

Relação entre a Atividade Proliferativa do Epitélio e a Resposta Angiogênica Estromal em Neoplasias Intra-Epiteliais do Colo Uterino

Relationship between Epithelial Proliferative Activity and the Stromal Angiogenic Response in Cervical Intra-Epithelial Neoplasias

Maria Angélica Maia Gaiotto, Julisa Chamorro Lascasas Ribalta, José Focchi
João Norberto Stávale, Marcos Roberto Ymayo, Naira Maria Codá

RESUMO

Objetivo: *quantificar os vasos neoformados e a proliferação do epitélio, por meio dos marcadores imuno-histoquímicos anti-CD34 e anti-PCNA, na neoplasia intra-epitelial do colo do útero.*

Métodos: *foram incluídas 16 pacientes com NIC III e 16 com NIC II (alto grau), 21 pacientes com NIC I (baixo grau) e ainda 11 pacientes com colos normais (grupo controle). A avaliação das lâminas foi feita por dois observadores, concomitantemente, em 10 campos consecutivos, com aumento de 100X e de 400X, na região de maior densidade vascular (CD34) e na região de maior atividade proliferativa (PCNA).*

Resultados: *as médias de células positivas obtidas com o emprego do anti-PCNA em neoplasias intra-epiteliais foram: 78,2% (NIC III), 52,1% (NIC II), 33,3% (NIC I) e 4,6% (grupo controle), ao passo que com o marcador vascular anti-CD34 as médias foram: 199,1 vasos (NIC III), 162,0 vasos (NIC II), 111,7 vasos (NIC I) e 124,4 vasos (grupo controle).*

Conclusões: *os resultados mostram que os dois marcadores, o anti-PCNA e anti-CD34, são úteis na avaliação da atividade proliferativa e angiogênica, respectivamente. O uso do anti-PCNA permite diferenciar as neoplasias intra-epiteliais com mais clareza do que o do anti-CD34.*

PALAVRAS-CHAVE: *Neoplasias intra-epiteliais cervicais. Angiogênese. Proliferação celular.*

Introdução

O câncer de colo uterino representa ainda, na atualidade, uma entidade das mais importantes e danosas, constituindo grande problema de saúde pública. Estima-se a prevalência em meio milhão de casos novos ao ano, principalmente em países em desenvolvimento (WHO)¹. No Brasil, segundo os dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA)², 21.725 novos casos foram diagnosticados no ano de 1998, ocorrendo 6.815 óbitos.

Na última década, múltiplos ensaios sugeriram que o papilomavírus humano (HPV) desempenha papel central na sua etiopatogenia, bem

como na de suas lesões precursoras^{3,4}.

A história natural desta neoplasia, já bem estabelecida, indica haver a progressão de lesões intra-epiteliais para a doença francamente invasora. Porém, a progressão não é impositiva, podendo ocorrer regressão em alguns casos e, em outros, a persistência da lesão⁴.

O diagnóstico das neoplasias intra-epiteliais e do carcinoma invasor baseia-se nos exames citológico e colposcópico, sempre complementados pelo exame anatomopatológico das biópsias realizadas sob orientação colposcópica.

O padrão vascular do colo uterino representa um dos mais importantes critérios de diagnóstico em colposcopia, método indispensável para localizar as áreas alteradas e orientar as eventuais biópsias⁵.

Hinselmann⁶ descreveu aspectos vasculares associados a alterações epiteliais, hoje co-

Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ginecologia.
Correspondência: Maria Angélica Maia Gaiotto
Rua Francisco Mariano, 554 - Centro
37130-000 - Alfenas - MG

nhedidos como mosaico e pontilhado, sendo o primeiro a mostrar que o carcinoma cervical apresenta modificações vasculares características, que denominou hiperplasia vascular adaptativa. Considerando que as alterações vasculares refletem o início da mudança do metabolismo celular, Stafl e Mattingly⁷ mostraram, na neoplasia intra-epitelial, a compressão dos vasos pré-existentes do estroma pela proliferação celular, formando assim o substrato histopatológico do pontilhado e/ou mosaico.

Entende-se por angiogênese a neovascularização ou formação de novos vasos sanguíneos a partir da microvasculatura pré-existente⁸. Sabe-se que a angiogênese ocorre durante a vida embrionária e também em inúmeros processos fisiológicos e em situações inflamatórias, como também em condições patológicas⁹. Stafl e Mattingly⁷ sugeriram que a neovascularização seria observada em todos os estágios de neoplasia intra-epitelial, sendo um pequeno aumento da densidade vascular já detectado no grau I.

Subseqüentemente, Sillman et al.¹⁰ observaram que 28% das pacientes com neoplasia intra-epitelial, 50% das pacientes com carcinoma microinvasor e 100% das pacientes com carcinoma invasor teriam neovascularização atípica. Utilizando anticorpos anti-fator VIII, Schindler¹¹ avaliou a densidade vascular nas neoplasias intra-epiteliais escamosas de graus I, II e III. Demonstrou existir uma tendência de aproximação entre as variedades II e III, reforçando assim o conceito de Richart¹², o qual considerava que as neoplasias intra-epiteliais de graus II e III teriam potencial de evolução semelhante.

Utilizando outro marcador vascular, o anti-CD34, mais sensível na avaliação da angiogênese do colo, Calux¹³ concluiu não haver diferença significativa entre lesões intra-epiteliais cervicais de baixo e alto grau. O marcador acima referido é uma glicoproteína de 110 kDa, presente em células progenitoras hematopoéticas, expressando-se em leucemias mielóide e linfoblástica agudas¹⁴. Do exposto, pode-se observar que o estudo da neoangiogênese está intimamente ligado ao do desenvolvimento neoplásico.

Por outro lado, recentes ensaios têm relatado a relação entre o potencial maligno dos neoplasmas e a atividade de proliferação celular, usando-se o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), marcador que pode ser empregado em material em parafina ou naqueles resultantes de punção aspirativa^{15,16}. Assim, pormenores sobre a proliferação celular poderiam ser úteis para predizer o potencial metastático, a recidiva

e, enfim, o prognóstico em várias neoplasias humanas¹⁷.

Inicialmente, o PCNA foi identificado como antígeno de proliferação celular *in vitro* e *in vivo*, em pacientes com lúpus eritematoso, podendo servir como marcador biológico para o estudo de células em proliferação¹⁸⁻²⁰. O PCNA é uma proteína de 36 kDa, com papel crítico na fase inicial da proliferação celular, atuando como cofator da enzima DNA polimerase delta. Aparece no núcleo durante a fase G1, imediatamente antes da síntese de DNA, atinge o máximo durante esta fase (S), declinando durante a fase G2 e apresenta níveis não-detectáveis na fase M²¹.

De modo geral, a literatura concernente tanto às variações de densidade vascular quanto aos diferentes índices de proliferação celular, relacionados com as neoplasias intra-epiteliais escamosas de colo, indica haver comportamentos semelhantes entre as lesões de graus II e III, atualmente consideradas como sendo de alto grau¹⁸⁻²².

Para esclarecer a existência de uma possível diferenciação entre as lesões precursoras das neoplasias cervicais, propusemo-nos a estudar a relação entre a angiogênese e o comportamento proliferativo do epitélio, utilizando os anticorpos anti-CD34 e anti-PCNA, nos diferentes graus de neoplasias intra-epiteliais do colo uterino humano. Os objetivos deste estudo são: quantificar a atividade angiogênica nos diferentes graus de neoplasia intra-epitelial do colo uterino, por meio da avaliação imuno-histoquímica para CD34, e diferenciar a densidade proliferativa dos epitélios com neoplasia intra-epitelial de graus I, II e III, pela técnica imuno-histoquímica para PCNA.

Pacientes e Métodos

Foram selecionados fragmentos histológicos obtidos de 64 pacientes com neoplasias intra-epiteliais e de colos sem processo neoplásico, atendidas no Setor de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia e na enfermaria da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Tocoginecologia da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP – EPM), no período de março de 1994 a agosto de 1998.

Os espécimes foram obtidos por meio de biópsia dirigida sob visão colposcópica, com pinça do tipo saca-bocado ou alça de alta frequência; conização cervical clássica ou cirurgia com alça de alta frequência ou cirurgias com retirada total do útero.

A faixa etária variou de 19 a 77 anos completos. Do total de 64 mulheres, 21 tinham NIC I

(grupo B), 16 NIC II (grupo C) e 16 NIC III (grupo D). As 11 pacientes restantes não apresentavam qualquer processo neoplásico, sendo assim consideradas como controle (grupo A). As lâminas preparadas a partir de tecidos obtidos por biópsias e peças cirúrgicas foram selecionadas do arquivo do Departamento de Patologia da UNIFESP - EPM. O grupo controle (A) foi constituído de pacientes submetidas a procedimento cirúrgico por lesão benigna. Após fixação em solução de formol a 10% por período de 24 a 48 horas, o material foi desidratado em álcool etílico, diafanizado pelo xilol e incluído em parafina por processador automático de tecido.

Histopatologia

A seguir foram obtidos três cortes histológicos para cada caso, com micrótomo tipo Minot (American Optical, modelo 820) ajustado para cinco micrômetros, perfazendo 192 espécimes.

Após o processamento histológico e montagem em lâmina de vidro, um dos três cortes de cada caso foi corado pela hematoxilina-eosina (HE) segundo a técnica de Michalany²³, concluindo-se a montagem entre lâmina e lamínula com Entellan. Os demais foram reservados para o exame imuno-histoquímico.

Imuno-histoquímica

Para a avaliação imuno-histoquímica foram utilizados anticorpos primários, monoclonais, obtidos por imunização de animais em laboratório com antígenos humanos. Para identificar as células com CD34 empregaram-se anticorpos séricos de camundongos (mouse anti human CD34, Novocastra, clone Q B End 10, lote 07-201, DAKO/M 7165) na diluição de 1:100. Identificou-se a expressão do PCNA, por meio de anticorpos séricos de camundongos (mouse anti human x PCNA, clone PC 10, DAKO/MO 879/lote 064-305), na diluição de 1:6000. Para ambos os conjuntos usaram-se anticorpos secundários a partir do método estrepto-avidina-biotina-peroxidase (Strepto ABC, Dako, Código KO 492 lote 105[102]), na diluição de 1:500, de acordo com Hsu et al.²⁴.

As lâminas histológicas, previamente tratadas com 3-aminopropiltriétoxisilana (APTS), foram colocadas em estufa a 57°C por aproximadamente 12 horas, para melhor adesão do tecido. Após a desparafinização e hidratação (xilol-álcool-água), imersão em tampão citrato (pH 6,0) e irradiação por microondas na potência máxima por 45 minutos, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena, com quatro banhos de água oxigenada a 20 volumes, de cinco minutos cada. Novos banhos em água corrente e em solução de tampão

fosfato (pH 7,4-7,6) foram feitos, precedendo a imersão em soro albumina bovina a 1%. Depois as lâminas foram incubadas com anticorpo primário em câmara úmida, por cerca de 12 horas, seguindo-se de incubação com o anticorpo secundário por 30 minutos. Após a amplificação das reações, os espécimes foram novamente lavados e revelados com 3-3'-diaminobenzidina por cinco minutos. Para contra-coloração, empregou-se a hematoxilina de Harrys e, finalizando, procedeu-se à desidratação, à diafanização e montagem entre lâmina e lamínula com Entellan.

As células endoteliais assim tratadas adquiriram coloração acastanhada quando ambos os anticorpos estavam presentes, o que permitiu identificá-las.

Simultaneamente, preparou-se um "controle positivo" para a avaliação da eficácia do anticorpo primário, utilizando-se para tanto espécimes teciduais de amígdalas humanas.

Para a contagem dos vasos nos servimos de microscópio ópticos com aumentos de 100X e 400X. Foram avaliados 10 campos histológicos consecutivos em cada lâmina, perfazendo um total de 640 campos avaliados, tomando-se o cuidado de marcar o último vaso, computado no campo anterior, para não contá-lo duas vezes. Considerou-se ainda como unidade vascular a presença obrigatória de células coradas em castanho margeando o espaço luminal. Os vasos parcialmente identificados, não-contidos por inteiro nos campos analisados, não foram considerados.

Para a contagem das células coradas pelo marcador imuno-histoquímico PCNA, utilizamos programa de análise gráfica por computador, o Imagelab (Softium), no Laboratório de Ginecologia Experimental da Disciplina de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo. Utilizou-se o microscópio óptico com objetiva de 100X para a localização das áreas positivas ao anti-PCNA.

Uma vez localizado, passou-se a utilizar objetiva de 400X, com a qual se contou o número total de células presentes, desde a superfície até a membrana basal, perfazendo um mínimo de 1000 células por lâmina. Do total de células contadas em cada campo, avaliaram-se quantas eram positivas ao marcador imuno-histoquímico PCNA.

Dois observadores independentes, concomitantemente e obedecendo aos critérios já citados, procederam à coleta dos dados. Somente quando houve a concordância de ambos, os dados foram registrados.

Análise estatística

Para a avaliação dos resultados obtidos com o emprego dos marcadores imuno-histoquímicos

anti-CD34 e anti-PCNA, inicialmente fez-se análise descritiva dos dados por meio do cálculo de medidas-resumo²⁵.

Para a análise inferencial, empregou-se a técnica de análise de variâncias (ANOVA) para comparar as médias dos quatro grupos em relação aos marcadores imuno-histoquímicos anti-PCNA e anti-CD34. Quando a análise de variâncias detectou a existência de diferenças entre as médias para o anti-PCNA e, posteriormente, para o anti-CD34, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de médias, duas a duas, de Fisher.

Nesta parte da análise foram construídos intervalos de confiança para as médias de cada marcador imuno-histoquímico (anti-PCNA e anti-CD34), com coeficiente de confiança de 95% ($\gamma = 0,95$), segundo Bravo et al.²¹. Em todos os testes, fixou-se em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

Resultados

Usando-se o marcador endotelial anti-CD34, observa-se que a média de vasos no grupo A (controle) foi de 124,4 (erro-padrão de 15,5). No grupo B, neoplasias intra-epiteliais grau I, foi de 111,7 vasos (erro-padrão de 13,0). Já entre as lesões de alto grau, no grupo C (NIC II) a média foi de 162,0 figuras vasculares (erro-padrão de 19,3) e no grupo D (NIC III) a média atingiu 199,1 vasos (erro-padrão de 12,1) (Tabela 1 e Figura 1).

Utilizando-se a técnica de análise de variância, concluímos que existem diferenças estatisticamente significantes entre as médias dos grupos avaliados pelo anti-CD34, com $p < 0,001$ (Tabela 1 e Figura 1).

Devido a esta diferença empregamos a técnica de comparações de médias, duas a duas de Fisher, em relação ao anti-CD34, e confirmamos que $A < D$ e $B < D$.

Na análise dos resultados obtidos com o anti-PCNA, observou-se que a média do grupo A (controle) foi de 4,6% (erro-padrão de 1,1) e no grupo B (NIC I) foi de 33,3% (erro-padrão de 2,3). Já entre as neoplasias intra-epiteliais de grau II e III o percentual médio foi de 52,1% (erro-padrão de 3,2) no grupo C e de 78,2% (erro-padrão de 1,8) no grupo D (Tabela 2 e Figura 2). Segundo a análise de variância, concluímos que existe alguma diferença entre as médias de anti-PCNA, com significância estatística ($p < 0,001$). Em decorrência desta diferença e utilizando a técnica de comparações de médias, duas a duas de Fisher, em relação ao anti-PCNA confirmamos serem os grupos diferentes entre si: $A < B < C < D$.

Tabela 1 - Distribuição dos valores de médias, erros-padrão e resultado da estatística correspondentes ao número de vasos avaliados no grupo controle (grupo A), neoplasia intra-epitelial grau I (grupo B), neoplasia intra-epitelial grau II (grupo C) e neoplasia intra-epitelial grau III (grupo D) utilizando-se técnica imuno-histoquímica para identificação de estruturas vasculares com o anti-CD34.

Caso (n°)	Grupo			
	A	B	C	D
1	98	176	110	236
2	110	145	82	215
3	65	163	131	152
4	188	188	86	181
5	85	204	155	200
6	90	193	168	166
7	76	89	133	240
8	118	125	177	110
9	156	135	249	165
10	229	20	176	176
11	154	51	114	312
12		94	175	220
13		164	381	247
14		66	236	221
15		80	69	199
16		95	150	146
17		59		
18		11		
19		171		
20		68		
21		48		
Média	124,4	111,7	162,0	199,1
Erro-padrão	15,5	13,0	19,3	12,1

Análise de Variância (ANOVA)	Teste de Comparações, duas a duas, de Fisher		
A x B x C x D	A x B	A x C	A x D
	(-47,1; 72,6)	(-100,5; 25,4)	(-137,6; -11,7)*
$p < 0,001^*$	B x C	B x D	C x D
	(-103,7; 3,0)	(-140,8; -34,1)*	(-94,0; 19,7)

*Significante

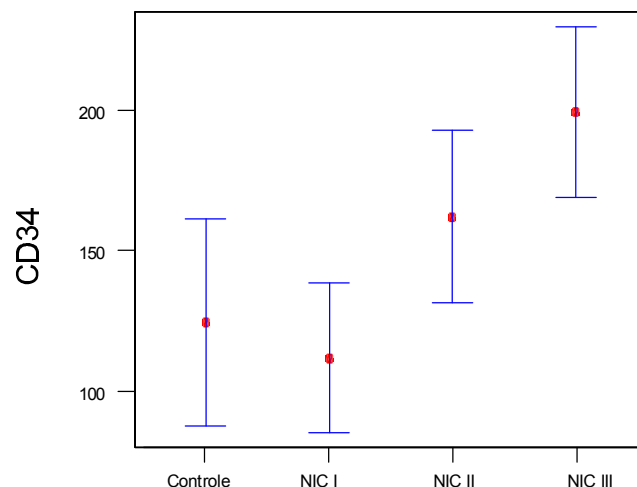


Figura 1 - Representação gráfica da distribuição de intervalos de confiança ($\gamma = 95\%$) para as médias dos quatro grupos avaliados com o marcador imuno-histoquímico anti-CD34.

Tabela 2 - Distribuição dos valores de médias, erros-padrão e resultado da estatística correspondentes à atividade proliferativa do epitélio ectocervical avaliados no grupo controle (grupo A), neoplasia intra-epitelial grau I (grupo B), neoplasia intra-epitelial grau II (grupo C) e neoplasia intra-epitelial grau III (grupo D) utilizando-se técnica imuno-histoquímica para identificação de proliferação celular com o anti-PCNA.

Caso (n°)	Grupo			
	A	B	C	D
1	7,9	16,9	19,2	63,6
2	9,8	29,2	48,8	85,6
3	10,4	19,9	34,2	84,5
4	0,5	32,7	55,5	72,3
5	6,5	34	67,0	78,1
6	0,4	31,9	51,0	74,3
7	6,8	44	62,4	74,6
8	2,1	31,1	57,0	70,9
9	2,8	40,9	60,3	78,8
10	2,9	15,2	50,9	82,9
11	1,2	37,1	46,4	77,5
12		20,5	45,7	91,4
13		42,4	62,9	85,9
14		13,7	42,8	80,5
15		42	68,9	69,8
16		42,1	51,4	80,3
17		40		
18		36,5		
19		50,4		
20		41,7		
21		36,2		
Média	4,6	33,3	52,1	78,2
Erro-padrão	1,1	2,3	3,2	1,8
Análise de Variância (ANOVA)		Teste de Comparações, duas a duas, de Fisher		
A x B x C x D		A x B	(-38,1; -19,1)*	A < B
		A x C	(-57,4; -37,5)*	A < C
		A x D	(-83,5; -63,6)*	A < D
p < 0,0001*		B x C	(-27,3; -10,4)*	B < C
		B x D	(-53,4; -36,5)*	B < D
		C x D	(-35,1; -17,1)*	C < D

* Significante

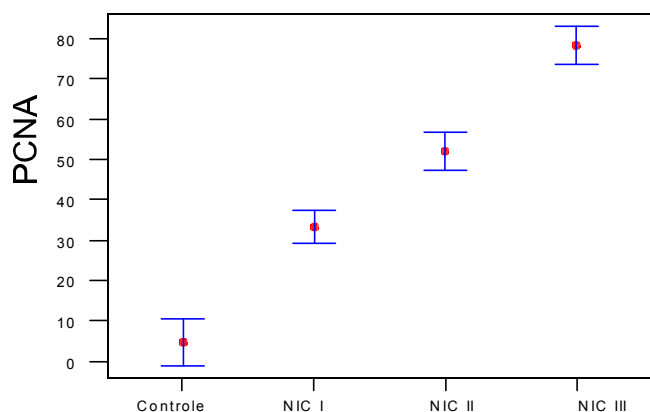


Figura 2 - Representação gráfica da distribuição de intervalos de confiança ($\gamma = 95\%$) para as médias dos quatro grupos avaliados com o marcador imuno-histoquímico anti-PCNA.

Discussão

A angiogênese e a identificação de proteínas celulares envolvidas no controle da proliferação celular revestem-se de importância para a compreensão dos mecanismos reguladores do crescimento e da transformação celular. Prestam-se ainda para predizer o potencial metastático, a recorrência e o prognóstico não só da paciente com carcinoma cervical mas também com suas lesões precursoras¹⁶.

Esse fato nos incentivou a quantificar a angiogênese e a proliferação celular no colo normal e nas neoplasias intra-epiteliais, com o intuito de trazer, eventualmente, novos conhecimentos neste campo.

Com relação à contagem dos vasos, observamos sempre a área de maior concentração vascular, segundo a metodologia proposta por Weidner et al.²⁶ e modificada por Smith-McCune e Weidner³ para lesões não-invasivas.

Na avaliação da atividade proliferativa, consideramos o número de células coradas pelo anti-PCNA, contanto pelo menos 1.000 por lâmina. Todas as lâminas foram submetidas à coloração imuno-histoquímica em uma só oportunidade, para cada um dos marcadores utilizados. Objetivou-se, com esse cuidado, diminuir qualquer irregularidade na coloração em decorrência de variações técnicas.

Considerando a técnica imuno-histoquímica para o CD34 e comparando o número de vasos corados nos grupos A, B, C e D, evidencia-se que as neoplasias intra-epiteliais de grau I não apresentaram diferença estatisticamente significativa em comparação ao grau II. Porém, a significância estatística surge quando comparamos o grupo de neoplasias intra-epiteliais de grau I com o de grau III.

Estes resultados mostram uma tendência de aproximação das NIC II ao grupo de lesões de baixo grau e também ao grupo controle. Em contrapartida, o grupo de neoplasias intra-epiteliais de grau III distancia-se dos grupos controle e do de neoplasias intra-epiteliais de grau I. Isto nos faz refletir que talvez a passagem para o estado neoangiogênico ocorra na transição de NIC II para III.

Curiosamente, observamos que o erro-padrão no grupo da neoplasia intra-epitelial de grau II foi maior (19,3) do que nos demais grupos. Este dado deixa entrever uma heterogeneidade dos elementos que compõem este grupo, pelo menos do ponto de vista funcional. Assim, as alterações vasculares poderiam representar a primeira evidência morfológica de neoplasia cervical e ocor-

reriam antes que modificações significantes da morfologia tecidual fossem detectadas⁷.

Notamos que a média de anti-PCNA do grupo B (NIC I) aumentou 7 vezes em relação ao controle, denunciando o início do processo proliferativo. Ainda nessa mesma linha de raciocínio, observamos, em relação ao grupo controle, um aumento de 11 vezes na média do grupo C (NIC II) e de 16 vezes na do grupo D (NIC III); isto mostra, claramente, que houve uma aceleração do processo proliferativo.

O grupo C (NIC II) apresentou aumento da média de anti-PCNA de 1,5 vezes em relação ao B (NIC I). Curiosamente, o grupo D (NIC III) mostra exatamente o mesmo aumento (1,5 vezes) em relação ao C (NIC II). Em outras palavras, o grupo C revela um comportamento mais constante, diferindo igualmente do grupo B e do D no que tange a média. Este fato sugere que talvez a colocação de neoplasia intra-epitelial de graus II e III em um mesmo grupo como preconiza o Sistema Bethesda, de lesões de alto grau, não esteja adequadamente fundamentado.

Ao analisarmos os resultados obtidos com o uso do anti-PCNA observamos que todos os grupos foram significativamente diferentes entre si, porém, evidenciou-se ser o erro-padrão maior entre os constituintes do grupo C (NIC II), revelando provavelmente um processo proliferativo mais variável.

Observamos ainda, nos três grupos de neoplasias intra-epiteliais, o aumento de 63% da proliferação epitelial no grupo C em relação ao B e de 66% em relação ao D (NIC III). Novamente pode-se questionar a reunião de NIC II e NIC III em um mesmo grupo, ou seja, de lesões de alto grau. Por outro lado, a angiogênese no grupo C (NIC II) não foi significativamente diferente da do B (NIC I), nem em relação à do D (NIC III). Isto nos leva a imaginar que as neoplasias intra-epiteliais de grau II seriam realmente o marco divisório do potencial de malignização de uma lesão pré-neoplásica, diferindo das neoplasias de grau III.

Os limites deste estudo não permitem desvendar as razões da aparente disparidade entre o aumento da atividade proliferativa e a menor proliferação vascular. Acreditamos que elementos de outras fases do ciclo de divisão, efeitos funcionais, como, por exemplo, ação de fatores de crescimento, ou ainda a indução promovida pelo agente etiológico dessas neoplasias possam ser responsáveis por este achado.

Do exposto é lícito concluir que: a atividade proliferativa consegue diferenciar as neoplasias intra-epiteliais de grau III da neoplasia intra-epitelial grau II, ou seja, a neoplasia intra-epitelial grau III apresenta maior atividade

proliferativa do que a de grau II, havendo significância estatística; as neoplasias intra-epiteliais de alto grau (NIC II e III) mostram densidades vasculares maiores que as neoplasias intra-epiteliais de grau I e que os colos normais, havendo significância estatística.

Por sua importância, o tema em apreço, além de justificar esta pesquisa, deve merecer futuras investigações para se tentar estabelecer outros marcadores que melhor expressem o comportamento dessa tão freqüente neoplasia.

SUMMARY

Purpose: to quantify the vessels and epithelial proliferation, applying immunohistochemical staining with anti-CD34 as well as anti-PCNA markers, in intra-epithelial neoplasia of the uterine cervix.

Methods: in the present study, 16 patients with CIN III, 16 with CIN II, 21 with CIN I and 11 with normal cervix (control group) were investigated. Slide analysis was performed at the same time by two observers, in 10 consecutive sites using 100X and 400X magnification, both in the highest vascularization (CD34) and proliferative activity sites (PCNA).

Results: the means obtained with the use of anti-PCNA in intraepithelial neoplasias were: 78.2% (CIN III), 52.1% (CIN II), 33.3% (CIN I) and 4.6% (control group), while 199.1 vessels (CIN III), 162.0 vessels (CIN II), 111.7 vessels (CIN I) and 124.4 vessels (control group) were quantified using anti-CD34 as a vascular marker.

Conclusion: the results showed that both markers, anti-PCNA and anti-CD34, are useful for investigating proliferative and angiogenic activity, respectively. However, anti-PCNA showed better and more accurate results than anti-CD34 in differentiating intraepithelial neoplasias.

KEY WORDS: *Cervical intraepithelial neoplasia. Angiogenesis. Cell proliferation marker.*

Referências

1. WHO. World Health Organization. Women's health towards a better world. 1st ed. Geneva: WHO; 1994. p.21-3.
2. INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil 1998. 1^a ed. Rio de Janeiro: Pró-Onco/INCA; 1998.

3. Smith-McCune KK, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res* 1994; 54:800-4.
4. Syrjänen K. Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated human papillomavirus (HPV). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 65:45-53.
5. Kolstad P. Vascular changes in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma. *Clin Obstet Gynecol* 1983; 26:938-48.
6. Hinselmann H. Diagnostico de los estados precursores del carcinoma de cuello uterino. *Rev Med Córdoba* 1952; 40:12-5.
7. Stafl A, Mattingly RF. Angiogenesis of cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 121:845-52.
8. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235:442-7.
9. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:4-6.
10. Sillman F, Boyce J, Fruchter R. The significance of atypical vessels and neovascularization in cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 139:154-9.
11. Schindler SS. Angiogênese no colo uterino normal, com neoplasia intra-epitelial e com carcinoma invasor por meio do marcador vascular anti-fator VIII [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1998.
12. Richart RM. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol* 1967; 10:748-84.
13. Calux NMCT. Angiogênese na neoplasia escamosa do colo uterino. Estudo imuno-histoquímico comparativo entre dois marcadores vasculares [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1998.
14. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990; 75:2417-26.
15. Kamerow HN, Perchick BA, Burstein DE. Immunocytochemical detection of cyclin, a proliferation-associated protein, in cytologic preparations. *Acta Cytol* 1991; 35:491-6.
16. Hartmann LC, Sebo TJ, Kamel NA, et al. Proliferating cell nuclear antigen in epithelial ovarian cancer: relation to results at second-look laparotomy and survival. *Gynecol Oncol* 1992; 47:191-5.
17. Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162:285-94.
18. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121:2228-34.
19. Takasaki Y, Deng JS, Tan EM. A nuclear antigen associates with cell proliferation and blast transformation. *J Exp Med* 1981; 154:1899-909.
20. Mittal KR, Demopoulos RI, Goswami S. Proliferating cell nuclear antigen (cyclin) expression in normal and abnormal cervical squamous epithelia. *Am J Surg Pathol* 1993; 17:117-22.
21. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987; 326:515-7.
22. Karakitzos P, Kyroudes A, Apostolaki C, et al. The evaluation of PCNA/cyclin expression in cervical intraepithelial lesions. *Gynecol Oncol* 1994; 55:101-7.
23. Michalany J. Técnica histológica em anatomia patológica. 1ª ed. São Paulo: Pedagógica e Universitária; 1981.
24. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29:577-80.
25. Bussab WO, Morettin PA. Estatística básica. 4ª ed. São Paulo: Atual; 1987.
26. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324:1-8.

**FAÇA UMA VISITA
A HOME PAGE
DA FEBRASGO**

www.febrasgo.org.br