

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Programa de Pós-Graduação em Patologia

HISTOMORFOMETRIA, APOPTOSE (Bcl-2 e Bax) e MARCADOR DE  
PROLIFERAÇÃO CELULAR Ki-67 EM NEOPLASIAS  
INTRAEPITELIAIS DO COLO UTERINO

Rodrigo Tadeu De Puy e Souza

Belo Horizonte  
2011

RODRIGO TADEU DE PUY E SOUZA

HISTOMORFOMETRIA, APOPTOSE (Bcl-2 e Bax) e MARCADOR DE  
PROLIFERAÇÃO CELULAR Ki-67 EM NEOPLASIAS  
INTRAEPITELIAIS DO COLO UTERINO

Dissertação apresentada no Colegiado do Curso  
de Pós-Graduação em Patologia do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Minas Gerais como pré-requisito para a obtenção  
do título de Mestre.

Programa de Pós-Graduação em Patologia  
Área de concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos

Co-orientador: Profa. Dra. Luciana Moro

**Belo Horizonte**  
**2011**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
1.1 Relevância do estudo e fatores de risco .....	3
1.2 História Natural da doença .....	3
1.3 Aspectos genéticos / biologia molecular em contexto com a apoptose e o presente estudo .....	5
1.4 Apoptose .....	5
1.5 Regulação gênica da apoptose .....	6
1.6 Apoptose é ativada pela p53 .....	8
1.7 Regulação da apoptose pela família de proteínas Bcl-2 .....	8
1.8 Senescência celular .....	11
1.9 Aspectos genéticos / biologia molecular em contexto com a infecção pelo HPV e displasias cervicais.....	11
1.10 Imunoistoquímica .....	12
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo Geral .....	16
2.2 Objetivos Específicos .....	16
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1 Origem do Material .....	17
3.2 Seleção das Amostras .....	17
3.3 Obtenção dos cortes, processamento histológico e coloração .....	18
3.4 Exame das preparações histológicas e análise morfométrica .....	18
3.5 Índice apoptótico .....	19
3.6 Índice mitótico .....	19
3.7 Imunoistoquímica para Ki-67, Bax e Bcl-2 .....	20
3.8 Etapas da reação .....	20
3.9 Critérios de avaliação imunoistoquímica .....	21
3.10 Delineamento estatístico e análise dos resultados .....	22
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 Análise histomorfométrica .....	23
4.2 Índice apoptótico .....	23
4.3 Índice mitótico .....	25
4.4 Células em interfase para o epitélio cervical na cervicite e nas NICs .....	26
4.5 Avaliação imunoistoquímica .....	27
4.5.1 Ki-67: <i>Reatividade, intensidade e localização das reações</i> .....	27
4.5.2 Bcl-2: <i>Reatividade, intensidade e localização das reações</i> .....	29
4.5.3 Bax: <i>Reatividade, intensidade e localização das reações</i> .....	30
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>

<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Avaliação histomorfométrica processada no programa <i>Image Pro Plus</i> versão 4.5 – HE, 40x. Fonte: Foto do autor .....	19
Figura 02	Histologia de amostras representativas. A. Cervicite: Epitélio estratificado escamoso não ceratinizado. No córion notam-se discretos focos de infiltrado inflamatório (*). B. NIC 1: Presença de coilócitos, halos perinucleares (*) e binucleações (ponta de seta, >). C. NIC 2: Hiper Cromasia nuclear associada à perda de polaridade nuclear, com desestruturação (*); D. NIC 3: Sobreposição de núcleos, mitoses frequentes no extrato superior (*). HE, objetiva de 40x. Fonte: Fotos do autor.....	23
Figura 03	Apoptose. A. anoiquia, condensação (*) e fragmentação nuclear, formação de corpos apoptótico (ponta de seta,>). Mitose. B. Figuras de mitose típicas em NIC 3 (*) HE, objetiva de 40x. Fonte: Fotos do autor .....	24
Figura 04	Expressão da imunomarcção pelo Ki-67. A. Cervicite: reatividade baixa, intensidade fraca e localização nas células do extrato basal do epitélio escamoso. B. NIC 2: reatividade acentuada, intensidade moderada e localização em toda espessura epitelial. C. NIC 3: reatividade acentuada, intensidade acentuada e localização em toda espessura epitelial. Ki-67, 40x (contracoloração com Hematoxilina) Fonte: Fotos do autor.....	28-29

- Figura 05 Expressão da imunomarcação pelo Bcl-2. A- Expressão de padrão basal encontrado na cervicite. Bcl-2, 40 x. B- Expressão em NIC 3, com detecção citoplasmática do antígeno. Bcl-2, 100 x (contracoloração com Hematoxilina). Fonte: Fotos do autor..... 30
- Figura 06 Expressão da imunomarcação pelo Bax. A. Ausência de expressão na cervicite. Bax, 40x. B. NIC 3: reatividade acentuada, intensidade acentuada e positividade em toda a espessura epitelial. Bax, 40x. C. Detalhe da marcação citoplasmática da reação. Bax, 100x. D. Detalhe do padrão citoplasmático granular da reação. Bax, 100x. (contracoloração com Hematoxilina). Fonte: Fotos do autor..... 31-32

## LISTA DOS GRÁFICOS

Gráfico 1	Apoptose crescente ao longo do espectro das lesões intraepiteliais a partir da categoria cervicite crônica. A. total, B. camada superior, C. camada inferior. Fonte: Elaborado pelo autor.....	24
Gráfico 02	Mitose crescente ao longo do espectro das lesões intraepiteliais a partir da categoria cervicite. A. total, B. camada superior, C. camada inferior. Fonte: Elaborado pelo autor.....	26
Gráfico 03	Porcentagem decrescente de células em interfase ao longo do espectro das lesões intraepiteliais a partir da categoria cervicite. Fonte: Elaborado pelo autor.....	27
Gráfico 04	Resultados da imunomarcação pelo Ki-67: A- Reatividade (1, <20% de marcação; 2, entre 20 e 40% de marcação e 3, > 40% de marcação). B- Localização (1, na camada basal, 2, nas camadas basal e intermediária, e 3, em todo o epitélio). C- Intensidade (1, leve, 2, moderada, 3 acentuada). . Fonte: Elaborado pelo autor.....	27-28
Gráfico 05	Resultados da imunomarcação pelo Bax: A- Reatividade (1, <10% de marcação; 2, entre 10 e 50% de marcação e 3, > 50% de marcação). B- Localização (1, na camada basal, 2, nas camadas basal e intermediária, e 3, em todo o epitélio). C- Intensidade (1, leve, 2, moderada, 3 acentuada). Fonte: Elaborado pelo autor.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Apaf-1</b>	Fator-1 ativador de protease apoptótica ( <i>Apoptotic protease activating factor 1</i> )
<b>ASCUS</b>	Atipias em células escamosas de significado indeterminado ( <i>Atypical Squamous Cells of undetermined significance</i> )
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>Bad</b>	Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2 ( <i>Bcl-2-associated death promoter</i> )
<b>Bak</b>	Proteína pró-apoptótica do gene da família Bcl-2 ( <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i> )
<b>Bax</b>	Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2 ( <i>Bcl-2-associated X protein</i> )
<b>Bcl-2</b>	Proteína antiapoptótica descrita inicialmente no linfoma ( <i>B cell lymphoma-2</i> )
<b>Bcl-XL</b>	Proteína antiapoptótica da família Bcl-2 ( <i>Bcl-2-associated XL protein</i> )
<b>Bcl-w</b>	Proteína antiapoptótica da família Bcl-2 ( <i>Bcl-2-associated W protein</i> )
<b>BH3</b>	Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2 ( <i>Bid</i> )
<b>Bid</b>	Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2 ( <i>BH3 interacting domain death agonist</i> )
<b>CAF</b>	Cirurgia de alta frequência
<b>CCE</b>	Carcinoma de células escamosas
<b>CDK</b>	Cinases dependentes de Ciclina ( <i>Cyclin-dependent kinase</i> )
<b>CKI</b>	Inibidor de Cinases dependentes de Ciclina ( <i>Cyclin-kinase inhibitor</i> )
<b>COEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>DNAse</b>	Enzima de degradação do DNA
<b>E6</b>	Proteína codificada pelo vírus do papiloma humano (E, <i>early</i> )
<b>E7</b>	Proteína codificada pelo vírus do papiloma humano que inibe o pRb (E, <i>early</i> )
<b>Fas</b>	Receptor de membrana celular que leva à apoptose (CD 95 ou Apo-1)
<b>Fig</b>	Figura
<b>G0</b>	Fase em que a célula permanece em interfase
<b>G1</b>	Fase do ciclo celular ( <i>Growth</i> ou <i>Gap 1</i> ) que precede a fase S.

<b>G2</b>	Intervalo G2 ou pré-mitótico
<b>Graf</b>	Gráfico
<b>HPV</b>	Vírus do papiloma humano ( <i>Human Papilloma Virus</i> )
<b>Hrk</b>	Proteína codificada pelo gene Hrk ( <i>activator of apoptosis harakiri</i> )
<b>IAPS</b>	Proteínas Inibidoras da Apoptose ( <i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i> )
<b>IARC</b>	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer ( <i>International Agency for Research on Cancer</i> )
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LIE</b>	Lesão intraepitelial escamosa
<b>LIE-AG</b>	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
<b>LIE-BG</b>	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
<b>M</b>	Fase mitótica
<b>Mdm2</b>	Proteína do ciclo celular ( <i>Murine Doble Minute 2</i> )
<b>Mcl-1</b>	Proteína do ciclo celular ( <i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i> )
<b>MIB-1</b>	Anticorpo monoclonal que detecta o antígeno Ki-67 ( <i>Molecular Immunology Borstel</i> )
<b>MPTP</b>	Proteína antiapoptótica da membrana mitocondrial interna que interage com Bcl-2 e Bcl-XL
<b>NIC</b>	Neoplasia intraepitelial
<b>NFκB</b>	Fator de transcrição nuclear Kappa Beta ( <i>Nuclear Factor Kappa Beta</i> )
<b>Noxa</b>	Proteína pró-apoptótica da família do gene Bcl-2
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>P53</b>	Proteína de 53 Kd expressa pelo gene supressor de tumor p53
<b>PIN</b>	Neoplasia intraepitelial prostática ( <i>Prostatic intraepithelial neoplasia</i> )
<b>PRb</b>	Proteína retinoblastoma expressa pelo gene supressor de tumor pRb
<b>S</b>	Fase do ciclo celular de síntese
<b>Tab</b>	Tabela
<b>TGF-β1</b>	Fator de crescimento transformante β ( <i>Transforming growth factor beta</i> )
<b>TNF-α</b>	Fator de Necrose Tumoral Alfa ( <i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i> )
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>VIN</b>	Neoplasia intraepitelial vulvar ( <i>Vulvar intraepithelial neoplasia</i> )

<b>VAIN</b>	Neoplasia intraepitelial vaginal ( <i>Vaginal intraepithelial neoplasia</i> )
<b>µm</b>	Micrômetros
<b>%</b>	Porcentagem

:

## RESUMO

As displasias do colo uterino são sabidamente lesões precursoras de carcinoma de células escamosas (CCE). Mutações induzidas por vários carcinógenos podem correlacionar-se com alterações proliferativas. O acúmulo dessas mutações e o descontrole da homeostase genômica permitem o aumento ou a redução da expressão de determinados genes e geram desequilíbrios na proliferação celular e na apoptose. O Papel dos marcadores imunoistoquímicos de proliferação celular (Ki-67), de apoptose (Bax) e de sobrevivência celular (Bcl-2) nas lesões intraepiteliais cervicais necessitam de estudos com maior casuística na evolução das displasias ao carcinoma, e auxiliar no diagnóstico e prognóstico. Para melhor entender os processos de proliferação celular, apoptose e renovação epitelial nas lesões precursoras foram realizadas histomorfometria para mitose e apoptose além de reações imunoistoquímicas das proteínas Bax, Bcl-2 e Ki-67 (reatividade, localização e intensidade), em biópsias cervicais. As amostras foram divididas em quatro grupos (n=20): (1). cervicite, (2). displasia leve, (3). displasia moderada e (4). displasia acentuada/carcinoma 'in situ'. Verificou-se intensa proliferação celular e apoptose nas lesões de alto grau (displasias moderada e acentuada) e ampla, intensa e difusa imunomarcagem para Ki-67 e Bax. Tais achados foram encontrados de maneira discreta ou nula nos grupos cervicite e displasia leve. A marcação para Bcl-2 foi mais intensa nas lesões de alto grau, tendo sido discreta nas demais. A ampla marcação imunoistoquímica de Ki-67 e Bax é sugestiva de elevado grau de renovação celular também sustentado pela histomorfometria. A expressão do Bcl-2 aumenta com a gravidade da displasia. Tais achados indicam que o processo pré-neoplásico é dinâmico, com apoptose e mitose ocorrendo concomitantemente.

Palavras chaves: Colo uterino. Mitose. Apoptose. Ki-67. Bcl-2. Bax. Histomorfometria.

## ABSTRACT

Cervical dysplasias are precursor to the squamous cell carcinoma (SCC) of the uterine cervix. Carcinogen induced mutations can be correlated with proliferative alterations. Accumulation of such mutations overlaps the genomic homeostasis and allows the super expression or sub-expression of determined genes, disturbing mitosis, apoptosis and cellular turn over. Immunohistochemical markers for cellular proliferation, (Ki-67) for apoptosis (Bax) and for cell survival (Bcl-2) still require studies in intraepithelial lesion of the uterine cervix to define their role in dysplasia to invasive carcinoma progression. In order to better understand the processes of cellular proliferation, apoptosis and turn-over in such precursory lesions, histomorphometric evaluation for mitosis and apoptosis besides immunohistochemistry reactions for Bax, Bcl-2 and Ki-67 proteins (considering reactivity, localization and intensity) were carried out in cervical biopsies. Samples were split in four groups: 1. Cervicitis (n=20), 2. Mild Dysplasia (n=20), 3. Moderate Dysplasia (n=20) and 4. Severe Dysplasia/“in situ” Carcinoma (n=20). Intense proliferation and apoptosis were observed in the lesions of high degree (moderate and severe dysplasias) as well as wide, intense and diffuse immunolabeling for Ki-67 and Bax. Such events were found discrete or null in groups cervicitis and light dysplasia. Bcl-2 labeling was incipient in most of the reactions but more intense in high degree lesions. Wide immunolabeling for Ki-67 and Bax are suggestive of an increased cellular turn over, supported by the histomorphometry for mitosis and apoptosis. The expression of the Bcl-2 increases with the severity of the dysplasia. In conclusion these data indicate that the pre-neoplastic process is dynamic; with apoptosis and mitosis occurring concomitantly.

Keywords: Cervix. Mitosis. Apoptosis. Ki-67. Bcl-2. Bax. Histomorphometry.

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Relevância do estudo e fatores de risco

O INCA estimou para 2010 o aparecimento de 18.430 casos novos de câncer de colo do útero no Brasil, com um risco relativo de 18 casos/100 mil habitantes, com 4.812 óbitos (BRASIL, 2009).

O fator de risco mais significativa na etiologia deste câncer é a infecção pelas amostras virais oncogênicas do vírus do papiloma humano (HPV) (IARC, 1995). Relata-se a prevalência de 99,7% de HPV no câncer cervical invasivo (JAN et al., 1999). O HPV se associa a dois tipos de neoplasia do colo uterino: o carcinoma de células escamosas (CCE), mais comum (85-90% dos casos) e o adenocarcinoma (10-15% restantes). O risco para ambos os tipos histológicos está fortemente associado ao número de parceiros sexuais e à idade da coitarca. Fatores de risco isolados para o desenvolvimento do CCE são associados à elevada paridade e ao tabagismo de longa duração (BOSCH et al, 1995). Os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento de ambas malignidades se associam à idade da primeira concepção (GREEN et al., 2003; LOUIE et al., 2009). Outros fatores para o câncer cervical incluem: região geográfica, *status* sócio-econômico, hábitos sexuais e reprodutivos, tratamentos hormonais, baixa ingestão de vitaminas, história de doença venérea (como herpes e clamídia) e de pacientes transplantadas tratadas com imunossupressores (BOSCH et al., 1995).

### 1.2 História natural da doença

As mulheres que permanecem infectadas nas idades entre 30 e 50 anos estão sob risco de desenvolver neoplasias intraepiteliais (NIC), as quais constituem anormalidades epiteliais reconhecidas como precursoras do câncer cervical. O HPV está presente em 39% das mulheres entre 18 e 40 anos, incluindo 36% com exame de Papanicolau negativo (PEYTON et al., 2001). Carcinomas cervicais invasivos são precedidos de alterações displásicas na diferenciação escamosa normal, designada como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) ou

lesão intraepitelial escamosa (LIE) (NCI Workshop, 1989; NUOVO et al., 1990; LORINCZ et al., 1992; ANDERSON et al., 1993).

Em 1953, Reagan introduziu o termo displasia, que caracteriza um espectro de mudanças cito-histológicas com características intermediárias entre as do carcinoma *in situ* e o epitélio cervical normal. Segundo a gravidade da atipia celular e a espessura das mudanças celulares anômalas no epitélio, foram sugeridos os termos: leve, moderada e acentuada. Em 1962, o *International Commmittee on Histological Definition* estabeleceu que a displasia compreendesse “todas as alterações da diferenciação do epitélio escamoso de menor grau que o carcinoma *in situ*”.

O informe “Tipificação histológica dos tumores do trato genital feminino” da OMS de 1975 já trazia o conceito de displasia cervical como “uma lesão na qual a totalidade ou a maior parte do epitélio mostra as características celulares de um carcinoma, sem identificar-se invasão do estroma subjacente e parte da espessura do epitélio é substituída por células com graus variados de atipia”.

O sistema de classificação *Bethesda* categorizou as lesões escamosas intraepiteliais em lesões intraepiteliais de baixo grau (LIE-BG) e lesões escamosas intraepiteliais de alto grau (LIE-AG). A LIE-BG inclui a evidência da infecção pelo vírus HPV (condiloma) e/ou NIC 1. Na categoria (LIE-AG) estão a displasia moderada (NIC 2) e a displasia acentuada/carcinoma *in situ* (NIC 3) (KURMAN e SOLOMON, 1993; SOLOMON et al., 2002).

LIE-BG associado com HPV de baixo risco não apresenta apenas uma pequena chance para progressão (ZUNA et al., 2004). Apesar do padrão morfológico de baixo risco, a chance para o desenvolvimento do LIE-AG e neoplasia invasiva estão relacionados aos HPV 16 e 18, que são de alto risco (BOSCH et al., 2002; MUÑOZ et al., 2003; CASTLE et al., 2005; COGLIANO et al., 2005). LIE-AG possui um percentual significativo para evoluir para o carcinoma invasor (até cerca de 30%) (BOSCH et al., 1995).

Ostor (1993) estimou que as NIC 3 regridem em 32%, persistem em 56% e progridem para invasão em 12% dos casos. Graus menores de displasia apresentam maiores taxas de regressão. As possíveis causas são fatores genéticos, estado imune, exposição aos carcinógenos, variação nas interações vírus-hospedeiro e diferenças nas amostras de HPV. Huang et al. (2008) constatou um risco acumulado de 4% de desenvolvimento do câncer cervical a partir de uma população infectada por HPV de alto risco. A incidência acumulada para LIE-AG e Carcinoma cervical *in situ*/invasivo em mulheres positivas para HPV foram de 5,6 e 3,7%, respectivamente e, naquelas negativas para HPV, foram de 0,3 e 0%,

respectivamente. A incidência máxima do NIC 3 ocorre na terceira década de vida. Depois diminui de forma progressiva e, aos 65 anos, é quase inexistente. Portanto, constata-se uma clara diferença nas idades de maior incidência entre NIC e o carcinoma invasor. Destaca-se ainda o longo curso de história natural da doença (média de 15 anos entre a infecção viral e a neoplasia invasiva) e a sobrevida média entre 49 a 69% em 5 anos (INCA, 2010).

### **1.3 Aspectos genéticos/biologia molecular em contexto com a apoptose e o presente estudo**

Mutações causadas pelos carcinógenos correlacionam-se com alterações proliferativas. O acúmulo destas mutações ocasiona o descontrole da homeostase genômica permitindo a superexpressão ou subexpressão de determinados genes, gerando desequilíbrios no crescimento celular e na apoptose (LYONS; CLARKE, 1997; SMEDTS, 1997; DEY, 2000; POPIOLEK, 2004; FEN WEI, 2007). Tem sido descrito a ocorrência de apoptose em vários tipos de carcinoma humanos, sendo as neoplasias mais indiferenciadas as que possuem o menor índice apoptótico (CHEUNG et al., 2002). Assim, o processo de apoptose parece guardar uma relação de proximidade com o prognóstico para o paciente portador destas neoplasias epiteliais e intraepiteliais do colo uterino.

Há dois mecanismos celulares básicos em que as células acumulam mutações somáticas e se protegem do desenvolvimento neoplásico: senescência e apoptose.

### **1.4 Apoptose**

Apoptose ou morte celular programada é um mecanismo de eliminação controlada de células. Trata-se de um fenômeno naturalmente controlado, iniciado ou inibido por vários estímulos, fisiológicos ou patológicos (KERR, 1993). Representa um tipo de autodestruição celular dependente de energia, síntese e degradação proteicas. Como processo ativo, a apoptose requer reservas de ATP (pelo menos nas fases iniciais), ao passo que a necrose se instala quando há depleção total do ATP (KERR; SEARLE, 1972). A apoptose representa um

mecanismo de defesa contra viroses e provavelmente outros agentes infecciosos como bactérias e protozoários intracelulares (VAUX et al., 1994). A apoptose desempenha papéis distintos na progressão (DAS et al., 2001) ou na regressão das inflamações (CONCEIÇÃO SILVA et al., 1998; HUANG et al., 1998).

A apoptose possui como marca registrada a degradação controlada dos constituintes celulares, devido à ativação de proteases endógenas e pode ser comparada metaforicamente a um “suicídio celular”. A ativação destas proteases compromete a integridade do citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular. Em resposta à redução do volume citoplasmático, a membrana celular forma bolhas e se altera o posicionamento de seus lipídios constituintes. Em células normais, a distribuição de fosfatidilserina se faz primariamente no folheto interno da membrana plasmática. Durante o processo de apoptose esse lipídio se expõe no folheto externo da membrana. O novo posicionamento da fosfatidilserina serve como sinalizador para que células fagocíticas das proximidades englobem os fragmentos celulares e completem o processo de degradação (PESSARE et al., 1999).

Durante o processo de apoptose ocorrem alterações características no núcleo graças à ativação de endonucleases que degradam o DNA. Como resultado, o núcleo torna-se retraído e hipercromático, com cromatina condensada nas porções adjacentes à carioteca. Finalmente, o núcleo se fragmenta. Simultaneamente, a célula se fragmenta em vesículas circundadas por membrana e contendo fragmentos do núcleo e organelas intactas, dando origem a estruturas denominadas corpos apoptóticos (KERR, 1993; THOMPSON, 1999). Um dos aspectos que distingue a apoptose da necrose é, nessa, a preservação da integridade da membrana plasmática que evita a liberação dos constituintes celulares para o meio extracelular e, conseqüentemente, a sinalização pró-inflamatória e quimiotaxia e a ativação de células fagocíticas (KERR, 1993).

### **1.5 Regulação gênica da apoptose**

A apoptose pode ser desencadeada por estímulos exógenos que agem em receptores de membrana ou via estímulos endógenos gerados após diferentes agressões, como a biológica. Independente do estímulo, a apoptose resulta na ativação de proteases, as quais induzem as modificações funcionais e morfológicas características do processo.

As caspases (*cysteine asparagil specific proteases*) são enzimas caracterizadas por possuírem cisteína no sítio ativo e por clivarem proteínas em sítios com resíduos de ácido aspártico. São produzidas como enzimas inativas (pró-caspases), sendo ativadas pelo deslocamento da molécula inibidora ou pela clivagem proteolítica em sítios com ácido aspártico. São conhecidas 12 caspases em humanos (CHANG, 2000, PEREIRA, 2010), nem todas envolvidas na apoptose: as caspases 1, 4 e 5 fazem a clivagem da pró-IL-1 e -18 (nos processos inflamatórios). As caspases envolvidas na apoptose podem ser separadas em *caspases ativadoras* (caspases 8, 9 e 10), que fazem a proteólise das *caspases efetoras* (caspases 3, 6 e 7), que, por sua vez atuam ativando outras proteases que degradam diferentes substratos da célula.

Proteínas do citosol regulam o processo ao inibirem as caspases ou ao regularem a permeabilidade das mitocôndrias. As IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) formam uma família de proteínas inibidoras da apoptose. Possuem um domínio em prega com zinco, denominado BIR (*Baculoviral IAP Repeats*), que se liga e inibe as caspases efetoras 3 e 7 e a caspase ativadora 9. Algumas destas proteínas são expressas em grandes quantidades em oncócitos, sendo um dos fatores que facilitam a sobrevivência dessas células. A família das proteínas Bcl (descoberta em *B cell lymphoma*) inclui 23 proteínas, inibidoras (antiapoptóticas) ou ativadoras (pró-apoptóticas) da apoptose (HARADA, 2003; PEREIRA, 2010).

As proteínas antiapoptóticas, como o Bcl-2 e o Bcl-XL, localizam-se na membrana mitocondrial, constituindo ou regulando proteínas formadoras de poros de permeabilidade transicional, importantes na permeabilidade mitocondrial. As proteínas pró-apoptóticas da família Bcl, conhecidas em conjunto como proteínas Bax (bim, bad, bid, Noxa, Hrk, Bcl-G, entre outras), caracterizam-se por apresentar um domínio de dimerização BH3 que permite ligá-las às proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 e Bcl-XL), inibindo-as. Muitas vias indutoras de apoptose agem ativando essas proteínas pró-apoptóticas, levando à desestabilização da membrana mitocondrial e à liberação do citocromo c e de outras proteínas ativadoras de caspases. Cada uma dessas proteínas pró-apoptóticas é acionada de maneira diferente: a P53, por exemplo, ativa o gene Noxa (PEREIRA, 2010).

## **1.6 Apoptose é ativada pela P53**

A P53, após se ligar às áreas de dano do DNA, ativa proteínas que mantêm a célula em G1 do ciclo celular, conferindo tempo para o reparo do DNA (MATHEVET et al., 2000; SCHAFFER, 2009). Se a lesão do DNA não puder ser reparada, a P53 ativa mecanismos de apoptose por diversas vias: diminui a transcrição da proteína anti-apoptótica Bcl-2; aumenta a transcrição dos genes pró-apoptóticos Bax e Bak; ativam certas helicases de DNA e outras enzimas que provocam a translocação de muitas proteínas pró-apoptóticas da membrana celular para o citosol (ALBERTS et al., 2002; NAKAMURA et al., 2002).

O aumento da expressão do gene p53, cujo produto, a proteína P53, induz o retardo mitótico e apoptose. Um dos alvos da P53 são os genes IAPs, cuja expressão é inibida. Deste modo, as caspases, especialmente a caspase 9, naturalmente inibidas pelos IAPs, tornam-se ativadas e ativam as caspases efetadoras. Por outro lado, a P53 ativa os genes das proteínas Bax, que se dimerizam com as proteínas Bcl-2, aumentando a permeabilidade mitocondrial, com liberação de fatores mitocondriais pró-apoptóticos (ALBERTS et al., 2002; NAKAMURA et al., 2002).

A inibição do p53 é vista na infecção pelo HPV, sobretudo nos tipos 16 e 18 (de alto grau) (MATHEVET et al., 2000; SCHAFFER, 2009).

## **1.7 Regulação da apoptose pela família de proteínas Bcl-2**

Além dos receptores de morte, a apoptose pode também ser induzida por sinais de estresse intracelular que resultem em disfunção mitocondrial, tais como lesão do DNA (via gene p53), alterações nas vias metabólicas (aumento do cálcio intracelular, redução do pH, estresse oxidativo e/ou do retículo endoplasmático), drogas, toxinas ou privação dos fatores de crescimento. Na presença de sinais de estresse intracelular ocorre a translocação de proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bid, etc.) do citosol para a mitocôndria. Essas proteínas são membros da família de proteínas Bcl-2 que exercem importante função reguladora da apoptose. (RUBIN; STRAYER, 2006).

A família das proteínas Bcl-2 desempenha papel crítico na regulação da apoptose em condições fisiológicas ou patológicas. Pelo menos 15 membros dessa família já foram identificados nos mamíferos. Algumas dessas proteínas como Mcl-1 e Bid são pró-apoptóticas (PATEL; GORES, 1998).

Muitos membros dessa família residem na membrana externa da mitocôndria, na membrana nuclear e no retículo endoplasmático. Na mitocôndria, distribuem-se focalmente, nos locais de contato entre a membrana interna e externa. Três funções têm sido descritas para essas proteínas: dimerização, atividade formadora de poro ou canal de íons e ligação a outras proteínas. A formação de heterodímeros entre proteínas agonistas e antagonistas, pode inibir a apoptose pela neutralização das agonistas ou promover a apoptose pelo deslocamento de fatores pró-apoptóticos ligados a antagonistas, como por exemplo, Apaf-1 (THOMPSON, 1999). Os principais antagonistas da apoptose, Bcl-2 e Bcl-XL, localizam-se, principalmente, na membrana mitocondrial (PATEL; GORES, 1998). Essas proteínas são capazes de formar poros condutores de íons em membranas sintéticas (THOMPSON, 1999). Acredita-se que um dos mecanismos pelos quais elas mantêm a homeostasia celular, seja o de regulação da permeabilidade das membranas nas quais se distribuem.

Foi demonstrado que a Bcl-2 bloqueia a penetração de perforinas e granzimas no núcleo. Tais substâncias são liberadas pelos linfócitos T citotóxicos contra seus alvos e podem ser ativadoras de caspases. Os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 são normalmente encontrados no citosol e quando ativados, se translocam para a mitocôndria, alterando a permeabilidade da membrana desta organela, permitindo o extravasamento de proteínas pró-apoptóticas, tais como o citocromo c, o fator indutor de apoptose, DNase e pró-caspases 2 e 9 (FELDMANN et al., 2000).

A mitocôndria participa da manutenção de funções celulares vitais, tais como respiração celular e síntese de ATP, regulação osmótica, controle do pH, homeostasia do cálcio no citosol e sinalização intracelular. Paradoxalmente, a mitocôndria guarda no espaço intermembranoso substâncias capazes de induzir o processo de morte celular, entre as quais o citocromo c. A translocação das proteínas pró-apoptóticas para a mitocôndria resulta na liberação para o citosol do citocromo-c. Quando liberado, este se associa a duas proteínas presentes no citosol - a Apaf-1 e a pró-caspase-9 que na presença de ATP, ativa a caspase-9 (RUBIN; STRAYER, 2006). Portanto, a ativação das caspases pode ser desencadeada via receptores de morte ou via disfunção mitocondrial, com liberação do citocromo-c (RUBIN; STRAYER, 2006).

A caspase-9, por sua vez, ativa as pró-caspases-3 e 7, que executam o processo de apoptose. A caspase-3 pode amplificar a cascata de proteólise pela ativação da caspase-8 e pela clivagem da proteína anti-apoptótica Bcl-2 que, normalmente, garante a integridade da membrana mitocondrial (PATEL; GORES, 1998). Para a manutenção da integridade celular é necessário que os componentes pró-apoptóticos, presentes no interior da mitocôndria, não sejam liberados para o citosol. Existe na membrana mitocondrial interna uma estrutura proteica chamada MPTP, que se mantém habitualmente fechada, assegurando a sobrevivência celular. Seu fechamento é facilitado pelo magnésio intracelular, pelo potencial elevado da membrana mitocondrial, pela expressão das proteínas Bcl-2 e Bcl-XL, pela maior expressão da superóxido dismutase mitocondrial, rica em manganês, que atua como removedora de radicais superóxido, e pela translocação nuclear do NF $\kappa$ B (PESSAYRE et al., 1999).

Diferentes estímulos podem causar a abertura do poro de permeabilidade, resultando na morte celular pela ativação das caspases: a ligação do TNF- $\alpha$ , ligantes-Fas ou do TGF- $\beta$ 1 aos respectivos receptores na membrana celular; a entrada de granzima-B, liberada pelos linfócitos T citotóxicos e facilitada pela perforina. A caspase-8 cliva a proteína pró-apoptótica Bid presente no citosol, gerando um fragmento truncado dessa proteína (tBid), que se liga à mitocôndria, permeabilizando as suas membranas. A lesão do DNA celular pode intensificar a expressão do gene p53 favorecendo a maior expressão da proteína pró-apoptótica Bax que, por sua vez, causa abertura do poro mitocondrial. Outros estímulos para a abertura desse poro incluem: maior formação de espécies reativas de oxigênio, aumento do cálcio intra-mitocondrial, ácidos biliares hidrofóbicos e algumas drogas (PESSAYRE et al., 1999).

Uma das consequências da abertura do poro de permeabilidade é a expansão da matriz mitocondrial devido à hiperosmolaridade. A membrana mitocondrial interna é pregueada e assim pode acomodar o aumento do volume da matriz. Já a membrana externa, que é esférica, não suporta o volume e se rompe, liberando componentes pró-apoptóticos, como Apaf-1 e o citocromo-c. Outra consequência é a nova entrada de prótons na matriz, causando colapso no potencial de membrana mitocondrial e comprometendo a síntese de ATP (PESSAYRE et al., 1999; FELDMAN et al., 2000).

A abertura do poro de permeabilidade mitocondrial causa, simultaneamente, ativação das caspases (potencialmente levando a apoptose) e depleção de ATP (potencialmente causando necrose). Essa disputa entre ativação das caspases e a depleção de ATP irá orientar a morte celular, seja por apoptose, seja por necrose. A disputa pode ser vencida pelas caspases quando estas são diretamente ativadas pelos receptores de superfície celular ou granzima B e

quando o poro de permeabilidade se abre em apenas algumas mitocôndrias, permitindo que as demais sintetizem ATP. Nestas circunstâncias, a célula entra no processo de apoptose. Por outro lado, se o poro de permeabilidade é aberto rapidamente, a célula morre por necrose (PESSAYRE et al., 1999).

## **1.8 Senescência celular**

É definida como o estado no qual a célula metabolicamente ativa estabiliza-se durante a fase G1 do ciclo celular (COLLADO et al., 2005). É induzida por uma variedade de estresses e representa um mecanismo no qual se inibem as replicações adicionais e o desenvolvimento da neoplasia em células potencialmente cancerosas. A senescência opera como um mecanismo de supressão de tumor, limitando a capacidade proliferativa de células *in vivo*. O encurtamento de telômeros até um comprimento crítico ativa o sistema de verificação dependente do p53 no ciclo celular. Adicionalmente, p53 pode induzir apoptose e diminuir a expressão do Bcl-2 (MYASHITA et al., 1994). Células que expressam p53 mutante têm perda da habilidade para interromper o ciclo celular e exibem instabilidade genômica (YIN et al., 1992).

## **1.9 Aspectos genéticos / biologia molecular em contexto com a infecção pelo HPV e as displasias cervicais**

Nas lesões de baixo grau, o DNA do vírus permanece sob a forma episossomal, livre no núcleo da célula, sendo replicado somente durante o ciclo de renovação do epitélio. A NIC de baixo grau é um exemplo de infecção permissiva, na qual o HPV é episossômico e replica-se livremente, desse modo provocando morte celular. Quantidades imensas de cópias virais precisam se acumular no citoplasma da célula para que possam ser visualizadas microscopicamente como um coilócito. Muitas verrugas genitais (condilomas acuminados) no colo uterino contêm HPV 6 ou 11, que são vistos como tipos de HPV de baixo risco (KURMAN et al., 2006).

Nas lesões de alto grau e no carcinoma, o DNA viral encontra-se geralmente integrado ao DNA do hospedeiro (CULLEN et al., 1991; HESELMAYER et al., 1996; DIMITRAKAKIS et al., 2000). As células na NIC de alto grau geralmente contém HPV dos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68. Os HPV dos tipos 16 e 18 são encontrados em 70% dos cânceres invasivos, e os outros tipos de alto risco somam mais de 25% (KURMAN et al, 2006).

O potencial oncogênico de cada subtipo de HPV parece refletir a capacidade de oncogenes virais, E6 e E7, em interferir no ciclo celular por degradação do gene supressor tumoral p53 e a inativação funcional do produto do gene pRb do retinoblastoma (ALANI; MUNGER, 1998).

### **1.10 Imunoistoquímica**

Marcadores de proliferação celular por imunoistoquímica, como o Ki 67 e o produto dos genes supressores de tumor, entre eles o p53 têm sido testados em diversas neoplasias. Entretanto, marcadores do tipo p53 e Ki-67 em lesões intraepiteliais do colo uterino necessitam de estudo com maior número de casos para definir seus papéis na evolução da NIC (GIRALDO et al., 2006).

Lesões epiteliais são a fonte mais comum de problemas diagnósticos na vulva, vagina e cérvix uterina. Testes imunoistoquímicos podem melhorar o reconhecimento e classificação das lesões precursoras, tais como o condiloma e as lesões escamosas intraepiteliais. Adicionalmente, podem favorecer o diagnóstico e a classificação de vários tipos de tumores malignos que ocorrem nestes sítios (SOSLOW, 2006).

#### **Ki-67**

A utilidade dos marcadores de proliferação como auxílio diagnóstico pode prover como método objetivo ou assegurar sua qualidade, em circunstâncias específicas. A marcação específica para o Ki-67 é exclusivamente confinada ao núcleo, com nenhuma coloração citoplasmática observada. A positividade da reação pelo Ki-67 é constatada pela coloração amarronzada em localização nuclear, com positividade mais densa tipo nucleolar. Em geral, as áreas de positividade pelo Ki-67 apresentam bom contraste face às áreas negativas, o que torna fácil e bem reprodutível a análise das lesões. Células estromais e necróticas são

uniformemente negativas para o Ki-67. Linfócitos se coram fortemente e funcionam como controle interno positivo.

A expressão do antígeno Ki-67 na pele normal e na mucosa escamosa é restrita às células basais e parabasais, o que denota a natureza replicativa destas na renovação epitelial. O controle do número de células, tanto em condições normais quanto nas neoplásicas, depende de fatores que influenciam o equilíbrio entre crescimento e morte celular. Na cérvix uterina normal, o controle do número de células está sob a influência dos esteróides ovarianos. Células epiteliais germinativas estimuladas pelo estrógeno iniciam proliferação, maturação e descamação. Assim, o epitélio é completamente restituído por uma população celular a cada 4 ou 5 dias (FERENCZY; WRIGHT, 1994).

MIB-1 é um anticorpo monoclonal que reconhece um epitopo do antígeno de proliferação do Ki-67 (CATTONETTI et al., 1992; KEY et al., 1993). O antígeno Ki-67 é uma proteína não histona de meia-vida curta, que é expressa durante as fases G1, S e G2/M do ciclo celular, mas não na fase G0 (GERDES et al., 1983; GERDES et al., 1984).

Marcadores celulares de proliferação, tais como os antígenos nucleares de células em proliferação, PCNA e o antígeno Ki-67, são utilizados por patologistas para obter caracterização tumoral e de outras doenças. Tanto o Mib-1 quanto o anticorpo policlonal anti-Ki-67 (DAKO, Carpenteria, CA) reconhecem o antígeno Ki-67 em material fixado. Anticorpos Mib-1 são preferidos aos anticorpos PCNA porque o antígeno Ki-67 rapidamente é degradado quando a célula sai do ciclo celular, ao passo que os PCNA podem continuar a ser expressos (BIBO, 2006).

Diversos estudos indicaram que o Ki-67 é um importante marcador prognóstico no estudo de tumores humanos (QUEIROZ et al., 2006).

O marcador Ki-67 pode ser útil na acurácia da gradação das lesões cervicais pré-neoplásicas (ISMAIL et al., 1989; ISMAIL et al., 1990; ROBERTSON et al., 1998), para a avaliação das displasias vulvares e vaginais, nos casos de uma histologia equívoca, notadamente nas lesões de baixo grau, neoplasia intravulvar/ neoplasia intravaginal grau I (VIN 1/ VAIN 1) com sensibilidade e especificidade de 0,96 e 0,90, respectivamente (LOGANI et al., 2003). O Ki-67 tem sido utilizado para diferenciar alterações pseudo-coilocitóticas e atrofia da displasia (MITTAL et al., 1999; PIROG et al., 2001).

## **Bax**

Bax pertence à família de proteínas que partilham homologia semelhante à oncoproteína Bcl-2. As proteínas relacionadas à Bcl-2 estão envolvidas na regulação da

apoptose, atuando como promotores ou supressores da morte celular. A superexpressão do Bax leva à promoção da morte celular. Foi proposto que a expressão relativa de diferentes proteínas da família Bcl-2 controla a sensibilidade das células em face de um estímulo apoptótico (CHEUNG et al., 2002).

O gene Bax codifica uma proteína, Bax- $\alpha$  de 21 kD de domínio transmembrana, que está localizado na mitocôndria (SCHLAIFER et al., 1996). Formas alternativas do Bax citosólico (Bax- $\beta$ , 24kD e Bax- $\gamma$ , 5 kD) têm sido observadas (OLTVAI et al., 1993).

Bax pode formar homodímeros e também é capaz de heterodimerizar com outras proteínas Bcl-2 relacionadas (REED, 1994). A formação de heterodímeros entre Bax e homólogos do Bcl-2 com a função de inibidor da morte (Bcl-2, Mcl-1 e Bcl-xl) leva à inibição dos efeitos promotores da morte celular do Bax (REED, 1994; OLTVAI et al., 1993).

A expressão do Bax foi estudada no carcinoma mamário *in situ* e na maioria dos casos foi positivo. Em 34% dos carcinomas mamários metastáticos, a expressão do Bax foi significativamente reduzida na maioria das células tumorais infiltrantes. Expressão moderada a forte tem sido observada em uma grande porcentagem de células tumorais do adenocarcinoma prostático e neoplasia intraprostática (PIN) (KRAJEWSKA et al., 1996).

A imunorreatividade para o Bax e Bcl-2 é relatada na mucosa cervical normal, sendo observada em 43 e 50% dos casos, respectivamente (SAEGUSA et al., 1995). O anticorpo marca o citoplasma das células epiteliais com padrão granular ou pontual.

## **Bcl-2**

A oncoproteína Bcl-2 é um bloqueador da apoptose. Níveis elevados da proteína podem proteger uma grande variedade de células de estímulos apoptóticos diversos, tais como linfocinas citotóxicas produzidas diante de infecções virais, radiação, drogas antiláblicas (ADAMS; CORY, 1996; KUSENDA, 1998). A oncoproteína Bcl-2, de 26kDA, localiza-se no citoplasma, na membrana mitocondrial externa, no retículo endoplasmático e no envelope nuclear (ADAMS; CORY, 1996; YANG; KORSMEYER, 1996; KUSENDA, 1998) e é conhecida por inibir a apoptose (KROEMER, 1997).

O oncogene bcl-2 é ativado como consequência da translocação t(14; 18) em linfomas foliculares humanos. A sua superexpressão deve prolongar o potencial de sobrevivência de células cancerosas e permitir sua transformação maligna (HOCKENBERY et al., 1990; HOCKENBERY, 1992). A proteína p53 participa no auxílio das vias tanto da senescência quanto da apoptose. Ela também pode induzir a apoptose via ativação de Bax (FENG WEI et al., 2007).

O anticorpo monoclonal de rato anti-humano reage com a oncoproteína Bcl-2 codificada por um gene envolvido na translocação cromossômica t (14;18), presente em 85% dos linfomas foliculares humanos e 20% dos linfomas difusos B (YANG; KORSMEYER, 1996).

Este anticorpo é encontrado em numerosas aplicações no estudo da apoptose, por exemplo em neoplasias (CAMPOS et al., 1993; PEZZELLA et al., 1993). O anticorpo pode ser útil na classificação dos linfomas foliculares e doenças linfoproliferativas difusas variadas e para identificação do diagnóstico diferencial entre linfoma difuso de grandes células B e o linfoma/leucemia de Burkitt (HARALAMBIEVA et al., 2005).

Tem sido proposto que a expressão relativa entre as diferentes proteínas da família Bcl-2 controla a sensibilidade das células ao estímulo apoptótico (REED, 1994; SATO et al., 1994; CHEUNG et al., 2002)

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Detectar e quantificar, histomorfometricamente, a apoptose e mitose na cervicite e nas lesões intraepiteliais escamosas do colo uterino e avaliar comparativamente cada um dos grupos com a técnica de imunohistoquímica para os marcadores Ki-67, Bcl-2 e Bax.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar o índice apoptótico, mitótico e de células em interfase em espécimes de colo uterino com o diagnóstico: negativo para displasia (cervicite), neoplasias intraepiteliais graus 1, 2 e 3/carcinoma *in situ*.
2. Avaliar, semiquantitativamente, a expressão, localização e intensidade da imunomarcção dos antígenos Ki-67, Bax e Bcl-2 em amostras de cervicite, NIC 1, NIC 2, e NIC 3 e correlacioná-las com o grau histológico.
3. Verificar se o padrão de imunomarcção para os antígenos estudados (Ki-67, Bax e Bcl-2) se presta, na prática, como fator de diferenciação entre displasias e cervicite e, na presença da displasia, na classificação entre LIE-BG e LIE-AG.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Origem do material

As amostras de tecidos já previamente processadas (blocos de parafina) foram cedidas mediante consentimento formal e escrito pelo Laboratório de Patologia Cirúrgica e Citopatologia Ltda (*Cytogenesis*).

Todos os procedimentos destes experimentos estão de acordo com as normas e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (Protocolo nº ETIC 606/08, aprovado em 20/02/09).

### 3.2 Seleção das amostras

Selecionaram-se 80 casos no período de 2008 a 2010, distribuídos igualmente em quatro grupos (n=20) sendo um não afetado (cervicite) e três lesões precursoras (NIC 1, NIC 2, NIC 3/ carcinoma “*in situ*”) com concordância inequívoca de diagnóstico revisado de forma independente por dois patologistas.

Utilizaram-se os seguintes critérios de exclusão na seleção das amostras:

- amostras de diminuto tamanho;
- amostras que possuíam lesões de extensão exígua;
- amostras emblocadas em estado precário de conservação;
- espécime obtida de paciente submetida a procedimento ablativo/ excisional seis meses antes da coleta da amostra (evitando-se que processos regenerativos e reparativos sejam vieses de confusão na avaliação dos índices apoptóticos e da fração de crescimento);

Não foram considerados como critérios de seleção idade ou cor da pele.

As lesões displásicas são classificadas em: baixo grau (NIC 1) e alto grau (NIC's 2 e 3/carcinoma *in situ*), segundo o grau do comprometimento do epitélio escamoso, com base em critério morfológico: ausência de maturação, pleomorfismo nuclear, perda da polaridade e

frequências de mitoses conforme critérios preconizados por outros autores (ANDERSON, 1991; GOMPEL; SILVERBERG, 1994; KURMAN, 1994).

### **3.3 Obtenção dos cortes, processamento histológico e coloração**

As amostras incluídas em parafina foram seccionadas a 4 $\mu$ m e coradas em Hematoxilina-Eosina (HE). Outros cortes foram submetidos à imunohistoquímica com utilização de marcador de proliferação celular Ki-67, Bcl-2 e Bax.

### **3.4 Exame das preparações histológicas e análise morfométrica**

Os cortes corados em HE foram utilizados para analisar o grau histológico e permitir a captura de imagens visando às análises histomorfométricas. Estas foram conduzidas no Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram estudadas todas as amostras (80 casos) e todos os campos lesionais por amostra, capturando-se imagens com objetiva planopocromática de 40X (Olimpus BX41 *Hatagaya, Shibuya-ku, Tokyo, Japan*) em câmera digital (JVC/TK-1270 *Color Video Camera; Germany*) acoplada a computador com placa de captura de imagens ("*frame grabber*" MiroMOVIE PRO; *Germany*), utilizando-se o programa *Media Cybernetics Image-Pro Plus* versão 4.5. Os parâmetros morfométricos foram: número de apoptoses (total e nas camadas superior e inferior), número de mitoses (total e nas camadas superior e inferior) e células em interfase, conforme figura 1.

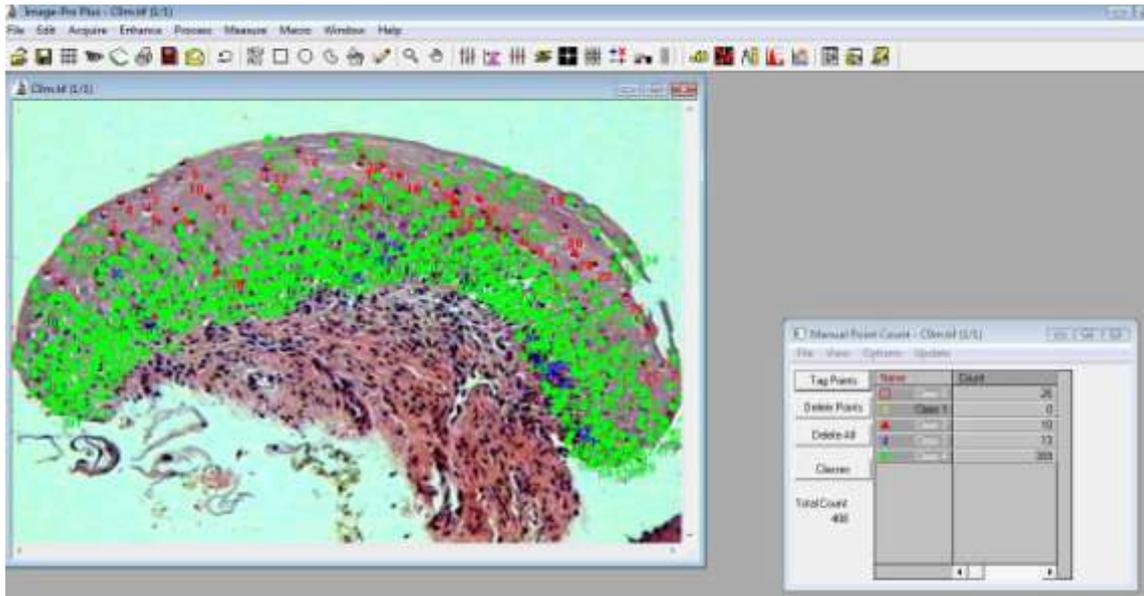


Figura 1: Avaliação histomorfométrica processada no programa *Image Pro Plus* versão 4.5 – HE, 40x. Fonte: Foto do autor

### 3.5 Índice apoptótico

O índice apoptótico ( $n^{\circ}$  de células apoptóticas/  $n^{\circ}$  total de células x 100) foi obtido das observações de um único indivíduo considerando como apoptóticas as células que apresentavam pelo menos três das seguintes características morfológicas peculiares ao processo: 1) anoiquia (presença de halo claro perinuclear); 2) condensação do citoplasma; 3) condensação nuclear (crescentes); 4) fragmentação nuclear; 5) fragmentação celular (corpos apoptóticos); 6) fagocitose dos corpos apoptóticos (“canibalismo celular”).

### 3.6 Índice mitótico

Para se analisar o índice mitótico ( $n^{\circ}$  de células em mitose/  $n^{\circ}$  total de células x100), as células foram observadas por um único indivíduo procurando-se identificar células em metáfase, anáfase e telófase.

### 3.7 Imunoistoquímica para Ki-67, Bax e Bcl-2

Amostras emblocadas em parafina foram submetidos à microtomia e cortes histológicos de 4 µm de espessura foram processados para imunoistoquímica utilizando-se os seguintes anticorpos primários: Mib-1 (clone DVB-2, *Dakocytomation, Carpinteria, Ca, Monoclonal*, Camundongo, 1;1); Bax (clone 2D2, *Invitrogen, Camundongo, Monoclonal*, 1:200) Bcl-2 (Clone 124, *Dakocytomation, Carpinteria, Ca, Camundongo, Monoclonal*, 1:100).

### 3.8 Etapas da reação

**Desparafinização:** os cortes, em lâminas previamente silanizadas, eram levados à estufa, à temperatura de 60°C, por 10-15 minutos. Posteriormente, eram imersas em xilol, por 10 minutos.

**Diafanização:** as lâminas eram imersas em álcool absoluto e hidratadas, por 3 vezes. Posteriormente, eram imersas em água deionizada, por 3 vezes.

**Recuperação antigênica:** as lâminas eram imersas no tampão *Diva* Tris (0,05mol/L, Tris-HCL, pH 6,0, 0,015 mol/L sodium azide e carrier protein) e levadas à panela de vapor, à temperatura de 90-100°C, por 20-25 minutos. Posteriormente, eram retiradas da estufa e deixadas em descanso por 15-25 minutos fora da panela.

**Bloqueio da peroxidase endógena:** demarcados os cortes com a caneta de imunoistoquímica era aplicado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 volumes por 5 minutos. Em seguida este era aspirado e repetia-se a operação por mais 2 vezes. Aspirava-se e colocava-se o tampão de lavagem por 5 minutos.

**Aplicação do anticorpo primário:** Aplicava-se o *Background Sniper* por 10 minutos. Em seguida, este era aspirado e procedia-se a lavagem com o tampão Tris. Deixava-se em repouso por 5 minutos e, depois, aspirava-se. Aplicava-se o anticorpo primário (Mib-1 pronto para uso; Bax, na diluição 1:200 ; Bcl-2, na diluição 1:100) por 20 minutos.

**Revelação estreptavidina-biotina** (Sistema revelador: *Biocare's Star Trek Universal HRP detection*): Aplicava-se o *Trekkie Universal link* (anticorpo secundário) e deixava-se por

20 minutos. Aspirava-se e lavava-se com tampão Tris. Aplicava-se o *Trekavidin-HRP label* e deixava-se em repouso por 15 minutos. Aspirava-se e lavava-se com tampão Tris.

Revelação com o cromógeno : Uso do *Betazoid DAB Chromogen Kit*: aplicava-se o tampão *Betazoid DAB Substrate* e colocava-se uma gota do *Betazoid DAB* cromógeno. Deixava-se em repouso por até 5 minutos. Aspirava-se e lavava-se.

**Contracoloração:** Lâminas contracoradas com hematoxilina de Mayer's por 2 minutos, imersas em 3 banhos de álcool absoluto e 3 banhos de xilol, posteriormente lavadas com água corrente. Secadas e montadas com verniz.

Todos os testes foram realizados com um controle reconhecidamente positivo e um negativo.

### 3.9 Critérios de avaliação imunoistoquímica

A marcação para Ki-67 é definida como um grupo mínimo de dois núcleos corados nos dois terços superiores da espessura epitelial total. A análise da expressão de Ki-67 foi semi-quantitativa com a reatividade e localização da coloração celular graduada como 0 a 3+ de acordo com os critérios de Queiroz et al. (2006): (0) células positivas apenas nas camadas basal e parabasal; (1) proliferação discreta: até 20%; (2) proliferação moderada: entre 21 a 40%; (3) proliferação intensa: acima de 40%. Além disso, os escores de intensidade para marcação foram avaliadas por 2 patologistas, conforme indicado por Feng Wei et al. (2007).

A imunorreatividade para Bax e Bcl-2 foi também semiquantitativa, com os seguintes escores: (0) sem marcação; (1) fraco com menos de 10% células positivas; (2) mais que 10% porém menos que de 50% de células positivas; (3) mais que 50% de células positivas. A imunorreatividade foi considerada negativa quando houve escores de (0) ou (1) e positiva quando houve escores de (2) ou (3), conforme os critérios de Oltvai et al. (1993) e Joensuu et al (1994). As lâminas foram observadas de forma independente por dois patologistas; os casos discordantes foram revistos e atribuíram novamente as contagens baseadas no consenso de opinião.

### 3.10 Delineamento estatístico e análise dos resultados

Todas as 80 amostras foram obtidas de pacientes submetidos à biópsia à frio ou cirurgia de alta frequência (CAF), sendo, portanto, um estudo coorte transversal, não intervencional. Todo o material utilizado foi, primariamente, colhido com finalidades diagnósticas e terapêuticas, não se aventando a possibilidade desta pesquisa.

Os parâmetros morfométricos obtidos dos diversos campos histológicos foram submetidos ao teste de Kolmogorov Smirnov para verificação de distribuição normal (Gaussiana). Quando os dados tinham distribuição Gaussiana, procedeu-se à Análise de Variância e/ou teste t de Student e à múltipla comparação de Student Newman Keuls. Quando as variáveis eram ordinais com emprego de scores e quando os dados morfométricos não atendiam à normalidade, optou-se pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ou de Mann Whitney acrescido do teste de múltiplas comparações de Dunn. Todas as análises foram realizadas no Graphpad Prism 3.0.

Médias e/ou medianas foram obtidas para cada parâmetro morfométrico estudado de cada grupo de amostras. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise histomorfométrica

As neoplasias intraepiteliais (NIC) foram classificadas pelo critério morfológico, conforme Anderson (1991); Gompel e Silverberg (1994) e Kurman (1994). Observou-se progressiva ausência de maturação, pleomorfismo nuclear, perda da polaridade e alterações nas frequências e tipo de mitoses (Fig.2A, B, C e D).

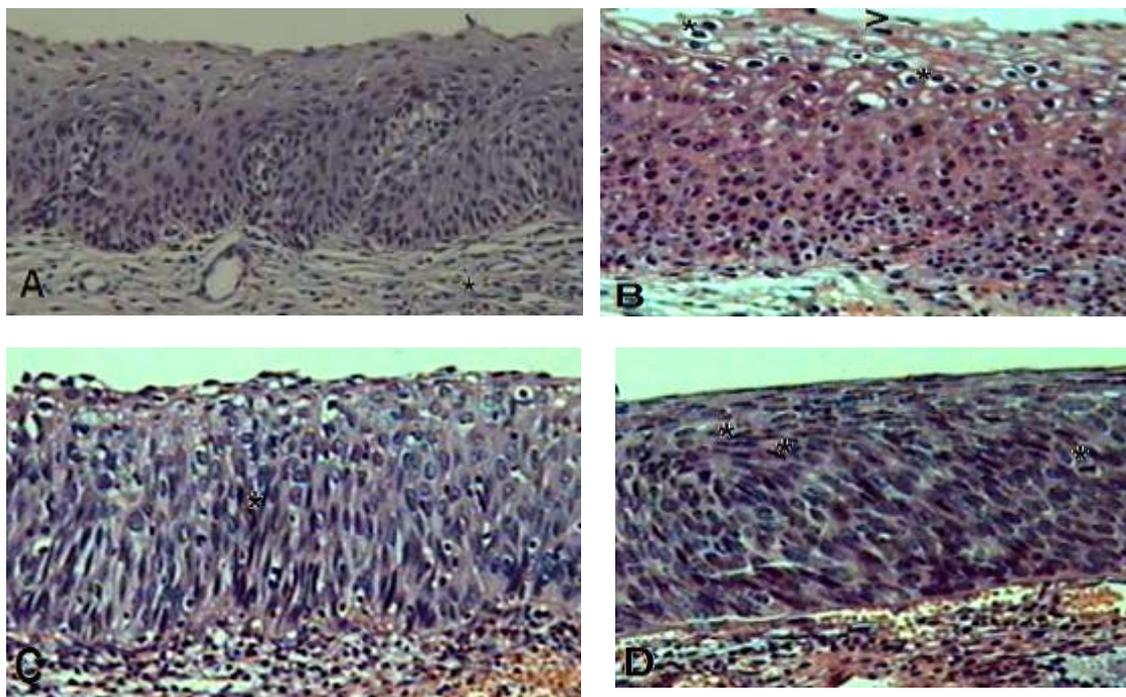


Figura 2. Histologia de amostras representativas. A. Cervicite: Epitélio estratificado escamoso não ceratinizado. No córion, notam-se discretos focos de infiltrado inflamatório (\*). B. NIC 1: Presença de coilócitos, halos perinucleares (\*) e binucleações (ponta de seta, >). C. NIC 2: Hiperchromasia associada à perda de polaridade nuclear, com desestruturação (\*); D. NIC 3: Sobreposição de núcleos, mitoses frequentes no extrato superior (\*). HE, objetiva de 40x. Fonte: Fotos do autor

### 4.2 Índice apoptótico

As células apoptóticas foram identificadas e quantificadas conforme os critérios morfológicos (anóiquia, condensação e fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos) (Fig. 3A).

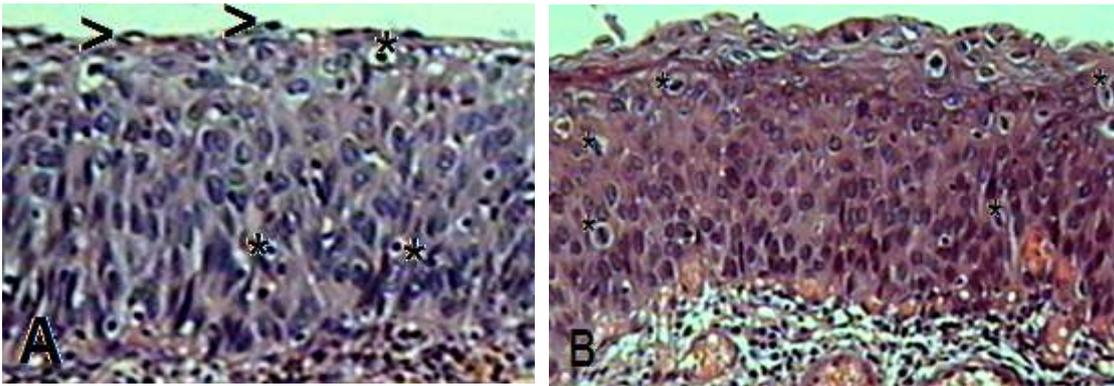


Figura 3. Apoptose. A. anoiquia, condensação (\*) e fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos (ponta de seta, >). Mitose. B. figuras de mitose típicas em NIC 3 (\*) HE, objetiva de 40x. Fonte: Fotos do autor

Os índices de apoptose obtidos, tanto na espessura total do epitélio, quanto nas camadas superior e inferior deste, foram crescentes ao longo do espectro das lesões intraepiteliais a partir da categoria cervicite. Assim, a apoptose foi mínima na cervicite ( $4,00 \pm 0,25$ ), menor na NIC 1 ( $5,47 \pm 0,36$ ), intermediária na NIC 2 ( $7,56 \pm 0,47$ ) e máxima na NIC 3 ( $10,68 \pm 0,42$ ). (Gráficos 1A, B, C).

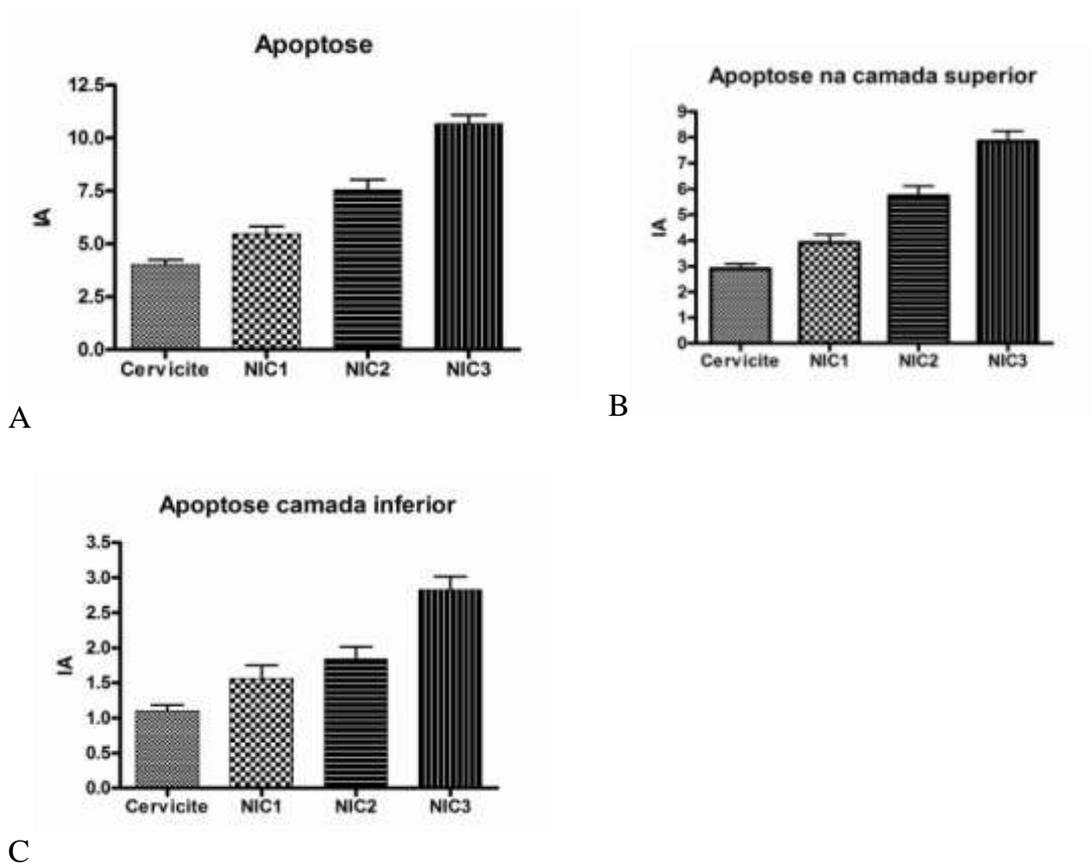


Gráfico 1. Apoptose crescente ao longo do espectro das lesões intraepiteliais a partir da categoria cervicite. A. total, B. camada superior, C. camada inferior. Fonte: Elaborado pelo autor

Na mucosa cervical do grupo cervicite, a apoptose ocorria de maneira pouco significativa, acometendo cerca de  $4,00 \pm 0,25\%$  das células. A maioria destas se localizava no extrato superior ( $2,90 \pm 0,19\%$  das células totais ou  $\pm 75\%$  das células em apoptose nesta categoria). Raras foram as células apoptóticas na camada inferior ( $1,10 \pm 0,08\%$  das células totais ou  $\pm 25\%$  das células em apoptose nesta categoria).

Lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (NIC 1) mostraram maiores índices apoptóticos ( $5,47 \pm 0,36\%$ ) que na cervicite, com  $p < 0,01$ . A maioria da apoptose na NIC 1 se localizavam no extrato superior ( $3,10 \pm 0,31\%$  das células totais ou  $\pm 72\%$  das células em apoptose nesta categoria). Menos frequentes foram as células apoptóticas na camada inferior ( $1,60 \pm 0,19\%$  das células totais ou  $\pm 28\%$  das células em apoptose nesta categoria).

Lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (NIC 2 e 3) possuem índices apoptóticos maiores ( $7,56 \pm 0,47$ ;  $10,68 \pm 0,42\%$ , respectivamente) que cervicite e NIC 1, com  $p < 0,001$ . A maioria da apoptose nas NIC 2 e 3 também se localizavam no extrato superior ( $5,72 \pm 0,40$ ;  $7,85 \pm 0,39\%$  das células totais ou  $75,66$  e  $73,50\%$  das células em apoptose respectivamente, nestas categorias). Menos frequentes foram as células apoptóticas na camada inferior ( $1,84 \pm 0,18$ ;  $2,83 \pm 0,19\%$  das células totais ou  $\pm 28,52\%$  das células em apoptose nesta categoria).

### 4.3 Índice mitótico

A frequência das figuras de mitose no epitélio cervical aumenta numericamente da cervicite para a NIC 3. A diferença na distribuição das figuras de mitose entre NIC 1 e NIC 2 é observada nas camadas superficiais do epitélio, vistas em NIC 2.

Figuras de mitose foram observadas em todas as categorias (Graf. 2A), porém são raras, típicas e basais (Graf. 2C) nos grupos cervicite e NIC 1 e frequentes, por vezes atípicas e encontradas comumente nos extratos epiteliais médio e superior (Graf. 2B) nas lesões intraepiteliais de alto grau, NIC 2 e 3. (Fig. 3B).

Na análise quantitativa (não paramétrica) observou-se baixos índices mitóticos nas categorias cervicite (Md=0,53) similares aos de NIC 1 (Md=0,66) com  $p > 0,05$ .

Por outro lado, NIC 2 e 3 possuem índices mitóticos mais elevados, sendo a mediana obtida para NIC 2 (Md=2,46) menor que a obtida para NIC 3 (Md=4,57) com  $p < 0,05$ . Tais

valores representam cerca de 4 a 7 vezes mais elevados quando comparados em conjunto com a categoria cervicite/NIC I.

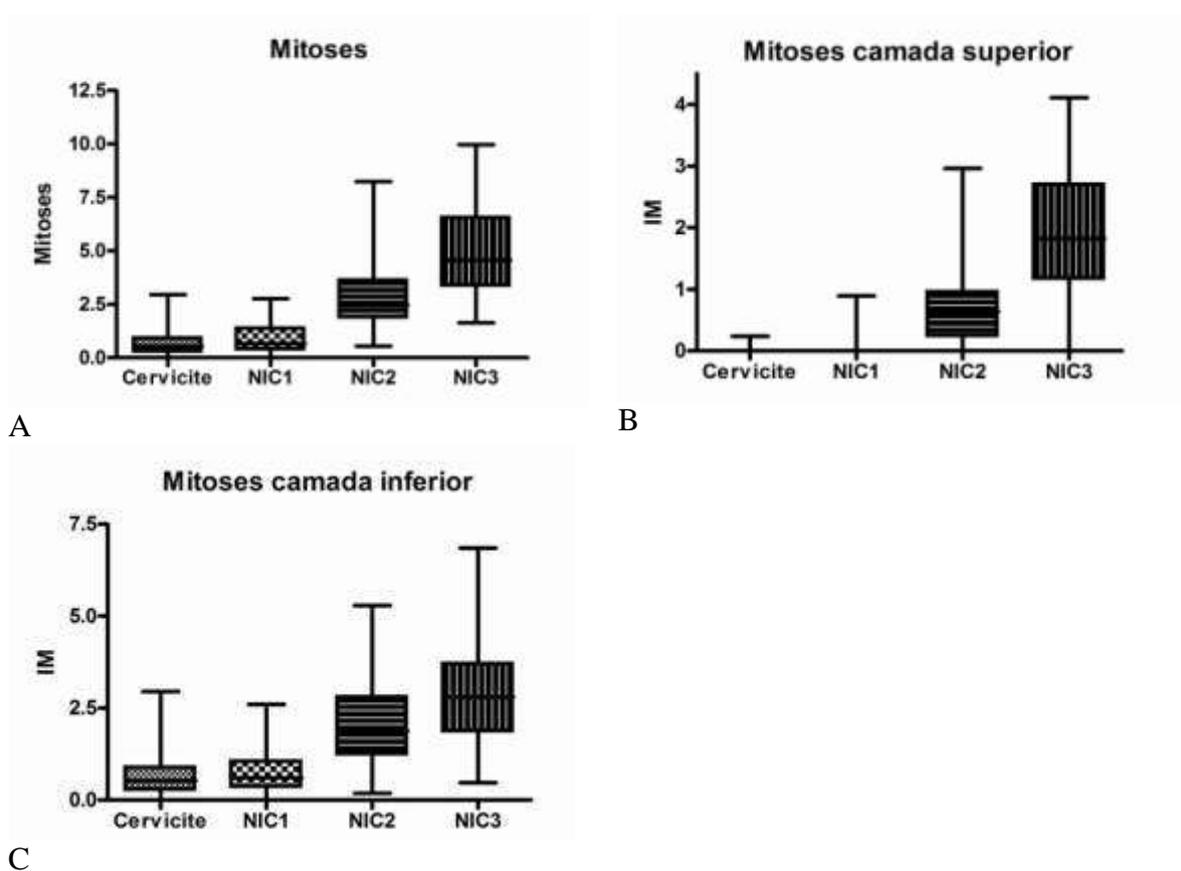


Gráfico 2. Mitose crescente ao longo do espectro das lesões intraepiteliais a partir da categoria cervicite. A. total, B. camada superior, C. camada inferior. Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.4 Células em interfase para o epitélio cervical na cervicite e nas NICs

Na mucosa cervical do grupo cervicite células em interfase correspondiam à grande maioria, sendo cerca de  $95,29 \pm 0,28\%$  das células. Na LIE de baixo grau (NIC 1) correspondiam a  $93,62 \pm 0,42\%$  enquanto nas LIE de alto grau (NIC 2 e 3) representavam respectivamente cerca de  $89,62 \pm 0,54$  e  $84,24 \pm 0,56\%$  das células (Graf. 3).

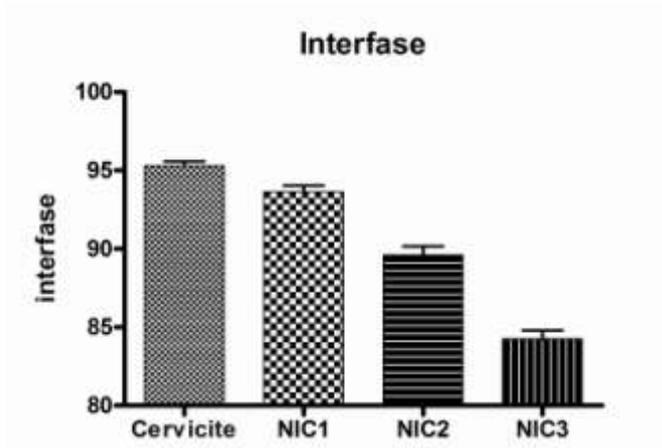
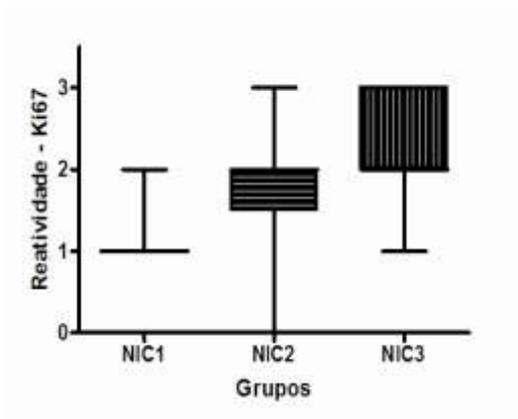


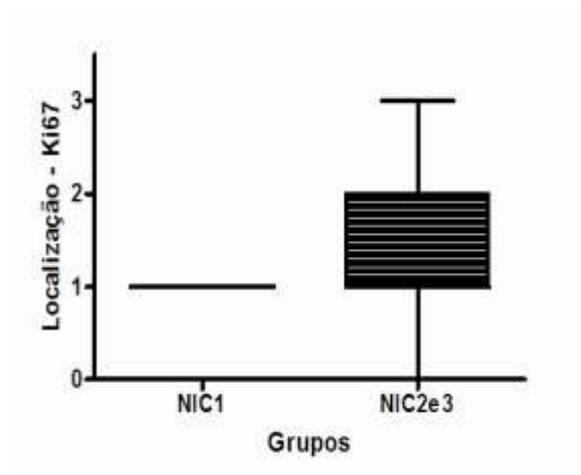
Gráfico 3. Porcentagem decrescente de células em interfase ao longo do espectro das lesões intraepiteliais a partir da categoria cervicite. Fonte: Elaborado pelo autor

## 4.5 Avaliação imunoistoquímica

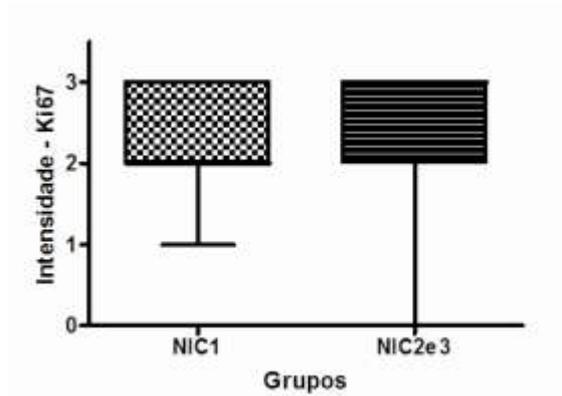
### 4.5.1 Ki-67: Reatividade, intensidade e localização das reações



A



B



C

Gráfico 4: Resultados da imunomarcção pelo Ki-67 : A- Reatividade. B- Localização. C- Intensidade. A- Reatividade (1, <20% de marcação; 2, entre 20 e 40% de marcação e 3, > 40% de marcação). B- Localização (1, na camada basal, 2, nas camadas basal e intermediária, e 3, em todo o epitélio). C- Intensidade (1, leve, 2, moderada, 3 acentuada). Fonte: Elaborado pelo autor

A imunomarcção do antígeno Ki-67 (variável ordinal nas três categorias: reatividade, localização e intensidade) foi avaliada pelo teste de Kruskal Wallis e de Múltipla comparação de Dunn e demonstrou diferenças entre as medianas obtidas para os grupos NIC 1, 2 e 3.

Assim, a reatividade encontrada foi maior nas lesões de alto grau, NIC 2 e 3 (Md=2), em comparação com as lesões de baixo grau, NIC 1 (Md=1), quando comparados ( $p < 0,001$ ) (Graf.4A).

Na localização das reações, o padrão de marcação pelo Ki-67 foi semelhante entre os grupos (Md=1), embora os achados em NIC 1 sejam homogêneos e de menor dispersão que NIC 2 e 3 (Graf. 4B).

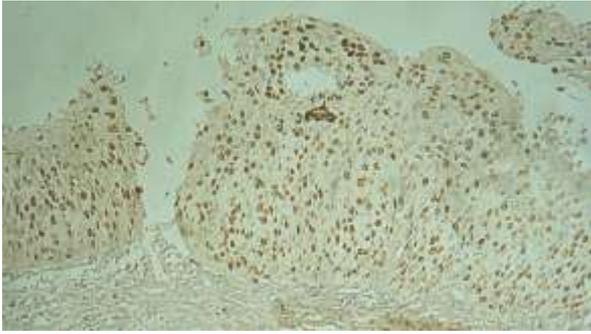
A intensidade das reações foi semelhante entre os grupos, tendo variado de moderada a acentuada (Gráfico 4C) (Fig. 4).



A



B



**C**

Figura 4: Expressão da imunomarcção pelo Ki-67. A- Cervicite: reatividade baixa, intensidade fraca e localização nas células do extrato basal do epitélio escamoso. B- NIC 2: reatividade acentuada, intensidade moderada e localização em toda espessura epitelial. C- NIC 3: reatividade acentuada, intensidade acentuada e localização em toda espessura epitelial. Ki-67, 40x (contracoloração com Hematoxilina). Fonte: Fotos do autor.

#### **4.5.2 Bcl-2: Reatividade, intensidade e localização das reações**

Processou-se a reação em 51 casos (15, cervicite; 13, NIC 1; 11, NIC 2, 12, NIC 3) que resultou em 42 casos negativos (82,35%) e 9 casos positivos (17,65%). Nos grupos cervicite e NIC 1, todos os casos foram negativos (n =28). A imunomarcção para o Bcl-2 foi positiva em 9 dos 23 casos restantes, sendo em 3 de 11 casos em NIC 2 (27,27%) e 6 de 12 casos em NIC 3 (50%).

Nos casos positivos (n=9), a localização se mostrou em células intermediárias em 4 (44,44%) e em 5 em todo epitélio (55,56%)(Fig. 5).

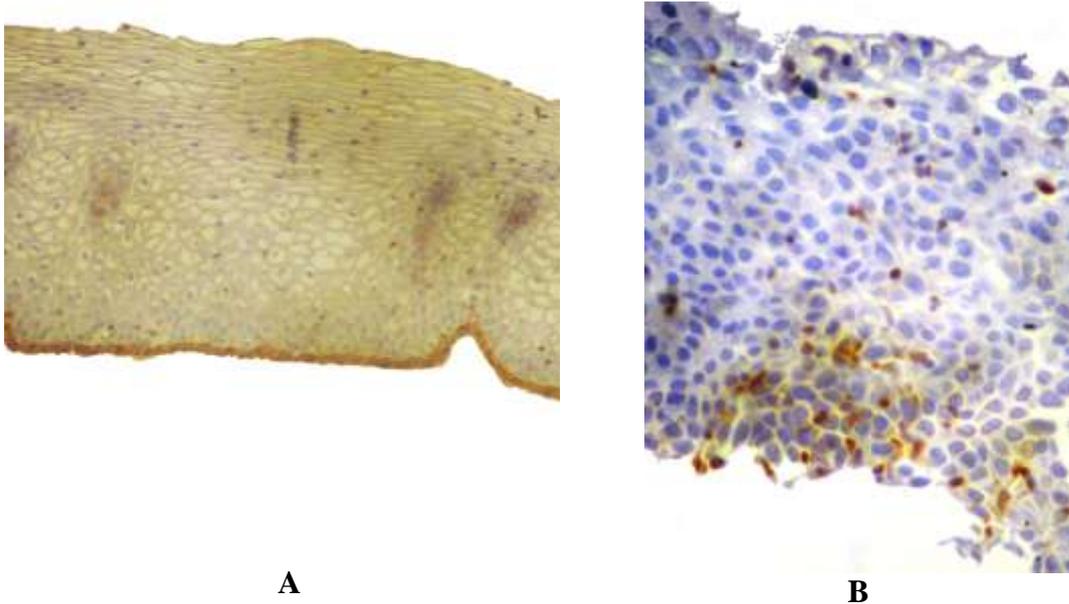


Figura 5: Expressão da imunomarcção pelo Bcl-2. A- Expressão de padrão basal encontrado na cervicite. Bcl-2, 40 x. B- Expressão em NIC 3, com detecção citoplasmática do antígeno. Bcl-2, 100 x (contracoloração com Hematoxilina). Fonte: Fotos do autor

#### 4.5.3 Bax:- *Reatividade, intensidade e localização das reações*

A imunomarcção do Bax (reatividade, localização e da intensidade da reação) foi analisada pelo teste de Mann Witney por se tratar de variável ordinal. A reatividade da reação em NIC 1 (Md=1) foi menor que nas lesões de alto grau, NIC 2 e 3 (Md=2)( $p=0,0088$ )(Graf. 5A).

A localização da reação variou entre as NIC, com a mediana menor em NIC 1 (Md=2) que NIC 2 e 3 (Md=2,5). Houve diferença estatisticamente significante entre NIC 1 e NIC 2 e entre NIC 1 e NIC 3 ( $p<0,05$ ). Não houve diferença significativa entre NIC 2 e NIC 3 ( $p>0,05$ )(Graf. 5B).

A intensidade da reação em NIC 1 (Md=1) foi menor que nas lesões de alto grau, NIC 2 e 3 (Md=2)( $p=0,0015$ )(Graf. 5C)(Fig.6).

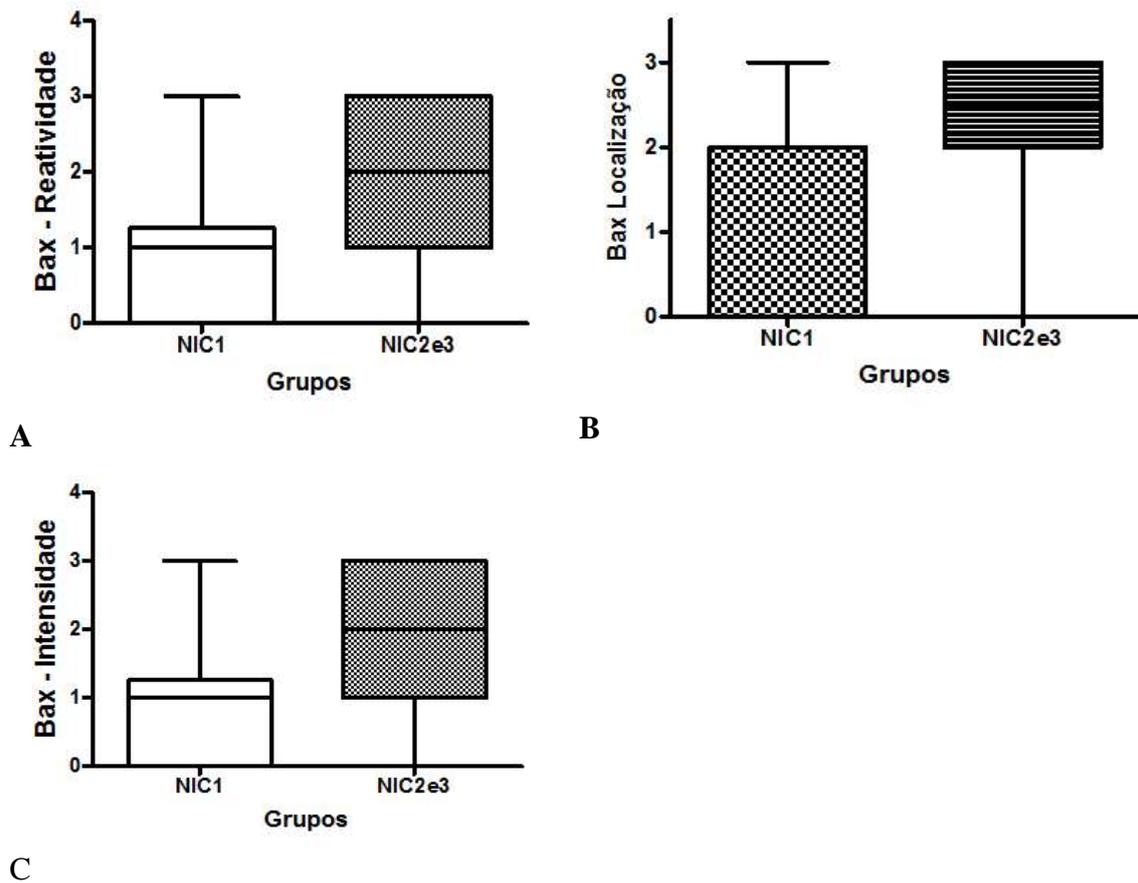
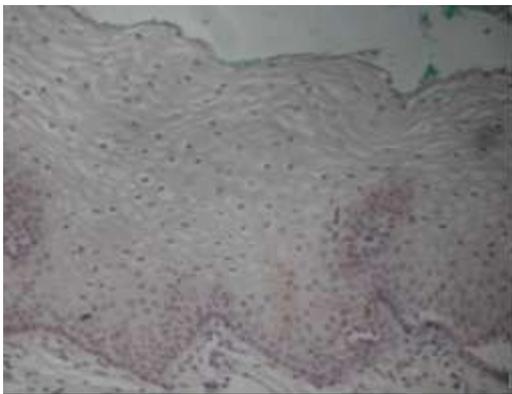
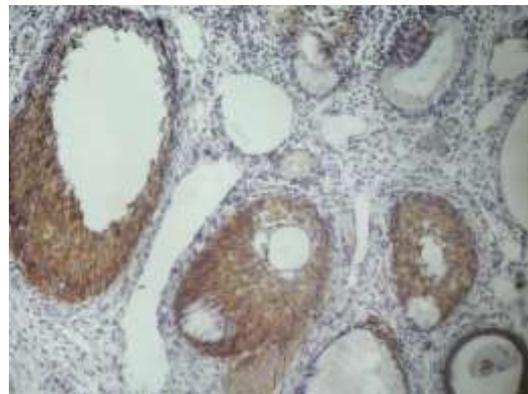


Gráfico 5: Resultados da imunomarcção pelo Bax : A- Reactividade (1, <10% de marcação; 2, entre 10 e 50% de marcação e 3, > 50% de marcação). B- Localização (1, na camada basal, 2, nas camadas basal e intermediária, e 3, em todo o epitélio). C- Intensidade (1, leve, 2, moderada, 3 acentuada). Fonte: Elaborado pelo autor



**A**



**B**

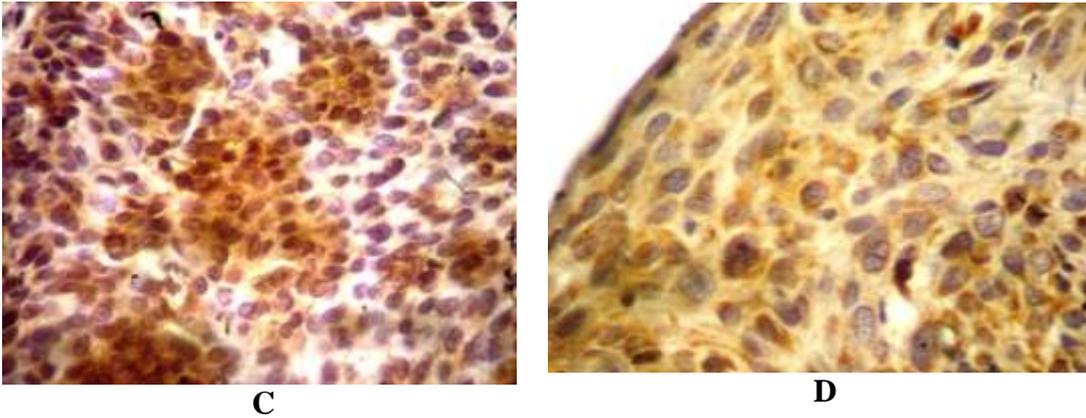


Figura 6: Expressão da imunomarcção pelo Bax. A- Ausência de expressão na cervicite. Bax, 40x. B- NIC 3: reatividade acentuada, intensidade acentuada e positividade em toda a espessura epitelial. Bax, 40x. C: Detalhe da marcação citoplasmática da reação. Bax, 100x. D: Detalhe do padrão citoplasmático granular da reação. Bax, 100x (contracoloração com Hematoxilina). Fonte: Fotos do autor

## 5 DISCUSSÃO

As neoplasias intraepiteliais aqui estudadas mostraram progressiva ausência de maturação, presença de coilócitos com halos perinucleares, hipercromasia e pleomorfismo nuclear, perda da polaridade, aumento da frequência e alterações no tipo das mitoses com binucleações, conforme já descrito na literatura (ANDERSON, 1991; GOMPEL; SILVERBERG, 1994; KURMAN, 1994).

A análise histológica aqui utilizada é empregada para diagnosticar as lesões pré-neoplásicas, prever seu comportamento e prognóstico e para controle de tratamento. Grau histológico e índice mitótico são parâmetros úteis (FELIX; WONG, 1994; LLEWELLYN, 2000; ROTELI-MARTINS et al., 2001).

Na casuística desta pesquisa, entraram somente aqueles espécimes que possuíram concordância diagnóstica e que preencheram, inicialmente, os critérios de inclusão adotados no trabalho. É relatada a variação intra e inter-observador das neoplasias intraepiteliais do colo uterino (ROTELI-MARTINS et al., 2001), sendo, pois, de excelente concordância o carcinoma invasivo, medianamente NIC 3 e pobre para NIC 2 e 1. Concordância intraobservador é consistentemente melhor em todas as categorias diagnósticas que as inter-observadores (ROTELI-MARTINS et al., 2001). Fatores associados com discordância são: hiperplasia de células basais, inflamação intensa e alterações floridas virais induzidas (ISMAIL et al., 1990).

Como forma de melhor avaliação da displasia leve, que possui maior discrepância inter-observador (ROTELI-MARTINS et al., 2001), utilizou-se critérios padrões, descritos em literatura (LOGANI et al., 2003): lesão com atipia coilocítica nas camadas superficiais do epitélio, perda da maturação com hipercromasia nuclear associada, pleomorfismo e adensamento celular confinado ao terço inferior do epitélio.

Os critérios morfológicos empregados para identificação e quantificação da apoptose - anoiquia, condensação e fragmentação nuclear e celular com formação de corpos apoptóticos - foram os descritos por Kerr et al. (1972) para a primeira caracterização e descrição do processo. Tais critérios morfológicos foram validados com os resultados da imunoistoquímica para Bax.

A apoptose foi mínima na cervicite, menor na NIC 1, intermediária na NIC 2 e máxima na NIC 3, atingindo, tanto na espessura total do epitélio, quanto nas camadas superior e inferior deste. Assim, os índices obtidos foram crescentes ao longo do espectro das lesões

intraepiteliais a partir da categoria cervicite. No entanto, a distribuição da apoptose nas camadas superior e inferior do epitélio não mostrou grandes oscilações mantendo a proporção.

Quando se compara a distribuição da apoptose obtida na morfometria para LIE-de alto grau com a LIE de baixo grau/ cervicite, observou-se que este índice é quase duas vezes superior nas LIE de alto grau, o que está consistente com os resultados da imunoistoquímica para Bax.

O aumento do índice apoptótico com o grau histológico sugere um mecanismo no qual a apoptose ajuda a eliminar células que proliferaram em excesso, desenvolveram imprópriamente, ou que mantiveram dano genético (WYLLIE, 1992; DEY et al., 2000; DUTTAGUPTA et al., 2001; CHEUNG et al., 2002; WALKER et al., 2005). O conceito que a apoptose participa da homeostasia na neoplasia não é recente (SARRAF; BOWEN, 1998) e a identificação da apoptose aumentada em processos pré-neoplásicos para lesões neoplásicas foi observada em outros tumores epiteliais humanos, incluindo fígado (COLUMBANO et al., 1984), próstata (AIHARA et al., 1994; BERGES et al., 1995) e também em carcinomas escamosos de outros sítios mucosos (EL-LABBAN e OSORIO-HERRERA, 1986). Claramente, o controle do número celular em epitélio em diferenciação é complexo e envolve fatores que influenciam tanto a habilidade da célula em se diferenciar quanto iniciar a morte celular via apoptose. A apoptose nas lesões virais induzidas se correlaciona com a atividade proliferativa face ao tipo HPV (baixo, intermediário e alto risco) (ISACSON et al., 1996).

O índice mitótico é de grande valia na análise da taxa de crescimento, entretanto, reflete apenas uma das variáveis em estudo do crescimento destas lesões (FELIX; WONG, 1994). O número de mitoses, a presença de mitoses atípicas e a localização das mitoses são particularmente utilizados como forma de graduar as lesões (MOURITS et al., 1992; ERHMANN, 1994; VAN LEEUWEN et al., 1995; STEINBECK, 2004). Em nosso estudo as mitoses ocorreram em todas as categorias, porém foram raras, típicas e basais nos grupos cervicite e NIC 1 e frequentes, por vezes atípicas e localizadas nos extratos epiteliais médio e superior nas lesões intraepiteliais de alto grau, NIC 2 e 3. No epitélio cervical sem lesão as figuras de mitose são raramente encontradas; quando presentes estão confinadas às camadas basais e não mostram atipias. Nas lesões intraepiteliais (NIC), as figuras de mitose ocorrem com maior frequência, são encontradas nas camadas suprabasais e podem ser mitoses atípicas (MOURITS et al., 1992; VAN LEEUWEN et al., 1995). Os baixos índices mitóticos nas categorias cervicite e de NIC 1 contrastaram com os obtidos para NIC 2 e 3, 4 a 7 vezes mais

elevados quando comparados em conjunto. Estas observações sugerem que as NIC's envolvem progressiva disfunção da atividade proliferativa das células epiteliais cervicais, no qual células em mitose são encontradas em níveis progressivamente maiores no epitélio em paralelismo com o grau de NIC (SHURBAJI et al., 1993; VAN LEEUWEN et al., 1995; DEY et al., 2000). Na distribuição das mitoses nas camadas superior e inferior ocorreram eventos nulos nas cervicites e NIC 1, o que era esperado pelos critérios de classificação das LIE. Tais eventos, no entanto, dificultaram a avaliação estatística, comprometendo inferências maiores nesta questão.

Os resultados histomorfométricos indicam que o processo normal de maturação do epitélio escamoso da cérvix está alterado na NIC, conforme evidenciado morfológicamente por alterações na celularidade, diferenciação, polaridade, características nucleares e atividade mitótica. Na NIC-1 (displasia leve), as alterações mais pronunciadas são vistas no terço basal do epitélio. Contudo, as células anormais estão presentes por toda a espessura do epitélio. Ocorre diferenciação citoplasmática substancial à medida que as células migram através dos dois terços superiores do epitélio, porém os núcleos dos níveis superiores ainda são morfológicamente anormais. Assim, as células descamadas podem ser detectadas como anormais nos esfregaços de Papanicolau. Na NIC-2 (displasia moderada), a maior parte das alterações celulares encontra-se nos terços inferior e médio do epitélio. Ocorre citodiferenciação nas células do terço superior, mas é menos intensa que na NIC-1. Na NIC-3 (displasia acentuada), as células no epitélio superficial (superiores) exibem alguma diferenciação, embora mínima (STEINBECK, 2004)

A avaliação combinada de células em apoptose, em mitose e em seu estado não replicativo indicam que lesões intraepiteliais de alto grau possuem maior grau de renovação celular em comparação ao grupo cervicite/NIC 1. Tanto os índices de proliferação quanto os apoptóticos aumentaram com o grau da lesão, por conseguinte, reduzindo a fração de células em interfase. A porcentagem de células em proliferação e em apoptose na cérvix normal diferiu significativamente em todas as lesões displásicas (DEY et al., 2000; FENG WEI et al., 2007). Os dados são corroborados na medida em que nas LIE-AG observa-se o fenômeno da imortalização celular, o que permite uma proliferação celular anárquica e autônoma, elevando, pois o índice mitótico (DUTTAGUPTA et al., 2001; FENG WEI et al., 2007). Por outro lado, a resposta do hospedeiro face ao controle do dano da lesão displásica se traduz em um aumento do índice apoptótico (DEY et al., 2000).

Nas lesões de baixo grau, a proliferação está raramente associada a apoptose mensurável. Estas lesões ainda retêm a capacidade substancial de diferenciação escamosa, na qual há um controle do número celular. Com o aumento do grau histológico, a capacidade de diferenciação é reduzida ou perdida, mas níveis mensuráveis de apoptose são identificados (DEY et al., 2000; DUTTAGUPTA et al., 2001; WALKER et al., 2005). Múltiplas vias de morte celular no epitélio escamoso são descritas em estudos de cultivo celular. O fator de crescimento  $\beta$  de transformação estimula a apoptose em células imortalizadas HPV-16 positivas, pela indução da fibronectina e transglutaminase tecidual ao invés de transglutaminase epidérmica, diminuindo a diferenciação celular do epitélio escamoso (RORKE; JACOBBERGER, 1995).

Na análise imunistoquímica para Ki-67 consideraram-se a porcentagem, a distribuição das células que expressam o antígeno Ki-67 e a intensidade da reação, ao invés da mera constatação, por si só, da presença ou ausência da reação.

Na reatividade da reação, os resultados mostram níveis crescentes de células marcadas pelo Ki-67 em associação com o grau da displasia e guarda relação com o índice mitótico obtido na histologia. Assim, todas as alterações displásicas no epitélio cervical foram acompanhadas de um aumento da atividade proliferativa. Uma correlação positiva significativa foi encontrada entre o grau da NIC e a análise semi-quantitativa do grau do antígeno de proliferação nuclear, APN, baseado no maior nível em que as células positivas são vistas no epitélio (SHURBAJI et al., 1993; LEE et al., 2002). O índice mitótico, variando de nulo a acentuado, foi altamente correlacionado ao grau histomorfológico da NIC (BULTEN et al., 1996). Já na cervicite, a reatividade foi mínima ou nula. Constatou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos NIC 1 e NIC 2 e entre NIC 1 e NIC 3. Entretanto, não houve diferença estatística na comparação entre os grupos NIC 2 e NIC 3. LIE-AG's (NIC 2 e 3), analisados como um único grupo mostram índices mitóticos elevados, estatisticamente significantes na comparação com os grupos cervicite e NIC 1, em consonância dos dados morfométricos. Nas lesões NIC 2 e 3, os índices do Ki-67 foram moderado e acentuado, respectivamente e divergem, em contrapartida, significativamente de NIC 1, que possui índices menores (baixo/moderado). Tais dados encontram respaldo na literatura. Níveis elevados como estes são mais frequentemente observados em tumores malignos com elevado índice proliferativo (GERDES et al., 1984; KUENEN-BOUMEESTER, et al., 1991). A frequência e a distribuição da marcação do Ki-67 pode também distinguir epitélio não neoplásico de lesões intraepiteliais (CRUM, 1999). Em NIC

3, a fração de células que expressam o antígeno Ki-67 foi aproximadamente 40 % e 2 a 5 vezes maior que as lesões de NIC 1. Frações de células que expressam o Ki-67 excedendo 25% foram exclusivamente encontradas nas lesões de NIC 2 e 3 (CRUM, 1999; FENG WEI et al., 2007).

A alta atividade proliferativa das NIC é controlada por genes e/ou proteínas. Os mecanismos de controle para prevenir a progressão da NIC para o carcinoma invasivo já foi elucidado em outros estudos. Isto presumivelmente reflete um aumento no número de células que estão no ciclo celular, devido à perda dos mecanismos de controle celular normal, tais como a inativação das funções de genes supressores tumorais (ex. p53 e p105Rb) (ANDERSON, 1991; FELIX; WONG, 1994). A imunomarcagem pelo Ki-67 é um meio fácil para se estudar o índice de proliferação celular no câncer cervical (FELIX; WONG, 1994). A expressão do Ki-67 apresenta grande associação com diagnósticos histológicos e da progressão da displasia de baixo para alto grau (QUEIROZ et al., 2006). O Ki-67 é um marcador útil em identificar lesões intraepiteliais de baixo grau e na verificação de diagnóstico nos casos equívocos (ISACSON et al., 1996; XUE et al., 1999, MIMICA, 2010).

Portanto, para efeitos diagnósticos, infere-se que a variável “reatividade” pode ser útil no esclarecimento de lesões onde paira dúvida da presença ou não de displasia e, quando presente, se a lesão é de baixo ou alto grau. Isto tem efeitos importantes na terapêutica *a posteriori* (tratamento expectante ou conservador nas lesões de baixo grau e tratamento excisional cirúrgico nas lesões de alto grau).

No epitélio da cervicite, a marcação para o antígeno Ki-67 foi encontrada exclusivamente nas células parabasais e basais. Estas observações são consistentes com estudos prévios de marcação para Ki-67 em epitélio cervical normal, no qual constatam que as células parabasais são as principais fontes de renovação celular no epitélio escamoso ectocervical e que as células basais funcionam como células de reserva (KONISHI et al., 1991; MITTAL et al., 1993; ISACSON et al., 1996; MITTAL et al., 1998; MITTAL; PALAZZO, 1998; ZANOTTI, et al., 2003). Nestes casos de cervicite, linfócitos intraepiteliais Ki-67 positivos podem estar presentes na espessura epitelial. O exame cuidadoso ao grande aumento auxilia a identificar que estas células são não-epiteliais (PIROG et al., 2002).

Popiolek (2004) e Mimica (2010) constataram a expressão aumentada do antígeno Ki-67 nos casos de coilocitose e NIC, progressivamente maior nas camadas mais altas do epitélio de acordo com o grau da NIC. No presente estudo, a maior marcação em NIC 1 foi observada no terço médio do epitélio; nas lesões de alto grau, NIC 2 e 3, no terço superior do epitélio

(camada superficial) ou mesmo todo o epitélio. Lorenzato et al. (2005) relatam que a presença de células Ki-67 positivas nos 2/3 superiores do epitélio é um método muito acurado para se detectar lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL), com sensibilidade de 100%, mas possui baixa especificidade. Em estudo semelhante, Popiolek (2004) e Mimica (2010) também mostram que Ki-67 melhora a sensibilidade do diagnóstico das lesões intraepiteliais de alto grau. Assim, a localização das células em proliferação guarda elevada correlação com o grau histomorfológico das alterações displásicas (XUE et al., 1999; POPIOLEK et al., 2004). Desta forma, na neoplasia intra-epitelial, células Ki-67 positivas aumentam progressivamente em quantidade no interior do epitélio à medida que se aumenta o grau lesional. A literatura é concordante neste quesito, ao mostrar que o padrão de imunomarcagem das lesões escamosas intraepiteliais difere significativamente do epitélio escamoso cervical. Nas lesões intraepiteliais, a expressão de Ki-67 é aumentada nas áreas parabasais com extensão de células positivas nas camadas intermediárias e superficiais (AL-SALEH et al., 1995; ISACSON et al., 1996; MITTAL et al., 1998; MITTAL; PALAZZO, 1998; GENG et al., 1999; ZANOTTI et al., 2003).

Portanto, a variável “localização” na imunistoquímica para Ki-67 é um recurso útil para dicotomizar as lesões de baixo e alto graus (XUE et al., 1999; POPIOLEK et al., 2004, MIMICA, 2010), fato que tem repercussões práticas no prognóstico/evolução da lesão e na terapêutica. Para Kruse et al. (2004) e Baak et al. (2005), o antígeno Ki-67 é capaz de prever a progressão nas lesões intraepiteliais graus 1 e 2. A imunistoquímica para Ki-67 tem um valor potencial na graduação da NIC e distinção com as lesões não neoplásicas que as mimetizam. A positividade para o Ki-67 também está associada à detecção do HPV, tanto em lesões cervicais quanto vulvares com elevada sensibilidade e especificidade (PIROG et al., 2000; LOGANI et al., 2001). Entretanto, células Ki-67 positivas podem estar presentes no extrato superior de epitélios com metaplasia escamosa ou em áreas de erosão (reparo); nestas circunstâncias podem não estar associados à presença do HPV e em situações onde há a perda da maturação escamosa normal (PIROG et al., 2002).

De forma diversa às duas variáveis já citadas (localização e reatividade), já muito estudadas nas lesões do colo uterino, os dados deste estudo inovam ao avaliar a intensidade da reação como variável independente. É entretanto importante ressaltar que a intensidade da reação no processo imunistoquímico é uma variável sujeita às condições de fixação do espécime e à reativação antigênica. Neste estudo, isto foi considerado e procedeu-se à uniformização de ambos fatores pré-analíticos.

A marcação nuclear pelo Ki-67 se apresentou, na maioria dos casos, de moderada a acentuada em todas as displasias e leve/nula nas cervicites. Assim, não se observou diferença estatística entre os grupos das displasias. Isto vem demonstrar que no estudo das displasias do colo uterino, a intensidade da reação pelo Ki-67 se presta para esclarecimento diagnóstico nas lesões em que paira a dúvida da presença de displasia *versus* cervicite, notadamente entre displasia leve e cervicite (atipias celulares inflamatórias da cervicite).

A expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 pode efetivamente ser um método histológico diagnóstico nos casos difíceis nos quais o epitélio escamoso atrófico e reativo deve ser diferenciado de displasia e carcinoma invasivo (MITTAL et al., 1999; KRUSE et al., 2001; FENG WEI et al., 2007; KALOF; COOPER, 2007).

Quanto à imunorreatividade pelo Bax, o padrão granular de reação é detectado nas displasias em confronto com o epitélio cervical normal (SAEGUSA et al., 1995). Nossos resultados mostram que não houve diferença significativa entre as displasias no que se refere à reatividade da reação, similar ao relatado por Aletra et al. (2000). O que se notou foi diferença estatística significativa entre o grupo cervicite e os de lesões de alto grau (NIC 2 e NIC 3), sustentado pela avaliação morfométrica do índice apoptótico, uma vez que não se encontrou apoptose significativa na primeira categoria. Não houve diferença entre cervicite e NIC 1 e este parâmetro apenas dicotomiza a cervicite das lesões de alto grau.

Estudo semelhante foi realizado comparando a displasia acentuada/carcinoma *in situ* e o carcinoma invasor, sendo encontrada reatividade citoplasmática forte em 21,7% das displasias acentuadas e 71,4% dos carcinomas invasivos. Reatividade moderada em 26% dos casos de displasia acentuada; baixa expressão em 43,4% das displasias acentuadas e 14,3% dos carcinomas invasivos e, finalmente, 8,7 % das displasias acentuadas e 14,3 % dos carcinomas invasivos não reagiram ao Bax (GIARNIERI et al., 2000). Tais achados, entretanto, são controversos. É relatada a redução da expressão do Bax no carcinoma face ao NIC 3 (SAEGUSA et al., 1995). Isto parece indicar que a apoptose esteja diminuída no carcinoma (SHEETS et al., 1996) e que a maquinaria apoptótica tenha ficado defectiva ao longo do processo de transformação maligna para conferir vantagens para a sobrevivência da neoplasia. Estas células tumorais com disfunção do maquinário apoptótico podem ter sido selecionadas para propagar-se em um ambiente de hipóxia enquanto o tumor se propaga. (CHEUNG et al., 2002).

No que se refere à variável localização da reação com o Bax, os resultados indicam diferença estatisticamente significativa entre NIC 1 e NIC 2 e 3. Tal diferença não foi

observada entre NIC 2 e NIC 3. Ao compararmos a lesão de baixo grau, NIC 1 e as de alto grau (NIC 2 e NIC 3), observa-se diferença estatisticamente significativa. Assim, a localização das células em apoptose marcadas pelo Bax guarda elevada correlação com o grau histomorfológico das alterações displásicas. Desta forma, na neoplasia intraepitelial, células Bax positivas aumentam progressivamente em quantidade no interior do epitélio à medida que se aumenta o grau lesional. O aumento da atividade apoptótica se dá em resposta ao crescente acúmulo de dano genético nas células displásicas (CHEUNG et al., 2002). Portanto, a variável “localização” na imunoistoquímica para Bax é também útil para diferenciar lesões de baixo e alto graus, o que demonstra importante suporte prático nos casos duvidosos à histologia e repercussões práticas no prognóstico/evolução da lesão e na terapêutica. Por outro lado, a redução na expressão do Bax nos carcinomas indica que o mecanismo apoptótico tenha ficado defectivo no processo de transformação maligna (CHEUNG et al., 2002).

Quanto à variável intensidade da reação com o Bax, nossos resultados mostram diferença estatisticamente significativa entre os grupos NIC 1 e NIC 2 e 3, o mesmo não ocorrendo entre NIC 2 e NIC 3. Assim, lesões de baixo grau apresentam intensidade leve, enquanto lesões de alto grau apresentam intensidade moderada. Tais achados demonstram que as lesões de alto grau são semelhantes entre si no que se refere à resposta do hospedeiro por meio da apoptose face ao agente viral e que este índice diverge significativamente das lesões de baixo grau e cervicite. A literatura reforça tal achado já que a reação é detectada nas displasias em confronto com o epitélio cervical normal (SAEGUSA et al., 1995; CHEAH; MENG, 2006).

A expressão do Bcl-2 nos grupos cervicite e NIC 1 ocorreu nas células-reserva do extrato parabasal. Estes achados concordam com estudos de Harmsel et al. (1996) e Cheah e Meng (2006). Esta expressão reflete a função germinativa deste compartimento. Aparentemente, Bcl-2 é requerido para proteção destas células germinativas, a fim de que se mantenha a homeostasia epitelial. Adicionalmente, as displasias de alto grau, NIC 2 e 3, mostraram aumento progressivo da reação intraepitelial ao Bcl-2, concordando com Harmsel et al. (1996), Dellas et al. (1997), Smedts et al., (1997), Grace et al (2003), Fonseca-Moutinho et al. (2004), Cheah e Meng, (2006) e Looi et al., (2008). Saegusa et al.(1995) propõe que a superexpressão do Bcl-2 no NIC 3 ocorra precocemente na carcinogênese e que se deva à perda da diferenciação celular, considerando que a inibição da apoptose pelo Bcl-2 induz instabilidade gênica por interferir no reparo do DNA, propiciando alterações genéticas

necessárias para a progressão tumoral. Bcl-2 estaria intimamente envolvido na sequência neoplásica cervical, agindo como co-fator na transformação maligna.

A progressão tumoral está associada com o equilíbrio entre a morte e a proliferação celular e o processo apoptótico tem importante papel nesta evolução. Membros da família gênica que incluem o Bcl-2 e o Bax estão envolvidos no controle da apoptose de uma extensa variedade de tipos celulares. Devido ao fato do Bax induzir a apoptose e do Bcl-2 atuar na sobrevivência celular, é aceito que o Bcl-2 e outros membros da família compitam para inativar o ligante Bax (SEDLACK et al., 1995). É também aceito que o prolongamento da sobrevivência celular com a inibição da apoptose esteja associada à carcinogênese (GIARNIERI et al., 2000). Todavia, a redução da expressão do Bcl-2 não necessariamente traduz um aumento da apoptose, porque outros fatores que controlam o mecanismo apoptótico podem estar alterados (CHEUNG et al., 2002, FENG WEI et al., 2007). Desta forma não há necessariamente uma correlação do Bcl-2 com o Bax (SAEGUSA et al., 1995, GIARNIERI et al., 2000).

As duas abordagens empregadas em nosso estudo, histomorfométrica e imunoistoquímica, avaliam o mesmo processo patológico, porém com níveis de resolução diferentes. A primeira constata alterações no plano de resolução tissular consolidadas na célula, sendo que as alterações morfológicas são observadas e quantificadas à microscopia óptica. A segunda, por conseguinte, constata alterações na expressão antigênica, de forma mais precoce que o dano celular e tissular, sustentando os resultados vistos à microscopia óptica.

A partir das duas abordagens constatou-se a ocorrência de apoptose e mitose nos grupos cervicite e neoplasia intraepitelial. Tanto apoptose quanto mitose estão diretamente relacionadas ao aumento do grau de displasia. O evento displásico é dinâmico, e representa um processo patológico com níveis crescentes de renovação celular, também diretamente proporcional ao grau de displasia. O epitélio escamoso local não está em estado de senescência.

Comparando os resultados das duas abordagens, de naturezas diferentes (quantitativa e semiquantitativa), mas enfocando em essência os mesmos processos, é compreensível alguma discrepância entre os índices morfométricos e de marcação imunoistoquímica. Entretanto, vistos por uma perspectiva mais ampla, os resultados da morfometria são sustentados pela imunoistoquímica. Assim, os índices apoptótico e mitótico mostram um mesmo padrão de resposta com a marcação imunoistoquímica para Bax, Bcl-2 e Ki-67, consoante ao

entendimento que níveis de resolução cada vez menores são capazes de captar alterações celulares mais precoces.

Além disso, é importante ressaltar que os níveis de expressão do Ki-67 nem sempre encontram paralelismo com os do Bcl-2, o que indica que a atividade proliferativa e apoptose são fatores independentes para a manutenção da displasia. Nos casos em que ambos os marcadores são intensamente expressos, a proteção contra a morte celular via apoptose possui um efeito sinérgico na acumulação de células displásicas.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados sustentam a teoria de que a neoplasia intraepitelial cervical envolve uma progressiva disfunção da renovação cervical (proliferação e morte celular) e suportam as seguintes inferências:

O emprego dos marcadores Ki-67, Bax e Bcl-2, em combinação com a análise de imagens, oferece uma alternativa promissora para a classificação das alterações displásicas no epitélio cervical, além de esclarecimentos diagnósticos, de forma objetiva, reprodutível e confiável.

A histomorfometria e a imunistoquímica, apesar de envolverem análises diferentes (quantitativa e semiquantitativa), enfocam em essência os mesmos processos, que vistos por uma perspectiva mais ampla, mostram resultados similares. Assim, os índices apoptótico e mitótico apresentam um mesmo padrão de resposta que a marcação imunistoquímica para Bax, Bcl-2 e Ki-67.

As células em interfase decrescem ao longo do espectro das lesões intraepiteliais a partir da categoria cervicite.

A imunistoquímica para Ki-67, Bax e Bcl-2 é ferramenta importante no estudo das lesões do colo uterino, proporcionando diagnóstico mais preciso, especialmente naquelas lesões duvidosas à histologia convencional, o que repercute no prognóstico e na terapêutica das pacientes.

Os parâmetros reatividade, localização e intensidade da reação para o Ki-67 são úteis para a avaliação da presença ou não de displasia. Na presença de displasia, apenas os parâmetros reatividade e localização são capazes de diferenciar lesões de baixo e alto grau.

Os parâmetros localização e intensidade da reação para o Bax são capazes de diferenciar lesões de baixo e alto grau; já a reatividade é capaz de dicotomizar lesões de alto grau com a cervicite.

A expressão do Bcl-2 se eleva com a gravidade da displasia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J. M., CORY, S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. **Science**, v. 81, p. 1322-6, 1996.
- AIHARA, M. et al. Frequency of apoptotic bodies positively correlates with Gleason grade in prostate cancer. **Hum Pathol.**, v. 25, p. 797-801, 1994.
- ALANI, R. M., MUNGER, K. Human papillomaviruses and associated malignancies. **J Clin Oncol.**, v. 16, p. 330-7, 1998.
- ALBERTS, B, JOHNSON, A, LEWIS, J, RAFF, M, ROBERTS, K, WALTER P. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. New York: Garland Science; 2002.
- ALETRA, C. et al. Expression of bcl-2 and bax in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 21, n. 5, p. 494-8, 2000.
- ALI-FEHMI, R., F. QURESHI, et al. "Apoptosis, proliferation, and expression of p53 and bcl-2 in endocervical glandular intraepithelial lesions and invasive endocervical adenocarcinoma." **Int J Gynecol Pathol** v.23, n1. p.1-6. 2004.
- AL-SALEH, W. et al. Assessment of Ki-67 antigen immunostaining in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 104, p. 154-60, 1995.
- ANDERSON, M. C. Female reproductive system. In: **Systemic Pathology**. 3. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1991. p. 93-6.
- ANDERSON, S. M. et al. Distribution of human papillomavirus types in genital lesions from two temporally distinct populations determined by in situ hybridization. **Hum Pathol**, v.24, p. 547-53, 1993.
- AUBELE, M. et al. Guidelines of AgNOR Quantification. **Zentralblatt Pathol.**, v. 140, n.1, p.107-8. 1994.
- BAAK, J. P. A. et al. Predictive testing of early CIN behaviour by molecular biomarkers. **Cell Oncol**, n. 27, p. 277-280, 2005.
- BERGES, R. R. et al. Implications of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. **Clin Cancer Res.**, v. 1, p. 473-80, 1995.
- BOSCH, F. X. et al. HPV and cervical cancer: screening ou vaccination? **Brit J Cancer** v. 98, p. 15-21, 2008.
- BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol** v. 55, p. 244-65, 2002.
- BOSCH, F.X. et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **J Natl Cancer Inst** v. 87, p. 796-802, 1995.

BRANCA, M. et al. p16 expression is related to grade of CIN an high-risk Human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome. **Int. J. Ginecol Pathol**, v.23, p354-65. 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009. 98 p

BULTEN, J. et al. MIB1, a promising marker for the classification of cervical intraepithelial neoplasia. **J Pathol.**, v.178, n.3, p.268-73. 1996.

CABIBI, D., L. Giovannelli, et al. "Predictive role of histological features and Ki67 pattern on high-risk HPV presence in atypical cervical lesions." **Histopathol.** v.51, n.5, p. 713-6. 2007.

CAMPOS, L. et al. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. **Blood**, v. 81, p. 3091-6, 1993.

CHANG, H.Y., YANG, Y. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.64, n. 4, p. 821-46, 2000.

CASTLE, P. E. et al Human papillomavirus type 16 infections and 2 year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. **J Natl Cancer Inst** , v. 97, p. 1066-71, 2005.

CATTONETTI, G. et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed, formalin-fixed paraffin sections. **J Pathol.**, v. 168, p.357-63, 1992.

CHEAH, P., MENG, L. Significance of Bcl-2 and Bax proteins in cervical carcinogenesis: an immunohistochemical study in squamous cell carcinoma and squamous intraepithelial lesions. **Malaysian J Pathol.**, v. 28, n. 1, p. 1-5, 2006.

CHEUNG, T. K. et al. Apoptosis-Related Proteins in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Squamous Cell Carcinoma of the Cervix. **Gynecol Oncol**, v. 86 ,n. 1, p. 14-8, 2002.

COGLIANO, V. et al. WHO International Agency for Research on Cancer. Carcinogenicity of human papillomaviruses. **Lancet Oncol**, v. 6, p. 204, 2005.

COLLADO, M. et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. **Nature**, v. 436, p. 642, 2005.

COLUMBANO, A. et al. Occurrence of cell death (apoptosis) in preneoplastic and neoplastic liver cells: a sequential study. **Am J Pathol.**, v. 116, p. 441-6, 1984.

CONCEIÇÃO SILVA, F. et al. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. **Eur. J. Immunol.**, v. 1, n. 28, p. 237-45, 1998.

CRUM, C. P. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host, and the stem cell. **Mod Pathol**, v. 13, n. 3, p. 243-51, 2000.

CRUM, C. P., Genest DR, Krane JF, Hogan C, Sun D, Bellerose B, Kostopoulou E, Lee KR. Subclassifying atypical squamous cells in thin-Prep cervical cytology correlates with detection of high-risk human papillomavirus DNA. **Am J Clin Pathol**. v. 112, n.3 p.384-90. 1999

CRUM, C. P., et al. Cervical papillomaviruses segregate within morphologically distinct precancerous lesions. **J Virol**; v. 54 p.675-81. 1985.

CULLEN, A. P. et al. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNA's in intraepithelial and invasive cervical neoplasms. **J Virol.**, v. 65, p. 606-12, 1991.

DAS, M. et al. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes . **J. Cell Sci.**, v.114, (Pt 13), p.2461-69, 2001.

DEY, P., DAS, R., SABUDDIN. Correlations between apoptotic and proliferative indices in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Indian J Pathol Microbiol**, v. 43, n. 3, p. 271-5, 2000.

DELLAS, A. et al. Investigation of the Bcl-2 and C-myc Expression in Relationship to the Ki-67 Labelling Index in Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Int J Gynecol Pathol.**, v. 16, p. 212-8, 1997.

DIMITRAKAKIS, C. et al. The possible role of p53 and bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. **Gynecol Oncol.**, v. 77, p. 129-36, 2000.

DUTTAGUPTA, C. et al. Apoptotic changes in cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecol Obstet Invest**, v. 52, n.1, p. 38-42, 2001.

EL-LABAN, N. G., OSORIO-HERRERA, E. Apoptotic bodies and abnormally dividing epithelial cells in squamous cell carcinoma. **Histopathol**, v. 10, p. 921-31, 1986.

ERHMANN, R. L. **Benign to Malignant Progression in Cervical Squamous Epithelium**. New York: Igaka-Sohoin, p. 36-9, 1994.

FELDMANN, G. et al. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. **Hepatology**, v. 31, p. 674-83, 2000.

FELIX, W., WONG, S. Immunohistochemical Detection of Proliferating Tumor Cells in Cervical Cancer Using Monoclonal Antibody Ki-67. **Gynecol Obstet Invest**; v.37 p.123-6. 1994

FENG WEI et al. Senescence and apoptosis in carcinogenesis of cervical squamous carcinoma. **Modern Pathology**, v. 20, p. 961-6, 2007.

FERENCZY, A., WRIGHT, T. C. **Anatomy and histology of the cervix.** In: KURMAN R. J. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract.* New York, Springer-Verlag, 1994, p. 185-201.

FONSECA-MOUTINHO, J. A. et al. Estrogen receptor, progesterone receptor and bcl-2 are markers with prognostic significance in CIN III. **Int J Gynecol Cancer**, v. 14, n. 5, p. 911-20, 2004.

GENG, L. et al. Atypical immature metaplasia (AIM) of the cervix: is it related to high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL)? **Human Pathol.**, v. 30, p. 345-51, 1999.

GERDES, J. et al. Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody ki-67. **Hematol Oncol.**, v. 2, p. 365-71, 1984.

GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody ki-67. **J Immunol.**, v. 133, p. 1710-5, 1984.

GERDES, J. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer**, v. 31, p. 13-20, 1983.

GIARNIERI, E. et al. Msh2, Mib1, Fhit, p53, Bcl-2, and Bax Expression in Invasive and *in situ* Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 3600, p. 3600-6, 2000.

GIRALDO, P. C. et al. Neoplasia Intra-Epitelial Cervical: Estudo de p16 como Fator Prognóstico e suas Correlações com p53 e MIB-1 em Lesões de Baixo Grau Positivas. **NewsLab**, v. 78 Out/Nov, p. 100-109, 2006.

GOMPEL, C., SILVERBERG, S. G. **Pathology in Gynecology and Obstetrics.** 4. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1994, p. 113-5.

GRACE, V.M. et al. Co-expression of p53 and Bcl-2 proteins in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Gynecol Oncol**, v.91, n.1, p. 51-8, 2003.

GREEN, J. et al. Risk factors for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix in women aged 20-44 years: the UK National Case-Control Study of Cervical Cancer. **Brit J Cancer**, v. 89, p. 2078-86, 2003.

HARADA, H., GRANT, S. Apoptosis regulators. **Rev Clin Exp Hematol**, v. 7, n. 2, p. 117-38, 2003.

HARALAMBIEVA, E. et al. Clinical, immunophenotypic, and genetic analysis of adult lymphomas with morphologic features of Burkitt lymphoma. **Am J Surg Pathol.**, v. 29, p. 1086-94, 2005

HARMSEL, B. T. et al. Bcl-2 immunoreactivity increases with severity of CIN: a study of normal cervical epithelia, CIN, and cervical carcinoma. **J Pathol**, v. 179, n. 1, p. 26-30. 1996.

HESELMAYER, K. et al. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 93, p. 479-84, 1996.

HOCKENBERY, D. et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature**, v. 348, p. 334-6, 1990.

HOCKENBERY, D. The Bcl-2 oncogene and apoptosis. **Semin Immunol.**, v. 4, p. 413-20, 1992.

HUANG, Y- K. et al. Long-term outcomes of high-risk human papillomavirus infection support a long interval of cervical cancer screening. **Brit J Cancer**, v. 98, p. 863-9, 2008.

HUANG, F. P. et al. Mice defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania major* despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production. **J Immunol.**, v. 160, n. 9, p. 4143-7, 1998.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Vol 64, Human Papillomaviruses.** Lyon: IARC, 1995.

ISACSON, C. et al. Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papillomavirus type. **Cancer Res**, v. 56, p. 669-74, 1996.

ISMAIL, S. M. et al. Reporting cervical intra-epithelial neoplasia (CIN): intra- and interpathologist variation and factors associated with disagreement. **Histopathol**, v. 16, p. 371-6, 1990.

ISMAIL, S. M. et al. Observer variation in histopathological diagnoses in grading of cervical intraepithelial neoplasia. **BMJ**, v. 298, p. 707-10, 1989.

JAN, M. et al. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**, v.189, p. 12-9, 1999.

JOENSUU, N. et al. Bcl-2 protein expression and long term survival in breast cancer. **Am. J. Pathol.**, v. 145, p. 1191-8, 1994.

KERR, J. F. R. Definition of apoptosis and overview of its incidence. In: LAVIN, M.; WATTERS, D. **Programmed cell death: the cellular and molecular biology of apoptosis.** Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993, p. 1-15.

KERR, J. F. R.; SEARLE, J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figure. **J. Pathol.**, v. 107, p. 41-4, 1972.

KERR, J. F. R. et al. Apoptosis: A basic biologic phenomenon with wide ranging applications in tissue kinetics. **Brit J Cancer**, v. 26, p. 239, 1972

KEY, G. et al. New ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. **Lab Invest.**, v. 68, p. 626-9, 1993.

KONISHI, I. et al. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors, progesterone receptors, Ki-67 antigen and human papillomavirus DNA in normal e neoplastic epithelium of the uterine cervix. **Cancer**, v. 68, p. 1340-50, 1991.

KRAJEWSKA, M. et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X and mcl-1 expression in prostate cancer. **Am J Pathol.**, v. 148, n. 5, p. 1567, 1996.

KROEMER, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nat Med.**, v. 3, p. 614-20, 1997.

KRUSE, A. J. et al. Quantitative molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability. **Int J Gynecol Pathol.**, v. 23, p. 100-9, 2004.

KRUSE, A. J. et al. Ki67 immunoquantification in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. **J Pathol**, v. 193, n. 1, p. 48-54, 2001.

KUENEN-BOUMEESTER, V. et al. Ki-67 staining in histological subtypes of breast carcinoma and fine needle aspiration smears. **J Clin Pathol.**, v. 44, p. 208-10, 1991.

KURMAN, R., SOLOMON, D. S. **The Bethesda System for Reporting Cervical/vaginal Cytologic Diagnoses**. New York, N. Y. Springer-Verlag, 1993.

KURMAN, R. J. **Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract**. 4. ed. New York: Springer-Verlag 1994, p. 244-53.

KURMAN, R. J. et al. Sistema Reprodutivo Feminino. In: RUBIN, E. **Rubin Patologia Bases Clinicopatológicas da Medicina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap. 18, p. 945-1036.

KUSENDA, J. Bcl-2 family proteins and leukaemia [minireview]. **Neoplasma**, v. 45, p. 117-22, 1998.

LEE, J.S. et al. Angiogenesis, cell proliferation and apoptosis in progression of cervical neoplasia. **Anal Quant Cytol Histol**, v. 24, n. 2, p. 103-13, 2002.

LLEWELLYN, H. Observer variation, dysplasia grading, and HPV typing: a review. **Am J Clin Pathol**, v.114, suppl S21-35, 2000.

LOGANI, S. et al. Low grade vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia: correlation of morphologic features with Mib-1 immunostainning and HPV DNA detection [Abstract 814]. **Mod Pathol.**, v. 14, p. A139, 2001.

LOGANI, S. et al. Low-grade vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia: correlation of histologic features with human papillomavirus DNA detection and Mib-1 Immunostaining. **Mod Pathol.**, v. 16, n. 8, p. 735-41, 2003.

- LOOI, M. L. et al. Expression of p53, bcl-2 and ki-67 in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Anal Quant Cytol Histol**, v. 30, n. 2, p. 63-70, 2008.
- LORENZATO, M. et al. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? **Hum Pathol.**, v. 36, n. 10, p. 1101-7, 2005.
- LORINCZ, A.T. et al. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obstet Gynecol**, v. 79, p.328-37, 1992.
- LOUIE, K. S. et al. Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. **Brit J Cancer**, v.100, p. 1191-7, 2009.
- LYONS, S. K., CLARKE, A. R. Apoptosis and carcinogenesis. **Brit Med Bull**, v. 52, n. 3, p. 554-569, 1997.
- MATHEVET, P., FRAPPART, L., HITTELMAN, W. Cervix dysplasias: study of Rb and p53 gene expression and correlation with mitotic activity. **Gynecol Obstet Fertil**, v. 28, n. 1, p. 44-50, 2000.
- MIMICA, M., et al. Ki-67 quantitative evaluation as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. **Int J Gynecol Cancer**, v. 20, n. 1, p. 116-9, 2010.
- MITTAL, K. et al. MiB-1 expression is useful in distinguishing dysplasia from atrophy in elderly women. **Int J Gynecol Pathol.**, v. 18, p. 122-4, 1999.
- MITTAL, K., PALAZZO, J. Cervical condylomas show higher proliferation than do inflamed or metaplastic cervical squamous epithelium. **Mod Pathol.**, v. 11, p. 780-3, 1998.
- MITTAL, K. et al. Proliferating cell nuclear antigen (cyclin) expression in normal and abnormal cervical squamous epithelia. **Am J Surg Pathol.**, v. 17, p. 117-22, 1993.
- MOURITZ, M. J. E. et al. Three group metaphase as a morphologic criterion of progressive cervical intraepithelial neoplasia. **Am J Clin Pathol.**, v. 167, p. 591-5, 1992.
- MUÑOZ, N. et al. International Agency for Research on Câncer Multicenter Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, v. 348, p. 518-27, 2003.
- MYASHITA, T. et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of Bcl-2 and Bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. **Oncogene**, v. 9, p. 1799-805, 1994.
- NAKAMURA, S, GOMYO, Y, RO JA. C- terminus of p53 is required for G(2) arrest. **Oncogene**, v.27. p.:2102-7, 2002.
- NCI Workshop. The 1988 Bethesda system for reporting cervical vaginal cytological diagnoses. **JAMA**, v.262 p.931-4, 1989.

NUOVO, G.J. et al. In situ hybridization analysis of HPV DNA segregation patterns in lesions of the female tract. **Gynecol Oncol**, v. 36, p. 256-62, 1990.

OLTVAI, Z. et al. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homologue, BAX, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v. 74, p. 609-19, 1993.

OSTOR, A. G. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **Int J Gynecol Pathol**, v. 12, p. 186-92, 1993.

PATEL, T. Apoptosis in hepatic pathophysiology. **Clin. Liver dis.**, v. 4, p. 295-317, 2000.

PATEL, T., GORES, G. J. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. **Liver Transplant Surg.**, v. 4, p. 42-50, 1998.

PEREIRA, F. E. L. Degenerações, Morte Celular, Alterações do interstício. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. Cap. 4; p. 43- 82.

PESSAYRE, D. et al. Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis. **J. Hepatol.**, v. 31, p. 760-70, 1999.

PEYTON, C. L. et al. Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. **J Infect Dis** v.183, p. 1554-64, 2001.

PEZZELLA, F. et al. Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. **N Engl J Med.**, v. 329, p. 690-4, 1993.

PIROG, E. C. et al. Mib-1 immunostaining is a beneficial adjunct test for the accurate diagnosis of vulvar condyloma acuminatum. **Am J Surg Pathol.**, v. 24, p. 1393-9, 2000.

PIROG, M. D. et al. Diagnostic Accuracy of cervical low grade squamous intraepithelial lesions is improved with Mib-1 immunostaining. **Am J. Surg Pathol.**, v. 26, n. 1, p. 70-5, 2002.

POPIOLEK, D., VENTURA, K., MITTAL, K. Distinction of low-grade squamous intraepithelial lesions from high-grade squamous intraepithelial lesions based on quantitative analysis of proliferative activity. **Oncol Rep**, v. 11, n. 3, p. 687-91, 2004.

QUEIROZ, C. et al. Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions. **Pathol Res Pract**, v. 202, p. 731-7, 2006.

REED, J. C. Mini-review: Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. **J Cell Biol.**, v. 124, n. 1&2, p. 1-6, 1994.

ROBERTSON, A. J. et al. Observer variability in histopathological reporting of cervical biopsy specimens. **J Clin Pathol.**, v. 42, p. 231-8, 1998.

RORKE, E. A., JACOBBERGER, J. W. Transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) enhances apoptosis in human papillomavirus type 16- immortalized human ectocervical epithelial cells. **Exp Cell. Res.**, v. 216, p. 65-72, 1995.

ROTELI-MARTINS, C. M. et al. Morphological diagnosis of HPV lesions and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) is highly reproducible. **Clin Exp Obstet Gynecol**, v.28, n. 2, p. 78-80, 2001.

SAEGUSA, M. et al. The possible role of bcl-2 expression in the progression of tumors of the Uterine Cervix. **Cancer**, v. 76, n. 11, p. 2297-303. 1995

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, p. 1-265.

SARRAF, C. E., BOWEN, L. D. Proportions of mitotic and apoptotic cells in a range of untreated experimental tumours. **Cell Tissue Kinet.**, v. 21, p. 45-9, 1998.

SATO, T. et al. Interaction among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 9238, 1994.

SCHAFFER, L. T. H. **A correlação da expressão do gene p53 no carcinoma invasor do colo uterino com fatores de risco e prognóstico**. Botucatu, 2009. Tese (mestrado)- Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

SCHLAIFER, D. et al. Immunodetection of apoptosis-regulating proteins in lymphomas from patients with and without human immunodeficiency virus infection. **Am J Pathol.**, v. 149, n. 1, p. 177, 1996.

SEDLACK, T. et al. Multiple bcl-2 family members demonstrate selective dimerisation with bax. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 7834-8, 1995.

SHEETS, E. E., CRUM, C. P., YEH, J. Association between cervical neoplasia and apoptosis as detected by *in situ* nuclear labeling. **Gynecol Oncol**, v. 63, p. 94-100, 1996.

SHURBAJI, M. S. et al. Proliferating cell nuclear antigen immunoreactivity in cervical intraepithelial neoplasia and benign cervical epithelium. **Am J Clin Pathol.**, v. 100, p. 22-26, 1993.

SMEDTS, F. et al. Progressing Imbalance Between Proliferation and Apoptosis with Increasing Severity of Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Int J Gynecol Pathol.**, v. 16, p. 205-11, 1997.

SOLOMON, D. et al. The 2001 Bethesda system: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**, v. 287, p. 2114-9, 2002.

STEINBECK, R. G. Dysplasia in view of the cell cycle. **Eur J Histochem**, v. 48, n. 3, p. 203-11, 2004.

SOSLOW, R. A., ISACSON, C., ZALOUDEK, C. Immunohistology of the female genital tract. In : **Diagnostic Immunohistochemistry**. 2. ed. Pittsburg : Elsevier, 2006. Cap.16, p. 637-745.

THOMPSON, C. B. Apoptosis. In: PAUL, W. E. **Fundamental immunology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-raven, 1999; p. 813-29.

WALKER, F. et al. Increased apoptosis in cervical intraepithelial neoplasia associated with HIV infection: implication of oncogenic human papillomavirus, caspases, and Langerhans cells. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 7, p. 2451-8, 2005.

WYLLIE, A. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. **Cancer Metast Rev.**, v. 11, p. 95-103, 1992.

YANG, E., KOSMEYER, S. Molecular thanatopsis: A discourse on the BCL-2 family and cell death [review]. **Blood**, v. 88, p. 386-401, 1996.

YIN, Y. et al. Wild type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. **Cell**, v. 70, p. 937-48, 1992.

VAUX DL, HAECKER G, STRASSER A. An evolutionary perspective on apoptosis. **Cell**. v.76, n.5 p.777-9. 1994.

VAN LEEUWEN, A. M. et al. Atypical mitotic figures and the mitotic index in cervical intraepithelial neoplasia. **Virch Arch**, v. 427, n. 2, p. 139-44, 1995.

XUE, Y. et al. Proliferative activity in cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. **Chin Med J**, v. 112, n. 4, p. 373-5, 1999.

ZANOTTI, S., FISSELER-ECKHOFF, A., MANNHERZ, H.G. Changes in the topological expression of markers of differentiation and apoptosis in defined stages of human cervical dysplasia and carcinoma. **Gynecol Oncol**, v.89, n.3, p. 376-84, 2003.

ZUNA, E. R. et al. Comparison of human papillomavirus genotypes in high-grade squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma: evidence for differences in biologic potential of precursor lesions. **Mod Pathol**, v.17, p. 1314-22, 2004.

## ANEXOS

Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (protocolo nº 606/2008, aprovado em 20/02/09).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 606/08

**Interessado(a): Prof. Anilton César Vasconcelos**  
**Departamento de Patologia Geral**  
**Instituto de Ciências Biológicas - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 04 de fevereiro de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Apoptose, expressão de regiões argirófilas organizadoras de nucléolos (AgNOR) e marcador de proliferação celular Mib-1/Ki-67 em neoplasias intra-epiteliais do colo uterino**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**



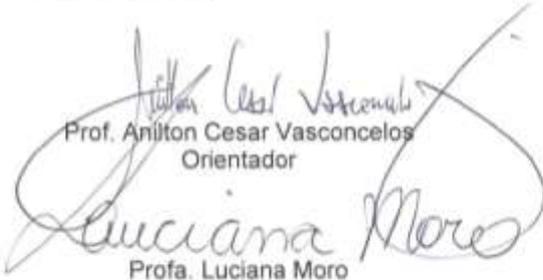
FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
cpa@medicina.ufmg.br



### DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Anilton Cesar Vasconcelos, Luciana Moro, Milene Alvarenga Rachid e Martinho Campolina Rebello Horta, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **"HISTOMORFOMETRIA, APOPTOSE (BCL-2 E BAX) E MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67 EM NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS DO COLO UTERINO"**, apresentada pelo mestrando **RODRIGO TADEU DE PUY E SOUZA**, para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 24 de fevereiro de 2011.

  
Prof. Anilton Cesar Vasconcelos  
Orientador

  
Profa. Luciana Moro  
Coorientadora

  
Profa. Milene Alvarenga Rachid

  
Prof. Martinho Campolina Rebello Horta