

JACQUELINE SILVA BRITO LIMA

**QUANTIFICAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS COM NEOPLASIAS DE
GRAU I E II DO COLO UTERINO PELA REAÇÃO DE FEULGEN EM
INDIVÍDUOS DO NORDESTE BRASILEIRO**

Recife/PE

2001

JACQUELINE SILVA BRITO LIMA

**QUANTIFICAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS COM NEOPLASIAS
INTRAEPITELIAIS DE GRAUS I E II DO COLO UTERINO PELA
REAÇÃO DE FEULGEN EM INDIVÍDUOS DO NORDESTE
BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfologia, do Departamento de Anatomia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte da avaliação exigida para obtenção do Grau de Mestre.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alexandre Motta Bittencourt
Professor Adjunto do Departamento de Anatomia da Universidade Federal de Pernambuco.

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Eduardo de Queirz Lima
Professor Adjunto da Disciplina de Citologia Clínica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco.

MESTRANDA: Jacqueline Silva Brito Lima

Recife/PE

2001

DEDICATÓRIA

A **Deus**, pelas dádivas que tenho recebido no decorrer da minha vida.

Aos meus pais, **Hermann e Sônia**

Aos meus irmãos, **Hermann e Kerline**

Ao meu filho, **Hermann**

Ao meu marido, **Luiz Carlos.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador **Prof. Dr. ALEXANDRE MOTTA BITTENCOURT**, por seus ensinamentos, paciência e dedicação durante a elaboração desta tese.

Ao **Prof. Dr. CARLOS EDUARDO DE QUEIROZ LIMA**, pela Co-Orientação deste trabalho, ensinando-me os primeiros passos, pela competência e incentivo.

A **todos os Professores** que fazem parte do programa de Pós-Graduação em Morfologia e, **aos Colegas** do Departamento de Anatomia, agradeço o apoio e a amizade que tornaram o ambiente profícuo à produção científica.

Ao **Magnífico Reitor da Universidade Federal de Alagoas, Professor ROGÉRIO MOURA PINHEIRO**, por ser um eterno incentivador nas minhas atividades culturais.

Aos **Professores do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Alagoas**, que sempre colaboraram para que eu pudesse prosseguir na conclusão desta nova etapa.

Aos **Médicos Patologistas**, do Hospital do Câncer de Pernambuco e Hospital Universitário de Alagoas, **ADONIS CARVALHO** e **RICARDO HOULY**, respectivamente, agradeço pela colaboração e ajuda desinteressada ao ceder as lâminas com os cortes histológicos, para a confecção deste trabalho.

Ao colega de Pós-Graduação **ALEX BENÍCIO DA SILVEIRA**, pelo incentivo, companheirismo e ajuda na confecção do material em estudo.

Aos técnicos **ANA LEMOS, NÚBIA VAZ SANTOS** e **ROBERTO FERREIRA**, obrigada pelas atenções e a paciência durante a minha permanência no laboratório.

Ao colega **WELLINGTON S. FONTES JÚNIOR**, pelas sugestões na confecção das lâminas.

Aos colegas **ALEXANDRE SHERLLEY** e **ANA MARIA ATAÍDE ROMANGUERA**, pelo apoio neste trabalho e, a **KIRLIAN SILVESTRE**, pela parte gráfica.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1. Progressão das Neoplasias Intraepiteliais Cervicais.....	16
Tabela 1. Distribuição dos indivíduos com diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical de Grau I	19
Tabela 2. Distribuição dos indivíduos com diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical de Grau II.....	20
Tabela 3. Distribuição dos indivíduos com diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical de Grau I	21
Tabela 4. Distribuição dos indivíduos com diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical de Grau II.....	21
Fotomicrografia 1. Células Intraepiteliais Cervicais do colo do útero pela Reação de Hematoxilina-eosina.....	23
Fotomicrografia 2. Células Intraepiteliais Cervicais do colo do útero pela Reação de Feulgen.....	24
Esquema 2. Calibração da intensidade da absorbância para células capturadas	25
Fotomicrografia 3. Corte histológico de colo do útero submetido à Reação de Feulgen	27
Fotomicrografia 4. Corte histológico de colo do útero submetido à Reação de Hematoxilina-eosina.....	28
Fotomicrografia 5. Corte histológico de colo do útero submetido à Reação de Feulgen	28
Fotomicrografia 6. Corte histológico de colo do útero submetido à Reação de Hematoxilina-eosina.....	29
Histograma 1. Quantificação de DNA nas células linfocitárias	30
Histograma 2. Demonstração da frequência e intensidade de DNA nas neoplasias intraepiteliais cervicais graus I (NIC I) e II (NIC II) e, em linfócitos (controle) por intermédio do Programa Image Lab	31

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS.....	5
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
RESUMO	12
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODO	19
RESULTADOS	27
DISCUSSÃO	33
CONCLUSÕES	37
ABSTRACT	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	47

RESUMO

A presente pesquisa tem como objetivo detectar variações de DNA nos núcleos das células marcadas pela Reação Histoquímica de Feulgen, em indivíduos com diagnóstico de Neoplasias Intraepiteliais Cervicais de Graus I e II (NIC I e II) do colo do útero.

A microcitometria foi realizada em lâminas preparadas provenientes de hospitais estaduais e universitário, submetidas à Reação Histoquímica de Feulgen, sendo analisadas no sistema Image Lab para a mensuração e absorbância. Os resultados encontrados entre as células neoplásicas dos graus I (NIC I) e II (NIC II) demonstraram que o método é sensível e eficiente na ajuda da quantificação entre as diferentes classificações, podendo, desta forma, auxiliar no diagnóstico das lesões do colo do útero em seu estágio inicial.

INTRODUÇÃO

As alterações do colo do útero têm sido objeto de estudo de vários pesquisadores. Como suas causas ainda não estão totalmente descritas, diversos centros dedicam-se no sentido de fornecer métodos e materiais cada vez mais atualizados, visando uma melhor definição e diagnóstico. Nas neoplasias do colo do útero, diagnósticos fornecidos pela citomorfologia e pela histologia, ainda são insuficientes na detecção preventiva de malignidade (BÖCKING, 1995). Nas respostas inflamatórias são observadas modificações celulares idênticas àquelas do tecido epitelial observadas em alguns carcinomas. Em casos moderados de neoplasias, não fica evidente se as células alteradas se transformaram em células malignas, dificultando ou induzindo, desta forma, a uma terapêutica equivocada (BÖCKING, 1995).

Sabendo que o câncer de colo do útero é uma doença vinculada ao grau de subdesenvolvimento das nações (NIH Consen Statement, 1996, *APUD* LIMA, 1999), no Brasil, estima-se que seja o terceiro mais comum na população feminina, sendo apenas superado pelos cânceres de pele (não melanoma) e de mama (MINISTÉRIO DA SAÚDE, boletim informativo, 2001). Assim, preocupamo-nos em realizar esta pesquisa na Região Nordeste, em especial nos estados de Alagoas e Pernambuco, aonde encontramos altas cifras de incidência, atingindo 16,9 em cada 100.000 habitantes, em Alagoas e 30,2, em Pernambuco (MINISTÉRIO DA SAÚDE, boletim informativo, 2000). Este tipo de câncer representa 10% de todos os tumores malignos em mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, boletim informativo, 2001).

Como o câncer de colo de útero é um tumor onde a ploidia de DNA é um provável fator prognóstico, torna-se necessário podermos prognosticar estes casos, visto que existe uma grande correlação da importância histológica e imunohistoquímica com a morfologia nuclear (WIED, 1966; GÖHDE, 1972; SACHS, 1972; HILGARTH, 1976 a e b; CHIEBANY, 1977; KRUG, 1977; SCHENCK, 1979; FU, 1981 e BÖCKING, 1983).

A doença inicia-se em idade precoce e tem evolução lenta, permitindo um melhor prognóstico (LIMA *et al*, 1999). CRAMER e CUTLER (1974) calcularam em 15,6 anos o tempo entre a lesão inicial e a fase clinicamente diagnosticada. O câncer do colo do

útero, possivelmente, é originário de lesões provenientes de tecido epitelial ou do Papiloma Vírus Humano (HPV) (ZUR HANSEN *et al*, 1974).

O termo carcinoma *in situ*, tal como hoje empregamos, foi introduzido por BRODERS em 1932. Com o advento da citologia, Papanicolaou e Traut (1943) publicaram as alterações celulares encontradas nas lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo do útero. O conceito de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) para classificar as diferentes etapas do processo da carcinogênese cervical, excluindo o termo carcinoma *in situ*, foi introduzido por RICHART (1967). HINSELMANN (1991) na busca do tumor em sua fase inicial, idealizou um aparelho óptico de aumento acoplado a uma potente fonte de luz e o denominou de colposcópio (*Kolpos*, vagina; *Skopeo*, olhar com atenção). HINSELMANN (1991) correlacionando os achados colposcópicos com os histopatológicos, evidenciou inúmeras alterações intraepiteliais e as classificou histologicamente de epitélio atípico.

Revisando as várias classificações histológicas das alterações epiteliais cervicais, constatamos que a terminologia empregada por RICHART (1967) é a mais prática, pois se separa as lesões que mais freqüentemente envolvem (baixo grau) daquelas que, se não tratadas corretamente, podem evoluir para o câncer invasor (Esquema 1). Atualmente, considera-se a lesão de alto grau como verdadeira precursora do carcinoma cervical. Por essas razões, será usada essa nomenclatura quando se referir a essa doença.

Baseado nos distúrbios arquiteturais, nas anomalias nucleares e na indiferenciação, RICHART (1967) subdividiu as alterações epiteliais cervicais em três graus, rotulando-as de I, II e III:

Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau I:

A atipia nuclear é mais evidente no terço basal do epitélio; persiste por toda a espessura, porém é menos nítida nos dois terços superiores onde há maturação celular. Existe baixa atividade mitótica nas camadas basais.

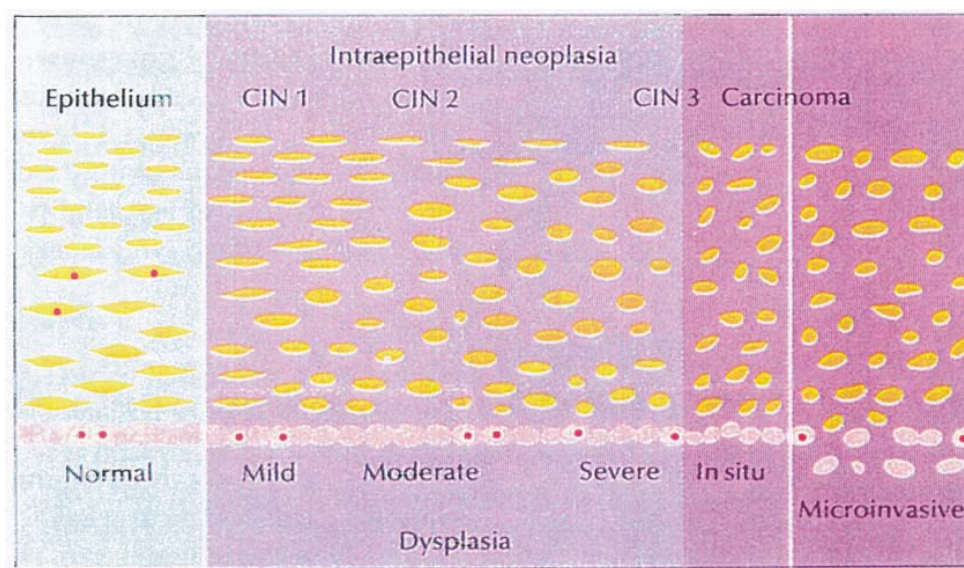
Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau II:

Atipia nuclear é mais intensa que na anterior, comprometendo principalmente os dois terços inferiores do epitélio, todavia, atinge até a superfície com menor intensidade. A atividade mitótica está mais restrita aos dois terços inferiores, podendo-se encontrar formas anômalas. Há maturação na metade superior do epitélio.

Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau III:

A atipia nuclear é acentuada, comprometendo toda a espessura epitelial. A atividade mitótica pode ser rica em toda a faixa epitelial, assim como figuras anômalas de mitose também são vistas. A maturação pode inexistir ou ser restrita à superfície epitelial.

Esquema 1 – Progressão das Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (RICHART, 1967).



Segundo BÖHM (1975, 1976), esforços têm sido dirigidos para o diagnóstico automático de tumores, utilizando-se, por exemplo, a citometria de fluxo para a mensuração dos núcleos de DNA (SPRENGER, 1977, 1978). Com o objetivo de se diagnosticar as células com as neoplasias mais freqüentes, procedimentos estatísticos, também, têm sido realizados por novos programas, com o intuito de se fornecer valores pela citometria de fluxo (SPRENGER, 1977; BÖCKING, 1983).

Os resultados das medições do DNA realizadas por varredura citofotométrica têm sido avaliados de modo subjetivo em histogramas progressivos para DNA, tendo-se apenas poucos métodos estatísticos visando ao diagnóstico da malignidade por via automática computadorizada (TAVARES, 1966, 1968; ENERZVEH, 1976; ZETTENBERG, 1976; BLONDAL, 1982). Embora existam todos estes estudos realizados para a definição do diagnóstico, ainda são considerados insuficientes (SPRENGER, 1974).

Métodos morfológicos para a classificação de tumores malignos, ainda são subjetivos e considerados inconfiáveis para serem reproduzidos (BÖCKING, 1982). É necessário que existam métodos objetivos, seguros, que possam assegurar-nos, com uma maior definição, os prognósticos das neoplasias intraepiteliais cervicais para que a terapêutica a ser aplicada, seja realizada de forma adequada e voltada, individualmente, para cada paciente. O estudo do DNA é, indubitavelmente, o parâmetro ideal que poderá servir como condição para teste prognóstico (ATKIN, 1962; TAVARES, 1966; BÖHM, 1975; FEULGEN, 1974; KIMTEMBERG, 1980; PATEK, 1980; BÖCKING, 1982). A tentativa de quantificar o DNA do núcleo observando a correlação entre a sua distribuição e o prognóstico, visa estabelecer parâmetros para um sistema de gradação de malignidade.

O nosso trabalho tem como objetivo determinar possíveis variações nos padrões de DNA entre os graus I e II (NIC I e NIC II) de neoplasias intraepiteliais cervicais do colo do útero, uma vez que, a morfologia apresenta limitações no que diz respeito ao prognóstico destas lesões.

MATERIAL E MÉTODO

O material utilizado neste estudo foi proveniente de biópsias do colo do útero, os cortes emblocados em parafina, de 103 pacientes, das raças branca e parda, cujas idades variaram de 15 a 66 anos (tendo em média 32,27 anos), com estados civis de solteira, casada e viúva, apresentando vida sexual ativa e, não fazendo uso de reposição hormonal (dados fornecidos através dos prontuários médicos). As amostras foram coletadas dos Centros de Anatomia Patológica dos Hospitais Universitário, da AgroIndústria do Açúcar e do Alcool, do estado de Alagoas e, do Hospital do Câncer, do estado de Pernambuco (Tabelas 1 e 2). Estes indivíduos foram separados em dois grupos, de acordo com o diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical do colo do útero, em graus I (NIC I) e II (NIC II). Todos os diagnósticos fornecidos foram confirmados, sendo os casos das portadoras de neoplasia intraepitelial cervical grau III descartados.

Tabela 1 – Distribuição dos indivíduos com diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau I (NIC I) do presente estudo.

Grau de Neoplasia	Número de Indivíduo	Estado Civil	Raça	Total
Grau I (NIC I)	56	Casada	Branca	-
			Parda	37
		Solteira	Branca	-
			Parda	08
		Viúva	Branca	-
			Parda	02
		Desconhecida		09

Tabela 2 – Distribuição dos indivíduos com diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau II (NIC II) do presente estudo.

Grau de Neoplasia	Número de Indivíduo	Estado Civil	Raça	Total
Grau II (NIC II)	41	Casada	Branca	02
			Parda	30
		Solteira	Branca	03
			Parda	05
		Viúva	Branca	-
			Parda	01
		Desconhecida		-

Durante as biópsias, os fragmentos de tecido do colo do útero foram fixados em paraformaldeído a 4% e processados, rotineiramente, para inclusão em parafina. Após a microtomia, os cortes de 5 µm (micras) de espessura, em Micrótomos Spencer, foram corados com hematoxilina-eosina para análise histológica e submetidos à técnica de Reação Histoquímica de FEULGEN e ROSSENBECK (1924) e contra-corado com Fast-Green para quantificação das possíveis variações de DNA.

Foram descartadas várias lâminas e vários blocos por não possuírem identificação do estado civil, raça, idade, vida sexual e o uso de reposição hormonal, assim como, lâminas com tecidos inadequadamente fixados, com diagnóstico não compatível e, de baixa resolução ótica. Permanecendo os casos dos indivíduos relatados dos grupos 1 e 2, perfazendo um total de quarenta (40), representando 38,83% das amostras (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Distribuição dos indivíduos com diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau I (NIC I) do presente estudo.

Grau de Neoplasia	Número de Indivíduo	Estado Civil	Raça	Total
Grau I (NIC I)	20	Casada	Branca	-
			Parda	14
		Solteira	Branca	-
			Parda	04
		Viúva	Branca	-
			Parda	02

Tabela 4 – Distribuição dos indivíduos com diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau II (NIC II) do presente estudo.

Grau de Neoplasia	Número de Indivíduo	Estado Civil	Raça	Total
Grau II (NIC II)	20	Casada	Branca	02
			Parda	16
		Solteira	Branca	-
			Parda	02

Foram utilizados como controle as células epiteliais e linfócitos em condições de normalidade do colo do útero, provenientes dos grupos 1 (NIC I) e 2 (NIC II), após terem sido corados pela Reação de hematoxilina-eosina (Fotomicrografia 1) e os demais cortes submetidos à Reação de Feulgen (Fotomicrografia 2).

Foi utilizado o seguinte protocolo:

I – As lâminas foram colocadas em estufa, para ser retirado o excesso de parafina, durante 20' a 30'

II – Retirando a parafina:

1 – xilol – 5'

2 – xilol – 10'

III – Hidratação:

1 – álcool 100% - 3'

2 – álcool 90% - 3'

3 – álcool 80% - 3'

4 – álcool 70% - 3'

5 – lavadas em água destilada – 10'

IV – Reação de Feulgen:

1 – reagente 1 (ácido hidrocloreídrico) – 50'

2 – lavadas em água destilada – 2'

3 – lavadas em água destilada – 2'

4 – reagente 2 (reagente de Schiff) – 60' + 15'

5 – reagente 3 (metabisulfite) – bloqueadas em solução de metabisulfite – 5 ml de metabisulfite + 95 ml de água destilada + 1 ml de ácido hidrocloreídrico – 3'

6 – bloqueadas em solução de metabisulfite – 5 ml de metabisulfite + 95 ml de água destilada + 1 ml de ácido hidrocloreídrico – 3'

7 – lavadas em água destilada – 2'

8 – lavadas em água destilada – 2'

9 – Fast green – 5'' a 1'

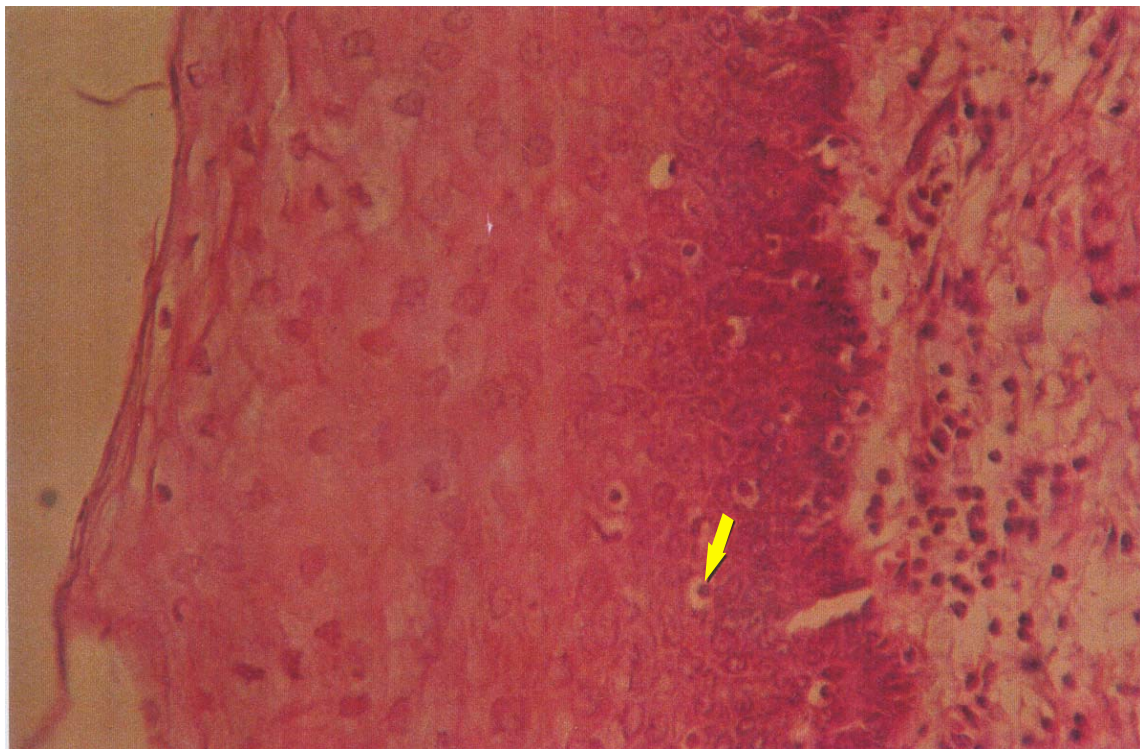
V – Desidratação:

- 1 – álcool 70% - 3'
- 2 – álcool 90% - 3'
- 3 – álcool 100% - 5'
- 4 – álcool 100% - 5'
- 5 – álcool 100% - 10'

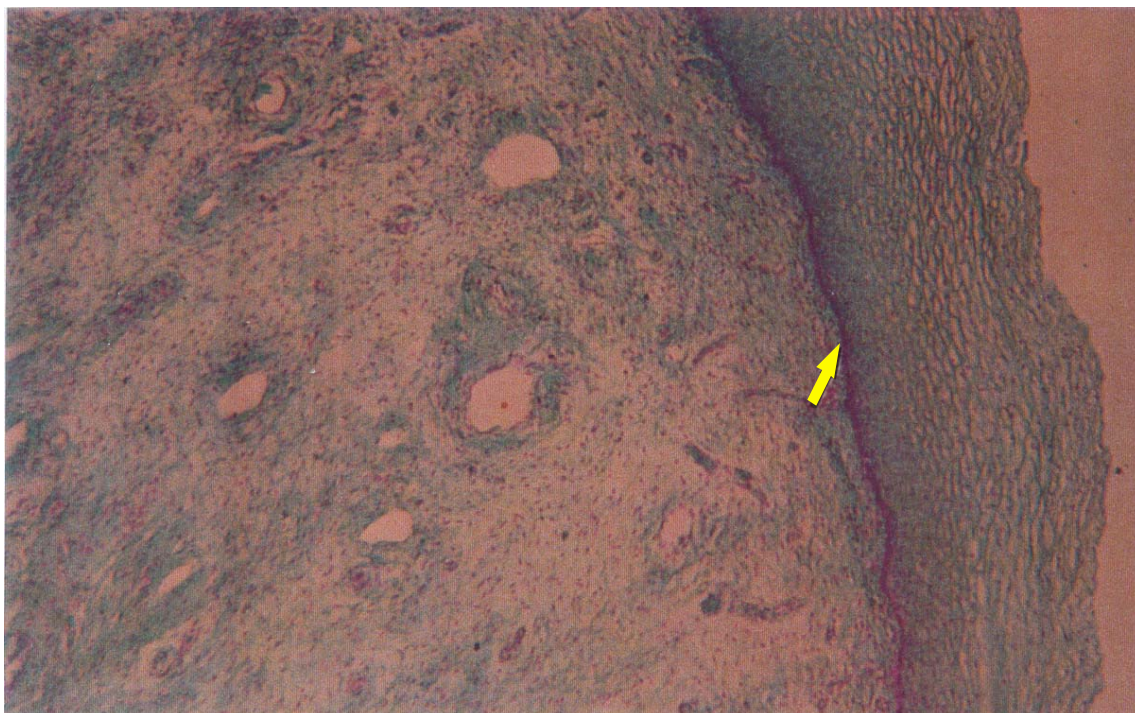
VI – Diafanização:

- 1 – xilol – 5'
- 2 – xilol – 20'

VII – Montagem com entellan

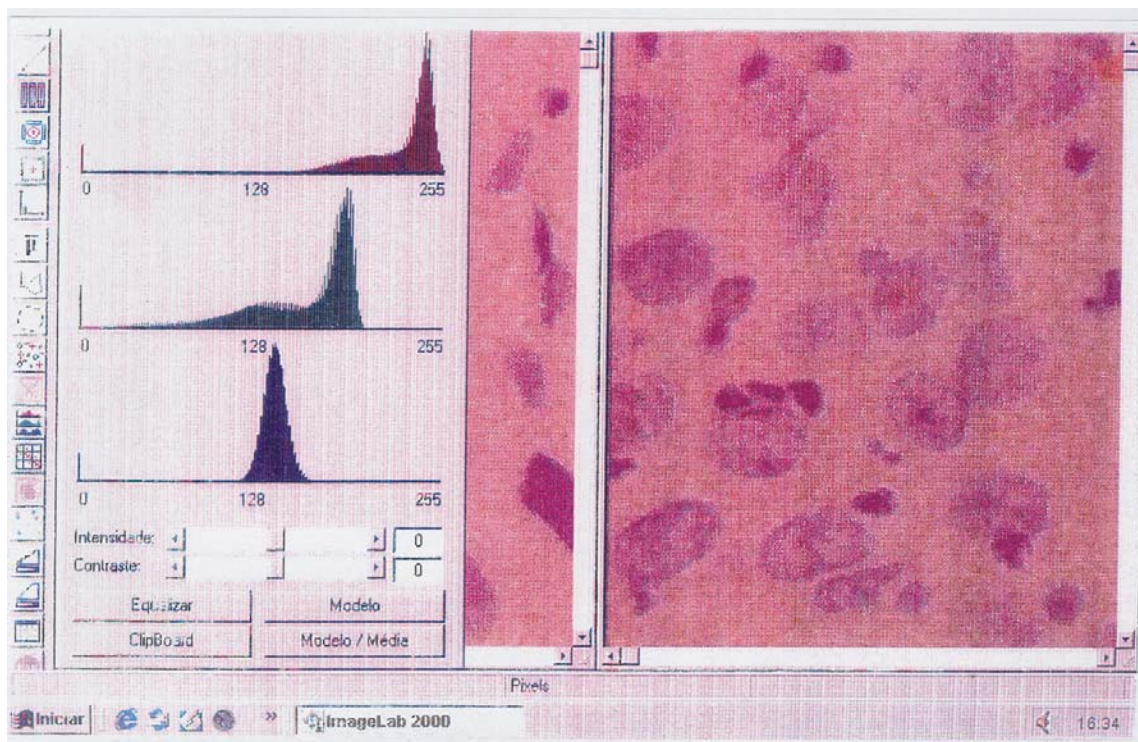


Fotomicrografia 1 – Células epiteliais do colo do útero Reação de Hematoxilina-eosina (HE); linfócito (seta).
Aumento de 400 x.



Fotomicrografia 2 – Células epiteliais do colo do útero pela Reação Histoquímica de Feulgen (Fastgreen); células basais (seta). Aumento de 100 x.

Após a Reação Histoquímica de Feulgen, cada lâmina foi selecionada e, em seguida, marcada de 8 (oito) a 15 (quinze) campos e, seqüencialmente, submetidas ao sistema de captura de imagem, perfazendo um total de 100 (cem) células, contadas por lâmina, em microscópio (Leica DMLS), acoplada uma câmera de vídeo (Samsung 410 – SHC – NAD) e, o software (Image Lab), inserido em um computador (Pentium III). Com o equipamento calibrado (Esquema 2), as leituras eram seqüenciadas utilizando-se dos métodos de segurança de HAROSKE (1998) e GIROUD (1998). Vários dados de intensidade, mensuração e absorbância foram anexados para fins de análise estatística. Algumas lâminas de neoplasias grau I e grau II foram submetidas à documentação fotográfica.



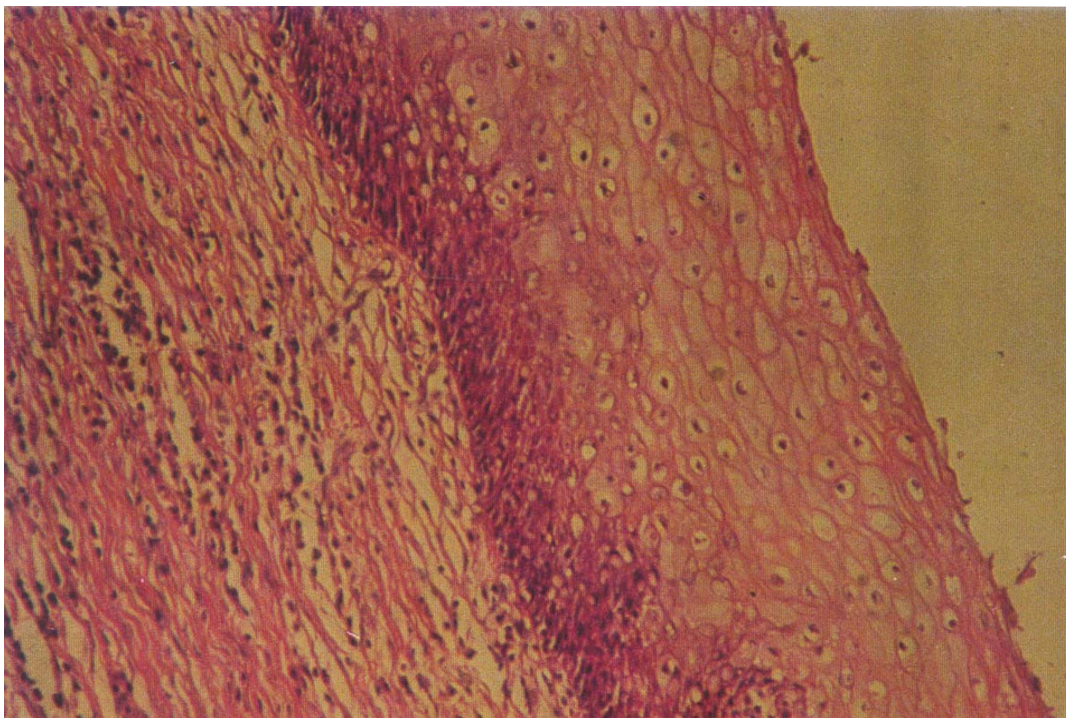
Esquema 2 – Calibração da intensidade da absorbância para as células epiteliais capturadas por intermédio do Programa Image Lab.

RESULTADOS

Quanto aos aspectos morfológicos, houve prejuízos decorrentes da má qualidade de parte do material cedido, de forma a impossibilitar o diagnóstico e trazer dificuldades quando submetido a Reação Histoquímica de Feulgen para quantificação do DNA. Destes, foram descartados 61,17% das amostras, permanecendo apenas 38,83%, representando 40 (quarenta) indivíduos, sendo 20 (vinte), com diagnóstico de neoplasia do colo do útero grau I (NIC I – Fotomicrografias 3 e 4) e, 20 (vinte) com neoplasia do colo do útero grau II (NIC II – Fotomicrografias 5 e 6), onde se observam, a partir das células basais, a distribuição dos diversos núcleos marcados pela Reação Histoquímica de Feulgen, contendo cortes cortes contracolorados pelo Fast green e pela Hematoxilina-eosina.



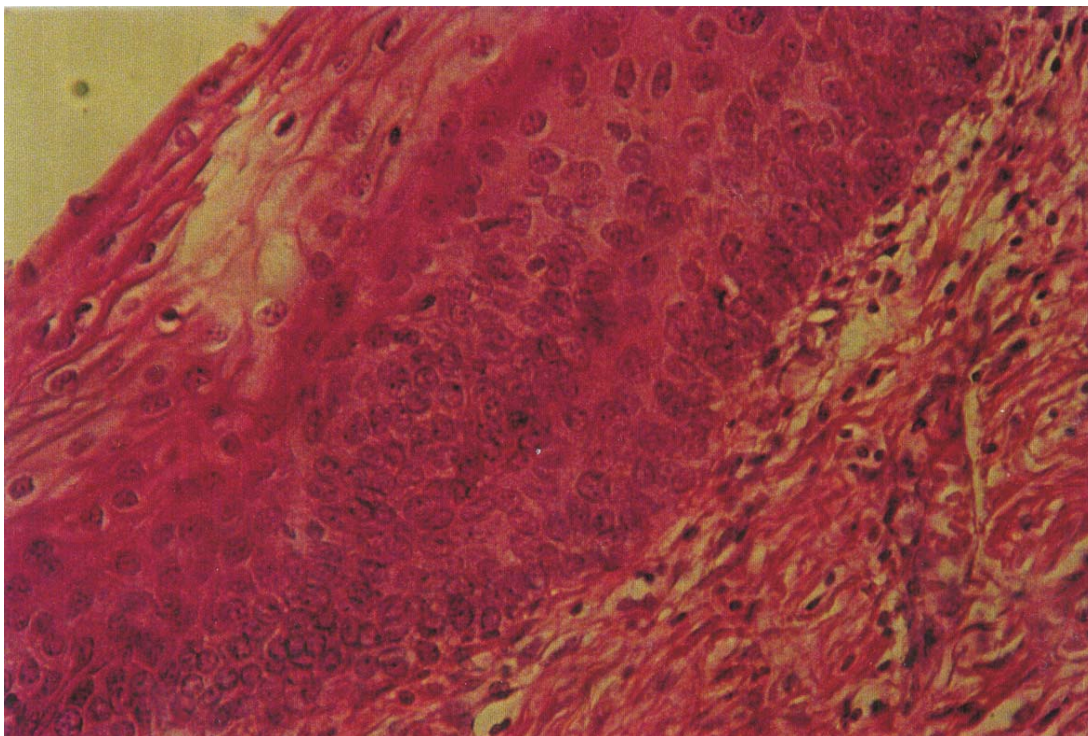
Fotomicrografia 3 – Corte histológico de colo do útero (5 µm) com neoplasia intraepitelial cervical grau I (NIC I), submetido à Reação Histoquímica de Feulgen e contracolorado pelo Fast green; células basais (*); núcleos reativos de DNA (seta). Aumento de 400 x.



Fotomicrografia 4 – Corte histológico de colo do útero (5 μ m) com neoplasia intraepitelial cervical grau I (NIC I), submetido à Reação de Hematoxilina-eosina. Aumento de 400 x.



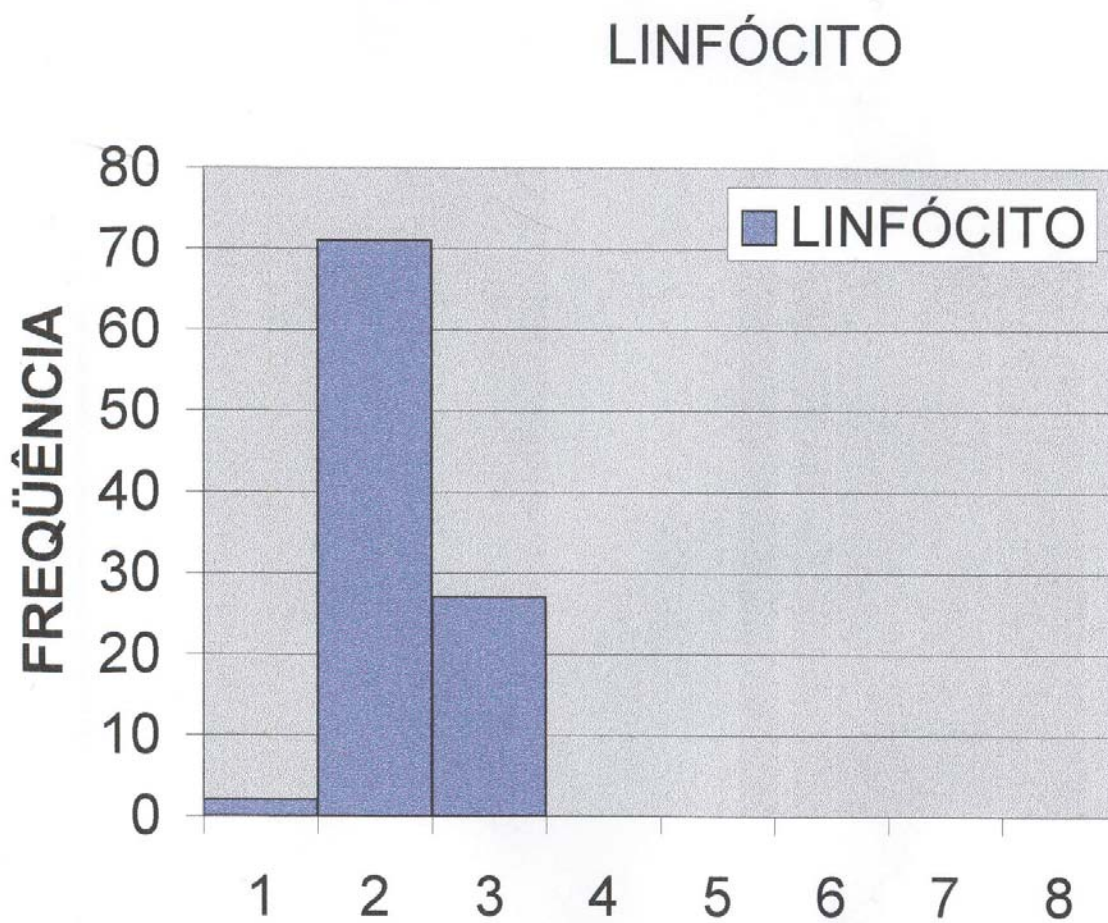
Fotomicrografia 5 – Corte histológico de colo do útero (5 μ m) com neoplasia intraepitelial grau II, submetido à Reação de Feulgen e contracorado pelo Fast green; células basais (*); núcleos reativos de DNA (seta). Aumento de 400 x.



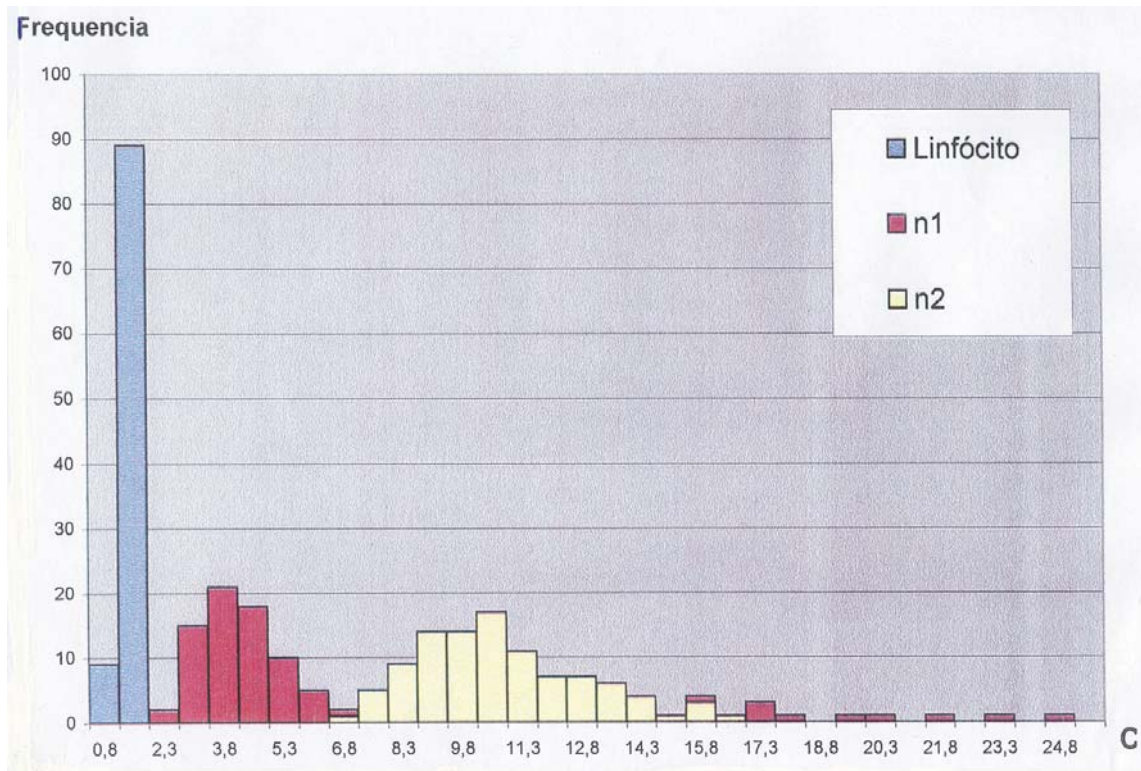
Fotomicrografia 6 – Corte histológico de colo do útero com neoplasia intraepitelial grau II, submetido a Reação de Hematoxilina-eosina. Aumento de 400 x.

A evidenciação dos graus de neoplasia intraepitelial cervical foi obtida das células epiteliais do colo do útero e dos linfócitos, utilizados como padrão morfológico (Fotomicrografia 5), no tecido uterino em estado de normalidade (Histograma 1).

Para a classificação do DNA, utilizando-se a técnica de Feulgen, observamos nos casos das neoplasias intraepiteliais cervicais grau I (NIC I), uma maior intensidade entre os canais de 2.3 a 6.8, sendo este canal final, com sobreposição de células neoplásicas do grau II (NIC II), por outro lado, ocorreu uma maior prevalência entre os canais de 6.8 a aproximadamente 17.02, para as células com neoplasias intraepiteliais cervicais grau II (NIC II), demonstrando uma maior intensidade dos núcleos celulares deste conjunto e, de fácil visualização e compreensão, quando observados no Histograma 2.



Histograma 1 – Quantificação de DNA em células linfocitárias por intermédio do Programa Image Lab.



Histograma 2 – Demonstração da frequência e intensidade de DNA nas neoplasias intraepiteliais cervicais graus I (NIC I) e II (NIC II) e, em linfócitos (controle) por intermédio do Programa Image Lab.

DISCUSSÃO

A grande vantagem da utilização do sistema de captura de imagem é, sem dúvida, a rapidez pela qual conseguimos reproduzir, em grande escala, um número de várias leituras em relação à sua medição, densidade, absorbância, entre outros. A outra grande vantagem é a precisão e o curto espaço de tempo gasto para a realização de tarefas, muitas vezes, enfadonhas.

Em nosso estudo, alguns fatores foram importantes para a padronização das contagens diárias. Primeiramente, a necessidade do estabelecimento de um padrão de calibração, de modo que as contagens seguintes possuíssem o menor grau de variação possível. As capturas nos mesmos graus de intensidade obedeceram as técnicas de HAROSKE (1998) e GIROUD (1998) como métodos de segurança.

As dificuldades existentes entre vários autores ao diagnosticar corretamente, principalmente, na fase inicial, para malignidade, sobre os aspectos morfológicos em relação ao DNA do núcleo (BÖHM, 1975), ocorreram, de fato, em nosso trabalho; fato este, que nos fez desprezar uma grande quantidade de material (61,17% das amostras), por se apresentarem com a distribuição da marcação do cromógeno de forma totalmente irregular nos diversos núcleos celulares, com uma maior intensidade em um determinado local, resultado, talvez, devido aos diferentes tipos de fixação durante a técnica de impregnação (VIDAL *et al*, 1973).

O uso de diferentes fixadores com diferentes métodos de fixação, formam uma gama de variedades na intensidade do cromógeno, em virtude da concentração do hidrogênio iônico e do tempo de hidrólise da Reação de Feulgen (BÖHM, 1968, a & b), que podem interferir na distribuição espacial da condensação de cromatina, podendo, além de marcar o DNA, marcar também, proteínas (STEDMAN, 1950).

Por outro lado, distribuições atípicas de DNA quando comparadas aos resultados da citometria do epitélio do colo do útero e seu DNA, não são consideradas, por alguns autores, um método para o diagnóstico precoce de malignidade (CHEBANY, 1977).

Embora, a maioria dos pesquisadores, considere aneuploidia um fator de malignidade (ONO, 1983; WIED, 1983 e BARLOGIE, 1984).

Baseando-nos nas dificuldades presentes em nossos estudos, entendemos que as neoplasias intraepiteliais cervicais de grau I (NIC I) podem estar sujeitas a diferentes interpretações, visto que, a maioria dos diversos graus de neoplasia e malignidade é detectada por acompanhamento morfológico (BÖCKING, 1983). Normalmente, os processos degenerativos são seguidos de dúvida devido à ausência de confirmação do início das diferenciações celulares. O uso de métodos histoquímicos associado à citometria é, sem dúvida, válido para detecção de células cancerígenas (WIED, 1966; GÖHDE, 1972; SACHS, 1972; HILGARTH, 1976, a & b; CHEBANY, 1977; KRUG, 1977; SCHENCK, 1979; FU, 1981 e BÖCKING, 1983). A vantagem do uso do DNA com a citometria é a confirmação do início das lesões, com a presença de células aneuplóides, ainda que, o paciente não tenha apresentado, na observação rotineira, neoplasia (AUFFERMANN, 1983; HIDDEMANN, 1983; ONO, 1983; BARLOGIE, 1984 e BÖCKING, 1984). As neoplasias intraepiteliais cervicais de grau II (NIC II), podem ser detectadas, anteriormente ao estudo morfológico, se utilizarmos a distribuição de DNA nas células (HILGARTH, 1976; AUFFERMANN, 1985 e BÖCKING, 1985).

Os nossos estudos sugerem que a diferença de concentração na distribuição de DNA, nas células com diagnóstico morfológico de neoplasia intraepitelial cervical de grau II (NIC II), em relação àquelas com neoplasia intraepitelial cervical de grau I (NIC I), possibilite, talvez, confirmação do início da lesão, observada por BÖCKING (1984, 1985), na detecção inicial do processo cancerígeno, em pacientes que ainda não possuam neoplasia. Esta diferença de concentração sugere o uso do DNA como um indicador inicial para o diagnóstico das neoplasias, prevenindo-se futuras lesões. As neoplasias intraepiteliais cervicais de grau II (NIC II) evoluem, em oito anos, para o carcinoma *in situ* (SACCOMANNO, 1982). Embora evidências morfológicas de malignidade só sejam claras quando ocorre o estágio de carcinoma *in situ*, a presença de células aneuplóides nas neoplasias intraepiteliais cervicais de grau I (NIC I), já indica maior agressividade, possivelmente, presença de lesões pré-cancerosas (BÖCKING, 1986). BIBBO *et al* (1983)

são da opinião que a demonstração da ploidia do DNA possa ser utilizada como controle de qualidade na citologia, assim como, a observação morfológica pela histologia.

A utilização de métodos histoquímicos é, sem dúvida, de grande importância no diagnóstico inicial de patologias e neoplasias do colo do útero, porém, o uso adequado de técnicas para a evidenciação do DNA, requer conhecimento e padronização, desde o início, com a obtenção e a fixação, ao uso do marcador histoquímico e leitura por equipamentos computadorizados, para o fornecimento de diagnósticos precisos e que possam ser utilizados na prática rotineira.

A ausência de dados nos prontuários dos indivíduos inviabilizou confrontos estatísticos entre aspectos raciais, incidência de neoplasias em relação às idades e os estados civis.

CONCLUSÕES

A marcação das células pela Reação Histoquímica de Feulgen para DNA ocorre e serve como um indicador para a classificação das células neoplásicas de grau I (NIC I) e de grau II (NIC II), possibilitando a um prognóstico.

Os diferentes graus de intensidade do DNA nos núcleos das células neoplásicas auxiliam na identificação precoce das alterações celulares.

ABSTRACT

The purpose of the present research was to detect the DNA variations by Feulgen-stained chromatin and the packing degree of the cervix chromatin in the clinical cases of human uterine carcinomas. Scanning microphotometry was carried out on slides prepared from en bloc Feulgen-stained. Accurate control procedures were performed using normal human cell nuclei. The cervical cells were morphometrically studied with the Image Lab system for cytologic classification. The overall diagnostic accuracy for neoplasia type I (NIC I) and type II (NIC II), demonstrated by stain interpretation values, a sensitive detection of DNA aneuploidy and a significant difference between two groups in scanning static cytophotometry.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATKIN, N. B. **Clinical significance of ploidy in carcinoma of cervix: its relation to prognosis.** *Br Med J.* 2: 1445-1446, 1962.

AUFFERMANN, W; BÖCKING, A. **Schenelle DNS-Zytophotometrie in der Troutine mit dem LEITZ TAS-plus.** *Verh Disch Ges Pathol* 67: 707, 1983.

AUFFERMANN, W; BÖCKING, A. **Early detection of precancerous lesions in dysplasia of the lung by rapid DNA image cytometry.** *Anayt Quant Cytol Histol.* 7: 218-226, 1985.

BARLOGIE, B. **Abnormal cellular DNA content as marker of neoplasia.** *Eur J. Cancer Clin Oncol* 20: 1123-1125, 1984.

BIBBO, M; ALENGHAT, E; BAHR, G. F.; BARTELS, P. H; DYTCH, H. E., HEBST, A. L.; KEEBLER, C. M.; PISHOTTA, F. T.; WIED, G. L. **A quality-control procedure on cervical lesions for the comparison of cytology and histology.** *J. Reprod. Med.* 28: 811-822, 1983.

BLONDAL, T.; BENGTSSON, M. **Diagnostic application of nuclear DNA measurements on bronchial secretions.** *Analyt Quant Cytol.* 4: 269-274, 1982.

BÖCKING, A.; AUFFERMANN, W. **Algorithm for DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy.** *Verh Disch Ger Pathol.* 66: 540, 1982.

BÖCKING, A.; HILGARTH, M. **Beurteilung der prospektiven malignitat zervikaler dysplasien durch DNS-Zytophotometrie.** *XIII Deutscher Kongress für Zytologie*, Freiburg, 1983.

BÖCKING, A.; ADLER, C. P.; COMMON, H. H.; HILGARTH, M.; GRANZEN, B.; AUFFERMANN, W. **Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy.** *Analyt Quant. Cytol.* 6: 1-8, 1984.

BÖCKING, A.; AUFFERMANN, W.; VOGEL, H.; SCHONDORFF, G.; GOEBBELS, R.
Diagnosis and grading of malignancy of squamous epithelial lesions of the larynx with DNA-cytophotometry. *Cancer*. 56: 1600-1604, 1985.

BÖHM, N. **Einfluss der Fixierung und der Säurekonzentration auf die Feulgenhydrolyse bei 28° C.** *Histochemie*. 14: 201-211, 1968 a.

BÖHM, N.; SANDRILLER, W. **DNA in human tumor: a cytophotometric study.** *Curr Top Pathol*. 60: 151-219, 1975.

BRODERS, A. C. **Carcinoma *in situ* contrasted with benign penetratiny epithelium.** *JAMA*, 99. 20: 1670, 1932.

CHEBANY, S. A.; KUSKCH, A. A.; ZELINI, A. V. **DNA content in dysplasias and early invasive forms of cervical cancer.** *Vorpr Onkol* . 23: 64, 1977.

CRAMER, D. W.; CUTLER, S. J. **Incidence and histopathology of malignancies of the genital female organs in the United States.** *Am. J. Obstet. Gynecol*. 118: 443, 1974.

ENERZVEH, C. M.; ZEMERBERG, A. **A cytochemical method of grading the malignancy of salivary gland tumours preoperatively.** *Acta Otolaryngol*. 81: 489-496, 1976.

FU, Y. S.; REAGAN, J. W.; RICHART, R. M. **Definition of precursors.** *Gynecol Oncol*. 12: 220-231, 1981.

GÖHDE, W.; DITTRICH, W.; ZINSER, H. K.; PRIESHOF, J. **Impulzytophotometrische messungen na a atypischen zellabstrischen aus scheide und cervix uteri.** *Geburtshilfe Frauenheikd*. 32: 382-393, 1972.

- HIDDEMAN, W.; WORMANN, B.; RITTER, J.; KLEINEMEIER, H. J.; VON BASSEWITZ, D. V.; ROSSNER, A.; MULLER, K.; BUCHNER, T. **A highly specific marker for cancer detection.** *Pro Am. Soc. Clin. Oncol.* 2: 7, 1983.
- HILGARTH, M.; SPRENGER, E. **Zellkern-DNS-Messung als diagnostikhilfe bei unklarem zytologischem befund.** *Arch Gynakol.* 219: 64-66, 1976.
- HILGARTH, M. **Abklärung unklarer zervixbefunde durch DNS-Einzelzell-Fluoreszenz-zytophotometrie.** *Fortschr Med.* 94: 1485-1487, 1976.
- HINSELMANN, H. **História da Colposcopia Feminina.** 19 (7): 563, 1991.
- KIMTEMBERG, A.; ZETTERBERG, A.; SODERBERG, G. **The prognostic significance of nuclear DNA content in chondrosarcoma.** *Analyt Quant Cytol.* 2: 272-279, 1980.
- KRUG, H.; EBERLING, K. **Pulse cytophotometric investigations concerniploidy and proliferation pattern of invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix.** *Exp. Pathol.* 13: 237-246, 1977.
- LIMA, G. R.; GEBRIM, L. H.; OLIVEIRA, V. C.; MARTINS, N. V. **Ginecologia Oncológica,** Atheneu, São Paulo, 1999.
- ONO, J.; AUER, G. **The significance of DNA measurements for the early detection of bronchial cell atypia.** *Citometry.* 3: 340-344, 1983.
- PAPANICOLAOU, G. M.; TRAUT, H. E. **Diagnosis of uterine câncer by the vaginal smear.** *Common Wealth Found,* New York, 1943.
- PATEK, E.; JOHANNISSON, E.; KRAUER, F.; RIOTTON, G. **Microfluorometric grading of mammary tumors: a pilot study.** *Analyt. Quant. Cytol.* 2: 264-271, 1980.

RICHART, R. M. **Natural history of cervical intraepithelial neoplasia.** *Clinical Obstet-Gynecol.* 10: 784, 1967.

SACCOMANO, G. **The contribution of uranium miners to lung cancer histogenesis.** *Recent results cancer Res.* 83: 43-52, 1982.

SACHS, H.; STEGNER, H. E.; BARISSEN, J. **Zytophotometrische Untersuchungen na Epitheldysplasien des Collum uteri.** *Arch Gynakol.* 212: 97-129, 1972.

SCHENCK, U. **Ergebnisse objekttragerzytophotometrischer DNS-Messungen na Materialien der Cervix Uteri.** *Med Klin.* 74: 1909-1913, 1979.

SPRENGER, E.; SANDRITTER, W.; NAUJOKS, H.; HILGARTH, M.; WAGNER, D.; VOGTSCHADEN, M. **Routine use of flow-through photometric prescreening in the detection of cervical carcinoma.** *Acta Cytol.* 21: 435-440, 1977.

STEDMAN, E.; STEDMAN, E. **The cytological interpretation of the Feulgen reaction.** *Bioch. J.* 47: 508-512, 1950.

TAVARES, A. S.; COSTA, J.; DE CARVALHO, A.; REIS, M. **Tumor ploidy and prognosis in carcinomas of the bladder and prostate.** *Br. J. Cancer.* 20: 438-441, 1966.

WIED, G. L.; BARTELS, P. M.; DYTCH, H. E. **Rapid DNA evaluation in clinical diagnosis.** *Acta Cytol.* 27: 33, 1983.

WIED, G. L.; MESSINA, A. M.; ROSENTHAL, E. **Comparative quantitative DNA-measurements on Feulgen-stained cervical epithelia cells.** *Acta Cytol.* 10: 31-37, 1966.

ZETTERBARG, A.; ESPOSTI, P. L. **Cytophotometric DNA-analysis of aspirated cells from prstatic carcinoma.** *Acta Cytol.* 20: 46-57, 1976.

ZUR HAUSEN, H.; MEINHOF, W.; SCHEIBER, W. **Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors I. Nuclei acid hybridization with complementary RNA of human wart virus.** *Int. J. Cancer.* 13: 650, 1974.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ATKIN, N. B. **Prognostic significance of ploidy level in human tumors: I. Carcinoma of the uterus.** *J. Natl Cancer Inst.* 56: 909-910, 1976.
- AUBELE, M.; BURGER, G.; RODENACKER, K. **Problems concerning quality of Feulgen DNA measurements: a study on five different fixation techniques.** *Analyt Quant Cytol Histol* ,in press.
- AUFFERMANN, W.; REPGES, R.; BÖCKING, A. **Rapid diagnostic DNA cytometric with an automatic microscope and a TV image analysis system.** *Analyt Quant Cytol.* 6: 179-188, 1984.
- BARRES, D. R.; DUHR, M. A.; BOIVIN, Y. A. **Discrimination between precancerous analysis of the DNA content in paraffin embedded tissue from colorectal carcinomas and its prognostic significance.** *Virchows Arch Cell Pathol.* 60: 123-131, 1985.
- BÖHM, N.; SPRENGER, E.; SCHLÜTER, G.; SANDRITTER, W. **Proportionalitätsfehler bei der Feulgen hydrolyse.** *Histochemie.* 15: 194-203, 1968 b.
- CASPERSON, T. **Quantitative cytochemical studies on normal, premalignant and atypical cell population from the uterine cervix.** *Scand. Arch Physiol.* 73: 8-45, 1936.
- COPPLESON, M.; ATKINSON, K. H.; DALRYMPLE, F. C. **Cervical squamous and glandular intraepithelial neoplasia.** *Clinical features and review of management.* IN: 1992.
- DELGADO, R.; MIKUZ, G.; HOFSTADTER, F. **DNA-Feulgen cytophotometric analysis of single cell isolated from paraffin embedded tissue.** *Path. Res. Prat.* 179: 92-94, 1984.

- FU, Y. S.; REAGAN, J. W.; JANIGA, K. E. **Adenocarcinoma and mixed carcinoma an the uterine cervix: II. Prognostic value of nuclear DNA analysis.** *Cancer*. 49: 2571-2577, 1982.
- GIROUD, F.; MONTMASSOU, M. P. **Reevaluation of optimal Feulgen reaction for automated cytology: influences of fixations.** *Analyt. Quant. Cytol. Histol.* 11: 87-95, 1989.
- GOPPINGER, A.; FREUDENBERG, N.; ROSS, A.; HILLEMANN, H. G.; HILGARTH, M. **The prognostic significance of the DNA distribution in squamous cells carcinomas of the uterine cervix.** *Analyt. Quant. Cytol.* 8: 148-151, 1986.
- HAROSKE, G.; KUNZE, K. D.; THEISSIG, F. **Prognostic significance of image cytometry DNA parameters in tissue sections from breast and gastric cancer.** *Analyt. Cell Pathol.* 3: 11-24, 1991.
- HAROSKE, G.; MEYER, W.; DIMMER, V.; KUNZE, K. D.; THEISSIG, F. **DNA ploidy analysis in tissue sections: methodological limitations and feasibility of a correction procedure for sectioning effects.** *Analyt. Cell Res. Path.*, in press, 1994.
- HRUSHOWETZ, S. B.; LAUCLAN, S. C. **Comparative DNA content of cells in the intermediate and parabasal layers of cervical intraepithelial neoplasia studied by two way elength, Feulgen cytophotometry.** *Acta Cytol.* 14: 68-77, 1988.
- JAKOBSEN, A.; BICHEL, P.; KRISTENSEN, G. B.; NYLAND, M. **Prognostic influence of ploidy level and histopathologic differentiation in cervical carcinoma stage IB.** *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 24: 969-972, 1988.
- LARSON, M. L. P.; SANAIA, H. **The Feulgen reaction: importance of the wash after hydrolysis.** *Acta Histochem.* 67: 6-12, 1980.

- MIKEL, U. V.; BECKER, R. L. **A comparative study of quantitative stains for DNA in image cytometry.** *Analyt Quant Cytol Histol.* 13: 253-260, 1991.
- MILLET, J. A.; HUSAIN, O. A. N.; BITENSKY, L.; CHAVEN, J. **Feulgen hydrolysis profiles in cells exfoliated from the cervix uterine: A potentiation aid in diagnosis of malignancy.** *J. Clin Pathol.* 35: 349-354, 1985.
- MURAD, A. D. **Quimioterapia do Tratamento do Carcinoma Avançado do Colo Uterino.** *Acta Oncológica Brasileira.* 14 (5): 195, 1994.
- MURTHY, V. V.; MITRO, B.; DAS, I. P.; LUTHRA, U. K. **Chromosomal phenotypes in patients with precancerous lesions of the uterine cervix progressed to câncer during follow up.** *Oncology.* 45: 384-388, 1988.
- SPRENGER, E.; HILGARTH, M.; VOGT-SCHADEN, M. **The diagnosis of endometrial carcinoma by means of jet wash and DNA flow-through cytophotometry.** *Pathol Res. Pract.* 162: 263-268, 1974.
- SIBATINI, A. **Effects of histone and others proteins on the Feulgen reaction.** *Nature.* 166: 355-356, 1950.
- STRANG, P.; EKLUND, G.; STENDAHL, U.; FRANKENDAL, B. **S-phase rate as a predictor of early recurrences in carcinoma of the uterine cervix.** *Anticancer Res.* 7: 807-810, 1987.
- TAVARES, A. S. **Ploidy and histological types of mammary carcinomas.** *Eur. J. Cancer.* 3: 449-455, 1968.
- TAVARES, A. S.; COSTA, J.; COSTA MAIA, J. **Correlation between ploidy and prognosis in prostatic carcinoma.** *J. Urol.* 109: 676-679, 1973.

WELCH, W. R.; FU, Y. S.; ROBBAY, S. J.; HERBST, A. L. **Nuclear DNA content of clear cell adenocarcinoma of the vagina and cervix and its relationship to prognosis.** *Gynecol Oncol.* 15: 230-238, 1993.



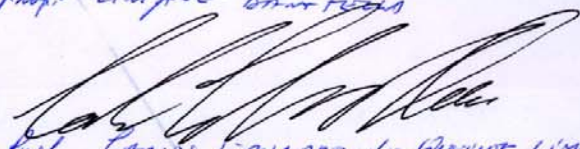
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOLOGIA

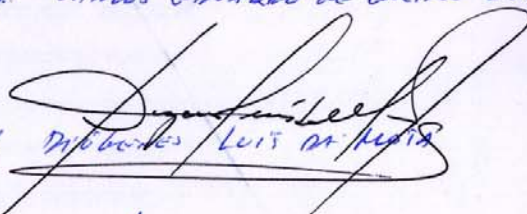
ATA DA 16ª REUNIÃO DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOLOGIA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, REALIZADA EM 18/06/01, ÀS 14:00 H.

Às 14:00 horas do dia 18 de junho de dois mil e um, na Sala de Reunião do Programa de Pós-graduação em Morfologia do Centro de Ciências Biológicas, sob a Presidência do Professor **ALEXANDRE MOTTA BITTENCOURT** - Coordenador do Mestrado - e o comparecimento dos seguintes Professores: **JENNECY SALES CAVALCANTI**, **AUSTREGEZILO VIEIRA DA COSTA SOBRINHO**, **CARLOS EDUARDO DE QUEIRÓZ LIMA**, **LIRIANE BARATELLA**, **DIÓGENES LUÍS DA MOTA**. e ausente a Profa. **SILVIA REGINA ARRUDA DE MORAES**. Havendo quórum foi iniciada a sessão e o Senhor Presidente solicitou ao secretário que fizesse a leitura da Ata da Reunião anterior, realizada em 11.05.2001, sendo aprovada por todos os presentes. Em seguida o senhor Presidente apresentou toda a documentação para solicitação da formação da Banca Examinadora, para defesa de Dissertação da aluna **Jaqueline Silva Brito Lima** intitulada "**Quantificação de DNA em células com neoplasias de Grau I e II do colo uterino pela reação de feulgen em indivíduos do nordeste brasileiro**". Ficou decidido que a data para a defesa de Dissertação será o dia 20/07, às 09:00 horas, na Sala 12 do CCB. O Colegiado aprovou a seguinte formação para a referida Banca: **TITULARES**: Carlos Eduardo de Queiróz Lima, Diógenes Luis da Mota e Joaquim Evêncio Neto. **SUPLENTE**: Eulámpio José da Silva Neto e Liriane Baratella. Para a defesa de Tese no dia 30/07 às 09:00 horas, a aluna **Ana Maria de Ataíde Romaguera**, intitulada "**DNA-ploidia em lesões intraepiteliais e invasivas do colo uterino**" ficou aprovada a Banca Examinadora: **TITULARES**: Liriane Baratella, Diógenes Luis da Mota e Joaquim Evêncio Neto); **SUPLENTE**: Alexandre Motta Bittencourt e Waldimiro Junior). E para defesa de Tese no dia 30/07, às 14:00 horas o aluno **Jean Batista de Sá**, intitulada "**DNA-ploidia como fator prognóstico no carcinoma de mama**" ficou aprovada a Banca Examinadora: **TITULARES**: Liriane Baratella, Alexandre Motta Bitencourt e Eulámpio José da Silva Neto; **SUPLENTE**: Joaquim Evêncio Neto e Diógenes Luis da Mota. E nada mais havendo a tratar, foi encerrada a sessão da qual para constar, Eu, José Pessoa Martins, secretário, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada e pelos demais Membros presentes. Recife, 18 de junho de 2001.

Prof.  Alexandre Motin Bittencourt


Prof. Linhares Duarte Almeida


Prof. Carlos Eduardo de Barros Lima


Prof. Diógenes Luís de Paula



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DECLARAÇÃO

Declaro para os fins que se fizerem necessários que, **JACQUELINE SILVA BRITO LIMA** defendeu Dissertação intitulada: "**Quantificação de DNA em células com neoplasias de Grau I e II do colo uterino pela reação de Feulgen em indivíduos do nordeste brasileiro**" para obtenção do Grau de Mestre no dia 20 de junho de 2001 como requisito do Programa de Pós-Graduação em Morfologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, sendo assim lhe conferido o título de Mestre em Morfologia. Recife, 07 de outubro de 2002.


Prof. Alexandre Motta Bittencourt
Coordenador do Mestrado em Morfologia