirurgicale*. Vol. III. Comité Científico. JF Bach (Ed.), Techniques, Paris.

Gutkowicz-Krusin D, Elbaum M, Jacobs A, Keem S, Kopf AW, Olivero M (2000) Precision of automatic measurements of pigmented skin lesion parameters with a MelaFind (TM) multispectral digital dermoscope. *Melanoma Res.* **10**(6): 563-570.

Hadju I, Zhang W, Gordon GB (1986) Peanut Agglutinin binding as a histochemical tool for diagnosis of eosinophilic granuloma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **110**: 719-21.

Hamilton PW & Allen DC (1995) Morphometry in Histopathology. *J. Pathol.* **175**: 369-379.

Hamilton PW (1997) Interactive computer-aided morphometry. **In:** *Quantitative Clinical Pathology*. Peter W. Hamilton & Derek C. Allen (Ed.), Blackwell-Science, USA, 342p.

Hart TR & Suini S (1992) Biology of tumour metastases. *Lancet* **339**: 1453-1457.

Hasan W, Cowen T, Barnett PS, Boulox PMG (2001) the sweating apparatus in growth hormone deficiency, following treatment with r-hgH and in acromegaly. *Autonomic Neurosci. Basic. Clin.* **89**(1-2): 100-109.

Hassanein AM, Al-Quran SZ, Kantor GR, Telang GH, Spielvogel RL (2001) Thomsen-Friedenreich (T) antigen: a possible tool for differentiating sebaceous carcinoma from its simulators. *Applied Immunohistochem. Mol. Morphol.* **9**(3): 250-54.

Herling M, Knolle J, Bahn H, Gabius HJ, Hinze R (2000) Glycohistochemical monitoring of chemically induced sarcomas at different stages of tumorigenesis. *In vivo.* **14**(4): 499-506.

Herman CJ (1996) Image Cytometry in Pathology. *Hum. Pathol.* **27**: 435-436.

Holikova Z, Smetana K, Bartunkova J, Kaltner H, Gabius HJ (2000) Human epidermal Langerhans cells are selectively recognized by galectin-3 but not by galectin-1. *Folia Biol.* **46**(5): 195-198.

Holikova Z, Hercogova J, Plzak J, Smetana K (2001) Dendritic cells and their role in skin-induced immune responses. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **15**(2): 116-120.

Holt PJA, Anglin JH, Nordquist RE (1979) Localization of specific carbohydrate configurations in human skin using fluorescein-labelled lectins. *Brit. J. Dermatol.* **100**: 237-45.

Hunt MJ, Halliday GM, Weedon D (1994) Regression in basal cell carcinoma: an immunohistochemical analysis. *Br. J. Dermatol.* **130**: 1-8.

Hunt MJ, Halliday GM, Weedon D, Cooke BE, Barnetson RS (1994) Regression in basal cell carcinoma: an immunohistochemical analysis. *Brit. J. Dermatol.* **130**: 1-8.

Ishida H, Kumakiri M, Veda K, Lao LM, Fukuda M (2001) Comparative histochemical study of Bowen's disease and actinic Keratosis: preserved normal basal cells in Bowen's disease. *Eur. J. Histochem.* **45**(2): 177-190.

Itoh T, Watanabe H, Ono T (1995) A young woman with xeroderma pigmentosum. *Br. J. Dermatol.* **132**(6): 122-127.

Janeway CA *et al.* (2000) O estudo dos linfócitos e imunidade mediada por células T. In: *Imunobiologia. O sistema imunológico na saúde e na doença*. 4^a Edição, Artmed (Ed). Rio de Janeiro, **C-2**: 59-60/267-269.

Kabir S (1998) Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. *J. Immunol. Meth.* **212**: 193-211.

Takeji Y, Tsujitani S, Mori M, Maehara Y, Sugimachi K (1991) Helix-pomatia agglutinin binding-activity is a predictor of survival-time for patients with gastric carcinoma. *Cancer.* **68**(11): 2438-2442.

Kanitakis J, Roche P, Thivolet J (1988) The expression of PNA-lectin binding sites and S100 protein in histocytic lesions of the skin. A comparative immunohistochemical study. *Acta Derm. Venereol.* **68**: 1-7.

Kanitakis J, Hoyo E, Hermier C, Chouvet B, Thivolet J (1992) Nucleolar organizer region enumeration in keratoacanthomas and squamous cell carcinomas of the skin. *Cancer.* **69**(12): 2937-41.

Kannan S, Balaram P, Chandran, GJ, Pillai MR, Mathew B, Nair MK (1993) Expression of lectin-specific cellular glycoconjugates during oral carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **119**(11): 689-694.

Kannon G & Park K (1990) Utility of Peanut agglutinin (PNA) in the diagnosis of squamous cell carcinoma and keratoacanthoma. *Am. J. dermatopathol.* **12**:31-36.

Karrer S, Abels C, Szeimies RM, Baumler W, Dellian M, Goetz AE, Landthaler M (1997) Topical application of a first porphycene dye for photodynamic therapy-penetration studies in human perilesional skin and basal cell carcinoma. *Arch. Dermatol. Res.* **289**(3): 132-137.

Katink-Prastowska I (1999) Haptoglobin glycoforms in a case of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Glycoconj. J.* **10**(10): 573-577.

Kennedy JF, Palva PMG, Corella MTS, Cavalcanti MSM, Coelho LCBB (1995) Lectins, versatile proteins of recognition - a review. *Carb. Polymers.* **26**(3): 219-230.

Kivinen PK, Hyttinen M, Harvima RJ, Naukkarinen A, Horsmanheimo M (1999) Quantitative digital image analysis applied to demonstrate the stratified distribution of involucrin in organ cultured human skin. *Arch. Dermatol. Res.* **291**(4): 217-223.

Klein PJ, Vierbuchen M, Wurz H, Schulz KD, Newman RA (1981) Secretion-associated lectin-binding sites as a parameter of hormone dependence in mammary carcinoma. *Brit. J. Cancer*. **44**: 476-478.

Kligerman J (2001) Estimativas sobre incidência e mortalidade por câncer no Brasil - 2001. *Rev. Bras. Cancerol.* **47**(2): 111-14.

Krüger K, Blume-Peytavi U, Orfanos CE (1999) Basal cell carcinoma possibly originates from the outer root sheath and/or the bulge region of the vellus hair follicle. *Archiv. Dermatol. Res.* **291**(5): 253-59.

Kwa RE, Campana K, Moy RL (1992) Biology of cutaneous squamous cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **26**: 1-26.

Lalwani AK, Carey TE, Goldstein IJ, Peters BP (1996) Lectin binding characteristics of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Acta Otolaryngol.* **116**: 125-131.

Lambert WC, Lapidus A, Rao BK (2001) Melanoma diagnosis by computerized analysis of clinical images. *Arch. Dermatol.* **137**(3): 377.

Leathem AJC (1995) Expression of alpha-gal-Nac glycoproteins by breast cancers. *Brit. J. Cancer*. **71**(5): 1033-1038.

Leboit PE & Sexton M (1993) Microcystic adnexal carcinoma of the skin - A reappraisal of the differentiation and differential-diagnosis of na under recognized neoplasm. *J. Am. Acad. Dermatol.* **29**(4): 609-618.

Lee JS, Jung JJ, Kim J (2000) Quantification of angiogenesis by a computerized image analysis system in renal cell carcinoma. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **22**(6): 469-474.

Lin B, Ginsberg MD, Zhao W, Alonso OF, Belayev L, Busto R (2001) Quantitative analysis of microvascular alterations in traumatic brain injury by endothelial barrier antigen immunohistochemistry. *J. Neurotrauma*. **18**(4): 389-97.

Litynska A, Przybylo M, Pohec E, Laidler P (2001) Comparison of the lectin-binding pattern in different human melanoma cell lines. *Melan. Res.* **11**(3): 205-212.

Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns L (1998) Legume lectin structure. *Biochem. Biophys. Acta*. **1383**: 9-36.

Maceira PJ, Magalhães RO (1998) Comparação entre a classificação tradicional dos nevus melanocíticos adquiridos. *Anais. Bras. Dermatol.* **73**(5): 403-408.

Maia LC, Figuerêdo-Silva J, Silva ECC, Souza BR, Cavalcanti CLB (1999) Estudo morfométrico da rede arteriolar miocárdica em indivíduos alcoolistas crônicos. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pe.* **44**: 31-33.

Martinez EIM (1998) Densidade de células de Langerhans em mulheres com vulva normal e em portadoras de HPV vulvar (**Tese de Mestrado**) FCM-UPE, Recife. 117p.

Massad E, Böhm GM, Wen CL, Silveira PSP (1998) O universo da informática e o ensino médico. *In: Educação Médica*. 1ª Edição, Eduardo Marcondes (Org). Sarvier Ed. São Paulo, 280p.

Matsuda H, Mori M, Tsujitani S, Sugimachi K (1990) Immunohistochemical evaluation of squamous cell carcinoma antigen and S-100 protein positive cells in human malignant esophageal tissues. *Cancer*. **65**: 2261-2265.

Matsumoto H, Shimazu H, Muramatsu T (1992) Carbohydrate profiles shown by a lectin and monoclonal antibody correlates with metastatic potential and prognosis of human lung carcinoma. *Cancer*. **69**(8): 2084-2090.

McNiff JM, Eisen RN, Glusac EJ (1999) Immunohistochemical comparison of cutaneous lymphadenoma, trichoblastoma, and basal cell carcinoma: support for classification of lymphadenoma as a variant of trichoblastoma. *J. Cutan. Pathol*. **26**(3): 119-24.

Mehregan AH *et al.* (1995) Basal cell epithelioma. *In: Pinku's guide to dermatopathology*. Capítulo 40, 6ª Edição, London: Prentice-Hall International, p. **629-647**.

Mello MLS, Contente S, Vidal BC, Planding W, Schenck U (1995) Modulation of *ras* transformation affecting chromatin supraorganization as assessed by image analysis. *Exp. Cell Res*. **220**: 374-382.

Menzeis SW (1999) Automated epiluminescence microscopy: Human vs machine in the diagnosis of melanoma. *Arch. Dermatol*. **135**(12): 1538-1540.

Menzeis SW (2001) Epiluminescence microscopy diagnostic criteria with follow-up computer-based monitoring of "less suspicious" lesions may increase sensitivity for the diagnosis of melanoma while maintaining adequate specificity. *Arch. Dermatol*. **137**(3): 378-379.

Mikulowska A, Falck B (1994) Distributional changes of Langerhans cells in human skin during irritant contact dermatitis. *Arch. Dermatol. Res*. **286**(8): 429-433.

Miller SJ (1991) Biology of basal cell carcinoma (part II). *J. Am. Acad. Dermatol*. **24**(1): 1-13.

Minwalla L, Zhao Y, Cornelius J, Le Poole IC (2001) Inhibition of melanosome transfer from melanocytes to keratinocytes by lectins and neoglycoproteins *in vivo* and *in vitro* model system. *Pig. Cell. Res*. **14**(3): 185-194.

Mitchell BS & Schumacher U (1999) The use of the lectin *Helix pomatia* agglutinin (HPA) as a prognostic indicator and as tool in cancer research. *Histol. Histopathol*. **14**(1): 217-226.

Miyagi J, Kinjo T, Tshako K, higa M, Iwamasa T, kamada Y, Hirayasu T (2001) Extremely high Langerhans cell infiltration contributes to the favourable prognosis of

HPV-infected squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Histopathol.* **38**(4): 355-67.

Monastirli A, Pasmatzis E, Georgiou S, Kapranos N, Ioannovich J (2000) Lectin-binding pattern of primary malignant melanomas and melanocytic nevi. *J Cut. Pathol.* **27**(3): 103-107.

Montenegro MR & Franco M (1999) Carcinogênese. **In:** *Patologia processos gerais*. Capítulo 13, 4ª edição, Editora Atheneu, São Paulo, 320p.

Morita A, Ariizumi K, Ritter R, Jester JV, Kumamoto T, Johnston AS, Takashima A (2001) Development of a Langerhans cell-targeted gene therapy format using a dendritic cell-specific promoter. *Gene Therapy.* **8**(22): 1729-37.

Mota MHG (2001) Lectinas da sub-tribo *Diocleinae* como ferramentas histoquímicas. Avaliação em tecidos normais e transformados do sistema nervoso central, colo uterino e mama. **(Tese Doutorado)** CCB-UFCE, Fortaleza. 108p.

Muramatsu T (1993) Carbohydrate signals in metastasis and prognosis of human carcinomas. *Glycobiol.* **3**: 291-96.

Murphy GF & Mihm MC (1994) The skin - Benign Epithelial Tumors **In:** *Robbins Pathologic Basis of Disease*. WB Saunders Company. 5ª edição; 1400p; Philadelphia, USA.

Nakanishi K, Kawai T, Suzuki M (1993) Lectin binding and expression of blood group-related antigens in carcinoma-in-situ and invasive carcinoma of urinary bladder. *Histopathology* **23**(2): 153-158.

Narita T (1989) Cellular glycoproteins correlatin with pulmonary-colonizing potential in B16 melanoma. *Inv. Metast.* **9**: 1-3.

Nelson DL & Cox MM (2000) *Lehninger. Principles of the Biochemistry*. Worth publishers. 3ª Edição, New York (USA), 1145p.

Nishimura A, Sawada S, Ushiyama I, Yamamoto Y, Nakagawa T, Nishi K (2000) Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain. *Forensic. Sci. Int.* **113**(1-3): 265-269.

Novik VI (2000) The use of computer technology in the cytologic diagnosis of neoplasms. *Vopr. Onkol.* **46**(2): 239-242.

Oberholzer M, Östreicher M, Christen H, Brühlmann M (1996) Methods in quantitative image analysis. *Histochem. Cell. Biol.* **105**: 333-355.

Okuyama T, Maehara Y, Kakeji Y, Tsujitani S, korenaga D, Sugimachi K (1998) Interrelation between tumor-associated cell surface glycoprotein and host immune response in gastric carcinoma patients. *Cancer.* **82**(8): 1468-75.

Oram Y, Orengo I, Griego RD, Rosen T, Thornby J (1995) Histologic patterns of basal cell carcinoma based upon patient immunostatus. *Dermatol. Surg.* **21**: 611-614.

Patel A, Halliday GM, Cooke BE, Barnetson RS (1994) Evidence that regression in keratoacanthoma is immunologically mediated: a comparison with squamous cell carcinoma. *Brit. J. Dermatol.* **131**: 789-798.

Pereira TS (1999) Estudo quantitativo das células de Langerhans em lesões melanocíticas (**Tese de Mestrado**) Centro de Ciências da Saúde-UFPE, Recife. 67p.

Petersen I, Wolf G, Roth K, Schlüns K (2000) Telepathology by the internet. *J. Pathol.* **191**(1): 8-14.

Petter G & Haustein UF (2001) Rarely occurring and newly described histological variants of cutaneous squamous cell carcinoma. Classification based on histopathology, cytomorphology and biologic behavior. *Hautarzt.* **52**(4):288-290.

Peumans WJ & Van Damme EJM (1998) Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotech. Genet. Eng. Rev.* **15**: 347-352.

Phillips CL, Arend LJ, Filson AJ, Clendenon JL, Dunn KW (2001) Three-dimensional imaging of embryonic mouse kidney by two-photon microscopy. *Am. J. Pathol.* **158**(1): 49-55.

Plzak J, Smetana K, Betka J, Kodet R, Kaltner H, Gabius HJ (2000) Endogenous lectins (galectins-1 and -3) as probes to detected differentiation-dependent alterations in human squamous cell carcinomas of the oropharynx and larinx. *Int. J. Mol. Med.* **5**(4): 369-372.

Poniecka AW, Alexis JB (1999) An immunohistochemical study of basal cell carcinoma and trichoepithelioma. *Am. J. Dermatopathol.* **21**(4): 332-336.

Porto JA (1995) Câncer da pele: prevenção primária. *Atual Dermatol.* **1**(1): 20-21.

Rabkin MS, Kjeldsberg CR, Wittwer CT, Marty J (1990) A comparison study of two methods of peanut agglutinin staining with S-100 immunostaining in 29 cases of Histiocytosis X (Langerhan's cell histiocytosis). *Arch. Pathol. Lab. Med.* **114**(5): 511-515.

Rashbass J (2000) The impact of information technology on histopathology. *Histopathol.* **36**(1): 1-7.

Robins SL, Cotran RS, Kumar V (1996) *Patologia Estrutural e Funcional.* 5ª Edição; Ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 384p.

Robson A, Allen P, Hollowood K (2001) S100 expression in cutaneous scars: a potencial diagnostic pitfall in the diagnosis of desmoplastic melanoma. *Histopathol.* **38**(2): 135-40.

Rode J, Williams RA, Jarvis LR, Dhillon AP, Jamal O (1990) S100 protein, neuron specific enolase and nuclear DNA content in Spitz naevus. *J. Pathol.* **161**: 41-45.

Roitt IM, Brostoff J, Male DK (1997) Hipersensibilidade - Tipo IV. In: *Imunologia* (Brostoff J). 4º Ed. Manole, São Paulo, p.25.1-12.

Rolim HML (2000) Ação da lectina de *Cratylia mollis* Mart. sobre células de carcinoma epidermóide de laringe (Hep-2). (**Tese de Mestrado**). Centro de Ciências Biológicas - UFPE, Recife. Brazil. 33p.

Rolim HML, Rodrigues OG, Nascimento SC, Figuerêdo-Silva J, Coelho LCBB, Correia MTS (2001) Effect of glucose/mannose lectins in larynx epidermoide carcinoma cells (HEp-2). *VI Phamatech - III annual Meeting of the SBTF*. **DD-117**. Recife, Brazil.

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

Rudiger H, Siebert HC, Solis D, Jimenez-Berbero J (2000) Medicinal chemistry based on the sugar code: Fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. *Cur. Med. Chem.* **7**(4): 389-416.

Sakamoto M, Into Y, Fujji T, Hirohashi S (1993) Phenotypic changes in tumor vessels associated with the progression of hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **23** (2) : 98-104.

Salmon JK, Armstrong CA, Ansel JC (1994) The skin as an immune organ. *West. J. Med.* **160**(2): 146-152.

Sames K, Moll I, van Damme EJ, Peumans WJ, Schumacher U (1999a) Lectin binding pattern and proteoglycan distribution in human eccrine sweat glands. *J. Leukoc. Biol.* **66**(4): 644-649.

Sames K, Schumacher U, Halata Z, van Damme EJ, Asmus B (1999b) Lectin and proteoglycan histochemistry of Merkel cell carcinomas. *Histochem. J.* **31**(11): 739-746.

Sames K, Schumacher U, Halata Z, van Damme EJ, Moll I (2001) Lectin and proteoglycan Histochemistry of feline pacinian corpuscles. *J. Histochem. Cytochem.* **49**(1): 19-28.

Santos ACO (2001) Feijão camaratu, *Cratylia mollis*: Aspectos estruturais e ultraestruturais, purificação, caracterização e imunolocalização de isolectinas (**Tese de Doutorado**) CCB-UFPE, Brasil. 126p.

Santos IB, Pereira Jr AC (1997) Reatividade da lesão cutânea de Hanseníase a imunógenos epicutâneos e intradérmicos. *An. Bras. Dermatol.* **72**(6): 539-545.

Santos OLR (1994) Carcinoma basoescamoso pigmentado. *An. Bras. Dermatol.* **69**(1): 22-26.

Schaumburg-Lever G (1990) Ultrastructural localization of lectin-binding sites in normal skin. *J. Invest. Dermatol.* **94**: 465-470.

Schumacher DV, Randall CJ, Ramsay AD, Schumacher U (1996) Is the binding of the lectin Helix pomatia agglutinin (HPA) of prognostic relevance in tumours of the upper aerodigestive tract? *Eur. J. Surg. Oncol.* **22**(6): 618-620.

Sharon N, & Lis H (1989) Lectins as cell recognition molecules. *Science.* **246**: 227-234.

Sharon N & Lis H (1993) Carbohydrates in cell recognition. *Scient. Am.* **268**: 74-78.

Shinagawa K, Anderson GP (2000) Rapid isolation of homogeneous murine bronchoalveolar lavage fluid eosinophils by differential lectin affinity interaction and negative selection. *J. Immunol. Meth.* **237**(1-2): 65-72.

Smith KJ, Williams J, Corbett D, Skelton H (2001) Microcystic adnexal carcinoma - An immunohistochemical study including markers of proliferation and apoptosis. *Am. J. Surg. Pathol.* **25**(4): 464-71.

Smolle J, Soyer HP, Hoemann-Wellenhof R, Smolle-Juettner FM, Kerl H (1989) Vascular architecture of melanocytic skin tumors. A quantitative immunohistochemical study using automated image analysis. *Pathol. Res. Pract.* **185**: 740-745.

Smolle J & Wolf P (1997) Is favorable prognosis of squamous cell carcinoma of the skin due to efficient immune surveillance. *Arch. Dermatol.* **133**(5): 645-46.

Smoller BR (1995) Differentiation of basal cell carcinoma from trichoepitelioma by lectin histochemistry. *Brit. J. Dermatol.* **132**: 1014-1025.

Spicer SS, Schulte BA (1992) Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: A perspective. *J. Histochem. Cytochem.* **40**(1): 1-38.

Stanley JM (1991) Biology of basal cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**(1): 1-13.

Steinman R, Hoffman L, Pope M (1995) Maturation and migration of cutaneous dendritic cells. *J. Clin. Invest.* **105** (Suppl 1): 2-7.

Stephenson TJ, Nichols CE, Cotton DWK (1987) Keratoacanthomas contain a higher density of Langerhans cells than well differentiated squamous cell carcinoma. *J. Pathol.* **152**: 237-238.

Strauchem JA (2000) Further called for "Teleconsultation". *Am. J. Clin. Pathol.* **113**(4): 595.

Stryer L (1996). *Biochemistry*

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

Takahashi, T. *et al.* (2000) Alpha 1,6 fucosyltransferase is highly and specifically expressed in human ovarian serous adenocarcinomas. *Int. J. Cancer.*, **88**(6): 914-19.

Takano, Y., Teranishi, Y., Terashima, S., Motoki, R., Kawaguchi, T. (2000) Lymph node metastasis-related carbohydrate epitopes of gastric cancer with submucosal invasion. *Surgery Today.*, 30(12): 1073-82.

Tamaki K, Hino H, Ohara K, Furue M (1985) Lectin-binding sites in Paget's disease. *Brit. J. Dermatol.* 113: 17-24.

Thies A, Moll I, Berger J, Schumacher U (2001) Lectin binding to cutaneous malignant melanoma: HPA is associated with metastasis formation. *Brit. J. Cancer.* **84** (6): 819-823.

Thrush G, Lark LR, Clinchy BC, Vitetta ES (1996) Immunotoxins: an update. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 49-71.

Tilman U & Scheriner MD (1995) Langerhans cell in skin tumors. *Arch. Dermatol.* **131**: 187-190.

True LD (1996) Morphometry Applications in Anatomic Pathology. *Hum. Pathol.* **27**: 450-467.

Udey MC (1997) Cadherins and Langerhans cell Immunobiology. *Clin. Exp. Immunol.* **107**(suppl 1): 6-8.

Vacuende CF & Ramirez BAA (1994) Langerhans cells and lymphocytic infiltrate in AIDS-associated Kaposi Sarcoma: An Immunohistochemical study. *Acta Derm. Venereol.* **74**(3): 183-187.

Valentiner U, Pfüller U, Baum C, Schumacher U (2002) The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II and III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cells lines in vitro. *Toxicology.* 171: 187-99.

Van Bommel JH, Musen MA (1997) Biostatistical Methods. In Handbook of medical informatics. Springer-Verlag (Ed.), Germany, 387-96p.

Villanueva MA (2002) Elimination of artifacts on native western blots arising from endogenous lectin activity. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **50**(2-3): 141-49.

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

Wakimoto H, Aoyagi M, Nakayama T, nagashima G, Yamamoto S, Tamaki M, hirakawa K (1996) Prognostic significance of Ki-67 labeling indices obtained using MIB-1 monoclonal antibody in patients with astrocytomas. *Cancer.* **77**: 373-380.

Waldman FM, Sauter G, Sudar D, Thompson CT (1996) Molecular Cytometry of Cancer. *Hum. Pathol.* **27**: 441-449.

Wang CY & Su WP (1995) Skin cancers associated with acquired immunodeficiency syndrome. *Mayo Clin. Proc.* **70**(8): 766-772.

Wang H, Gao J, Ng TB (2000) A new lectin with highl potent anti-hepatoma and anti-sarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **275**(3): 810-816.

Weis WI, Drickamer K (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Ann. Rev. Biochem.* **65**: 441-473.

Wennberg AM (2000) Basal cell carcinoma - New aspects of diagnosis and treatment. *Acta Derm. Venereol. Supp.* **209**: 5-25.

Whimster WF, Cookson MJ (1995) Three-dimentional reconstruction. In: *Quantitative Clinical Pathology*. Hamilton PW (Ed.). Blackwell Science Ltd. Oxford. p. **289-300**.

Wright-Browne V, McClain KL, Talpaz M, Ordenez N, Estrov Z (1997) Physiology and pathophysiology of dendritic cells. *Hum. Pathol.* **28**: 563-579.

Xu XC, Brinck U, Schauer A, Gabius HJ (2000) Differential binding activities of lectins and neoglycoproteins in human testicular tumors. *Urol. Res.* **28**(1): 62-68.

Yu RC, Abrams DC, Alaibac M, Chu AC (1994) Morphological and quantitative analyses of normal epidermal Langerhans cells using confocal scanning laser microscopy. *Brit. J. Dermatol.* **131**: 843-48.

Yu, L.G. et al. (2001) Opposite effects on human colon cancer cell proliferation of two dietary Thomsen-Friedereich antigen-binding lectins. *J. Cell. Physiol.*, 186(2): 282-87.

ANEXOS

RESUMOS E PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS DURANTE O MESTRADO

MELO-JÚNIOR, Mário Ribeiro de, BELTRÃO, Eduardo Isidoro Carneiro, FIGUERÊDO-SILVA, José, CARVALHO JÚNIOR, Luiz Bezerra de. Comparative lectin Histochemistry of Nodular hyperplasia and Prostatic carcinoma using image analysis. In: **XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e biologia Molecular**, C:25, pág. 28, Caxambú, Brasil, 2002.

MELO-JÚNIOR, Mário Ribeiro de, BELTRÃO, Eduardo Isidoro Carneiro, FIGUERÊDO-SILVA, José, CARVALHO JÚNIOR, Luiz Bezerra de. Relationship between lectin-binding in human gastric mucosae with and without exposure to *Helicobacter pylori*. In: **XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e biologia Molecular**, C:07, pág. 25, Caxambú, Brasil, 2002.

MELO-JÚNIOR, Mário Ribeiro de, BELTRÃO, Eduardo Isidoro Carneiro, CARVALHO JÚNIOR, Luiz Bezerra de. Lectin Histochemistry of gastrointestinal mucosae of rats exposed to alcohol. In: **XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, H:76, pág. 102, Caxambú, Brasil, 2002.

MELO-JÚNIOR, Mário Ribeiro de, LIMA, Laurení Alves de, PONTES FILHO, Nicodemos Teles de. Does the exposition to Alcohol in pre and post-natal periods interfere on the formation and maturation of Peyer's patches ?. **An. Fac. Med. Univ. Fed. Pe**, 47(1): 22-26, 2002.

MELO-JÚNIOR, Mário Ribeiro de, NERI, David Fernandes Morais, CARVALHO JÚNIOR, Luiz Bezerra de, BELTRÃO, Eduardo Isidoro Carneiro. Comparative lectin binding of the egg-granuloma system in experimental and human Schistosomiasis. In: **VI Reunião Regional-Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica**, N:100, pág. 122-A, Fortaleza, Brasil, 2002.

MELO-JÚNIOR, Mário Ribeiro de, VASCONCELOS, Susan Kelly Silva, PONTES FILHO, Nicodemos Teles de. NADPH-diaphorase neurons density of the visual cortex of rats exposed to ethanol. In: **VI Reunião Regional-Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica**, H:45, pág. 130-A, Fortaleza, Brasil, 2002.

MELO-JÚNIOR, Mário Ribeiro de, CARDOSO-SILVA, Cynarha Daysy, PONTES FILHO, Nicodemos Teles de. Distinct immune-morphologic alterations in Peyer's patches and spleen during exposition to ethanol. In: **VI Reunião Regional-Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica**, B:14, pág. 102-B, Fortaleza, Brasil, 2002.

MELO-JÚNIOR, Mário Ribeiro de, PATU, Vasco José Ramos Malta, CARVALHO JÚNIOR, Luiz Bezerra de, PONTES FILHO, Nicodemos Teles de, BELTRÃO, Eduardo Isidoro Carneiro. Effects of exposition to ethanol in the rat renal cortex: Lectin histochemistry study. In: **VI Reunião Regional-Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica**, B:08, pág. 103-C, Fortaleza, Brasil, 2002.

MELO-JÚNIOR, Mário Ribeiro de, ARAÚJO-FILHO, Jorge Luiz Silva, VIEIRA-MELLO, Roberto José, CARVALHO JÚNIOR, Luiz Bezerra de, BELTRÃO, Eduardo Isidoro Carneiro. Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. In: **VI Reunião Regional-Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica**, B:11, pág. 103-D, Fortaleza, Brasil, 2002.

MELO-JÚNIOR, Mário Ribeiro de, VEIGA, Renata Kelly de Araújo, PONTES-FILHO, Nicodemos Teles de. Splenic alterations of pre and post-natal exposure to alcohol (CH₃CH₂OH): A morphometric study. Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. In: **VI Reunião Regional-Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica**, H:78, pág. 102-E, Fortaleza, Brasil, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)