

# PROLIFERAÇÃO CELULAR E PLOIDIA EM ESFREGAÇOS DO COLO UTERINO – ESTUDO EVOLUTIVO\*

Fernando J. Costa, Maria J. Martins, Maria T. Bombas, Pedro P. Santos, Madalena Diniz,  
Paula Agapito, Maria A. Manarte, Vitor Rodrigues, Carlos Oliveira,  
Maria I. Martins, Henrique M. Oliveira

Serviço de Ginecologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra

Serviço de Anatomia Patológica dos Hospitais da Universidade de Coimbra

Instituto de Higiene e Medicina Social da Faculdade de Medicina da Universidade  
de Coimbra

Correspondência:  
Fernando Jorge Costa,  
Rua dos Covões,  
Bl. B – r/c, S. M. Bispo  
3040 290 Coimbra

## RESUMO

O estudo citomorfológico do colo do útero é o único exame de rastreio oncológico com resultados claramente positivos na redução das taxas de morbilidade e mortalidade.

A citologia, ainda assim, não é isenta de dúvidas e algumas lesões actualmente classificadas como de baixo grau (LoSil), bem como algumas atípicas de significado indeterminado, permanecem indefinidas quanto às possibilidades de evolução e uma fracção significativa irá evoluir, irreversivelmente, para um maior grau displásico.

O estudo da ploidia e da proliferação celular tem uma aplicação crescente em oncologia. A aneuploidia relaciona-se directamente com as lesões cervicais de alto grau.

Por outro lado, os tumores cervicais com pior prognóstico, independentemente da ploidia, são os que possuem o maior índice proliferativo.

Nesta perspectiva, os autores propuseram-se efectuar um estudo prospectivo, acompanhando um grupo de 45 mulheres com citologias normais ou com lesões de baixo grau, durante um período de 9 meses. Com intervalos de 3 meses, cada participante efectuou 4 consultas com co-lheitas por esfregaço para estudo citomorfológico, histografia por análise de imagem e avaliação do índice de proliferação celular por imunomarcagem do Ki67.

Iniciaram o estudo cerca de 80% de mulheres com citologias normais, 20% com CIN I e uma com atípicas de significado indeterminado.

Verificaram-se algumas modificações evolutivas nos resultados das citomorfologias, muito embora sem ultrapassar CIN I. Houve duas alterações da ploidia (peri-diploidias), contemporâneas com citomorfologias normais. Verificaram-se também dois resultados anormais da proliferação celular, representando 4,4% dos casos, ambos coincidentes com

\*Trabalho subsidiado pela Comissão de Fomento à Investigação em Cuidados de Saúde do Ministério da Saúde (DR nº 11 de 14/1/97, II série)

citologias normais. Não se exclui a possibilidade de poderem traduzir uma antecipação às modificações morfológicas identificáveis pela microscopia clássica.

Os autores concluem pela exequibilidade das técnicas referidas às citologias, muito embora com reservas para a técnica de colheita. Verificaram a possibilidade da coexistência de alterações da ploidia e do índice de proliferação celular com citomorfologias normais, o que mostra que estas não reflectem eventuais anomalias do ciclo celular. Não relacionaram as alterações dos parâmetros estudados com as displasias ligeiras ou as atípicas de significado indeterminado.

**Palavras-chave:** Citologia, esfregaço, displasia, ploidia, proliferação celular.

### INTRODUÇÃO

As displasias cervicais estão longe de serem uma entidade patológica de diagnóstico simples ou facilmente classificável. A prová-lo temos o facto de não raro persistirem dúvidas quanto ao tipo de lesões encontradas em muitos esfregaços cervicais e assim denominados atípicas de significado indeterminado (ASCUS / AGUS). Esta categoria na classificação de Bethesda não superou completamente as dificuldades existentes com as anteriores atípicas de grau I e Classe II de Papanicolaou (Stafl, in Abstracts da 10ª Reunião Internacional da ESGO, Coimbra, 1997). Ainda assim, o estudo citomorfológico do esfregaço do colo do útero mantém a me-lhor relação custo / benefício em termos de rastreio de patologia cervical, como procedimento isolado (di Paola, in Abstracts da 10ª Reunião Internacional da ESGO, Coimbra, 1997), além de que é o único exame de rastreio oncológico com resultados claramente positivos na redução das taxas de morbidade e mortalidade (1).

As lesões actualmente classificadas como de baixo grau (LoSil), bem como as ASCUS, permanecem indefinidas quanto às possibilidades de evolução e susceptibilidade a eventuais factores agravantes. Por outro lado,

é sabido que uma percentagem significativa de doentes com lesões classificadas como moderadas vão evoluir, irreversivelmente, para um maior grau displásico (Ostor et al, 1993; Int J Gynecol Pathol, 12: 193 - 207).

A oncogenicidade do HPV (Human Papiloma Virus) nas lesões cervicais está estabelecida. Além dos comportamentos sexuais e, por arrastamento, da infecção cervical por HPV há, ainda assim, outros factores envolvidos na progressão ou transformação displásica. O tabaco e outros produtos com propriedades carcinogénicas provaram já alguma responsabilidade no problema: "a nicotina aumenta a proliferação de células cervicais normais bem como as infectadas com HPV in vitro" (2); a poliamina espermina inibe a proliferação de células "natural-killer" e linfócitos T, liga-se ao DNA e altera a ploidia celular, tendo um papel supressivo importante na destruição de células displásicas pelos linfócitos (3).

A imunocompetência tem também um papel muito importante e cada vez mais estabelecido na evolução das lesões cervicais, sobretudo na presença de HPV, bem como o ambiente hormonal e respectivas consequências metabólico-proliferativas .

O estudo da ploidia e da proliferação celular tem uma aplicação crescente na área da oncologia. Walsh et al, em 1995, sugerem que os mecanismos biológicos que levam à invasão a partir de um CIN se processam pela selecção de clones celulares hipodiplóides (já apontado por Jacobsen: Eur J Cancer Clin Oncol, 1988; 24, 969 - 72).

A aneuploidia, segundo outros autores, relaciona-se positivamente com as displasias cervicais de alto grau (4,5) e tem significado prognóstico (6). Outros ainda demonstram que o tipo de aneuploidia permitiria predizer a eventual progressão de uma lesão CIN III para uma microinvasão (Jacobsen et al, 1988; Strang, 1988), muito embora haja estudos contraditórios.

Havendo já a demonstração da concordância entre os resultados do estudo da ploidia nos esfregaços cervicais e respectivas biópsias

(7), afigura-se-nos útil o estudo das colheitas citológicas por esfregaço para determinadas situações clínico-patológicas. Dentro destas apontamos, como exemplo, mulheres de risco, com resultados citomorfológicos de atipias de significado indeterminado (ASCUS) sem concordância colposcópica, lesões de baixo grau (LoSil) de repetição em mulheres com antecedentes ou outros factores de risco e, neste subgrupo, as infectadas imunodeprimidas e as mulheres sujeitas a medicação imunossupressora.

Apoiando ainda a utilização dos esfregaços neste tipo de investigação, junta-se o estudo de Guillaud et al (8) onde ficou estabelecida a relação entre a intensidade das "Malignancy Associated Changes" (MAC) com a severidade das lesões adjacentes.

O estudo da proliferação celular visa encontrar, de igual modo, um apoio prognóstico preditivo de evolução para uma displasia mais grave.

Segundo Steinbeck (9) as atipias histopatológicas da mucosa cervical relacionam-se com um aumento inicial do PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen: proteína nuclear, não histona, cofactor para a DNA-polimerase delta). Naus et al (Gynecol Oncol 1991; 43: 149 - 153) demonstrou que os tumores cervicais com pior prognóstico, independentemente da ploidia, são os que possuem o maior índice proliferativo.

No presente estudo pretendemos assim estabelecer a exequibilidade e eventual valor diagnóstico e prognóstico da avaliação da ploidia e da proliferação celular em esfregaços do colo do útero normais ou com lesões de baixo grau.

### **OBJECTIVOS**

- 1 - Estudar a ploidia e a proliferação celular em esfregaços cervicais normais.
- 2 - Estudar a ploidia e a proliferação celular em lesões cervicais de baixo grau.
- 3 - Estudar a evolução citomorfológica, da ploidia e da proliferação celular de

esfregaços cervicais normais e com lesões de baixo grau (LoSil) durante um período de 9 meses.

- 4 - Estabelecer uma base de prognóstico evolutivo para as citomorfologias do colo uterino, em função da ploidia e da proliferação celular.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

Para os objectivos propostos pretendemos excluir, à partida, alguns factores que pudessem ter influência variável entre as participantes no estudo. O tabaco, a infecção por HPV, medicações hormonais ou oscilações hormonais endógenas importantes, são alguns dos exemplos que tomámos como referência.

Assim, usámos como critérios de selecção os seguintes:

- Mulheres seguidas em consultas de ginecologia dos HUC, em idade reprodutiva, não grávidas, com idades compreendidas entre os 20 e os 48 anos, com útero e ovários conservados, não submetidas anteriormente a qualquer tratamento cirúrgico cervical, ciclos menstruais regulares, com interlúneos compreendidos entre os 25 e os 35 dias, não sujeitas a contracepção hormonal ou tratamentos hormonais sistémicos ou locais (cervico-vaginais) nos últimos 90 dias, sem dispositivo intrauterino, não fumadoras ou abaixo de 10 cigarros/dia, imunocompetentes e sem neoplasias conhecidas, sem doenças sistémicas ou infecções genito-urinárias, portadoras de citologias cervicais actuais sem lesões de alto grau e com ausência de Koilocitos (marcador indirecto da infecção pelo HPV).

#### **1 - Selecção de doentes e colheita de material.**

De 447 resultados de exames citomorfológicos de potenciais candidatas, obtivemos 124 processos clínicos com dados obedecendo aos critérios de inclusão. Foram assim convocadas 112 doentes (eliminadas 12 pela distância da área de residência), tendo comparecido à entrevista 74. Destas, 63 aceitaram

participar no estudo. Após novo controlo citológico foram rejeitadas 18 por infecções cervico-vaginais, esfregaço insatisfatório ou outros.

Iniciaram então o estudo 45 mulheres obedecendo a todos os critérios referidos. Todas assinaram o respectivo termo de consentimento.

Cada participante efectuou 4 consultas com intervalos de três meses ( $\pm 2$  semanas). Cada consulta constava na colheita de três amostras citológicas por esfregaço do colo do útero, utilizando Cervex brush\*, para duas lâminas silanizadas e um frasco com 15cc de soro fisiológico à temperatura ambiente. Uma das lâminas era fixada utilizando laca fixadora e era destinada a leitura citomorfológica clássica. A segunda lâmina, não fixada, era imediatamente enviada para o serviço de Anatomia Patológica para conservação e armazenamento controlados. O frasco com soro fisiológico destinava-se à preparação de "cell-block" e análise de DNA. Dado termos verificado que esta última forma de colheita e conservação cursava frequentemente com escassez de material, optámos por continuar o estudo com colheita para três lâminas, das quais duas não fixadas.

Todas as colheitas dos esfregaços cervicais foram efectuados entre o 14º e o 26º dias do ciclo menstrual.

O estudo teve início em Dezembro de 1997, tendo terminado em Março de 1999.

## **2 - Preparação dos esfregaços.**

Os exames citomorfológicos foram efectuados pela mesma pessoa e desconhecendo os resultados do estudo da ploidia e do marcador de proliferação.

As lâminas recebidas no SAP, não fixadas, eram armazenadas a 6° C. Esfregaços destinados à leitura por análise de imagem eram fixados 30 minutos em formol tamponado a 10%, sujeitos a lavagem em água desionizada e secos ao ar, seguindo-se armazenamento à temperatura ambiente, ao

abrigo da luz. A fixação precedia em cerca de 18 horas a técnica estequiométrica, coloração de Feulgen, que põe em evidência o DNA nuclear, corando-o de azul.

## **3 – Coloração para o DNA.**

Seguindo estritamente o protocolo, todos os espécimens e lâminas de calibração, em grupos de 19, foram hidrolizadas com 5N ácido clorídrico durante 1h, à temperatura ambiente. Após uma lavagem em H<sub>2</sub>O, foram tratados com coloração de Feulgen para o DNA durante 60 minutos e sujeitos a 3 lavagens sucessivas, com tempos crescentes, com o reagente de lavagem que, tal como o reagente de coloração, fazem parte do "kit" de coloração para quantificação do DNA da Becton Dickinson – "Cas DNA Staining Reagent".

As lâminas foram tratadas com álcool ácido a 1% durante 5 minutos, após a lavagem em água desionizada durante 5 minutos.

O passo seguinte foi a lavagem em álcool a 100%, 3 mais 3 minutos, e por fim, em xilol por igual período de tempo. Procedeu-se à montagem das lâminas com resina sintética.

## **4 – Sistema de análise de imagem e procedimento.**

As leituras foram efectuadas num citómetro de imagem CAS 200/486 Image Analysis System da Becton Dickinsons Cellular Imaging System que inclui microscópio óptico com objectiva de 40x e outra de 10x para magnificar a imagem para 400x. Inclui ainda duas câmaras de captação de imagem com um filtro vermelho (comprimento de onda 650/10 nm) e outro verde (500/10 nm) que permitem a leitura de diferentes densidades ópticas. A imagem é digitalizada num dos dois monitores TV acoplados ao sistema. Cada subunidade do ecrã ou pixel é expressa como um valor de densidade óptica proporcional à quantidade de DNA. Os valores numéricos encontrados de densidade óptica (OD) e a sua re-presentação estatística surgem no 2º monitor sob a forma de um gráfico – histograma.

## 5 – Análise de imagem.

A calibração do sistema foi efectuada usando lâminas de controlo contendo hepatócitos de rato, fornecidas conjuntamente com o "kit" de coloração, cujo coeficiente de variação (CV) foi sempre inferior a 4%.

Cada leitura analisou no mínimo 100 células do esfregaço bem preservadas e não sobrepostas, numa média de 12 campos. Os histogramas do DNA foram fornecidos pelo programa de software QDA (Quantitative DNA Analysis) da Becton Dickinson, e o índice de DNA (DI) de cada um calculado pelo computador.

## 6 – Interpretação dos histogramas.

Os critérios para classificação do conteúdo de DNA (ploídia) foram os seguintes:

Um histograma foi considerado diplóide quando:

- Ocorreu um único pico na região diplóide com DI entre 0,92 – 1,10.
- Menos de 15% das células se encontravam na região tetraplóide.
- A percentagem de células > 5C era inferior a 1%.

A neuploidia foi considerada quando um pico anormal distinto estava presente fora da região diplóide (2 C), ou quando mais de 15% das células se localizavam na região tetraplóide (4 C).

Para a marcação pelo Ki67 utilizou-se uma lâmina de colheita não fixada. O anticorpo usado foi o soro anti-Ki67 policlonal (Dako-A 0047), que marca as células que se encontram nas fases G1, S, M e G2 do ciclo celular. Utilizou-se a técnica imunocitoquímica da Streptavidina-biotina / HRP.

A lâmina do esfregaço, não fixada, foi colocada em acetona a -20°C durante 10 minutos. Após secagem colocou-se TBS e tratou-se a lâmina com peróxido de hidrogénio a 3% durante 15 minutos e lavou-se novamente com TBS. De seguida colocou-se o soro de limpeza Porco

normal (Dako X0901) na diluição 1/20 em TBS, durante 20 minutos. Após se escorrer a lâmina, incubou-se no anticorpo primário policlonal anti-Ki67 (Dako A 0047) na diluição 1/30 em TBS, durante 30 minutos. Depois de nova lavagem em TBS, incubou-se no soro secundário Porco anti-coelho biotinilado (Dako E 0353) na diluição 1/200, em TBS durante 30 minutos. Nova lavagem em TBS e incubação no soro de Streptavidina / peroxidase (Dako P-0397), na diluição 1/400, em TBS durante 30 minutos. A peroxidase revelou-se com DAB (Merk ref. 1.02924.0001 3,3'-Diamino-benzidina-tetrahydrochloride), após lavagem em TBS.

Lavagem das lâminas em água corrente e contraste dos núcleos com hematoxilina de Mayer durante 5 minutos. O passo seguinte foi azular as lâminas em água corrente, desidratar em alcoóis de graduações progressivas e diafanizar em xilol. As lâminas foram então montadas em meio sintético.

Os núcleos positivos para o anticorpo Ki67 ficam marcados a castanho.

## RESULTADOS

Iniciaram o estudo 45 mulheres, cuja idade média foi de 36,9 anos (22 – 47).

A menarca foi, em média, aos 13,1 anos (10 – 16), com um número médio de gestações de 2,3 (0 – 4) e 2 (0 – 4) de partos.

Todas as mulheres recrutadas e seleccionadas tinham ciclos menstruais regulares, com interlúneos de 24 a 32 dias e cataménios de cerca de 4 dias (3 a 7). O início médio da actividade sexual foi aos 19 anos (16 – 24), com número de parceiros variando de 1 a 3 (média de 1,2).

Eram uniformes quanto a outros critérios de ordem clínica e patológica, nomeadamente antecedentes pessoais e familiares. Em nenhum caso houve tomada de medicações hormonais ou com influência hormonal importante, nos 3 meses antes ou durante o período do estudo.

Das 45 doentes que iniciaram o estudo só 34 compareceram à segunda consulta (76%), 21

(47%) à terceira e apenas 20 terminaram sem faltas o proposto inicialmente (44%). Destas, três colheitas finais não puderam ser validadas por problemas técnicos (Quadro I).

**Quadro I – Número de colheitas**

	1ª COLHEITA		2ª COLHEITA		3ª COLHEITA		4ª COLHEITA	
	Fez	Não fez	Fez	Não fez	Fez	Não fez	Fez	Não fez
CM <sup>1</sup>	45	0	34	11	21	24	17	28
Ploidia <sup>2</sup>	33	12	29	16	16	29	14	31
Ki67 <sup>3</sup>	19	26	17	28	14	31	17	28

<sup>1</sup> 11% esfregaços insatisfatórios, não utilizados estatisticamente.

<sup>2</sup> idem, com restrições parciais à leitura em 29% dos casos.

<sup>3</sup> idem, com restrições parciais à leitura em 29,8% dos casos.

Várias razões explicam os sucessivos abandonos: gravidez (2), amenorreia (4), doença grave intercorrente (3), infecções cervico-vaginais (3), outras (13).

No total foram efectuadas 363 colheitas (repartidas para citomorfologia, estudo da ploidia e imunomarcacão pelo Ki67), ao longo de cerca de 14 meses.

Começaram o estudo 20% de mulheres com lesões de baixo grau, tendo as restantes exames citomorfológicos normais e uma atípicas de significado indeterminado (ASCUS).

**Quadro II – Resultados evolutivos das citomorfologias**

1ª COLHEITA	2ª COLHEITA	3ª COLHEITA	4ª COLHEITA
N – 35	N – 27	N – 16	N – 11
			CIN I – 1
			ASCUS – 1
		NF – 10	NF – 3
	NF – 5	NF – 5	NF – 10
			NF – 5
	CIN I – 1	N – 1	NF – 1
	ASCUS – 3	N – 1	ASCUS – 1
		ASCUS – 1	NF – 1
		NF – 1	NF – 1
CIN I – 9	N – 3	N – 2	N – 1
			NF – 1
		NF – 1	NF – 1
	NF – 6	NF – 6	NF – 6
ASCUS – 1	N – 1	NF – 1	ASCUS – 1
Total 45	35	21	17

Legenda: N – normal, NF – não efectuado

Ao longo do estudo houve 6 casos com alteração do resultado citomorfológico de normal para CIN I ou ASCUS (5,8%). Não obtivemos nenhum agravamento acima de CIN I.

3 casos de CIN I inicial normalizaram a partir do exame seguinte (3 meses)(Quadro II). Também 3 casos de ASCUS intercorrente provinham de citologias com idêntico resultado, ou seja, em 3 de 4 casos de ASCUS o resultado repetiu-se 3 a 9 meses após.

No total das colheitas obtivemos 84,5% de citologias normais, 9,4% de CIN I e 6,8% de ASCUS.

Em relação ao índice de DNA, só foi possível a leitura como descrito em 58,5% dos esfregaços totais recebidos (Quadro III). Os motivos prenderam-se com falta de material (pobreza celular) ou inviabilidade da leitura pelo citômetro, nomeadamente por fundo

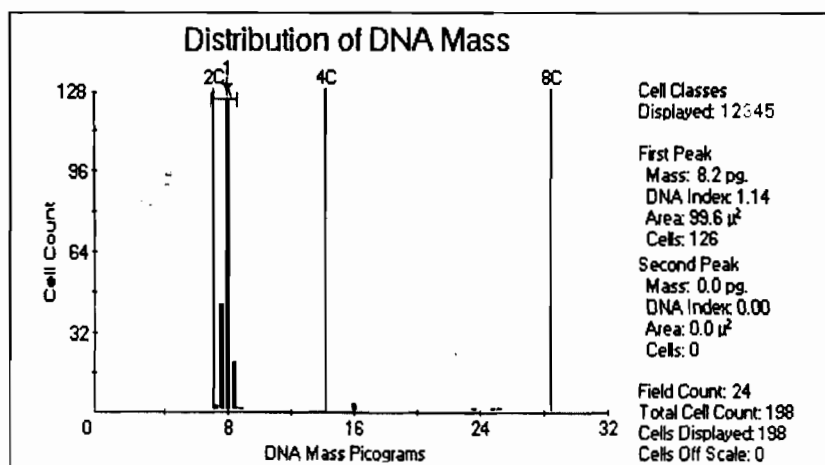
sanguinolento ou com muco. Os resultados mostraram 63 histogramas com DI compreendido no intervalo considerado como pertencente a um esfregaço diplóide, variando o DI entre 0,92 e 1,10.

Dois dos histogramas não possuíam as características a preencher para diploidia, sendo ambos correspondentes a segundas colheitas. Ambos os casos, classificados como aneuploides, correspondiam a localizações do pico muito próximo da região diplóide permitindo a sua integração nos histogramas "quase-diplóides" ou "peri-diplóides". (Figuras 1 e 2). Ambos os casos eram contemporâneos de citomorfologias normais, muito embora um deles procedesse um CIN I e o outro um ASCUS, nos dois casos 3 meses antes. Em ambos foram as últimas colheitas na sequência do estudo, motivo pelo qual não existe controlo ulterior.

**Quadro III - Ploidia**

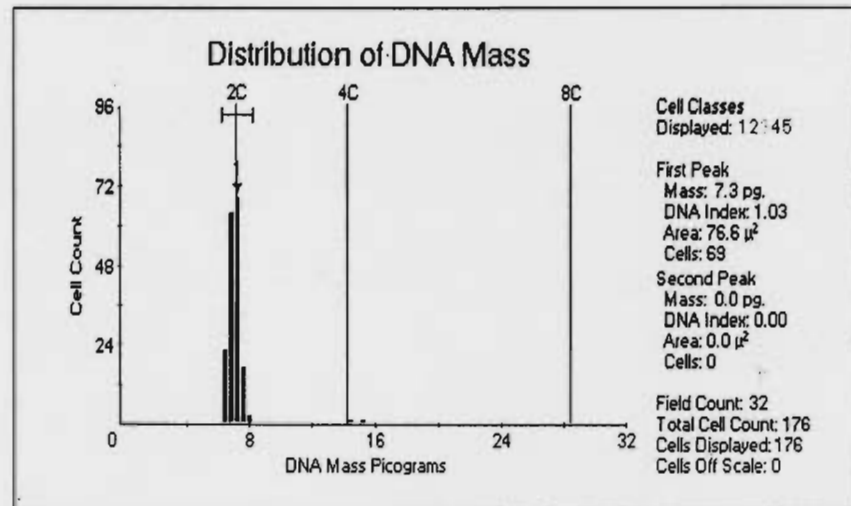
PLOIDIA*	1ª colheita	2ª colheita	3ª colheita	4ª colheita
CM NORMAIS	N - 17	N - 19	N - 13	N - 7
	NF - 16	A - 2 NF - 11	NF - 5	NF - 1
CIN I	N - 1	N - 1	0	N - 1
	NF - 8			
ASCUS	N - 1	N - 2	NF - 1	N - 2
		NF - 1		N - 1
NF	0	0	0	N - 2

Legenda: N - normal, A - anormal, NF - não efectuado; \* excluídas todas as lâminas sem condições de leitura correcta.



Área	Min.	Máx.	Modal D.I.	Mean D.I.	S.D.	C.V.	% Cells	# Cells	Description
A	1.00	1.22	1.14	1.13	0.03	2.73	96.46	191	população qse diploide
B									
C									
D									
E									
F									

Figura 1 – Histograma diplóide



Área	Min.	Máx.	Modal D.I.	Mean D.I.	S.D.	C.V.	% Cells	# Cells	Description
A	0.89	1.16	1.00	0.99	0.05	4.62	98.86	174	população qse diploide
B									
C									
D									
E									
F									

Figura 2 – Histograma peri-diplóide

Tratando-se de uma amostra com um número limitado de casos, não estranhemos obter margens estatísticas dilatadas para as alterações da ploidia: valores percentuais de 11% (0 a 32%) com intervalos de confiança de proporções a 95%, a 25% (0 a 74%), para o mesmo intervalo de confiança.

Em relação à avaliação da proliferação celular, através da imunomarcagem com o Ki67, a actividade proliferativa só é considerada significativa quando existe marcação superior a 10% dos núcleos observados. Neste estudo obtivemos dois resultados claramente anormais – 4,4% dos casos: marcação em mais

**Quadro IV – Proliferação celular (Ki67)**

Ki67*	1ª colheita	2ª colheita	3ª colheita	4ª colheita
CM NORMAIS	N – 8 NF – 27	N – 8 NF – 22	N – 12 NF – 7	N – 8 A – 2 NF – 1
CIN I	N – 1 NF – 8	N – 1	0	N – 1
ASCUS	N – 1	N – 3	NF – 1	N – 2 N – 1
NF	0	0	0	N – 2

Legenda – N - normal, A - anormal, NF – não efectuado; \* excluídas todas as lâminas sem condições de leitura correcta.

de 25% das células, com leitura mínima entre 350 a 400 células, em esfregaços considerados satisfatórios – contendo células do endo e exocolo. Ambos corresponderam à quarta colheita de duas doentes, não existindo assim outro resultado posterior (Quadro IV).

As alterações do Ki67 situaram-se em valores de 13,3 a 18,2%, com intervalos de confiança de proporções a 95% de 0 a 31 e 0 a 42,1%.

Todos os casos com alterações da ploidia ou da proliferação celular foram independentes, isto é, nenhuma daquelas anomalias foi contemporânea de outra.

## DISCUSSÃO

Provavelmente o maior factor de risco para o cancro do colo do útero é o facto de não se fazer rastreio citomorfológico (1). A citologia, ainda assim, não é isenta de dúvidas e coexiste com uma faixa de resultados que apesar de pouco frequentes obriga a repetições de exames, custos acrescidos e ansiedades.

Se está provada a exequibilidade técnica da pesquisa e quantificação de DNA em citologias do colo do útero em lesões de alto grau (5), bem como definida a noção de aneuploidia ou tetraploidia em 60 a 100% de lesões Cin III (3),

é compreensível a aplicação deste estudo, com intuítos prognósticos, a nível de lesões menos graves ou de significado indeterminado.

Já Walsh e outros autores (5, 3, 10, 11, 12, 13) propunham como de grande utilidade a quantificação do DNA em lesões de baixo grau depois de constatado o que se passava com lesões cervicais CIN III. O mesmo autor pode confirmar a elevada concordância entre os resultados obtidos na análise das citologias e as biópsias cervicais das mesmas doentes (3).

A maioria dos estudos, contudo, não reflecte uma preocupação prospectiva, isto é, ao dizerem respeito a colheitas pontuais não possibilitam um controlo evolutivo de cada mulher. Este foi um dos motivos pelos quais uma sequência temporal de colheitas nas mesmas mulheres se nos mostrou inovador.

Outro ponto de importância inquestionável é a presença ou não de HPV nas lesões cervicais. No presente estudo este factor foi considerado como de exclusão, afastando assim o maior "transformador" oncogénico (15).

A estabilidade da ploidia em citomorfologias normais já havia sido apontada por McDermott

(10) que assim se contrapôs a outros autores na questão das "Malignancy associated Changes" pela diferença de perspectivas (alterações regulares de acordo com o grau de displasia, segundo Guillaud e colaboradores) (8).

Quanto à utilização de parâmetros definidores de proliferação celular, baseámo-nos em vários trabalhos dos quais salientamos Steinbeck (9) e outros (16), tendo aquele encontrado uma relação directa entre o aumento das atípias histológicas da mucosa cervical e um aumento prévio do "proliferating cell nuclear antigen" (PCNA) e ploidia (independente), desde a mucosa normal a lesões progressivamente mais graves.

Naturalmente que o número de análises não efectuadas em relação ao previsto foi o principal inimigo para uma maior valoração numérica. Questões como o número de células legíveis e material não celular nos fundos das lâminas seriam sempre factores críticos para a leitura em análise de imagem (6, 17). Por outro lado não esperaríamos obter tão grande número de células descamadas em esfregaços de colos uterinos sem lesões quanto em casos com CIN I ou mais graves, o que de resto pudemos confirmar. Acrescenta-se ainda o facto de, em cada consulta, serem feitos 3 esfregaços a cada doente, o que implicava um dilema entre uma recolha de células suficientes e evitar uma erosão sangrativa do colo, tornando a lâmina ilegível. Verificamos como fundamental uma técnica correcta de colheita, com vista à obtenção de material suficiente e legível.

Com citomorfologias normais e lesões de baixo grau não obtivemos uma correlação tão linear como propõe, por exemplo, Multhaupt et al (5). Não encontramos relação contemporânea entre lesões citológicas CIN I e correspondentes alterações da ploidia ou proliferação celular. Por outro lado, os nossos resultados diferem dos de McDermott (10)

no sentido em que não podemos afirmar uma estabilidade da ploidia em esfregaços cervicais normais.

Não excluimos que as modificações da ploidia ou do índice de proliferação celular possam traduzir uma antecipação às modificações morfológicas celulares identificáveis pela microscopia clássica.

Consideramos limitativo para mais ilações sobre os resultados, o pequeno número de casos e o período de tempo de seguimento demasiado curto.

Permanece-nos o interesse pela investigação dos parâmetros em causa em relação às citologias relatadas como ASCUS. Em três de quatro doentes com ASCUS este resultado citológico repetiu-se em colheitas posteriores durante o período de 9 meses do estudo. É precisamente pela observação do organograma analítico (Quadro II) que verificamos uma certa continuidade nas alterações tipo ASCUS, sublinhando que foi num destes casos que se verificou um dos dois histogramas não diplóides.

Com respeito aos dois resultados anormais do Ki67 poderemos especular tratarem-se eventualmente de casos com evolução futura desfavorável, o que somente pela continuidade de observação se poderá confirmar.

Propômo-nos ainda convocar posteriormente as doentes referentes às alterações verificadas para controlo e eventual terapêutica.

## CONCLUSÕES

É possível estudar a ploidia e a proliferação celular, utilizando a análise de imagem e a imunomarcagem pelo Ki67, em esfregaços do colo do útero citomorfologicamente normais ou com lesões de baixo grau.

Em mulheres com resultados citomorfológicos normais podem encontrar-se anomalias da ploidia, identificadas por análise de imagem.

Verificamos alterações da proliferação celular em mulheres sem anomalias citomorfológicas, através da imunomarcção pelo Ki67.

Em mulheres com displasias cervicais ligeiras pode não haver alterações nos histogramas correspondentes ou nos indicadores de proliferação celular.

Durante o período de estudo prospectivo de 9 meses não houve modificações significativas nos resultados sequenciais dos três factores estudados, bem como alterações relacionáveis entre os resultados das citomorfologias, o estudo da ploidia ou da proliferação celular.

Assim sendo, o significado biológico de um exame citomorfológico normal não é uniforme e generalizável, isto é, não reflecte com rigor alterações do ciclo de reprodução celular. O mesmo se aplica às lesões cervicais de baixo grau.

Propomos o mesmo tipo de estudo aplicado a um período de tempo mais longo, a grupos específicos de mulheres e às citomorfologias com alterações atípicas de significado indeterminado.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1 - CREASMAN WT: Screening for gynecological cancer. In: Ottesen B, Tabor (ed.) New Insights in Gynecology & Obstetrics. The proceedings of the XV FIGO World Congress of Gynecology and Obstetrics. Parthenon Publishing, 1997, 8, p. 67.
- 2 - STEVEN E. WAGGONER AND XU WANG. Effect of nicotine on proliferation of normal, malignant and human papilloma

viruses-transformed human cervical cells: 1994; Gynec Oncol, 55-1: 91-95.

- 3 - EVANS CH, LEE TS, FLUGELMAN AA. Spermine directed immunosuppression of cervical carcinoma cell sensitivity to a majority of lymphokine-activated killer lymphocyte cytotoxicity. Nat-Immun 1995; 14(3): 157-63.
- 4 - HANSELAAR AGJ, VOOIJS GP, OUD PS, PAHLPLATZ MMM, BECK JLM. Cytophotometric analysis of corresponding cytological and histological cervical intraepithelial neoplasia Grade III specimens. Cytometry 1991; 12: 1-9.
- 5 - MULTHAUPT H, BRUDER E, ELIT L, ROTHBLAT I, WARHOL M. Combined analysis of cervical smears. Cytopathology, image cytometry and in situ hybridization. Acta Cytol 1993; 37(3): 373-8.
- 6 - ROSS JF: DNA Ploidy and Cell Cycle Analysis: Prediction of Tumor Aggressiveness and Clinical outcome. In: ROSS JF. DNA Ploidy and Cell Cycle Analysis in Pathology. Igaku-Shoin Medical Publishers, Inc. 1996: 70-71.
- 7 - WALSH CB, THORNHILL M, KAY E et al. DNA quantification is technically feasible and of value in cervical smear samples: possible applications for determination of progression in low grade dyskaryosis. Cytopathology 1995; 6: 88-94.

- 8 - GUILLAUD M, DOUDKINE A, GARNER D, MACAULEY C, PALCIC B. Malignancy associated changes in cervical smears: systematic changes in cytometric features with the grade of dysplasia. *Analyt Cell Pathol* 1995; 9(3): 191-204.
- 9 - STEINBECK RG, HESELMAYER KM, MOBERGER HB, AUER GU. The relationship between proliferating cell nuclear antigen (PCNA), nuclear DNA content and mutant p53 during genesis of cervical carcinoma. *Acta Oncol* 1995; 34(2): 171-6.
- 10 - MCDERMOTT N, SULIMAN Y, WALSH CB, KAY EW, CURRAN B, MILBURN C. Ploidy profile of morphologically normal squamous epithelium adjacent to high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104(5): 623-5.
- 11 - BIBBO M, DYTCH HE, ALENGATH E, BARTELS P, WIED GL. DNA ploidy profiles as prognostic indicators in CIN lesions. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 261-5.
- 12 - BIBBO M, BARTELS P, DYTCH HE, et al. Ploidy patterns in cervical dysplasia. *Anal Quant Cytol Histol* 1985; 7: 214-17.
- 13 - BOCKING A, HILGARTH M, AUFFERMANN W, HACK-WERDIER C, FISHER-BECKER D, VON KALEKREUTH G. DNA cytometric diagnosis of prospective malignancy in borderline lesions of the uterine cervix. *Acta Cytol* 1986; 30: 68-15.
- 14 - JAKOBSEN A. Prognostic impact of ploidy level in carcinoma of the cervix. *Am J Clin Oncol* 1984; 7: 475-480.
- 15 - RIHET S, LORENZATO M, CLAVEL C. Oncogenic human papillomaviruses and ploidy in cervical lesions. *J Clinical Pathol* 1996; 49(11): 892-6.
- 16 - NAKANO T, OKA T. Transition of Ki67 index of uterine cervical tumors during radiation therapy. *Cancer* 1991; 68: 517-23.
- 17 - BENGTSOON EW, NORDIN B. Image analysis in cytology: DNA-histogramming versus cervical smear prescreening. *Annales Biol Clin* 1993; 51(1): 27-38.