

Cinética celular em lesões pré-invasivas e invasivas do epitélio escamoso cervical: estudo morfológico e imunoistoquímico

Cellular kinetics in preinvasive and invasive lesions of cervical squamous epithelium: morphologic and immunohistochemical study

Luzia S. U. YAMAMOTO^{1*}
Marina Y. S. MAEDA¹
Janaína E. PITTOLI³
Evandro S. de MELLO⁴
Luciana de O. LEANDRO³
Alda WAKAMATSU¹
Celso di LORETO⁴

RIALA6/924

Yamamoto, L. S. U. et al. Cinética celular em lesões pré-invasivas e invasivas do epitélio escamoso cervical: estudo morfológico e imunoistoquímico. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 61(2):97-101, 2002

RESUMO. Avaliar quantitativamente a apoptose (morte celular programada) e a taxa de proliferação celular no espectro das lesões neoplásicas do colo uterino. Materiais e Métodos: Analisamos 81 biópsias cervicais previamente diagnosticadas na Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz segundo a classificação da OMS como sendo: neoplasia intraepitelial cervical de grau 1 NIC 1 = 20, NIC 2 = 19, NIC 3 = 23 e carcinoma de células escamosas (CCE) = 19. Foi utilizado o método imunoistoquímico para detecção das células em proliferação (MIB-1) e o método de TUNEL para a apoptose. As células foram contadas através de fotomicrografia digital, sendo que o número variou de 83 a 2975 (média = 1515,62) para MIB-1 e 315 a 3565 para apoptose (média = 1273,24). Resultados: Houve um aumento progressivo nas taxas de proliferação (%) com a severidade da lesão (NIC 1 = 22,7; NIC 2 = 34,5; NIC 3 = 38,3; CCE = 52,6 p < 0,0001). O mesmo foi obtido com as taxas de apoptose (%) (NIC 1 = 0,30; NIC 2 = 0,55; NIC 3 = 0,70; CCE = 1,19 p < 0,0001) e o índice de renovação celular (%) (NIC 1 = 23,0; NIC 2 = 35,0; NIC 3 = 39,0; CCE = 53,8 p < 0,0001). Surpreendentemente a razão das taxas proliferação / apoptose não mostrou aumento progressivo (NIC 1 = 75,6; NIC 2 = 62,7; NIC 3 = 54,7; CCE = 44,2). Conclusão: Observamos aumento paralelo tanto nas taxas de proliferação como nas de apoptose com o grau das lesões cervicais. As taxas crescentes de apoptose possivelmente representam a persistência de alguns mecanismos compensatórios de regulação da população celular.

PALAVRAS CHAVE. apoptose, proliferação celular, epitélio escamoso cervical, imunoistoquímica

¹Divisão de Patologia - Instituto Adolfo Lutz - Central - SP; ³ Estagiária FIDIAL / FUNDAP; ⁴ Médico Citopatologista
*Endereço para correspondência Av. Dr. Arnaldo, 351 - 7º andar, tel 3068-2875 Cerqueira César - São Paulo - SP.
CEP- 01246-902

INTRODUÇÃO

Uma das propriedades fundamentais de malignidade é a vantagem seletiva de crescimento sobre os tecidos normais, que parece derivar pelo menos em parte, de uma taxa inadequada de morte celular das células neoplásicas. Em estudos quantitativos, os tumores tendem a mostrar taxas de replicação maiores do que as esperadas pela sua taxa de crescimento, indicando algum tipo de perda celular¹⁹. Entretanto, o controle dessa população celular depende do equilíbrio dos mecanismos de proliferação e morte celular.

A morte celular é comumente considerada um processo patológico. Entretanto, em várias circunstâncias (incluindo a renovação celular normal, o desenvolvimento embrionário e o equilíbrio trófico estabelecido pelo estado hormonal) a morte celular é induzida por estímulos fisiológicos, e parece ter um papel importante na regulação do tamanho e da forma tecidual. A morte celular sob estas circunstâncias, é chamada de apoptose, sendo morfológicamente distinta da necrose que foi identificada também em processos patológicos, incluindo neoplasias.

Ainda que as pesquisas da carcinogênese usualmente estejam centradas na proliferação celular⁹, o papel da apoptose tem sido recentemente objeto de intensa investigação. Tem-se descoberto que os mecanismos envolvidos na regulação da proliferação celular são freqüentemente superponíveis com os da apoptose¹³. Uma alteração desses mecanismos, pode, portanto, resultar na sobrevivência de células geneticamente lesadas que usualmente sofreriam apoptose, e desempenhar um papel importante na evolução de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas.

Diversos estudos têm mostrado relação entre taxa de apoptose e prognóstico em neoplasias malignas como neuroblastoma² e adenocarcinoma de próstata¹.

Apesar das neoplasias do colo uterino serem uma questão prioritária em saúde pública e este ser o modelo de neoplasia mais bem estudado, somente recentemente têm surgido publicações que avaliam as taxas de apoptose no epitélio cervical, com neoplasias intra-epiteliais e invasoras. Nestes estudos, resultados contraditórios têm sido obtidos. Enquanto alguns autores relatam uma menor taxa de apoptose em lesões de alto grau^{17,22}, outros obtiveram resultados justamente contrários^{3,7,9,11,14,18}.

No presente estudo propomos avaliar quantitativamente a taxa de apoptose e proliferação celular em neoplasias epiteliais cervicais para conhecermos melhor a cinética celular no espectro das neoplasias cervicais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas retrospectivamente 81 biópsias de colo uterino, processadas histologicamente e emblocadas em parafina do arquivo da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. As amostras consideradas adequadas para este estudo

consistiram de 20 casos de neoplasia intraepitelial cervical grau 1 (NIC 1), 19 de neoplasia intraepitelial cervical grau 2 (NIC 2), 23 de neoplasia intraepitelial cervical grau 3 (NIC 3) e 19 de carcinoma de células escamosas (CCE). Os critérios diagnósticos utilizados foram os definidos pela Organização Mundial de Saúde²⁰.

Método Imunoistoquímico

Para avaliação da taxa de proliferação, o material histológico foi submetido à marcação imunoistoquímica com o anticorpo monoclonal anti-Ag Ki-67 clone MIB-1, utilizando-se para amplificação o método de Streptavidina-biotina-peroxidase¹⁰, com recuperação antigênica por aquecimento em panela de pressão com ácido cítrico 0,01M pH 6,0. O anticorpo primário MIB-1 (Immunotech) foi utilizado na diluição 1/100, com incubação por 30 minutos a 37°C e *overnight* (18 horas) a 4°C.

Método de Túnel para detecção de apoptose

Para melhor detecção das figuras de apoptose foi utilizado o método "in situ" para evidenciar as quebras de cadeias de DNA (método de TUNEL) (Intergen Company). Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram submetidos a digestão enzimática com 20 µg/ml de proteinase K à temperatura ambiente por 15 minutos e lavados com água destilada; tratamento com peróxido de hidrogênio 0,3% (H₂O₂) por 5 minutos à temperatura ambiente, para bloqueio da peroxidase endógena e lavagem com PBS.

Os cortes foram imersos em tampão de equilíbrio a temperatura ambiente por 10 minutos e então incubados com solução de uso de enzima TdT a 37°C por 1 hora. Posteriormente os cortes foram lavados com PBS, incubados com o conjugado anti-digoxigenina peroxidase e substrato da peroxidase para detecção dos sinais de apoptose. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 5 minutos e montagem dos cortes com Entellan e lamínula.

Contagem das células em proliferação e das células apoptóticas

Para a avaliação de proliferação celular e de apoptose realizamos a contagem de pelo menos 1000 células¹¹ à exceção de alguns casos, onde devido às dimensões pequenas da área correspondente à lesão foram contadas células em menor quantidade. Os corpos apoptóticos mostraram-se corados em castanho, sendo descartadas todas as células que não apresentassem características morfológicas típicas de apoptose, mesmo quando marcadas com a coloração castanho. Posteriormente foram relacionadas as porcentagens de MIB-1 (índices de proliferação) e índices apoptóticos. Os índices de renovação celular (IR) foram obtidos através da somatória dos índices de proliferação (IP) + índices apoptóticos (IA)³. Todas as contagens foram realizadas em imagens digitalizadas das lâminas correspondentes.

Análise estatística

De cada categoria diagnóstica foram calculados a média e o desvio padrão para comparação entre si. Foi definido o valor

de $P < 0,05$ como estatisticamente significativa e as médias individuais foram comparadas usando o Teste "One Way Analysis of Variance" (ANOVA).

RESULTADOS

O número total de células contadas em cada caso variou de 83 a 2.975 (média = 1.515,62) para MIB-1 e 315 a 3.565 para apoptose (média = 1.273,24).

A expressão do antígeno Ki-67 (MIB-1) e dos corpos apoptóticos em diferentes lesões são mostrados nas Fig.1 e Fig. 2.

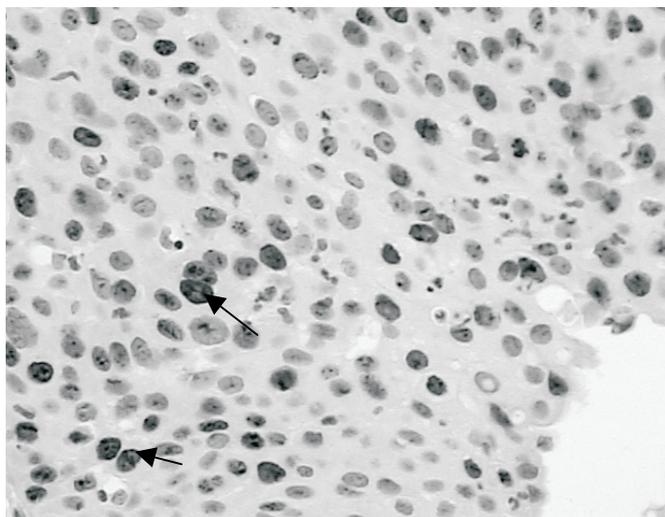


Figura 1. Coloração imunohistoquímica para MIB-1 em NIC 3 (x 200). Núcleos positivos são indicados por setas (↙)

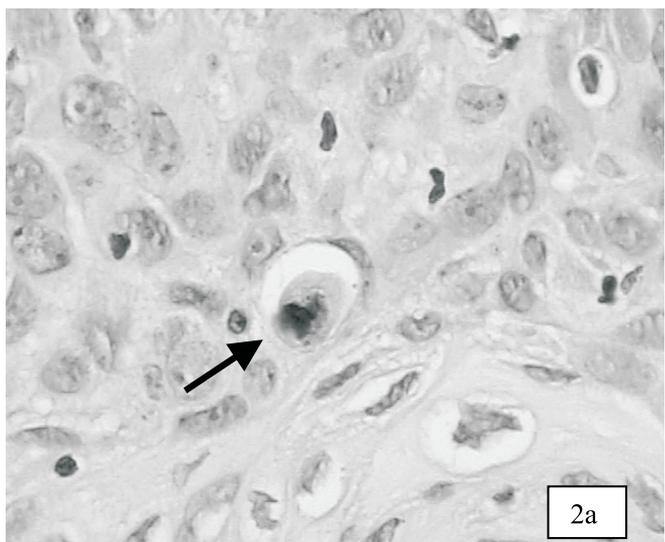


Figura 2a. Corpos apoptóticos pelo método de TUNEL em CCE (x 400)

A tabela 1 mostra a média dos índices de proliferação (IP), índices apoptóticos (IA) e índice de renovação celular (IR) em NIC 1, 2 e 3 e CCE, com o valor de $p < 0,0001$ para os três índices. Ocorreu um aumento progressivo tanto nos índices de proliferação celular como nos índices apoptóticos com a severidade da lesão.

A proporção das taxas de proliferação/apoptose não mostrou aumento progressivo (NIC 1= 75,6; NIC 2= 62,7; NIC 3= 54,7 e CCE= 44,2).

A análise estatística da reatividade imunohistoquímica revelou diferenças significante (**) e altamente significativa (***) ($p < 0,05$) entre: NIC 1 e NIC 3 ($p < 0,05^*$), NIC 1 e CCE ($p < 0,001^{***}$), NIC 2 e CCE ($p < 0,01^{**}$) para MIB-1; NIC 1 e CCE ($p < 0,001^{***}$); NIC 2 e CCE ($p < 0,01^{**}$) para apoptose, como também entre NIC 1 e NIC 3 ($p < 0,05^*$), NIC 1 e CCE ($p < 0,001^{***}$) e NIC 2 e CCE ($p < 0,01^{**}$) para o índice de renovação celular.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O controle da população celular tanto em situações normais como neoplásicas depende do equilíbrio entre crescimento e morte das células. Na cérvix uterina normal as células basais são estimuladas a sofrerem proliferação, maturação e descamação sob a ação de estrógenos de forma que a população se renova a cada 4 ou 5 dias⁵. Nas lesões do colo uterino relacionado com a infecção pelo HPV²¹, ocorre morte programada (apoptose) de células escamosas quando o agente viral infecta as células epiteliais, como mecanismo de defesa do hospedeiro, no intuito de evitar a produção de novas partículas virais. Acredita-se que a proteína E6, do HPV incorporado à célula hospedeira, interfira com a proteína p53, fazendo com que

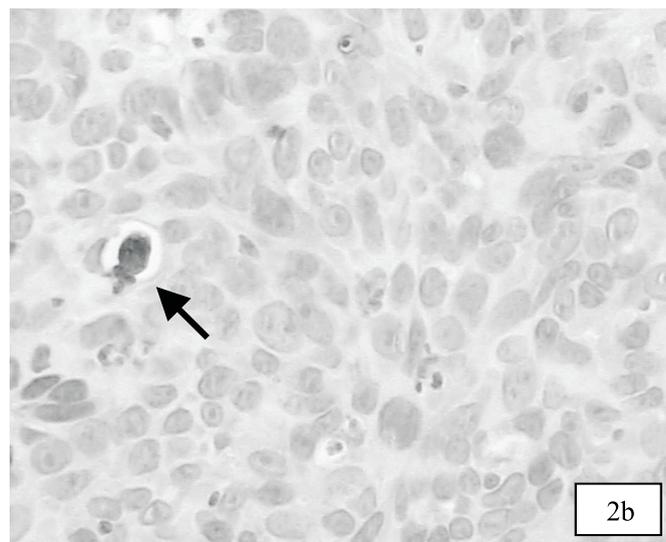


Figura 2b. Corpos apoptóticos pelo método de TUNEL em CCE (x 400)

Tabela 1. Imunoexpressão em média \pm desvio padrão dos índices de proliferação, apoptótico e renovação celular nas neoplasias cervicais do colo uterino.

Diagnóstico	Nº casos	IP (%)	IA (%)	IR (%)
NIC 1	20	22,75 \pm 14,92	0,30 \pm 0,28	23,05 \pm 14,88
NIC 2	19	34,50 \pm 16,48	0,55 \pm 0,47	35,00 \pm 16,83
NIC 3	23	38,35 \pm 14,27	0,70 \pm 0,54	39,00 \pm 15,67
CCE	19	52,68 \pm 19,00	1,19 \pm 0,93	53,8 \pm 23,73

IP = Índice de proliferação, IA = Índice apoptótico, IR = Índice de renovação celular

NIC 1 = neoplasia intraepitelial cervical grau 1, NIC 2 = neoplasia intraepitelial cervical grau 2, NIC 3 = neoplasia intraepitelial cervical grau 3, CCE = carcinoma de células escamosas.

não ocorra a apoptose e a atividade proliferativa esteja aumentada⁴.

A proliferação celular pode ser avaliada na rotina através da contagem de mitoses. Existem entretanto alguns problemas na identificação das mesmas, requerendo exame cuidadoso de forma que, figuras duvidosas ou núcleos picnóticos não sejam aceitos⁸. Atualmente, o método mais empregado para avaliar a proliferação celular, tem sido pela expressão antigênica do Ag Ki-67 detectada pelo método imunoistoquímico, sendo que sua contagem é expressa sob forma de porcentual de células positivas¹⁵. O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear presente nas células em todas as fases do ciclo de divisão celular, exceto na G0⁷.

A apoptose é o tipo de morte celular responsável pela deleção das células em tecidos normais e tumorais. Os corpos apoptóticos são morfológicamente reconhecidos ao exame microscópico de rotina³, sendo este ainda atualmente o padrão-ouro. Durante muitos anos a identificação da apoptose e sua mensuração foi baseada apenas na morfologia^{12,16}. Tal estratégia torna-se difícil em algumas situações como neoplasias intraepiteliais, onde a presença de leucócitos intraepiteliais pode simular corpos apoptóticos. Recentemente a identificação morfológica de células em apoptose tornou-se mais sensível com o auxílio da técnica de marcação de fragmentos de DNA (TUNEL)⁶. Este método se baseia na ligação específica de nucleotídeos marcados catalisada pela deoxinucleotidil transferase (TdT) aos terminais 3'-OH do DNA, nas áreas de fragmentação.

Neste estudo, avaliamos quantitativamente a proliferação celular pela imunoreatividade do antígeno Ki-67 (MIB-1) e a apoptose através do reconhecimento morfológico ressaltados pelo método de TUNEL em lesões neoplásicas intraepiteliais (NIC 1, NIC 2 e NIC 3) e carcinomas cervicais.

Em nossa análise observamos um aumento progressivo tanto nas taxas de proliferação como na apoptose com o grau das lesões cervicais. Houve diferença significativa entre as lesões de baixo grau (NIC 1), alto grau (NIC 3) e invasivas tanto para os índices de proliferação celular como para apoptose. Tais achados são semelhantes aos obtidos por Gerdes et al.⁷; Isacson et al.¹¹; Harmsel et al.⁹; Sagol et al.¹⁸; Dey et al.³ e Lee et al.¹⁴ que também

observaram aumento progressivo tanto de proliferação como de apoptose, à medida que aumentava a severidade das lesões neoplásicas do colo uterino. Paradoxalmente, Sheets et al.²² e Rogovskaya et al.¹⁷ relataram diminuição progressiva de apoptose nestas lesões cervicais.

O aumento da taxa de proliferação é um fenômeno bem conhecido no desenvolvimento das neoplasias¹⁴. Mas o aumento da taxa de apoptose é, aparentemente, paradoxal. As taxas crescentes de apoptose, encontradas por nós e pela maior parte de outros autores^{3,6,9,11,18} que investigaram o assunto, possivelmente representam a persistência de alguns mecanismos compensatórios de regulação da população celular. Esta persistência possivelmente é insuficiente, no entanto, para reestabelecer o estado normal de equilíbrio da população celular encontrado nos tecidos normais, havendo um déficit relativo da taxa de morte celular.

Os valores da razão das células positivas para MIB-1/corpos apoptóticos resultam no favorecimento da proliferação com a severidade da lesão, como ocorreu com o aumento da taxa de renovação celular. Esse aumento progressivo do IR a cada grau diferente da lesão reflete a importância dos eventos de proliferação e morte celular no desenvolvimento das neoplasias³.

Quando comparamos nossos achados com o comportamento clínico, observamos que as lesões de baixo grau, as quais desaparecem espontaneamente, em cerca de 80% dos casos apresentam índices de apoptose e proliferação celular significativamente mais baixo que os das lesões de alto grau, os quais raramente se curam espontaneamente. Tais dados devem ser melhor estudados, eventualmente amparados com a tipagem viral, uma vez que a apoptose como mecanismo de "clareamento" da infecção viral deveria ser mais intensa nas lesões de baixo grau.

O entendimento da cinética tecidual é fundamental para melhor conhecimento dos processos envolvidos na carcinogênese. O estudo das proteínas que regulam o ciclo celular, tanto em direção à proliferação quanto à apoptose, deve ser o próximo passo nessa linha de investigação, bem como a avaliação deste processo por meio da quantificação das regiões organizadoras de nucléolo marcadas pela prata (AgNor).

Yamamoto, L.S.U. et al. Cellular kinetics in preinvasive and invasive lesions of cervical squamous epithelium: morphologic and immunohistochemical study. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 61(2):97-101, 2002

ABSTRACT: To assess proliferative and apoptotic rates in squamous lesions of the uterine cervix. **Material and Methods:** 81 cervical biopsies were classified as cervical intraepithelial neoplasia grade 1 CIN1 = 20, CIN2 = 19, CIN3 = 23 and squamous cell carcinoma (SCC) = 19, according to WHO classification. Histological sections were submitted to MIB-1 immunostaining by streptavidin-peroxidase amplification. In situ end-labeling of DNA strand breaks by TUNEL method was used to enhance the detection of apoptosis. All cells representative of the pertinent lesion were counted in each sample in digital photomicrographs and the results were expressed as positive cells %. The groups were compared using a one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was defined as a $P < 0.05$. **Results:** There was progressive increase of proliferation rate (%) with the severity of lesion CIN 1 = 22.7; CIN 2 = 34.5; CIN 3 = 38.3; SCC = 52.6 $p < 0.0001$). The same was obtained with apoptotic rate (%) (CIN 1 = 0.30; CIN 2 = 0.55; CIN 3 = 0.70; SCC = 1.19 $p < 0.0001$), and turnover rate (%) (CIN 1 = 23.0; CIN 2 = 35.0; CIN 3 = 39.0; SCC = 53.8 $p < 0.0001$). Surprisingly, the ratio of proliferation/apoptotic rate did not show a progressive increase (CIN 1 = 75.6; CIN 2 = 62.7; CIN 3 = 54.7; SCC = 44.2). **Conclusions:** There is an increase in both proliferation and apoptosis with increasing atypical in cervical lesions. Increase in apoptotic rate possibly represents persistence of some compensatory regulation mechanisms of cell population.

KEY WORDS. apoptosis, cell proliferation, cervical squamous epithelium, immunohistochemistry

REFERÊNCIAS

1. Aihara, M.; Scardime, P.T.; Truong, D.L.. The frequency of apoptosis correlates with the prognosis of Gleason grade 3 adenocarcinoma of prostate. *Cancer*, 75: 522-529, 1995.
2. Brook, F.B. et al. Histologic and immunohistochemical investigation of neuroblastomas and correlation with prognosis. *Hum Pathol*, 19: 879-888, 1988.
3. Dey, P.; Das, R.; Sabuddin. Correlations between apoptotic and proliferative indices in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol*, 43: 271-275, 2000.
4. Di Loreto, C.; Alves, V.A.F. Patologia das lesões relacionadas ao HPV no trato anogenital. In: Bibbo, M.; Moraes Filho, A. (ed). **Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital**. 1º ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p. 107-116.
5. Ferenczy, A.; Wight, T.C. Anatomy and Histology of the cervix. In: Kurman, R.J.; Blaustein, A. (ed). **Pathology of the female genital tract**. New York: Springer-Verlag; 1994. p. 185-201.
6. Gavrieli, Y.; Sherman, Y.; Ben-Sasson, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119: 493-501, 1992.
7. Gerdes, J. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31: 13-20, 1983.
8. Hall, P.A.; Lewinson, D.A. Review: Assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol*, 43: 184-192, 1990.
9. Harmsel, B. et al. Progressing imbalance between proliferation and apoptosis with increasing severity of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol*, 16: 205-211, 1997.
10. Hsu, S.M.; Raine, L.; Fanger, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem*, 29: 577-580, 1981.
11. Isacson, C. et al. Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papillomavirus type. *Cancer Res*, 56: 669-674, 1996.
12. Kerr, J.F.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis a basic biological phenomena with wide ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257, 1972.
13. Leach, A.P. Apoptosis: molecular mechanism for physiologic cell death. *Clin Lab Sci*, 11: 346-9, 1998.
14. Lee, J.S. et al. Angiogenesis, cell proliferation and apoptosis in progression of cervical neoplasia. *Anal Quant Cyto Histol*, 24 (2): 103-113, 2002.
15. Maeda, M.Y.S. – **Imunoreatividade do PCNA, Ki-67 e p53 em diferentes lesões do colo uterino humano**. São Paulo, 1999 [Dissertação de Mestrado – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo].
16. Majno, G.; Joris, I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. *Am. J. Pathol.*, 146: 3-15, 1995.
17. Rogovskaya, S.I. et al. Apoptosis in woman uterine cervix in pathologies associated with human papillomavirus. *Bull Exp Biol Med*, 131 (6): 576-582, 2001.
18. Sagol, O. et al. Apoptotic and mitotic index in squamous cell carcinomas and premalignant lesions of the uterine cervix. *Int J Surg Pathol*, 7: 155-160, 1999.
19. Sarraf, C.E.; Bowen, I.D. Kinetic studies on a murine sarcoma and na analysis of apoptosis. *Br J Cancer*, 54: 989-998, 1986.
20. Scully, R.E. et al. **Histological typing of female genital tract tumours**. 2º ed. Boston: Springer-Verlag; 1994. p. 39-54.
21. Schiffman, M.H. et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 85: 958-964, 1993.
22. Sheets, E.E.; Crum, C.P.; Yeh, J. Association between cervical neoplasia and apoptosis as detected by in situ nuclear labeling. *Gynecol Oncol*, 63: 94-100, 1996.

Recebido em 03/07/2002 ; Aprovado em 05/11/2002