

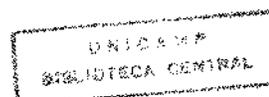
GLAUCE APARECIDA PINTO

**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DO COLÁGENO IV DA
MEMBRANA BASAL NO CARCINOMA DO COLO
UTERINO**

**Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas**

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Magna
Co-Orientador: Prof. Dr. José Vassallo

**UNICAMP
1994**



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	P658e
V.	Ex.
T.º AND. EX.	14503
PROC.	286/94
	D <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/08/94
N.º CPD	

*aguardar
base P. 658e
otiquela*

C4-00059918-0

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Pinto, Glauce Aparecida

Estudo imuno-histoquímico do colágeno IV da membrana basal no
P658e carcinoma do colo uterino / Glauce Aparecida Pinto. - - Campinas,
SP : [s.n.], 1994.

Orientador : Luis Alberto Magna, Jose Vassallo.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Colo uterino. 2. Carcinoma. 3. Membrana basal. I. Magna,
Luis Alberto. II. Vassallo, Jose. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

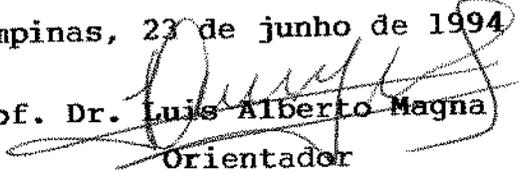
28. CDD -618.14
-616.994
-574.875

Índices para catálogo sistemático:

1. Colo uterino 618.14
2. Carcinoma 616.994
3. Membrana basal 574.875

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentado a Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Anatomia Patológica da aluna Glauce Aparecida Pinto.

Campinas, 23 de junho de 1994

Prof. Dr.  Luis Alberto Magna
Orientador

Este trabalho é fruto de incansáveis horas de carinho e amor que muitos souberam presentear-me em diferentes etapas da vida, dando-me a certeza de ser uma pessoa amada e, por ser amada, muito feliz...

DEDICATÓRIA

A DEUS, pela constante presença em minha vida.

Aos meus pais, João e Nadége ("in memoriam"), símbolos de simplicidade,
pelo exemplo de amor, trabalho e honestidade.

Ao meu filho, Renato, que é a razão da minha luta e que, na inocência de
criança, soube entender e retribuir com carinho e incentivo todas as horas de
ausência.

AGRADECIMENTOS

- . Prof. Dr. Luis Alberto Magna, pela atenciosa orientação e o sempre presente apoio como amigo, que tanta segurança me trouxe em muitos momentos durante a realização deste trabalho.
- . Prof. Dr. José Vassallo, desafiador incansável, "porteiro" de oportunidades, "bandeirante" de potencialidades, exemplo de mestre, que compartilhou comigo as ansiedades e angústias para a finalização deste trabalho.
- . Prof. Dr. Marcelo Alvarenga, pela sugestão do tema e pela compreensão nos momentos de minha ausência no Laboratório de Patologia Experimental, em razão do processo de realização desta dissertação.
- . Profa. Dra. Liliana A.L. Andrade, pela abertura com que nos cedeu o seu arquivo de casos, facilitando muito a coleta do material; pela revisão dos casos mais difíceis e pelas sugestões a todo o momento.
- . À Rosemeire Franchi Dionizio, pela amizade e presença constante no trabalho com o manuscrito, em todas as suas fases, e à Wanda Wreck, pela delicadeza de seu convívio e a realização dos cortes histológicos.
- . A toda a equipe da ASTEC, em especial à Sueli Chaves, Isabel Gardenal e Maria do Rosário Gonçalves Rodrigues Zullo, pela inestimável ajuda no preparo da versão final deste volume.
- . À Edí Lúcia Sartorato, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), pela colaboração com a confecção dos desenhos no computador.
- . A Dra. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela, pela amizade calorosa e pela ajuda com preparo dos diapositivos.
- . Ao Departamento de Anatomia Patológica, pela acolhida e cessão do material aqui estudado, além do auxílio em inúmeros pequenos detalhes, tão freqüentes na realização de um trabalho de tese.
- . Aos colegas do Laboratório de Patologia Experimental e do Curso de Pós-Graduação em Anatomia Patológica, pelo companheirismo e apoio, tão importantes em todos os momentos.

SUMÁRIO

	Pág.
ABREVIATURAS	
SUMMARY	
RESUMO	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Membrana Basal	1
1.1.1. Componentes Intrínsecos	4
1.1.2. Componentes Extrínsecos	7
1.1.3. Funções da Membrana Basal	8
1.1.4. Membrana Basal e Oncologia	8
1.1.5. Padrão de Distribuição da MB em Carcinomas	12
1.2. Carcinoma do Colo Uterino	16
1.2.1. Vírus do Herpes Simples Tipo 2	17
1.2.2. Vírus do Papiloma Humano (HPV)	17
1.2.3. Carcinogênese	17
1.2.4. Carcinoma Epidermóide "In Situ" ou Carcinoma "In Situ"	18
1.2.5. Carcinoma Microinvasivo	18
1.2.6. Carcinoma Epidermóide Invasivo	19
1.2.7. Imunocoloração de MB em Carcinoma de Colo Uterino	20
2. OBJETIVOS	25
3. METODOLOGIA	26
3.1. Técnica de Imuno-Histoquímica	26
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

ABREVIATURAS

ABC - Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase
ABP - Avidina-Biotina-Peroxidase
BSA - Soroalbumina Bovina
CAISM - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CIS - Carcinoma "In Situ"
CMI - Carcinoma Microinvasivo
CEI - Carcinoma Epidermóide francamente Invasor
DAB - 3,3 tetra-hidrocloro de diamino-benzidina
FCM - Faculdade de Ciências Médicas
FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
HE ou H&E - Hematoxilina e Eosina
HPV - Vírus do Papiloma Humano
HSV - Vírus do Herpes Simples
IHQ - Imuno-Histoquímica
MB - Membrana Basal
NIC - Neoplasia Intra-Epitelial Cervical
NS - Não-Significativo
PAS - Reação do "Periodic Acid Schiff"
PBS - Phosphate Buffer Saline (Tampão Fosfato)

SUMMARY

Basement membrane (BM) integrity is altered when a benign or potentially malignant process changes into malignancy. In this process, it may undergo varying degrees of discontinuity, as a prerequisite to tissue invasion. Immunostaining for collagen IV, present in BM solely, has been used to evaluate patterns of BM integrity in neoplastic and benign processes in several organs. A survey was performed, within cases diagnosed as cervix in situ (ISC), microinvasive (MIC) and invasive squamous cell carcinoma (SCC), at the Department of Pathology, State University of Campinas (São Paulo, Brazil), from 1988 to 1993. Our purpose was to evaluate the pattern of continuity of BM amongst these cases, and to verify in which extent it could be helpful in the diagnosis of beginning stroma invasion (MIC). Specimens had been previously formalin fixed, paraffin embedded. Standard stains (H&E) were reviewed and selected blocks were submitted to immunohistochemical processing, using an avidin-biotin-peroxidase technique, with a mouse monoclonal anti-collagen IV antibody (Dakopatts). Histological sections were previously treated with pepsin, in a two hour incubation period at 37°C. At the end of selection, 20 cases of ISC, 15 MIC and 24 SCC were studied. SCC cases showed evident BM disruption, one case only showing BM linear and continuous. Although no statistical difference could be demonstrated in BM pattern of integrity among ISC and MIC cases, there was a clear tendency of MIC to show small areas of discontinuity (7/15 MIC compared to 3/20 ISC). Presence of inflammatory infiltration did not seem to be responsible for BM discontinuity, because these two variables were not statistically associated. In 15 of the 59 cases studied there was some degree of diagnosis disagreement, either in reviewing H&E, or after immunohistochemistry. These cases were submitted to a second

examiner and in 8 of them immunohistochemistry was an important tool for final diagnosis. In further 5 cases, however, immunohistochemistry failed to demonstrate the lesion, due to wasting off the paraffin blocks. Our results on pattern of BM continuity in cervix cancer are in agreement with others previously reported. We then conclude that immunohistochemistry for collagen IV may be a helpful tool for diagnosis of beginning stroma invasion (MIC), but evaluation must be carefully performed together with traditional morphological data (H & E).

RESUMO

A integridade da Membrana Basal (MB) está comprometida no processo de evolução de uma lesão benigna ou potencialmente maligna para uma lesão maligna, onde ela pode sofrer graus variados de descontinuidade como condição necessária ao processo de invasão. A imunocoloração para colágeno IV, componente encontrado exclusivamente na MB, tem sido utilizada para avaliar os padrões de apresentação da mesma em neoplasias e lesões benignas de vários órgãos. Com o objetivo de avaliar o padrão de continuidade da MB em Carcinomas "In Situ" (CIS), Microinvasivos (CMI) e Epidermóides Francamente Invasores (CEI) do colo uterino, bem como o de verificar o possível auxílio de tal expressão no diagnóstico de invasão inicial do estroma (CMI), realizou-se aqui um estudo retrospectivo em casos diagnosticados no Departamento de Anatomia Patológica da UNICAMP entre 1988 a 1993. Os casos selecionados, previamente fixados e incluídos em parafina, foram revistos (hematoxilina-eosina) e posteriormente submetidos a estudo imuno-histoquímico pelo método da avidina-biotina-peroxidase com anticorpo monoclonal produzido em camundongo anticolágeno IV (Dakopatts). Os cortes histológicos foram previamente submetidos à digestão por pepsina durante 2 horas a 37°C. Ao final da seleção foram avaliados 20 casos de CIS, 15 de CMI e 24 de CEI. Os casos de CEI mostraram evidente descontinuidade, em grau pequeno ou grande da MB (23/24 casos), mostrando apenas um caso com MB contínua e íntegra. Embora não houvesse significância estatística no padrão de continuidade da MB entre casos de CIS e CMI, houve nítida tendência destes a apresentarem pequenas interrupções (sete de 15 casos de CMI contra apenas três de 20 casos de CIS). O infiltrado inflamatório, variável também analisada, não deveria ser responsabilizado pelas áreas de descontinuidade da MB, uma

vez que não houve correlação estatística entre elas. Em 15 dos 59 casos estudados houve algum grau de discordância, quer à revisão da morfologia ou após avaliação da imunocoloração. Estes casos foram submetidos a um segundo Revisor, sendo que em oito casos a imunocoloração foi importante na decisão diagnóstica. Em outros cinco, porém, a imunocoloração mostrou-se falha, pois o processo patológico analisado havia sido desbastado do bloco de parafina. Os resultados do presente trabalho sobre o padrão de continuidade da MB são compatíveis com os dados da literatura. Concluiu-se que a imunocoloração para colágeno IV pode ajudar o diagnóstico de invasão inicial do estroma (CMI), contudo, a avaliação deve ser criteriosa e feita em conjunto com os dados de morfologia clássica.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Membrana Basal

O organismo dos mamíferos normais é composto por compartimentos celulares separados por matriz extracelular, como a membrana basal e o estroma intersticial. As células normais respeitam os limites dos compartimentos teciduais, mesmo nos crescimentos hipertróficos ou hiperplásicos. Em contraste, as células tumorais malignas não respeitam estes limites e se metastatizam para outros tecidos (ALBRECHTSEN, WEWER, LIOTTA, 1986).

A Membrana Basal (MB) corresponde à matriz extracelular especializada, encontrada em quase todos os animais pluricelulares, produzida por células epiteliais, endoteliais e diversas células mesenquimais (YURCHENCO & SCHITTNY, 1990). A maioria dos órgãos mostra MB separando células epiteliais, endoteliais e mesenquimais. Alguns órgãos, porém, apresentam pouca MB, como é o caso do fígado e do sistema nervoso central. Os hepatócitos e as células nervosas não são envolvidos por MB. No tecido conjuntivo, há MB envolvendo cada adipócito e célula muscular, todavia não outras células mesenquimais (LEE, 1988).

A MB é definida ultraestruturalmente por duas camadas: eletrolúcida (lâmina rara ou lúcida, 10-50nm) adjacente às células e, outra, eletrodensa (lâmina densa, 20 a 300nm) adjacente ao tecido conjuntivo (FAVRET e cols., 1990). Estas lâminas estendem-se, por um lado, em direção à membrana celular e, por outro, em direção às fibras colágenas (INOUE, 1989) (Figura 1).

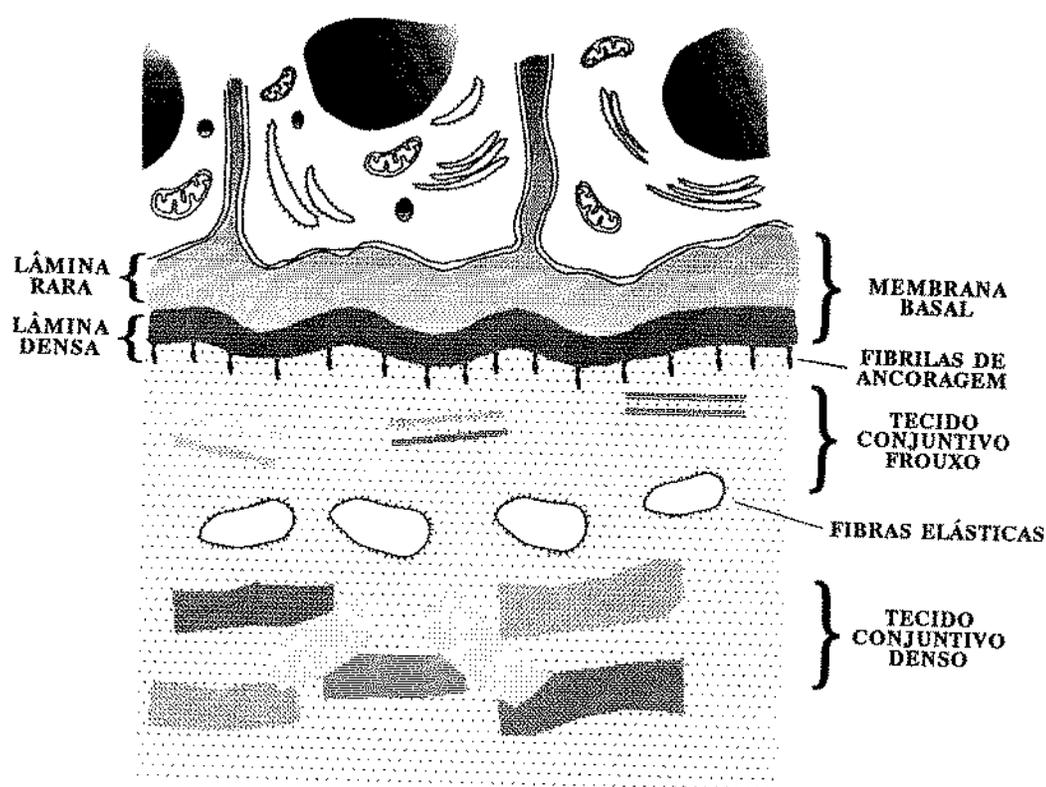


Figura 1. Esquema da interface entre a célula epitelial e o tecido conjuntivo. A MB é composta de duas camadas de eletrodensidades diferentes: lâmina rara e lâmina densa. A lâmina densa liga-se à porção superior do tecido conjuntivo mais frouxo, ou camada reticular, através de fibrilas de ancoragem. A camada reticular contém proteoglicanos, fibranectina, proteínas estruturais e fibras colágenas, predominantemente do tipo 3. Há, ocasionalmente, pequenas e delicadas fibras elásticas. A camada de tecido conjuntivo denso contém colágeno, predominantemente do tipo 1, glicoproteínas estruturais e proteoglicanos (MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983).

Para demonstração rotineira da MB são utilizadas colorações pelo PAS ou impregnação pela prata, evidenciando-se uma estrutura linear fortemente corada (OZZELLO, 1959; BOSMAN, HAVENITH, CLEUTJENS, 1985). Ao microscópio eletrônico, a estrutura da MB varia de acordo com o tipo de célula com a qual ela está associada. Algumas membranas, como a cápsula do cristalino, consistem de uma lâmina densa apenas. Muitas outras membranas contêm a lâmina rara e a lâmina densa, como a epiderme, sistema respiratório, geniturinário, gastrointestinal, etc. Em glomérulos e alvéolos, a MB é trilaminar devido à justaposição da membrana epitelial e da endotelial (BOSMAN e cols., 1985).

Todos os tipos de matrizes extracelulares, tais como MB, interstício, estroma do corpo e cartilagem, diferem uns dos outros pelos tipos de componentes da matriz. Cada tipo de matriz é composto por tipos característicos de colágeno geneticamente distintos (BORNSTEIN & SAGE, 1980; LIOTTA e cols., 1981; TIMPL e cols., 1981; BISSEL, HALL, PARRY, 1982).

A MB é composta por 90% de proteínas, 10% de carboidratos e pequena quantidade de lipídios. A análise de aminoácidos indica que 40% a 60% das MB são compostas por proteínas colágenas (KEFALIDES, ALPER, CLARK, 1979; KEFALIDES, 1980).

Os termos "extrínseco" e "intrínseco" foram propostos por alguns autores para os componentes da MB (MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983; BIREMBAUT e cols., 1985), sendo componentes intrínsecos o colágeno IV, a laminina, o sulfato de heparan de proteoglicano e, possivelmente, a entactina (MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983; WEBER, 1992). Os componentes extrínsecos estão presentes apenas em algumas membranas, particularmente naquelas com proeminente função

filtrante. Estes componentes são o colágeno V, a fibronectina e o sulfato de condroitina.

A seguir, faremos uma breve descrição de cada componente da MB:

1.1.1. Componentes Intrínsecos

Colágeno IV: Existem sete tipos de colágeno bem definidos (MINOR, 1980; MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983). Os tipos I, II e III são chamados colágenos intersticiais; o tipo IV é exclusivamente de MB; e o tipo V compõe o colágeno estromal e pericelular (GAY e cols., 1981; MARTINEZ-HERNANDEZ, GRAY, MILLER, 1982b). O colágeno tipo VI foi originalmente isolado de um digesto de pepsina da aorta e, depois, foi encontrado numa série de tecidos (placenta, córnea, músculo esquelético, disco intervertebral, osso alveolar, dentina e pele). A coloração para colágeno VI foi observada na cápsula de Glisson, no estroma do espaço portal e espaço de Disse. Em cirrose biliar primária encontra-se intensa reatividade para colágeno VI ao redor dos ductos biliares proliferados. Este componente da matriz extracelular pode ter um papel importante na fibrose hepática (GRIFFITHS e cols., 1992). O colágeno VII foi demonstrado como constituinte protéico que ancora a membrana basal com o tecido conjuntivo subjacente. Em tecidos normais, o colágeno VII foi encontrado em MB de epitélios mistos e estratificados, tais como: mama, próstata, laringe, esôfago, traquéia e epiderme (WETZELS e cols., 1992). Também foi sugerido que o colágeno VII poderia desempenhar algum papel no processo de invasão, por estar presente na fase de transição entre displasia e carcinoma do cólon (VISSER e cols., 1993).

Cada molécula de colágeno é composta por três cadeias de polipeptídeos chamadas cadeias-alfa. A seqüência de aminoácidos de cada cadeia-alfa é característica para cada tipo de colágeno. As cadeias são

helicoidais, usualmente contêm glicina na terceira posição (exceto o colágeno IV) e são ricas em hidroxiprolina e hidroxilisina.

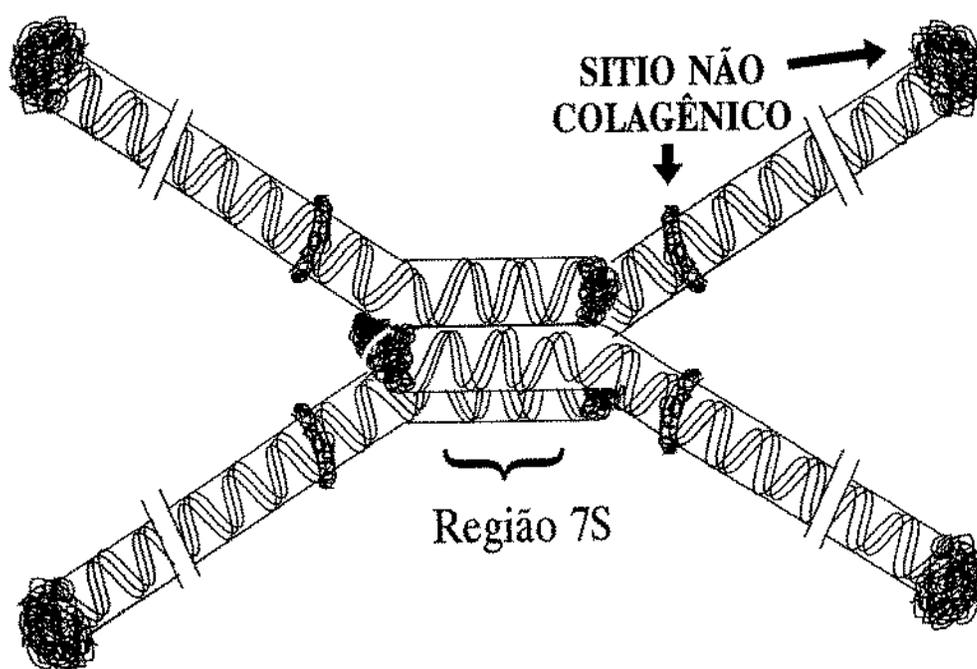


Figura 2. Modelo do colágeno tipo IV: quatro moléculas de colágeno estão unidas através de ligações estáveis na região 7S. Cada molécula de colágeno é composta de três cadeias-alfa dispostas em tripla hélice, que são interrompidas em vários pontos. Estas áreas de descontinuidade são os sítios de suscetibilidade à protease. Regiões globulares terminais estão envolvidas em interações com outras moléculas de colágeno tipo IV, formando uma rede que constitui o esqueleto das membranas basais (MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983).

A estrutura helicoidal da cadeia-alfa do colágeno IV parece ser interrompida por segmentos de cadeia de polipeptídeos. Estas interrupções provavelmente explicam a conhecida susceptibilidade do colágeno IV à digestão por enzimas não-colagenolíticas (MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983). A cadeia-alfa contém relativamente grandes quantidades de 3-hidroxiprolina e é rica em carboidratos (KEFALIDES e cols., 1979). Sua configuração é em tripla hélice, formada por duas cadeias diferentes, alfa - 1 e alfa - 2 (BOSMAN e cols., 1985). As grandes quantidades de carboidratos poderiam explicar a coloração PAS positiva da MB (BARSKY e cols., 1983b).

Todos os anticorpos direcionados contra o colágeno IV, monoclonais ou policlonais, localizam-se exclusivamente na MB (MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983; FOELMER, MADRI, FURTHMAYR, 1983). Por método imuno-histoquímico e eletroimuno-histoquímico, demonstrou-se que os determinantes antigênicos do colágeno IV estão localizados tanto na lâmina rara quanto na lâmina densa (ROLL e cols., 1980; SANO e cols., 1981; MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983).

Laminina: É uma glicoproteína não-colagênica. Estudos imuno-histoquímicos com microscopia óptica e microscopia eletrônica mostram que a laminina ocorre exclusivamente na MB, especialmente na lâmina rara. A laminina provavelmente tem papel importante na ligação de células à MB e ela também se liga aos proteoglicanos, os quais poderiam contribuir para a integridade estrutural da MB (MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983).

Sulfato de Heparan de Proteoglicano (HPG): É covalentemente ligado a uma seqüência de proteínas e ocorre na membrana como agregado na lâmina rara. Tem importante papel de sustentação das células à MB, por sua propriedade catiônica e também na regulação da filtração glomerular (MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983; WEBER, 1992).

Entactina: Glicoproteína altamente sulfatada que parece ser um produto dos fibroblastos estromais (MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983; ABRAHAMSON, 1986). Está associada tanto à laminina quanto ao colágeno IV através de sua porção COOH-terminal, sugerindo, portanto, que pode servir de ponte na ligação destes dois mais importantes componentes da MB (YURCHENCO & SCHITTNY, 1990).

1.1.2. Componentes Extrínsecos

Os componentes extrínsecos são substâncias que não ocorrem exclusivamente na MB e, portanto, não são sintetizados por células epiteliais e endoteliais envolvidas exclusivamente na produção da mesma (MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983). São eles:

Fibronectina: A partir de estudos de imunofluorescência, vários autores descrevem-na como um componente da MB (LINDER e cols., 1975; STENMAN & VAHERI, 1978; WARTIOVAARA, LEIVO, VAHERI, 1979). Porém, a eletroimuno-histoquímica a evidencia no estroma do tecido conjuntivo imediatamente adjacente à MB (BOSELLI e cols., 1981; MARTINEZ-HERNANDEZ e cols., 1982a; MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983; ABRAHAMSON, 1986).

Colágeno V: Foi isolado a partir da placenta humana (CHUNG, RHODES, MILLER, 1976; BURGESSON e cols., 1976), sendo encontrado no estroma, onde parece ter a função de ancoragem dos vasos sanguíneos, interconectando diferentes colágenos (MARTINEZ-HERNANDEZ e cols., 1982b).

1.1.3. Funções da Membrana Basal

As três principais funções da MB (MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983) são:

- constituir uma força tensional, fornecendo suporte físico para estruturas tais como túbulos renais (WELLING, GRANTHAM, QUALLIZZA, 1972), vasos sanguíneos e cápsula do cristalino (MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983), entre outras.
- função de ancoragem (ligação) celular, propriedade demonstrada em estudos de cultura de tecido e que envolve colágeno IV e a laminina (STANLEY e cols., 1980; TERRANOVA, ROHRBACH, MARTIN, 1980); a membrana celular, provavelmente, contém sítios de ligação específicos para estas proteínas.
- a última função é a de ultrafiltração, propriedade que ocorre nos capilares e que foi particularmente estudada no glomérulo renal. O sulfato de heparan tem o papel principal nesta função (RYAN & KARNOVSKY, 1975; CAUFIELD & FARQUHAR, 1978; KANWAR & FARQUHAR, 1979).

1.1.4. Membrana Basal e Oncologia

Recentemente, um grande número de pesquisas têm sido desenvolvidas no campo da bioquímica do tecido conjuntivo, incluindo estudos da composição da MB. Muitos destes trabalhos têm aplicações na biologia tumoral, como por exemplo o uso de anticorpos específicos contra laminina e colágeno IV para posterior estudo imuno-histoquímico da MB no câncer.

O conceito de penetração da MB por tumores invasivos não é novo. BRODERS (1932) notou, por coloração rotineira (HE), a propriedade de alguns tumores invasivos de penetrá-la. Embora o estudo dos caracteres

morfológicos da MB no câncer não sejam novos, existem muitas controvérsias neste assunto. A detecção imuno-histoquímica de componentes da MB, portanto, tem expandido muito as investigações em direção ao estudo do comportamento invasivo do câncer. A visualização da MB por este método, com anticorpos específicos contra seus componentes, proporciona uma alta resolução e precisão. Esta técnica é, além disso, confiável e reprodutível. Ambos os anticorpos, contra a laminina e o colágeno IV, têm sido amplamente usados como marcadores da membrana em alguns tipos de tumores (HAVENITH e cols., 1987; SCHAPERS e cols., 1990).

A imuno-histoquímica aplicada em carcinomas demonstrou uma MB fragmentada e interrompida (RICHARDS & FURNESS, 1990). Alguns autores mostraram que lesões pré-malignas ou carcinoma "in situ" têm MB intacta e, no último, por vezes, descontínua (VISSER e cols., 1986; RICHARDS & FURNESS, 1990). Outros trabalhos concluíram que nas lesões "in situ" a MB é sempre contínua (PERTSCHUK e cols., 1977; BARSKY e cols., 1983ab; WILLEBRAND, BOSMAN, DE GOEJ, 1986; VOGEL & MENDELSON, 1987). Entretanto, inspeções cuidadosas têm revelado uma pequena descontinuidade acompanhando o epitélio da lesão pré-maligna da mama, dos brônquios, do cólon e do endométrio (ALBRECHTSEN e cols., 1981; BIREMBAUT e cols., 1985; BOSMAN e cols., 1985; FURNESS & LAM, 1987).

Os estudos iniciais nessa área, usando anticorpos que reagem naturalmente contra o antígeno do penfigóide bolhoso, reforçaram os achados ultrastruturais de defeitos de MB em carcinoma basocelular de pele (DE MORAGAS, WINKELMANN, JORDON, 1970).

Essas falhas apresentadas na MB têm uma grande importância, pois é sabido que o movimento das células através delas é biologicamente importante e constitui caráter fundamental do desenvolvimento de

neoplasmas invasivos. Assim, a capacidade das células malignas de atravessar a MB epitelial e endotelial é essencial para o processo de metástase (LIOTTA, 1984).

A perda ou uma marcada desorganização da MB é encontrada durante a transição do processo epitelial benigno para o maligno (BARSKY e cols., 1983b). Segundo RICHARDS & FURNESS (1990), o crescimento invasivo de um carcinoma é definido como a penetração de células neoplásicas malignas através da MB e esta, por sua vez, serve como uma importante barreira estrutural à progressão de neoplasias que irão infiltrar e metastatizar, como a neoplasia epitelial que tem de penetrar uma ou mais camadas de MB para se tornar invasiva.

O mecanismo pelo qual as falhas da MB são formadas é ainda desconhecido. Existem algumas hipóteses para explicar os mecanismos envolvidos na descontinuidade da MB no câncer, uma vez que ela não é uma estrutura estática; ao contrário, é continuamente catabolizada e depositada. RICHARDS & FURNESS (1990) sugeriram três possibilidades:

1. Degradação de componentes da matriz extracelular pelas células neoplásicas;
2. Diminuição ou defeito de síntese dos componentes de MB pelas células neoplásicas;
3. Capacidade reduzida para reparar os defeitos produzidos pela passagem das células inflamatórias.

A dissolução local da MB ocorre na área de contato com as células tumorais invasivas (LIOTTA, RAO, BARSKY, 1983; LIOTTA, 1986). Colagenases específicas tipo IV já foram isoladas de uma variedade de

células neoplásicas (LIOTTA e cols., 1979; SHIELDS e cols., 1984). Alguns tumores invasivos elaboram enzimas degradativas específicas dos componentes da MB, e a atividade enzimática está correlacionada com o comportamento metastático do tumor (LIOTTA e cols. 1979; LIOTTA e cols., 1980; BARSKY e cols., 1983a). LIOTTA e cols. (1980) demonstraram que a produção da colagenase específica do tipo IV está correlacionada com o potencial metastático da linhagem celular do melanoma B16. KRAMER, VOGEL, NICOLSON (1982); KRAMER & VOGEL (1984) identificaram uma endoglicosidase nas células deste melanoma, a qual degrada seletivamente o sulfato de heparan de proteoglicano.

Os estudos de microscopia eletrônica demonstraram, além disso, uma dissolução de MB na área de contato com a célula tumoral invasiva sugerindo um mecanismo enzimático (LIOTTA e cols., 1980). No entanto, o encontro de colagenases através de hibridização "in situ" também em neoplasias benignas demonstra que o mecanismo de invasão deve ser mais complexo que o aventado anteriormente (SOINI & AUTIO-HARMAINEN, 1993).

LIOTTA (1986) chegou a uma hipótese que descreve a seqüência de eventos bioquímicos durante a invasão da célula tumoral na matriz extracelular. Estes eventos são:

1. A célula tumoral ataca MB via receptores de superfície, os quais se ligam especificamente aos componentes da matriz, tais como laminina (MB) e fibronectina (estroma) (KRAMER, GONZALEZ, NICOLSON, 1980; TERRANOVA e cols., 1980).

2. A célula tumoral secreta enzimas hidrolíticas (ou induz as células normais adjacentes a secretarem estas enzimas), as quais podem, localmente, degradar a matriz (incluindo degradação de componentes da MB).

3. A locomoção da célula tumoral para a região da matriz extracelular assim degradada seria facilitada pela proteólise, repetindo-se ciclicamente estas três etapas.

Segundo BOSMAN e cols. (1985), os defeitos da membrana são causados por um desequilíbrio entre a produção e a degradação, que poderia ser devido ao aumento da degradação ou à diminuição da síntese dos constituintes da MB ou ainda à combinação destes processos.

Deve ser ainda considerado que os componentes sintetizados pela célula tumoral são, em geral, do mesmo tipo dos sintetizados pela célula normal (ADAMSON, GAUNT, GRAHAM, 1979; BORNSTEIN & SAGE, 1980; ALITALO, KESKI-OJA, VAHERI, 1981), porém a quantidade de matriz produzida pela célula tumoral é freqüentemente muito menor do que pela célula normal (HYNES, 1976; ALITALO e cols., 1981; FAGAN e cols., 1981; HAYMAN e cols., 1982).

1.1.5. Padrão de Distribuição da MB em Carcinomas

Os estudos imuno-histoquímicos de carcinomas em diferentes tecidos têm mostrado que a maioria das lesões benignas apresentam uma configuração normal e contínua da membrana (GOULD & BATTIFORA, 1976; LIOTTA e cols., 1983; BARSKY e cols., 1983b), assim como as lesões pré-invasivas, que exibem imunorreatividade da laminina e do colágeno IV, evidenciando uma membrana intacta e linear.

Os avanços da pesquisa sobre MB levaram à apreciação da estrutura e função de seus componentes individuais, dando novas interpretações à aplicação da imunocoloração no monitoramento das mudanças na membrana em câncer humano. Usando coloração imuno-histoquímica para

os componentes da membrana de tecidos normais, tais como mama, trato respiratório, rim, estômago, cólon, reto, glândulas endócrinas e exócrinas, pele, vasos e placenta, mostrou-se uma membrana bem preservada, linear e contínua. Os tecidos carcinomatosos poderiam exibir um padrão de distribuição de membrana relativamente bem definido (LEE, 1988). Vamos então descrevê-los em alguns carcinomas (ver também Quadro 1, página 23).

Carcinoma de Mama: ALBRECHTSEN e cols. (1981) foram os primeiros a demonstrar, por coloração imuno-histoquímica dos componentes da MB da mama, que tanto no carcinoma "in situ" quanto no intralobular a MB está intacta. Em contraste, carcinomas invasivos mostraram MB com defeitos focais, especialmente nas áreas de invasão. Trabalho semelhante foi feito por SIEGAL e cols. (1981), que estabeleceram um padrão de imunorreatividade da laminina e do colágeno IV na MB subjacentes às células tumorais, tanto primárias quanto metastáticas. Outros autores também observaram que nos carcinomas bem a moderadamente diferenciados a MB é fragmentada ou descontínua, porém, nos pouco diferenciados, pouca ou nenhuma coloração é observada (BURNS, DIXON, WOODS, 1980; BURTIN e cols., 1982).

Carcinoma Intestinal e Colorretal: FOSTER, TALBOT, CRITCHLEY (1984); FOSTER e cols. (1986), estudando carcinoma retal, fizeram uma correlação entre a coloração da MB e o grau de diferenciação do tumor, estágio e presença de metástases. Eles concluíram que a deposição de laminina no limite entre o tumor e o estroma está correlacionada significativamente com graus histológicos mais diferenciados e melhor sobrevida do paciente. Estes autores sugeriram o uso de IHQ para laminina

como complemento ao diagnóstico de carcinoma colorretal e ao estadiamento proposto por Dukes.

OFFERHAUS e cols. (1991) estudaram 154 pacientes com câncer colorretal operados entre 1967 e 1974. Estes autores testaram o valor prognóstico da deposição de colágeno IV no estroma do tumor, além de outras variáveis. Eles concluíram que a deposição de colágeno IV nos limites do tumor com o estroma tem correlação significativa com a sobrevida, quando analisada como dado isolado. Além disso, a imunocoloração do colágeno IV facilita o reconhecimento de invasão vascular, pois resalta a MB de vasos.

Carcinoma de Pulmão: Alguns autores (BARKSKY, 1983c; BIREMBAUT e cols., 1983; CAM, BELLON, POULIN, 1984) estudaram um pequeno número de carcinomas de pulmão e observaram grau variado de coloração positiva da laminina ao redor das áreas invasivas.

Carcinoma Renal: Foram estudados cinco casos para a presença de coloração para laminina. Em três casos de carcinoma de células renais, obteve-se coloração positiva intensa da MB contornando os túbulos que eram distintamente separados da membrana vascular. Em um tumor pobremente diferenciado, a MB estava interrompida e havia coloração intracitoplasmática positiva para laminina (ALBRECHTSEN e cols., 1986).

SARIOLA e cols. (1985) publicaram uma série de tumores de criança, incluindo 82 casos de tumor de Wilms. Estes autores concluíram que a imunocoloração da MB, utilizando anticorpos antilaminina e colágenos, pode ser acessório no diagnóstico destes tumores, segundo a distribuição de diferentes tipos de colágeno e padrão de reatividade nos diferentes subgrupos de tumor histologicamente definidos.

Carcinoma Pancreático: A visualização da MB em tumores comparada a processos inflamatórios foi bem descrita por HAGLUND e cols. (1984), que examinaram 15 casos de pancreatite crônica e 33 de carcinoma pancreático. Durante o estágio da doença inflamatória, a MB apresentava-se contínua, mas focalmente fraca e mais fina do que o normal. Em adenocarcinoma pancreático, a laminina distribuía-se irregularmente e estava ausente em áreas. O carcinoma anaplásico não tinha laminina extracelular, mas em dois casos mostrou laminina intracelular. Estes autores concluíram que a integridade da MB correlaciona-se com o grau de malignidade em adenocarcinoma ductal.

Tumores de Glândula Salivar: TOIDA e cols. (1984) estudaram 41 casos de glândula salivar usando imuno-histoquímica para laminina. No carcinoma adenóide cístico encontraram positividade para laminina na MB ao redor dos pseudoductos de células tumorais. Em outros tipos de tumores, tais como adenoma pleomórfico, tumor mucoepidermóide e adenocarcinoma, foi demonstrada coloração da laminina interrompida.

Carcinoma de Pele e Oral: A MB em tumor maligno de pele foi estudada quanto à presença de colágeno IV e laminina. No carcinoma basocelular a MB é contínua ao redor dos elementos do tumor (VAN CAUWENBERGE e cols., 1983). Em carcinoma de célula escamosa, a MB é mais irregular, com interrupção focal e reduplicações focais (ALBRECHTSEN e cols., 1986).

THESLEFF & EKBLUM (1984) estudaram a presença de imunocoloração para laminina em cinco ameloblastomas e cinco carcinomas epidermóides orais. Todos os ameloblastomas mostraram linha contínua de coloração da laminina ao redor das células tumorais, no tecido conectivo. A laminina também foi observada em carcinoma escamoso, mas com distribuição heterogênea e irregular.

1.2. Carcinoma do Colo Uterino

O câncer do colo uterino é uma das raras moléstias malignas que obtém uma cura 100% quando diagnosticada nas suas formas iniciais. No Brasil, esta afecção, que é curável totalmente nos seus primórdios, é responsável por 15% dos óbitos de câncer das mulheres acima de 15 anos (TERREIRO, 1987). Em nosso meio, o câncer do colo uterino é o segundo colocado em mulheres, com 17% dos casos, em material de patologia cirúrgica, seguindo o de pele, com 35,5% dos casos (LOPES DE FARIA e cols., 1982). Bastam estes dados estatísticos para demonstrar a importância desta afecção, bem como o posicionamento do câncer cervicouterino que extrapola o seu estudo da área médica para a de saúde pública.

A importância do câncer do colo uterino no Brasil é totalmente diferente na Inglaterra, onde o câncer do ovário tem maior incidência, e nos EUA, onde predominam os carcinomas de pulmão e de mama. O câncer cervicouterino invasor é uma das causas mais frequentes de óbito na população feminina da América Latina, cujas taxas de incidência encontram-se entre as mais altas do mundo.

Os fatores mais importantes que se relacionam com o desenvolvimento do carcinoma cervical e de suas lesões precursoras são: múltiplos parceiros sexuais e a idade precoce ao primeiro coito. O fumo parece ser fator de risco independente. Como consequência, a displasia e o Carcinoma "In Situ" (CIS) são considerados dentro do contexto de doenças sexualmente transmissíveis. Não existe confirmação de que o baixo nível socioeconômico, infecção prévia por sífilis ou gonorréia, o DNA do espermatozóide ou certos métodos anticoncepcionais sejam causas de Neoplasia Intra-Epitelial Cervical (NIC). Existem trabalhos de pesquisa que indicam um vírus associado a um cocarcinogênico como agente responsável. Em parte, este conceito baseia-se no potencial carcinogênico

bem conhecido dos vírus. Os vírus mais responsabilizados são Herpes Simples Tipo 2 (HSV2) e o Vírus Papiloma Humano (HPV) (TERREIRO, 1987).

1.2.1. Vírus do Herpes Simples Tipo 2: A indicação da presença de HSV2 em neoplasia cervical baseia-se em estudos soroepidemiológicos mostrando títulos elevados do anticorpo de HSV2 em mulheres com neoplasia cervical. Foi também identificado o DNA do HSV2 em lesões e NIC de todos os graus e em cultura de tecido de carcinomas de células escamosas. Estes subgenomas foram reconhecidos em 40% de carcinomas cervicais.

1.2.2. Vírus do Papiloma Humano (HPV): Foi reconhecido como um provável agente etiológico do carcinoma escamoso cervical. Embora apenas uma pequena porcentagem de mulheres infectadas com vírus apresente displasia ou carcinoma, 80% das lesões displásicas incipientes apresentam aspectos citológicos de infecção por HPV. Além disso, as células epiteliais em quase todos os graus de displasia, CIS e carcinoma invasivo contêm DNA do HPV. Recentemente, também foi identificado o DNA do HPV dentro de linhagem de células cultivadas do câncer cervical.

O condiloma viral benigno contém tanto os tipos 6 como os 11 do HPV, sendo considerados tipos de baixo risco para o desenvolvimento de câncer. Ao contrário, as células na grande maioria das displasias intensas e câncer invasivo contêm HPV 16, 18 e 31, considerados tipos de risco elevado.

1.2.3. Carcinogênese: A displasia e o carcinoma "in situ" estão incluídos na classificação de Neoplasia Intra-Epitelial Cervical (NIC). O termo neoplasia intra-epitelial cervical foi introduzido para salientar que a displasia e CIS representam mais estágios de um processo contínuo do que doenças separadas. A NIC é definida como um espectro de alterações intra-epiteliais

que começam com atipia global mínima e que evoluem através de estágios de anomalias intra-epiteliais mais acentuadas até o carcinoma invasivo de células escamosas. Foi adotada a seguinte classificação: NIC I = displasia leve; NIC II = displasia moderada; e NIC III = displasia intensa e carcinoma "in situ". Considera-se que o tempo médio para todas as displasias evoluírem para CIS é de aproximadamente dez anos. Este conceito de continuidade de lesão displásica até carcinoma tem sido questionado por alguns autores, que vêem nas lesões produzidas por HPV 6 e 11 diferenças de evolução clínica quando comparadas às produzidas pelo HPV 16 e pelo 18, estes sim com propensão à evolução para o carcinoma (KIVIAT & KOUTSKY, 1993).

1.2.4. Carcinoma Epidermóide "In Situ" ou Carcinoma "In Situ": Este carcinoma é designado atualmente como Neoplasia Intra-Epitelial Cervical grau III (NIC III). Caracteriza-se como uma lesão com alterações citoistológicas do carcinoma, mas limitadas ao epitélio.

O CIS apresenta-se sob fenótipos diversos, todos tendo em comum alterações citoarquiteturais de caráter maligno, sem invasão de estroma do componente celular presente: anaplásico de células pequenas; células grandes não-queratinizantes ou tipo intermediário; e células grandes queratinizantes correspondentes "in situ" respectivamente aos equivalentes invasivos: pouco diferenciado, moderadamente diferenciado e bem diferenciado.

1.2.5. Carcinoma Microinvasivo: Entre os carcinomas epidermóides do colo uterino, o carcinoma microinvasivo é a expressão morfológica do estágio pré-clínico la segundo a FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia - Quadro 2, página 24). Carcinoma microinvasivo é a neoplasia epitelial com um ou mais focos de invasão até a profundidade

máxima de 5mm. O diagnóstico é formulado incluindo o nível exato de profundidade da invasão em milímetros, tomado a partir da base do epitélio, do qual ela parte (superficial ou da cripta), o número de focos da invasão, a confluência ou não dos mesmos, e a presença de comprometimento vascular linfático ou sangüíneo.

Histologicamente, os focos de invasão são representados por um ou mais blocos de células neoplásicas que se projetam da base do epitélio superficial ou da cripta glandular, contendo neoplasia intra-epitelial. Estes blocos assumem formas variadas, como bojuda, em lingüeta ou irregular, e mostram, em geral, mais células diferenciadas do que o componente epitelial "in situ" associado, demonstrando freqüentemente células maiores e queratinizadas. O contorno dos focos é irregular, com perda da membrana basal, e o estroma circunjacente mostra variável infiltrado inflamatório linfomonoplasmocitário, com sinais de agressão às células neoplásicas. Trata-se de uma lesão seguramente de prognóstico mais favorável que o correspondente francamente invasivo.

1.2.6. Carcinoma Epidermóide Invasivo: O carcinoma epidermóide invasivo, nas fases iniciais do seu crescimento, promove um aumento na consistência e confere granulosidade ao colo, já percebidos ao toque. Nestas fases, na grande maioria das vezes, a sua localização na zona de transformação pode ser visualizada. A progressão tumoral faz-se sob duas formas básicas de apresentação morfológica: exofítica e endofítica. Esta última inclui os tipos ulcerados e nodulares, que podem coexistir com a forma exofítica. A forma exofítica apresenta-se como tipo poliplóide e vegetante; este último incluindo a apresentação verrucosa e a papilífera.

Na prática, o carcinoma epidermóide apresenta-se sob variáveis graus de diferenciação classificados como: bem diferenciado (grau 1), moderadamente diferenciado (grau 2) e pouco diferenciado (grau 3). Os

tumores bem diferenciados são constituídos por células com sinais de maturação escamosa evidente, como produção de queratina, presença de pontes intercelulares e citoplasma abundante eosinofílico, por vezes claro, contendo glicogênio. Estas células formam grupos coesos, circundados em geral por estroma com denso infiltrado inflamatório linfomonoplasmocitário e ocasional reação granulomatosa tipo corpo estranho à queratina, substrato morfológico da reação do hospedeiro à invasão neoplásica. Os núcleos são grandes e têm cromatina irregularmente distribuída.

As neoplasias moderadamente diferenciadas mostram composição celular mais pleomórfica que a do grau 1, sendo caracterizadas por diminuição do volume citoplasmático, bordas celulares menos nítidas, pontes intercelulares indistintas e praticamente ausência de pérolas córneas comuns no grau 1, embora queratinização individual de células esteja presente. As figuras de mitose são comumente encontradas.

Os carcinomas pouco diferenciados caracterizam-se por ausência de maturação escamosa indicada pela produção de queratina opticamente visível. São em geral compostos por células pequenas, com alta relação núcleo/citoplasma, tipo basalóide, ocasional disqueratose e numerosas figuras de mitose, por vezes atípicas (CARVALHO, 1987).

1.2.7. Imunocoloração de MB em Carcinoma de Colo Uterino: A exemplo de achados em outros órgãos, lesões benignas e pré-malignas do epitélio cervical mostram, em geral, MB preservada enquanto que carcinomas tendem a apresentar áreas de descontinuidade da mesma. Isto foi verificado em estudos de imunofluorescência, imuno-histoquímica e microscopia eletrônica (FRAPPART e cols., 1982; STENBÄCK e cols., 1985). RICHARDS & FURNESS (1990) realizaram um estudo para avaliar a freqüência de falhas na MB em lesões de colo uterino, através da detecção imuno-

histoquímica de colágeno IV. Estudaram 185 casos, divididos em dois grupos:

- a) Histerectomia por disfunção uterina sem neoplasia (epitélio escamoso normal = grupo-controle); epitélio mostrando alterações virais sem evidência de atipia e epitélio escamoso metaplásico.
- b) Biópsia de cone = alterações virais com neoplasia intra-epitelial cervical e carcinoma de células escamosas microinvasivo e invasivo.

Foram também caracterizados mais dois grupos: um associado com infiltrado inflamatório e outro não associado com infiltrado inflamatório. Foi verificado que o epitélio escamoso cervical em condições benignas tem MB preservada; o desenvolvimento de atipia viral ou NIC provoca o aparecimento de pequenas falhas na MB; e em carcinomas microinvasivos e invasivos a MB está ausente ou severamente fragmentada. Nas neoplasias mais severas, observou-se forte infiltrado inflamatório no estroma e maior frequência de falhas da MB.

Em outro trabalho foi feito também um estudo imuno-histoquímico da distribuição de laminina, colágeno IV e fibronectina em colo uterino normal (16 casos), displasia cervical (14 casos) e carcinoma invasivo (45 casos) (FAVRET e cols., 1990). Os autores verificaram coloração para laminina e colágeno IV linear e contínua no epitélio normal e displásico (NIC1 e NIC2), falhas na continuidade da MB e alterações na linearidade em carcinoma "in situ" (NIC3). Além disto, notaram o desaparecimento de MB em áreas de microinvasão. No carcinoma invasivo bem diferenciado houve falhas focais da MB, e no moderadamente diferenciado e pobremente diferenciado houve redução progressiva e perda de laminina e colágeno IV. A fibronectina não mostrou distribuição relacionada com o grau de neoplasia. Os resultados deste estudo sugerem que o modelo de distribuição de componentes da MB varia conforme a capacidade de invasão do tumor.

Mais recentemente, PITT, HALL, BUCKLLY (1992) avaliaram o colágeno IV em carcinoma epidermóide e adenocarcinoma do colo uterino (60 casos). Esta avaliação foi semiquantitativa de acordo com as características de coloração da seguinte forma:

Tipo 1: MB espessa ou normal sem descontinuidade ou com descontinuidade mínima.

Tipo 2: MB fina sem descontinuidade ou com descontinuidade moderada.

Tipo 3: MB fragmentada ou ausente.

Em adenocarcinomas a deposição reduzida de colágeno IV estava correlacionada com pior prognóstico e padrão de crescimento infiltrante. Também a presença de metástase em linfonodos estava correlacionada com a deposição reduzida de colágeno IV e pior prognóstico. Em todos os casos com metástase, doença recorrente ou fatal, o colágeno IV estava diminuído ou ausente; nenhum caso com deposição normal de colágeno IV apresentava metástase ou doença recorrente. O carcinoma escamoso e o adenoescamoso não mostraram correlação significativa com o padrão de distribuição do colágeno IV. PITT e cols. (1992) concluíram que o colágeno IV poderia ser usado como marcador prognóstico, em particular para adenocarcinomas. Estes achados corroboraram estudo pregresso em adenocarcinoma de colo uterino (TOKI e cols., 1990).

Quadro 1: Alterações de membrana basal em neoplasias humanas benignas e malignas

ÓRGÃO	TIPO DE NEOPLASIA	MORFOLOGIA DA MB
PELE	Carcinoma de célula escamosa Epitelioma de célula basal Tumor benigno de anexos	Fendas focais até perdas extensas Intacta, contínua Distinta, contínua Em alguns tipos de tumores, descontínua
	Tumor maligno de anexos	Descontinuidade ou perda
CABEÇA E	Carcinoma de célula escamosa Orofaringe	Bem desenvolvida, descontinuidade focal
PESCOÇO	Amígdala	Idem
	Laringe	Idem
MAMA	Fibroadenoma	Intacta, contínua
	Adenose esclerosante	Intacta, contínua
	Adenocarcinoma	Descontínua ou ausente
CÓLON	Adenoma	Intacta, contínua
	Adenocarcinoma	Desconhecida ou ausente
PÂNCREAS	Adenoma de células da ilhota	Intacta, contínua
	Adenocarcinoma	Irregular, descontínua
PRÓSTATA	Hiperplasia	Intacta, contínua
	Adenocarcinoma	Descontínua ou ausente
GLÂNDULA SALIVAR	Adenoma pleomórfico	Pobremente desenvolvida, descontínua
	Carcinoma adenóide cístico	Intacta, contínua
	Tumor de Warthin	Intacta, contínua
	Tumor mucoepidermóide	Descontínua ou ausente
ÚTERO	Adenocarcinoma endometrial	Descontínua ou ausente
	Carcinoma de célula escamosa da cervice	Intacta ou fendas focais
PULMÃO	Adenocarcinoma	Intacta, contínua
	Carcinoma de célula escamosa	Irregular, descontínua

Modificado de BOSMAN e cols. (1985)

Quadro 2: Definição da FIGO para o estadiamento clínico do câncer cervical

ESTÁDIO 0	Carcinoma "in situ"; carcinoma intra-epitelial
ESTÁDIO I	Carcinoma estritamente confinado à cervice (extensão ao corpo não deve ser aqui incluída)
ESTÁDIO Ia	Carcinomas pré-clínicos da cervice, i.e., apenas diagnosticados por microscopia
ESTÁDIO Ia1	Invasão estromal microscópica mínima
ESTÁDIO Ia2	Lesões detectadas microscopicamente que podem ser medidas. O limite superior da medida não deve mostrar uma profundidade de invasão de mais do que 5mm tomados da base do epitélio, quer da superfície, quer glandular, do qual ela se origina, e uma segunda dimensão, a extensão horizontal, não deve exceder 7mm Lesões maiores devem ser estadiadas como Ib.
ESTÁDIO Ib	Lesões de dimensões maiores que o estágio Ia2, quer visualizadas clinicamente ou não. A área de envolvimento deve ser especificamente relatada de forma a determinar se deve afetar conduta terapêutica futura
ESTÁDIO II	Carcinoma estende-se além da cervice, sem extensão para parede pélvica e terço inferior da vagina
ESTÁDIO IIa	Sem envolvimento óbvio dos parâmetros
ESTÁDIO IIb	Com envolvimento óbvio dos parâmetros
ESTÁDIO III	Carcinoma estende-se à parede pélvica e/ou ao terço inferior da vagina. Todos os casos com hidronefrose ou rim não-funcionante estão aqui incluídos
ESTÁDIO IIIa	Sem extensão para a parede pélvica
ESTÁDIO IIIb	Com extensão para a parede pélvica
ESTÁDIO IV	Carcinoma estende-se além da pelve verdadeira ou envolve bexiga ou reto
ESTÁDIO IVa	Envolvimento de órgãos adjacentes
ESTÁDIO IVb	Envolvimento de órgãos a distância

FIGO Cancer Committee; *Gynecol. Oncol.*, 25:383-5 (1986)

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Dada a prevalência do carcinoma de colo uterino em nosso meio e a importância prática da correta avaliação do grau de invasão pelo anatomopatologista e as conseqüências terapêuticas e de prognóstico, objetivamos com o presente trabalho:

2.1. Avaliar o comportamento de um dos componentes da membrana basal, o colágeno IV, através de método imuno-histoquímico em carcinoma "in situ", microinvasivo e francamente invasivo do colo uterino;

2.2. Verificar em que medida esta avaliação pode ser útil à prática do patologista diante de um caso de caráter invasivo dúbio.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

Através da revisão dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da FCM - UNICAMP, nos anos de 1988 a 1993, foram levantados casos diagnosticados como carcinoma "in situ", microinvasivo e epidermóide francamente invasor do colo uterino.

Todo material examinado havia sido enviado a esse Serviço fixado em formalina a 10%, tendo sido posteriormente submetido aos procedimentos para inclusão em parafina.

As lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) foram examinadas, sendo selecionados os melhores blocos para o processamento das reações de imuno-histoquímica (IHQ). Os espécimes examinados provinham de biópsias, cones ou histerectomia. Este estudo foi realizado no Laboratório de Patologia Experimental - CAISM - UNICAMP, de acordo com os seguintes procedimentos:

3.1. Técnica de Imuno-Histoquímica

A pesquisa de antígenos do colágeno IV foi realizada segundo procedimentos de imuno-histoquímica, técnica da avidina-biotina-peroxidase, descritos por HSU, RAINE, FANGER (1981).

A reação da imunoperoxidase permite a localização de antígenos celulares via enzima peroxidase em continuação com um anticorpo específico. Uma substância geradora de cor é adicionada para reagir com a enzima e se precipita no local da reação. A reação é proporcional à quantidade de antígeno presente. Os demais componentes tissulares serão contrastados pela contracoloração, geralmente com hematoxilina. São usados três reagentes: o anticorpo específico primário monoclonal

anticolágeno IV, contra o antígeno a ser localizado; anticorpo secundário capaz de ligar-se ao primário, conjugado à biotina; e o complexo de peroxidase, conjugado à avidina e biotina (Figura 3).

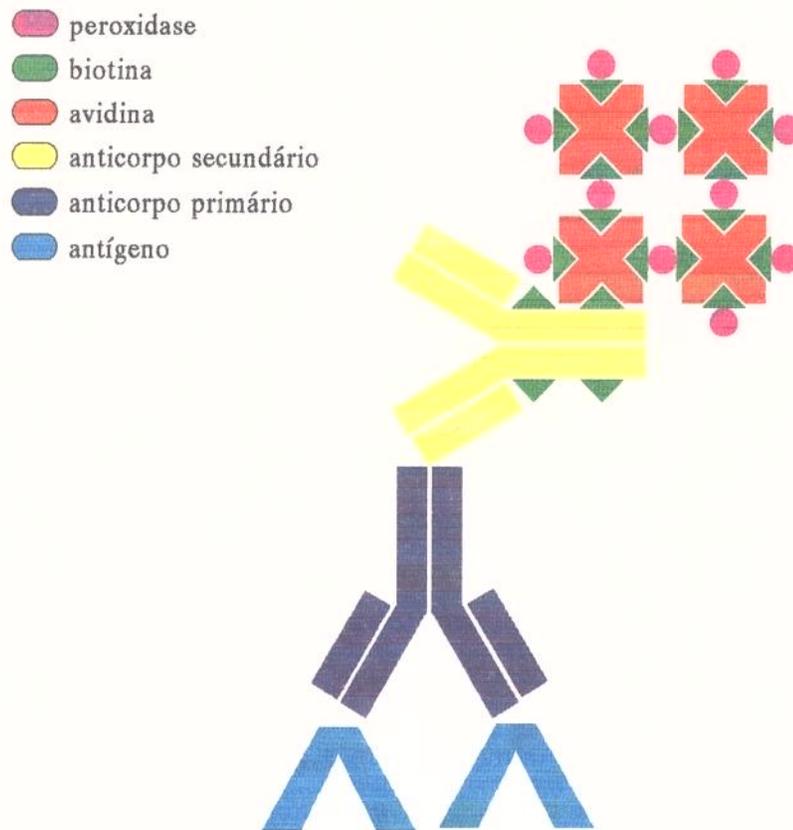


Figura 3. Representação esquemática da reação imuno-histoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase.

A avidina contém quatro sítios para ligação com a biotina, sendo que um deles vai ser ocupado pela biotina ligada ao anticorpo secundário e os outros três sítios serão acoplados ao complexo biotina-peroxidase da solução.

Sumariamente procedeu-se como se segue:

- Cortes histológicos de 5 micrômetros (μm) foram colocados em lâminas previamente lavadas e desengorduradas, tratadas com solução aquosa de cola branca comum (à base de PVA). As lâminas com os cortes foram deixadas no mínimo por 24 horas em estufa a 60°C , para melhor adesão dos mesmos.
- Desparafinação dos cortes com um banho de xilol a 60°C (15 minutos) e dois banhos de xilol à temperatura ambiente (10 minutos cada) para retirar o excesso de parafina.
- A hidratação foi feita em gradiente decrescente de álcoois (três banhos de álcool absoluto, dois minutos cada; uma vez em álcool 80%, por dois minutos; uma vez em álcool 50%, por dois minutos - todos à temperatura ambiente).
- Seguiu-se lavagem em água corrente por dois minutos e passagem em água destilada.
- Digestão enzimática: o antígeno pode ficar mascarado durante a fixação com formalina ou outro fixador quando ocorre formação de ligações químicas aldeídicas. Estas são quebradas pela pepsina ou outra enzima proteolítica e, assim, o antígeno fica acessível ao anticorpo. Para digestão enzimática foi utilizada pepsina (Pepsin-Sigma cód. P 7012) 0,4g em 100ml

HCl 0,01N. Incubação das lâminas por duas horas a 37°C, seguindo-se lavagem em água corrente e passagem por água destilada.

- Inibição da peroxidase endógena: banho de solução a 3% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 30%) em metanol, 15 minutos, à temperatura ambiente, seguindo-se lavagem em água corrente e passagem por água destilada. Incubação em tampão PBS (Phosphate Buffer Saline, Na_2HPO_4 0,01M; NaCl 0,1M, pH 7,6).

- Bloqueio de reações inespecíficas: visa evitar que o anticorpo primário e secundário liguem-se a antígenos inespecíficos, eliminando, desta forma, a reação de fundo. O soro normal deve ser de um animal diferente daquele no qual é produzido o anticorpo primário e, de preferência, igual ao secundário. O soro normal utilizado foi o de cavalo - diluído a 1:10 e incubação de 20 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. A seguir, retirou-se o excesso de soro normal, sem lavagem posterior.

- Reação antígeno-anticorpo primário: dirigido a um antígeno específico. Incubação com o anticorpo primário anticolágeno IV (Dakopatts - Denmark, cód. M 785, monoclonal, produzido em camundongo, diluição 1:100 em BSA 0,1% [soro albumina bovina]). Incubação noturna a 4°C em câmara úmida. Na manhã seguinte, foi retirado o excesso do anticorpo primário, seguindo-se três lavagens em PBS de cinco minutos cada, à temperatura ambiente.

- Reação com o anticorpo secundário biotinilado (porção Fc): dirigido contra o anticorpo primário (cadeia pesada). Incubação com anticorpo secundário biotinilado (anti-IgG de camundongo produzido em cavalo, Kit Vector, Vectastain, mouse, cód. PK 4002 - diluição 1:200 em tampão PBS) durante 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente.

- Retirado o excesso do anticorpo secundário biotinilado, seguiram-se três lavagens em PBS, cinco minutos cada, à temperatura ambiente.
- Reação ABC - complexo avidina-biotina-peroxidase: à incubação com complexo ABC (Kit ABC Vector - Vectastain, mouse IgG - cód PK 4002 - diluição 1:200 em tampão PBS), 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, seguindo-se lavagem em tampão PBS.
- Coloração: realizada em DAB (3,3 tetra-hidrocloreto de diaminobenzidina, Sigma nº D 5637), cromógeno de cor marrom impregnado no local onde ocorre a reação:



[Preparo: 40mg de DAB em 100ml de tampão PBS e 20µl de peróxido de hidrogénio a 30%]. Deixaram-se as lâminas na solução por cerca de dois a três minutos, à temperatura ambiente, ou até visualização de coloração levemente acastanhada dos cortes.

- Lavagem em água corrente, seguida de passagem em água destilada.
- Contracoloração: hematoxilina de Mayer, durante um minuto, à temperatura ambiente. Seguiu-se lavagem em água corrente, colocando-se algumas gotas de amoníaco na água para evidenciar a contracoloração (contraste). Seguiu-se lavagem em água corrente e passagem em água destilada.
- Desidratação em gradiente crescente de álcoois: uma vez álcool 50%, uma vez álcool 80%, três vezes álcool absoluto, passagem em três xilóis. Montagem das lâminas com Entellan (Merck nº 7961).

- A observação dos resultados foi feita em microscópio óptico comum, sendo considerada positiva a linha contínua de MB, corada em marrom. Serviu de controle interno positivo dos cortes a coloração da MB dos vasos, sempre presentes, bem como a membrana basal de áreas de epitélio normal, quando existente. A MB foi avaliada em cada grupo CIS, CMI e CEI segundo o seu grau de continuidade de acordo com PITT e cols. (1992) em:

A- membrana basal normal, contínua.

B- membrana basal com áreas de adelgaçamento.

C- membrana basal com pequenas áreas de descontinuidade.

D- membrana basal com extensas áreas descontínuas ou ausentes.

E- áreas de espessamento da MB (podendo coexistir com os itens A a D).

Além disto, a intensidade da reação foi graduada em: + (leve) ++ (moderada)

+++ (intensa).

Também foi observada a localização das áreas de descontinuidade existentes: se em áreas de invasão tumoral, de infiltrado inflamatório ou de ambos. O infiltrado inflamatório também foi graduado em: 0 (inexistente); + (leve); ++ (moderado) e +++ (intenso).

Sendo este um método que preserva detalhes morfológicos, foi feito o diagnóstico de carcinoma "in situ", microinvasivo ou francamente invasivo, para posterior comparação com diagnóstico de hematoxilina e eosina, na avaliação do valor da metodologia nestes diagnósticos. Tal procedimento foi realizado independentemente pelos observadores, sem conhecimento do diagnóstico dos preparados de HE. Os casos foram diagnosticados por um Revisor (co-orientador deste trabalho) e apenas os casos com discordância diagnóstica foram submetidos à especialista em Ginecopatologia do Departamento de Anatomia Patológica/UNICAMP (Revisor 2).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

No período estudado (1988 a 1993), os casos para análise levantados no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP foram: 40 casos de CIS, 35 casos de CMI e 30 casos de CEI, todos eles analisados histologicamente em coloração hematoxilina-eosina.

Desses casos, foram estudados com IHQ somente aqueles com blocos de parafina disponíveis: 33 casos de CIS, 28 de CMI e 26 de CEI.

I. Dos 33 casos de CIS, 20 forneceram dados avaliáveis de imunohistoquímica (Tabela 1).

Na revisão do diagnóstico histológico em HE destes 20 casos, quatro apresentaram discordância de diagnóstico pelo Revisor 1: um para CEI e três para CMI (3ª coluna da Tabela 1).

II. Dos 28 casos de CMI, apenas 15 forneceram resultados avaliáveis para IHQ (Tabela 2).

A revisão da HE destes 15 casos pelo Revisor 1 não apresentou discordância em relação ao primeiro diagnóstico, isto é, diagnóstico inicial do arquivo (3ª coluna da Tabela 2).

III. Dos 26 casos de CEI, 24 forneceram resultados avaliáveis para IHQ (Tabela 3).

A revisão do HE destes 24 casos pelo Revisor 1 também não apresentou discordância em nenhum caso quando comparados ao primeiro diagnóstico (3ª coluna da Tabela 3).

O restante dos casos, 13 de CIS, 13 de CMI e 2 de CEI, não forneceram resultados positivos à IHQ, sendo o controle interno (vasos) negativo, mesmo após várias repetições da técnica. Estes casos somam 28, correspondendo a 32% do material inicialmente submetido à IHQ.

TABELA 1. CIS como diagnóstico de arquivo (20 casos): Dados sobre a revisão da HE e avaliação após IHQ

N BIÓPSIA	DIAG. HISTOL. INICIAL	DIAG. HE REV. 1	ÁREA DO CARCINOMA MB	INFILTR. INFLAMATÓRIO	REVISOR 1 IHQ
30102	CIS	CIS	++/A	++/A	CIS
30816	CIS	CMI*	++/B	++/B	CMI*
31049	CIS	CIS	+/C	+/C	CIS
31435	CIS	CMI*	+++ /B, E	+/B	CMI*
32742	CIS	CIS	+++ /B, E	++/C	CMI*
33126	CIS	CIS	+++ /B	++/B	CIS
33394	CIS	CIS	++/B	+/B	CIS
33652	CIS	CIS	+++ /B	+/B	CMI*
33682	CIS	CIS	+++ /C, E	+/C	CIS
33796	CIS	CIS	++/A	+/A	CIS
33902	CIS	CIS	+/B	+/B	CIS
33934	CIS	CIS	++/B	+/B	CIS
34011	CIS	CEI*	+/D	+++ /C	CMI*
34145	CIS	CIS	+/A	++/A	CIS
34452	CIS	CIS	++/B	++/B	CIS
34668	CIS	CIS	+/A	0	CIS
35339	CIS	CIS	++/A	0	CIS
37405	CIS	CMI*	+/B	++/B	CIS
37459	CIS	CIS	+++ /B	++/B	CIS
37568	CIS	CIS	+++ /A	++/A	CIS

TABELA 2. CMI como diagnóstico de arquivo (15 casos): Dados sobre a revisão da HE e avaliação após IHQ

N BIÓPSIA	DIAG. HISTOL. INICIAL	DIAG. HE REV. 1	ÁREA DO CARCINOMA MB	INFILTR. INFLAMATÓRIO	REVISOR 1 IHQ
17123	CMI	CMI	+++/A	++/A	CIS
21056	CMI	CMI	++/C	++/C	CMI
22123	CMI	CMI	+++/B	++/B	CMI
22846	CMI	CMI	+++/B	++/B	CIS*
24594	CMI	CMI	+++/B	+++/B	CIS*
25215	CMI	CMI	+++/B, E	++/B	CMI
25784	CMI	CMI	++/A	+/A	CIS*
26362	CMI	CMI	+++/C, E	+/C	CMI
28818	CMI	CMI	++/C	++/C	CMI
28969	CMI	CMI	++/C	+++/C	CMI
30056	CMI	CMI	+++/C	++/C	CMI
30638	CMI	CMI	+++/B, E	+++/B	CIS*
31643	CMI	CMI	+++/B, E	++/B	CIS*
32740	CMI	CMI	++/C	+/A	CMI
35963	CMI	CMI	+++/D	++/D	CMI

TABELA 3. CEI como diagnóstico de arquivo (24 casos): Dados sobre a revisão da HE e avaliação após IHQ

N BIÓPSIA	DIAG. HISTOL. INICIAL	DIAG. HE REV. 1	ÁREA DO CARCINOMA MB	INFILTR. INFLAMATÓRIO	REVISOR 1 IHQ
17728	CEI	CEI	+++/D	+/D	CMI*
17982	CEI	CEI	++/D	+/D	CEI
18356	CEI	CEI	+/D	++/D	CEI
18919	CEI	CEI	++/D	+/D	CMI*
20533	CEI	CEI	++/D	+++/D	CEI
22865	CEI	CEI	+++/C	++/C	CEI
23225	CEI	CEI	+++/D	+++/D	CEI
23685	CEI	CEI	+++/D	+/D	CEI
24884	CEI	CEI	+++/D	++/D	CEI
26126	CEI	CEI	+/D	++/D	CEI
26646	CEI	CEI	+++/D	++/D	CEI
26800	CEI	CEI	+++/D	+++/D	CEI
19026	CEI	CEI	+/C	+/C	CEI
27381	CEI	CEI	+++/D	+++/D	CEI
27674	CEI	CEI	+++/D	+++/D	CEI
27941	CEI	CEI	+++/A	+/A	CIS*
28124	CEI	CEI	+++/D	++/D	CEI
29899	CEI	CEI	++/D	++/D	CEI
30321	CEI	CEI	+++/C, E	++/C	CEI
31505	CEI	CEI	++/D	++/D	CEI
31847	CEI	CEI	++/D	++/D	CMI*
34895	CEI	CEI	++/D	+/D	CEI
35740	CEI	CEI	++/D	++/D	CEI
32762	CEI	CEI	+++/D	++/D	CEI

Depois de selecionados os casos corados em HE, foi então realizada a IHQ com os seguintes resultados:

I. Após IHQ para colágeno IV do grupo de CIS, cinco casos apresentaram discordância pelo Revisor 1, mudando o diagnóstico para CMI (todos os cinco) (6ª coluna da Tabela 1). Em três casos já havia esta discordância ao analisar em HE.

a) Houve reação fraca da MB em seis casos, moderada em sete e intensa em sete (4ª coluna da Tabela 1).

b) Em relação à continuidade da membrana (4ª coluna da Tabela 1):

A = MB contínua	= 6 casos
B = MB com áreas de adelgaçamento	= 11 casos
C = MB com áreas pequenas de descontinuidade	= 2 casos
D = MB com áreas extensas de descontinuidade	= 1 caso
E = MB com áreas de espessamento	= 3 casos

c) Em relação ao infiltrado inflamatório, ele foi (5ª coluna da Tabela 1):

Intensidade:		MB subjacente ao infiltrado:				
		A	B	C	D	E
o = ausente	- 2 casos	-	-	-	-	-
+ = leve	- 8 casos	1	5	2	-	-
++ = moderado	- 9 casos	3	5	1	-	-
+++ = intenso	- 1 caso	-	-	1	-	-

d) Dos casos em que houve discordância do diagnóstico de IHQ do Revisor 1 em relação à HE (cinco casos), temos que quatro apresentaram padrão B de MB, ou seja, áreas de adelgaçamento e um apresenta MB com padrão D, ou seja, ausência em áreas extensas.

II. A análise IHQ para colágeno IV do grupo CMI foi discordante do primeiro diagnóstico (HE) em seis casos, todos para CIS (6ª coluna da Tabela 2). Esta discordância não havia aparecido na primeira revisão em HE.

a) A intensidade da reação da MB foi moderada (++) em cinco casos e intensa (+++) em dez casos (4ª coluna da Tabela 2).

b) O padrão de MB foi (4ª coluna da Tabela 2):

A = 2 casos

B = 6 casos

C = 6 casos

D = 1 caso

E = 4 casos

c) Em relação ao infiltrado inflamatório foi (5ª coluna da Tabela 2):

	A	B	C	D	E
o = 0 caso	-	-	-	-	-
+ = 3 casos	2	-	1	-	-
++ = 9 casos	1	4	3	1	-
+++ = 3 casos	-	2	1	-	-

d) Dos seis casos em que houve discordância entre o primeiro diagnóstico de HE e o diagnóstico após IHQ, em dois casos o padrão de MB foi A e em quatro casos o padrão foi B.

III. Após a IHQ, no grupo de CEI, o diagnóstico do Revisor 1 discordou do diagnóstico inicial (HE) em quatro casos, sendo três deles para CMI e um para CIS (6ª coluna da Tabela 3).

a) A intensidade da reação da MB foi: leve em três casos, moderada em oito casos e intensa em 13 casos (4ª coluna da Tabela 3).

b) O padrão de MB foi (4ª coluna da Tabela 3):

A = 1 caso

B = 0 caso

C = 3 casos

D = 20 casos

E = 1 caso

c) O infiltrado inflamatório foi (5ª coluna da Tabela 3):

	A	B	C	D	E
o = 0 caso	-	-	-	-	-
+ = 7 casos	1	-	1	5	-
++ = 12 casos	-	-	2	10	-
+++ = 5 casos	-	-	-	5	-

d) Dos quatro casos discordantes entre o primeiro diagnóstico e o diagnóstico de IHQ, três apresentavam padrão D de MB e um padrão A.

Feita a análise em HE e IHQ pelo Revisor 1, observamos que, dos 59 casos estudados, 15 mostraram discordância de diagnóstico à HE e/ou IHQ. Apenas estes foram então avaliados pelo Revisor 2.

Os resultados encontram-se na Tabela 4.

TABELA 4. Casos discordantes (15/59) após revisão pelo Revisor 1 e respectivos diagnósticos pelo Revisor 2

Nº BLOCO	DIAGNÓSTICO		IMUNO-HISTOQUÍMICA	
	REV.1	HISTOLÓGICO REV. 2	REV.1	REV. 2
01. 17728	CEI	CEI	CMI	CMI
02. 18919	CEI	CEI	CMI	CEI
03. 27941	CEI	CEI	CIS	CMI+CIS
04. 31847	CEI	CEI	CMI	CMI
05. 30816	CMI	CIS	CMI	CMI
06. 31435	CMI	CIS	CMI	CIS
07. 32742	CIS	CIS	CMI	CMI
08. 33652	CIS	CIS	CMI	CMI+CIS
09. 34011	CEI	CIS	CMI	CMI
10. 17123	CMI	CMI	CIS*	CMI+CIS*
11. 22846	CMI	CMI	CIS*	CMI+CIS*
12. 25594	CMI	CMI	CIS*	CMI*
13. 25784	CMI	CMI	CIS*	CMI*
14. 30638	CMI	CMI	CIS*	CMI*
15. 31643	CMI	CMI	CIS	CIS

a) Dos 15 casos analisados pelo Revisor 2, em oito casos a IHQ foi importante para o diagnóstico no sentido de alterá-lo ou de complementá-lo, sendo levado em consideração na decisão final (Tabela 4: 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 15). Em cinco casos a IHQ foi considerada incorreta por não apresentar mais o processo quando analisada, pois o bloco havia sido muito desbastado (Tabela 4: 10, 11, 12, 13, 14). Estes cinco casos foram então diagnosticados como CIS à IHQ pelo

Revisor 1, quando na verdade tratava-se de CMI. O Revisor 2 manteve o diagnóstico de CMI (assinalados com * na Tabela 4) após revisão da IHQ, pois este fez uma avaliação conjunta com o HE para chegar a um diagnóstico final. Em dois casos (Tabela 4: 2 e 6) a IHQ apenas confirmou para o Revisor 2 os seus diagnósticos de HE, sendo ambos discordantes

dos diagnósticos do Revisor 1. Os dados sobre a reatividade da IHQ e sobre os padrões da MB estão resumidos na Tabela 5.

TABELA 5. Resumo dos dados sobre a intensidade da reação e padrão de MB nos carcinomas

	REATIVIDADE MB			PADRÃO MB				
	+	++	+++	A	B	C	D	E
CIS = 20	6	7	7	6	11	2	1	3
CMI = 15	0	5	10	2	6	6	1	4
CEI = 24	3	8	13	1	0	3	20	1
TOTAL	9	20	30	9	17	11	22	8

Análise Estatística

Os dados a respeito da intensidade da reação IHQ e do infiltrado inflamatório foram analisados pela comparação das médias entre os grupos por meio da análise de variância segundo o modelo inteiramente casualizado e teste t para amostras independentes.

As associações entre os diagnósticos à HE e diagnóstico após estudo IHQ, intensidade do infiltrado inflamatório e continuidade da membrana basal nos grupos de carcinomas estudados foram verificadas pelo teste Qui-Quadrado.

A Tabela 6 mostra médias e desvios-padrões da intensidade da reação IHQ nos grupos de carcinomas estudados.

TABELA 6. Intensidade da reação IHQ na área do carcinoma e adjacências

GRUPO	MÉDIA	DESVIO-PADRÃO	N
CIS	1,83	0,75	20
CMI	2,60	0,54	15
CEI	2,38	0,78	24

A Tabela 7 apresenta análise de variância aplicada aos dados da Tabela 6. Segundo esta análise, verifica-se que existem diferenças significantes entre as médias. O teste t para amostras independentes indica não haver diferenças significativas entre CMI e CEI ($T = 0,96$ GL = 37 $0,30 < p < 0,40$). Deste modo, pode-se concluir que a intensidade da reação IHQ (leve, moderada, intensa) foi significativamente maior nos grupos CMI e CEI do que no CIS.

TABELA 7. Análise de variância aplicada aos dados da Tabela 6

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ	GL	QM	F	P
ENTRE	5,82	2	2,91	5,65	$p < 0,05$
DENTRO	28,86	56	0,52		
TOTAL	34,69	58			

CMI X CEI $T = 0,96$ GL = 37 $0,30 < p < 0,40$ (N.S)

A Tabela 8 mostra a média e os desvios-padrões relativos à presença de infiltrado inflamatório e sua intensidade nos grupos de carcinomas estudados.

TABELA 8. Intensidade do infiltrado inflamatório

GRUPO	MÉDIA	DESVIO-PADRÃO	Nº
CIS	1,45	0,76	20
CMI	2,00	0,65	15
CEI	1,92	0,72	24

A Tabela 9 mostra análise de variância aplicada aos dados da Tabela 8, verificando-se diferença significativa entre as médias $P < 0,05$. O teste t para amostras independentes indica não haver diferença significativa entre CMI e CEI ($t = 0,35$ GL = 37 $0,70 < p < 0,80$).

TABELA 9. Análise de variância aplicada aos dados da Tabela 8

FONTE DE VARIAÇÃO	SQ	GL	QM	F	N
ENTRE	3,35	2	1,68	3,26	$p < 0,05$
DENTRO	28,78	56	0,51		
TOTAL	32,14	58			

CMI X CEI $T = 0,35$ GL = 37 $0,70 < p < 0,80$ (N.S.)

O que podemos concluir das Tabelas 8 e 9 é semelhante aos resultados obtidos nas Tabelas 6 e 7, ou seja, a intensidade do infiltrado inflamatório também foi maior nos dois últimos grupos (CMI e CEI) do que no CIS.

Tabela 10. Análise da continuidade da MB na área do tumor e intensidade do infiltrado inflamatório

Infiltrado Inflamatório	Continuidade da MB		Total
	A + B	C + D	
O/+	13	10	23
++	11	16	27
+++	2	7	9
TOTAL	26	33	59

$$\chi^2 = 3,31 \quad 0,10 < p < 0,20$$

A continuidade da MB foi independente da presença do infiltrado inflamatório, segundo os dados da Tabela 10.

A seguir, foram analisados apenas CIS e CMI em relação aos padrões de continuidade da MB, porque 96% dos casos de CEI mostraram padrões de MB do tipo C e D, ou seja, ocorreu inquestionável comprometimento da mesma.

Tabela 11. Padrão de continuidade da MB em CIS e CMI

Diagnóstico	Continuidade da MB		Total
	A + B	C + D	
CIS	17	3	20
CMI	8	7	15
TOTAL	25	10	35

$$\chi^2 \text{ (corrigido)} = 2,80 \quad 0,05 < p < 0,10 \quad GL = 1$$

O valor do Qui-Quadrado corrigido entre CIS e CMI foi igual a 2.80. Embora este valor indique que as diferenças não são estatisticamente significantes, permite verificar uma tendência à desorganização da MB quando o tumor passa de CIS a CMI, uma vez que este valor está próximo aos limites da significância. De fato, pode-se inferir que a não detecção da diferença entre estes dois grupos é, muito provavelmente, devido ao pequeno tamanho amostral neste trabalho.

As Figuras 4 a 12 ilustram os padrões de MB à IHQ.

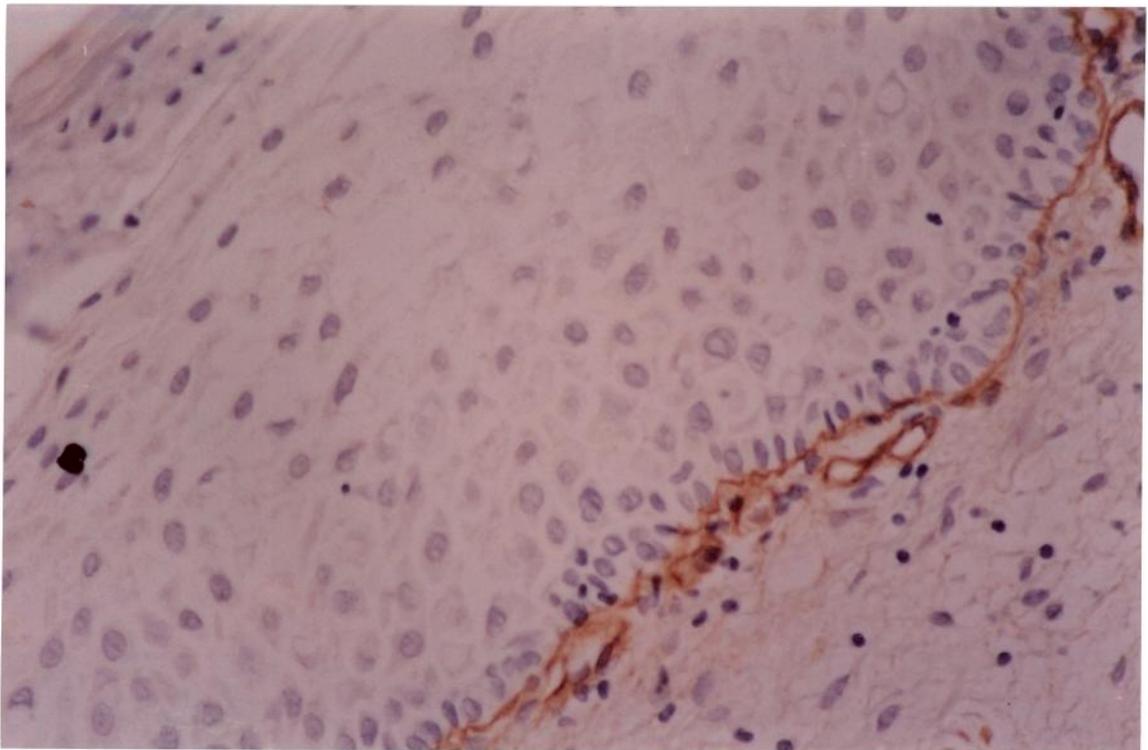


Figura 4. Área de epitélio plano estratificado normal mostrando MB em linha contínua e nítida. Em áreas logo abaixo dela notam-se pequenos vasos sangüíneos [Avidina-Biotina-Peroxidase (ABP) contracorada com hematoxilina 330 x].

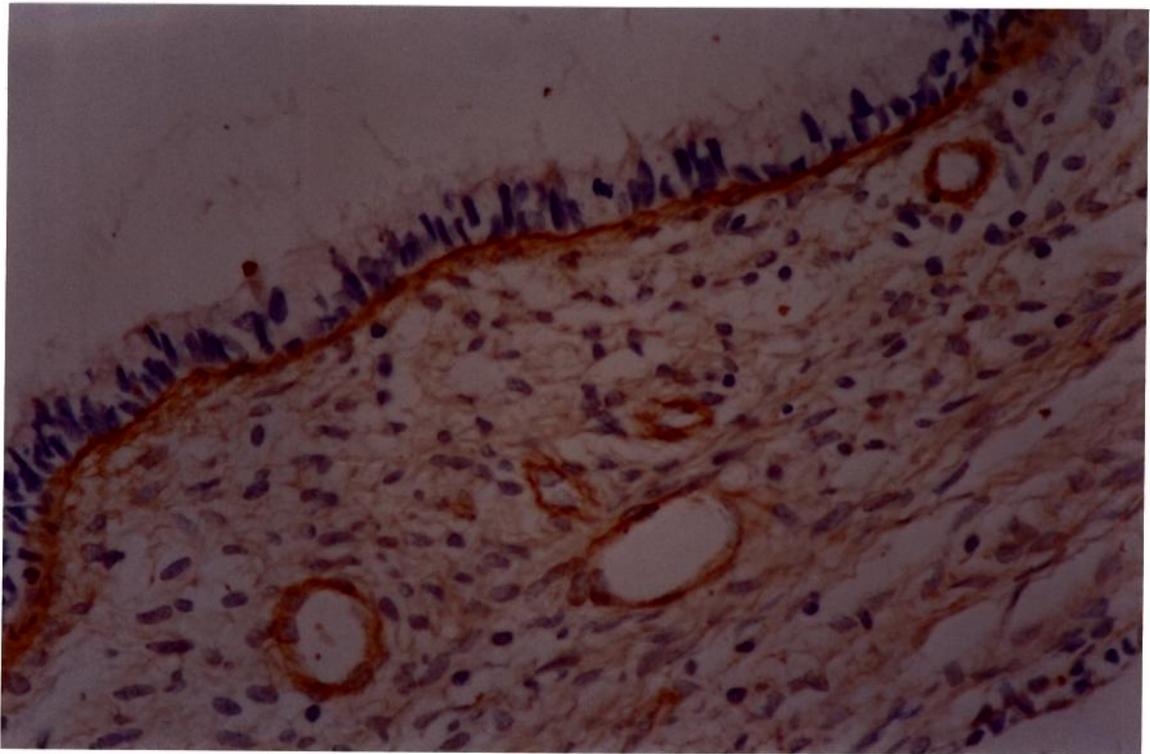


Figura 5. Área de epitélio cilíndrico simples endocervical mostrando MB íntegra (ABP contracorada com hematoxilina 330x).

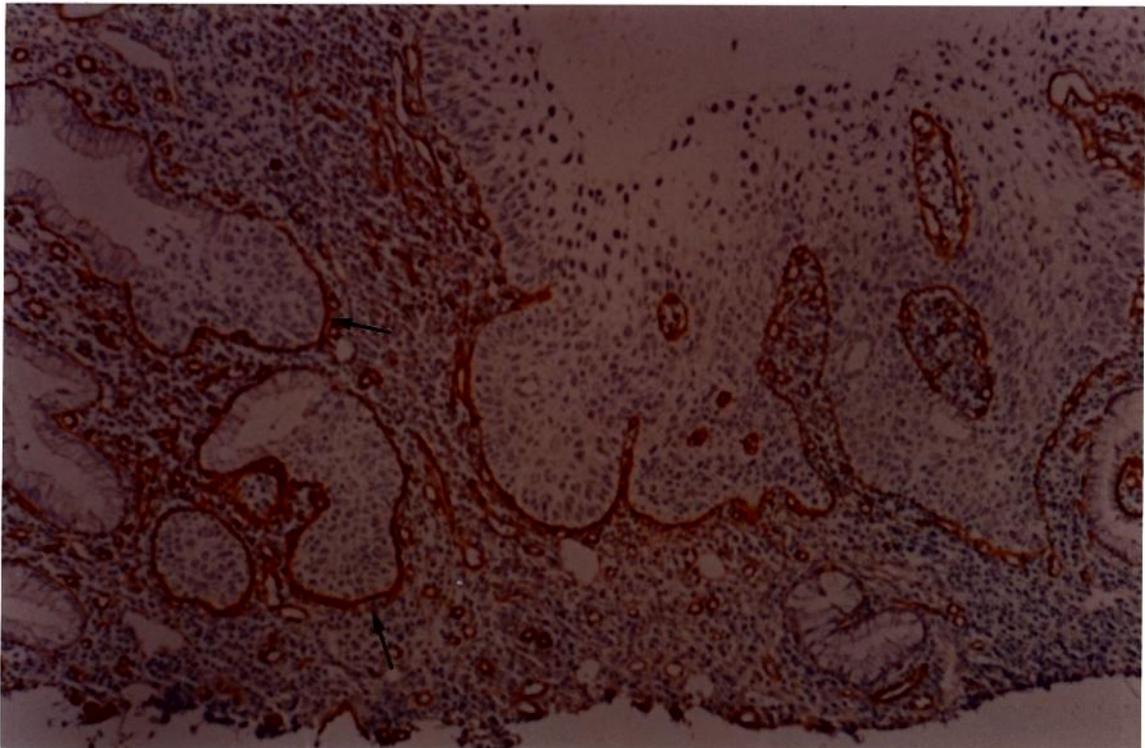


Figura 6. Carcinoma "in situ" com extensão glandular focal (setas) mostrando MB linear contínua em toda a sua extensão (ABP contracorada com hematoxilina 132x).

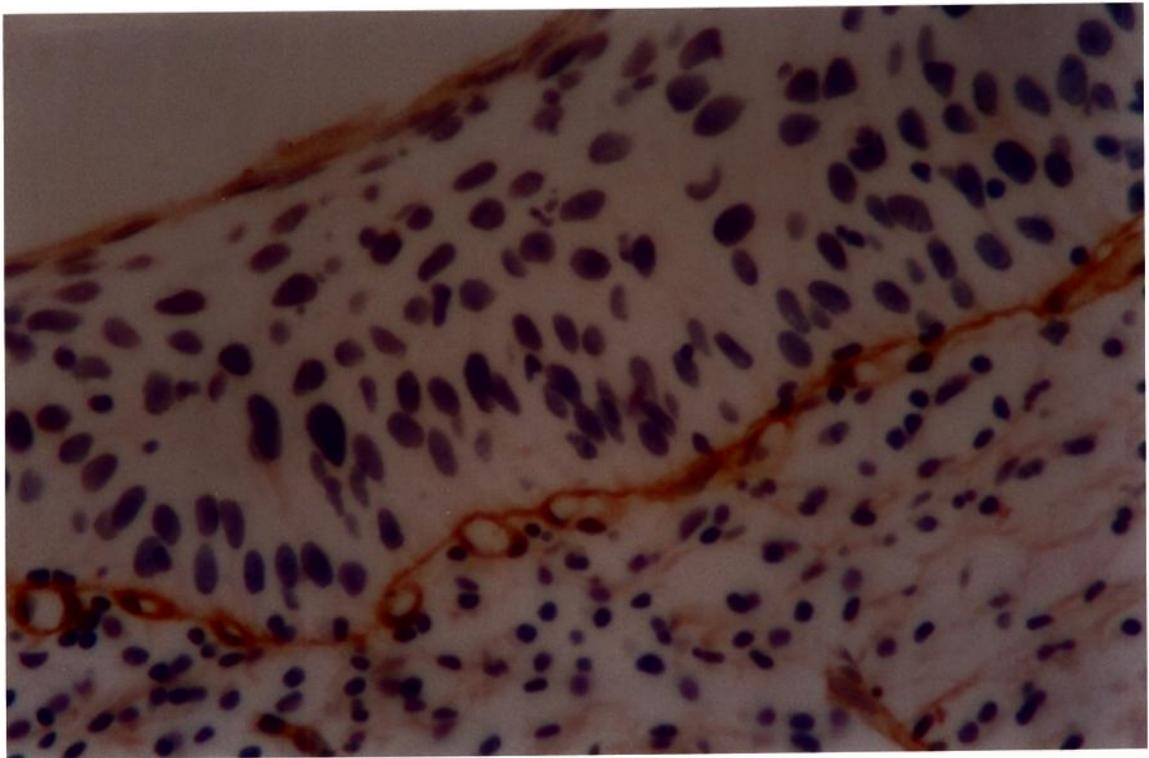


Figura 7. Carcinoma "in situ" com MB linear e contínua. Notar algumas células inflamatórias permeando a MB e o epitélio. Observam-se, também, pequenos vasos, cuja MB confunde-se em áreas com a do epitélio (ABP contracorada com hematoxilina 330x).

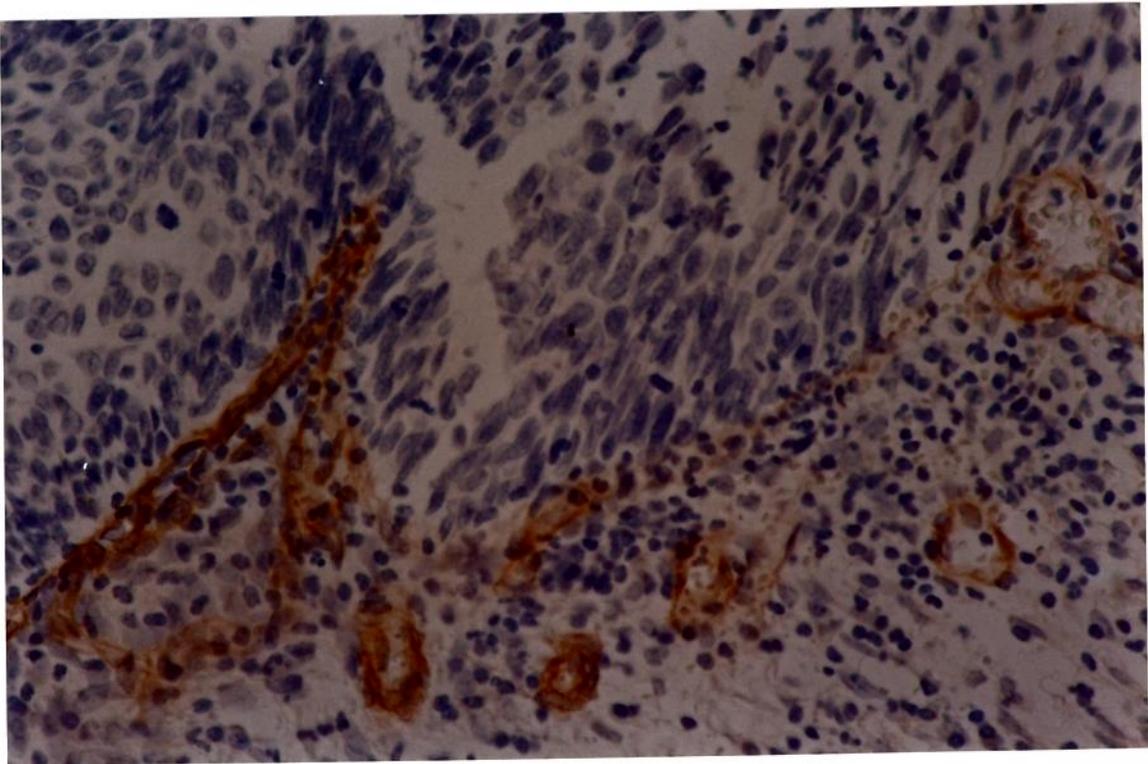


Figura 8. Carcinoma "in situ" com infiltrado inflamatório moderado na região da MB e permeando o epitélio. Notar que a MB está adelgada em áreas e interrompida em outras (ABP contracorada com hematoxilina 330x).

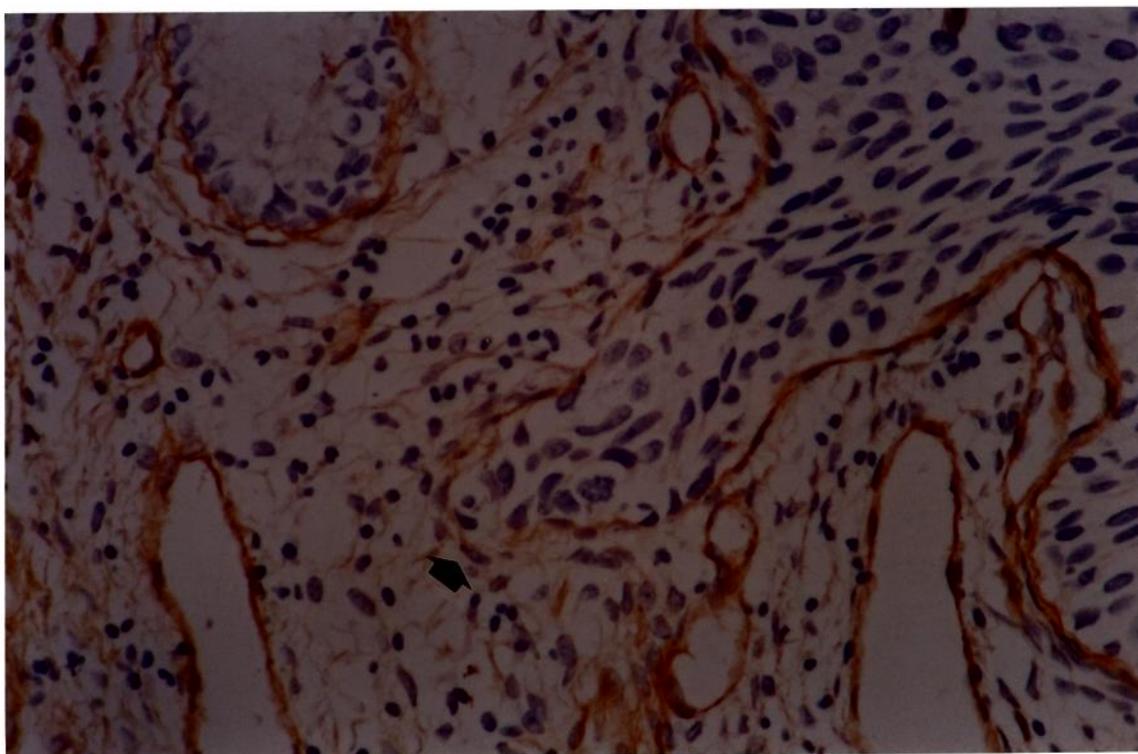


Figura 9. Carcinoma microinvasivo mostrando áreas de adelgaçamento da MB (seta) (ABP contracorada com hematoxilina 330x).

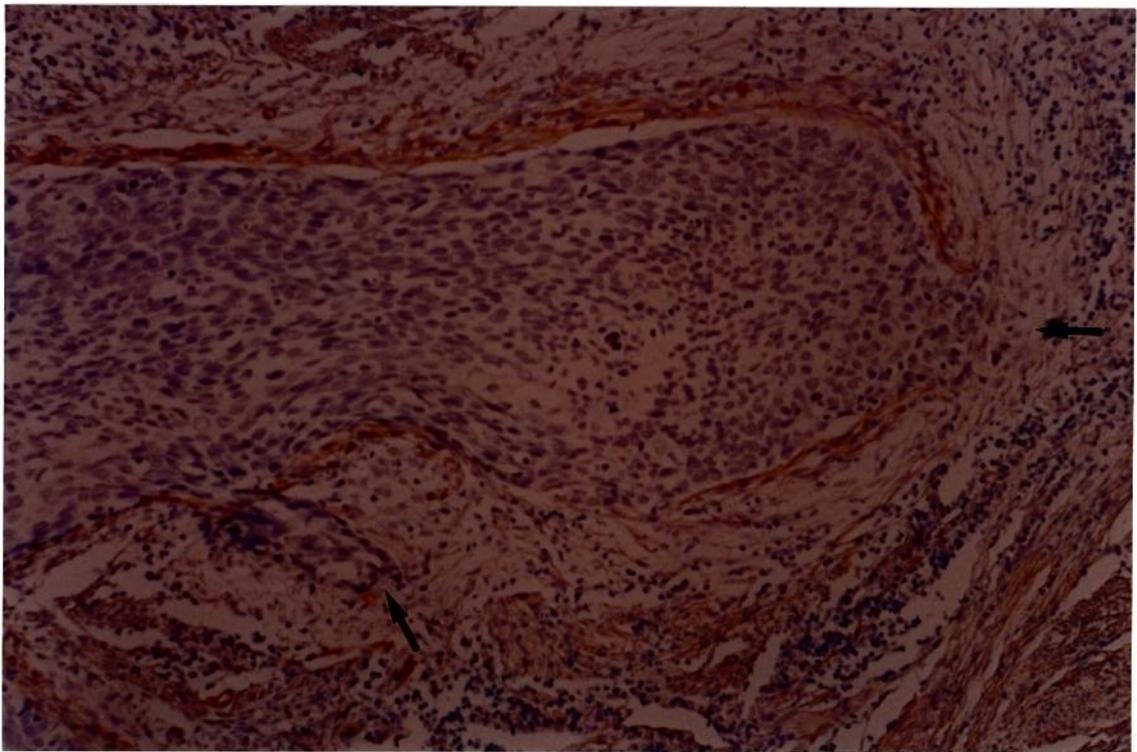


Figura 10. Carcinoma microinvasivo mostrando áreas de ruptura da membrana (setas) (ABP contracorada com hematoxilina 264x).

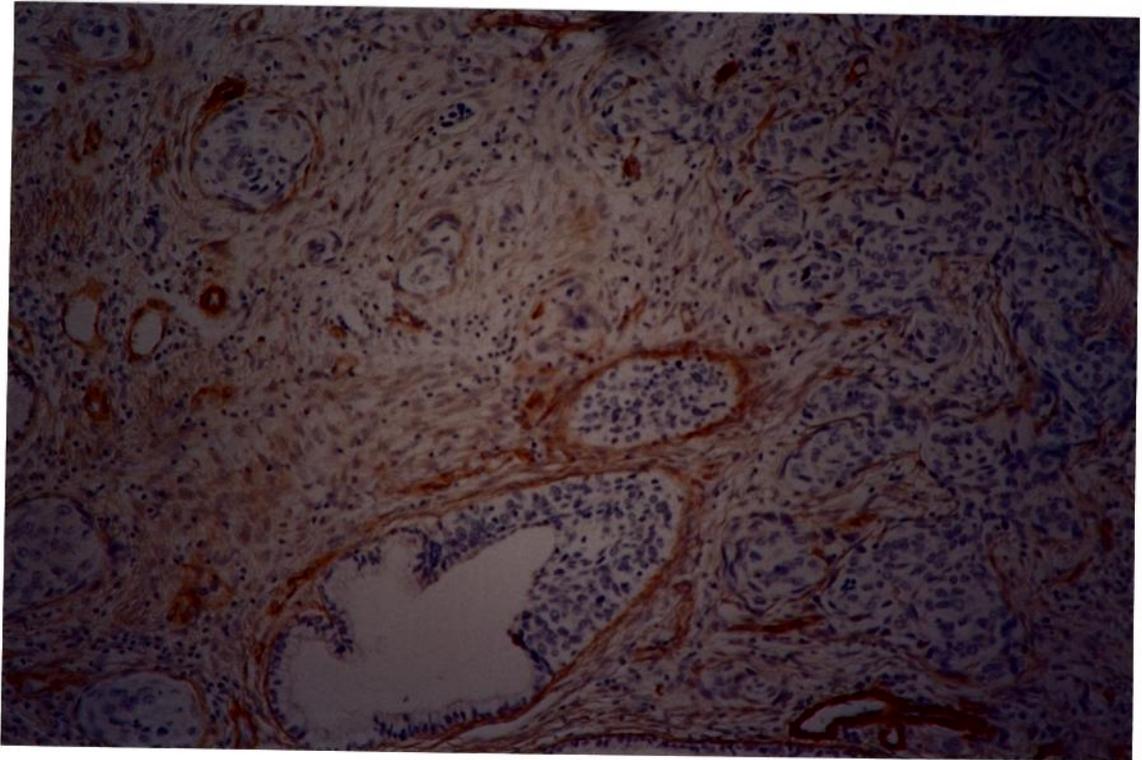


Figura 11. Carcinoma epidermóide francamente invasor. Notar MB preservada nas áreas de CIS em glândulas, bem como na parede dos vasos. A MB está totalmente ausente nas áreas de invasão (ABP contracorada com hematoxilina 264x).

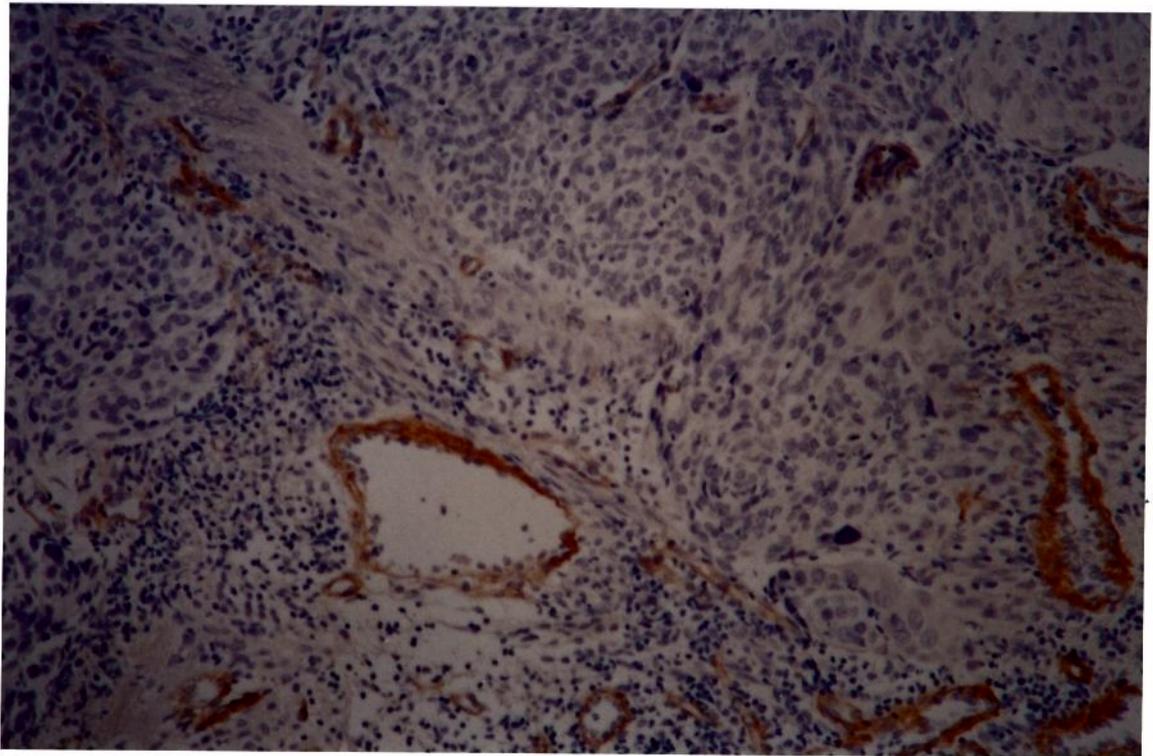


Figura 12. Carcinoma epidermóide francamente invasor com perda total de MB, a qual está presente apenas nas paredes dos vasos. Notar que a perda da MB é verificada também em áreas onde o infiltrado inflamatório não é importante (ABP contracorada com hematoxilina 264x).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho tem como objetivo estudar o comportamento da MB em CIS, CMI, CEI do colo uterino e verificar em que medida alterações da mesma podem auxiliar o patologista na rotina diagnóstica, uma vez que o diagnóstico diferencial preciso é de relevância clínica, terapêutica e prognóstica.

Para tanto, optamos pela pesquisa de colágeno IV, pois este está bem estabelecido como componente exclusivo da MB. A reação do PAS também pode ser utilizada para o mesmo fim, porém não é uma coloração tão específica como a imunorreação para colágeno IV e laminina.

Já no passado, OZZELLO (1959) utilizou a reação do PAS para analisar os contornos da MB de lesões de mama, sugerindo uma destruição da mesma nas áreas de invasão pelo carcinoma ductal. Porém, já era reconhecida a dificuldade em se avaliar precisamente distúrbios na integridade da MB por esta técnica.

O PAS cora glicoproteínas inespecificamente, tanto as presentes na MB quanto em outros sítios. Frequentemente, o tecido conectivo intersticial denso cora-se intensamente pelo PAS e, como resultado, ninhos de células tumorais podem aparecer rodeados por substância PAS positiva, que não corresponde à MB. As áreas da MB positivas ao PAS não correspondem exatamente às identificadas à microscopia eletrônica e imuno-histoquímica (AHMED, 1974; GOULD & BATTIFORA, 1976). À microscopia eletrônica, observam-se extratos distintos: uma lâmina basal eletrolúcida que faz face à membrana celular e uma zona eletrodensa, ancorada por fibrilas, as quais se misturam com o tecido conectivo intersticial adjacente. Enquanto a reação do PAS identifica glicoproteínas em todas estas regiões, a imunocoloração para colágeno IV e laminina identificam regiões distintas da MB (YAOITA,

FOIDART, KATS, 1978). Por imunoeletromicroscopia, foi estabelecido que o colágeno IV localiza-se na lâmina rara e lâmina densa (ROLL e cols., 1980), enquanto que a laminina, embora acompanhando a mesma distribuição, concentra-se em maior quantidade na lâmina rara (MADRI e cols., 1980; FOIDART e cols., 1980). Utilizamos neste estudo uma coloração que permite melhor visualizar a invasão tumoral, o que pode não ser confiável com corantes menos específicos como PAS (BARSKY e cols., 1983b).

A reação de imuno-histoquímica apresenta também a grande vantagem de poder ser utilizada em tecidos arquivados em blocos de parafina, em estudos retrospectivos, como é o caso do presente trabalho. Alguns cuidados técnicos são, no entanto, necessários ao se lidar com a pesquisa de alguns antígenos em tecidos previamente fixados e incluídos em parafina, particularmente do colágeno IV. A fim de se exporem os antígenos do colágeno IV, por vezes "mascarados" nos processos de fixação e histológico, permitindo a reação antígeno-anticorpo e sua visualização, é necessária uma cuidadosa etapa prévia de digestão enzimática.

Esse procedimento desfaz ligações protéicas aldeídicas formadas no processo de fixação, "desmascarando" os antígenos. BARSKY e cols. (1984), comparando o efeito da pepsina com outras proteases, especialmente a tripsina, enzima comumente utilizada para digestão em IHQ, observaram que a pepsina tem um papel seletivo em melhorar a reatividade da MB. O mecanismo pelo qual isto ocorre ainda é desconhecido. Todas as proteases testadas, isto é, tripsina, pepsina e collagenase bacteriana, mostraram atividade colagenolítica da MB, sendo que cada uma age sobre o colágeno IV em um diferente sítio. De todas as proteases referidas, a pepsina foi a mais efetiva em solubilizar o colágeno IV da MB. A tripsina, freqüentemente utilizada para melhorar a reatividade imuno-histoquímica, não pareceu muito efetiva em solubilizar o colágeno IV (BARSKY e cols., 1984). Já a collagenase IV e a collagenase bacteriana

foram efetivas em solubilizar o colágeno IV em atividade extremamente alta, podendo, inclusive, destruir os sítios antigênicos reconhecidos pelos anticorpos (LIOTTA, 1984). BARSKY e cols. (1984) sugeriram, então, o uso de pepsina como enzima proteolítica na reação IHQ para colágeno IV, com tempo ótimo de incubação de duas horas a 37°C. Uma vez que é importante a padronização de concentrações de anticorpos e tempos de digestão para cada Laboratório e para cada tecido utilizado, realizamos testes-pilotos com os casos aqui estudados e chegamos igualmente aos melhores resultados de coloração com pepsina (0,04% em HCl 0,01N) em duas horas de incubação a 37°C.

Em 28 dos 87 casos inicialmente examinados (32%), não houve reatividade à IHQ, mesmo após repetidas tentativas. Os vasos sangüíneos utilizados como controle interno também estavam negativos. Nestes casos é muito provável que problemas de fixação tenham sido responsáveis por dano irreparável aos antígenos. Por esta razão, foi sugerido que os melhores fixadores para pesquisa de colágeno IV seriam os à base de álcool, como Carnoy ou Methacarn (LEE, 1988).

A análise dos resultados por nós obtidos, após a coloração do colágeno IV, mostram que os CEI apresentam nitidamente padrão com extensas áreas de interrupção (D) da MB (20 casos em 24), sendo outros três com pequenas áreas de interrupção e apenas um caso com membrana íntegra. Estes últimos quatro casos, onde a MB esteve pouca ou nada alterada, não devem causar espécie, pois, em alguns casos, é reconhecida a capacidade de alguns carcinomas epidermóides de produzir MB (GUSTERSON e cols., 1984; CARTER e cols., 1985; GUSTERSON, CLINTON, GOUGH, 1986). Esta capacidade de carcinomas invasores apresentarem MB preservada levou alguns autores a negar a utilidade da pesquisa de colágeno tipo IV para avaliar invasão de carcinoma do colo uterino em estudo feito com imunofluorescência (FRAPPART e cols., 1982).

Este, porém, não foi o caso do presente estudo. Já entre os grupos CIS e CMI não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao padrão de continuidade da MB, porém houve uma nítida tendência para os CMI apresentarem mais defeitos de MB (46% dos casos CMI mostraram padrões C ou D, contra 15% dos CIS). Esta tendência poderia caminhar para uma significância, caso a amostra fosse maior. Estes dados estão de acordo com o encontrado em vários outros órgãos, como foi sumarizado na Introdução deste Trabalho e no Quadro 1. Estão também de acordo com os trabalhos realizados em colo uterino, onde foi demonstrado que as falhas na MB aparecem tanto mais quanto maior o grau de invasão do carcinoma (RICHARDS & FURNESS, 1990; FAVRET e cols., 1990). O caráter lesivo à MB pela neoplasia fica evidente, quer o mecanismo seja por destruição da membrana por enzimas degradativas (LIOTTA e cols., 1979, 1980, 1981), quer seja pela menor capacidade das células neoplásicas refazerem a membrana, alterando o equilíbrio no sentido de expressão diminuída (RICHARDS & FURNESS, 1990).

Não pudemos comprovar a contribuição do infiltrado inflamatório à lesão da membrana, como foi sugerido por STENBÄCK e cols. (1985); RICHARDS & FURNESS (1990), dado que não houve correlação entre a intensidade do mesmo com os padrões interrompidos de MB (C e D). RICHARDS & FURNESS (1990) sugeriram que a resposta inflamatória que acompanha a invasão tumoral pode ter papel na produção de falhas da MB. Também em estudo de displasia e carcinoma de laringe foram encontradas pequenas áreas de interrupção da membrana associadas ao infiltrado inflamatório (VISSER e cols., 1986). Por outro lado, EHRMANN e cols. (1988) não encontraram, à semelhança do presente estudo, correlação entre intensidade do infiltrado inflamatório e lesão de MB em carcinoma epidermóide invasor do colo uterino. Estes autores sugeriram uma progressão do carcinoma em ciclos: a MB seria destruída; o carcinoma

creceria e formaria MB; esta seria destruída e o carcinoma voltaria a invadir, e assim por diante.

Segundo UITTO, SCHWARTZ, VERS (1980), as células inflamatórias granulocíticas seriam capazes de produzir colagenase tipo IV à semelhança de células neoplásicas. Observamos, entretanto, que o infiltrado inflamatório por nós encontrado foi predominantemente mononuclear, principalmente linfocitário. O papel do infiltrado inflamatório no local de invasão tumoral ainda não está bem estabelecido e nem a relação dos linfócitos com a MB. Estudos "in vitro" mostram que os diferentes componentes da MB podem propiciar adesão e mobilidade de linfócitos e células tumorais, modulando sua atividade (LI & CHEUNG, 1992). Os dados são, contudo, ainda fragmentários para nos permitir uma melhor compreensão das inter-relações entre célula tumoral - MB - linfócitos.

Além disso, ainda que o infiltrado inflamatório tivesse sido significativamente menor no grupo de CIS, onde predominaram os padrões A e B de continuidade da MB, não houve diferença na intensidade de infiltrado inflamatório entre os grupos CMI e CEI, onde as diferenças na continuidade da MB foram óbvias (46,6% de padrões C e D nos CMI, contra 95,8% nos CEI). Pode ser que o infiltrado inflamatório dificulte a avaliação da continuidade da MB em algumas áreas, quando muito intenso e localizado na junção entre as células neoplásicas e o estroma, porém não deve interferir na avaliação global dos casos. Evidência disto é que o adelgaçamento focal da MB (padrão B de continuidade) corresponde a aproximadamente iguais proporções de casos no CIS e CMI (55% e 40% respectivamente), mesmo havendo diferenças significativas entre estes dois grupos quanto ao infiltrado inflamatório. Esta seria a situação mais propensa à dificuldade de avaliação por corresponder a um achado intermediário, sutil, entre a MB contínua e íntegra (A) e a membrana com pequenas áreas de descontinuidade (C).

Em relação à aplicação da imunocoloração da MB na prática clínica, foi sugerido que a continuidade da mesma poderia ter valor prognóstico. Isto foi verificado em carcinoma colorretal (FOSTER e cols., 1984, 1986; OFFERHAUS e cols., 1991) e apenas em adenocarcinoma do colo uterino, mas não em carcinomas epidermóides e adenoescamosos (TOKI e cols., 1990; PITT e cols., 1992).

Outra aplicação prática, e um dos objetivos do presente trabalho, é a de utilizar informações sobre a continuidade da MB para tomar decisões quando a histopatologia não puder decidir principalmente no diagnóstico de invasão inicial (CMI). Não houve diferenças estatísticas significantes entre CIS e CMI no que diz respeito à integridade da MB em nosso estudo. Notou-se, contudo, uma nítida tendência a se observar falhas na MB nas pacientes com CMI.

Em casos individuais, portanto, a IHQ para colágeno IV pode ser de ajuda, porém sempre em avaliação conjunta com a coloração rotineira de HE. Isto fica evidenciado na Tabela 4, na análise da revisão dos 15 casos onde o Revisor 1 havia discordado quer do diagnóstico inicial de HE, quer após ter visto a IHQ: destes 15, em oito casos o Revisor 2 foi decisivamente ajudado pelos dados da IHQ. Em cinco, todavia, o valor da IHQ não pôde ser avaliado, pois o processo patológico já não se encontrava no preparado por desbaste do bloco de parafina. Esta dificuldade deve ser prevista, pois, em processos de microinvasão, a área duvidosa pode ser pequena e desaparecer ao ser realizado corte histológico para IHQ. Uma possível solução para o problema seria a realização da reação na própria lâmina de dúvida, após retirada da lamínula. Porém, a intensidade da digestão enzimática, necessária à imunocoloração para colágeno IV, dificilmente preservaria os cortes de histopatologia rotineira sobre as lâminas.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

6.1. Nos carcinomas epidermóides francamente invasores (CEI) houve nítida descontinuidade em grandes áreas da MB. Não encontramos diferenças estatisticamente significantes em relação à continuidade da MB entre os carcinomas "in situ" (CIS) e os microinvasivos (CMI), embora houvesse tendência para defeitos na MB nestes últimos.

6.2. Nossos dados não apóiam a sugestão de que o infiltrado inflamatório tem qualquer papel no desenvolvimento de interrupções da MB, uma vez que não houve correlação entre estas duas variáveis estudadas.

6.3. A imunocoloração para colágeno IV específica para MB é aplicável em material rotineiro de histopatologia. A aplicação da IHQ na avaliação inicial de microinvasão é útil, mas deve ser feita em conjunto com uma criteriosa avaliação da coloração rotineira pela HE, dado que, se houve uma nítida tendência da presença de defeitos na MB em CMI quando comparados com CIS, esta não foi de significância estatística.

6.4. Além disto, deve-se contar com o desbaste da lesão no bloco de parafina ao ser realizada a imunocoloração em alguns casos, impedindo sua adequada avaliação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ABRAHAMSON, D.R. - Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. **J. Pathol.**, **149**:257-78, 1986.
2. ADAMSON, E.D.; GAUNT, S.J.; GRAHAM, C.F. - The differentiation of teratocarcinoma stem cells is marked by the types of collagen which are synthesized. **Cell**, **17**: 469-76, 1979.
3. AHMED, A. - The myoepithelium in cystic hyperplastic mastopathy. **J. Pathol.**, **113**:209-15, 1974.
4. ALBRECHTSEN, R.; NIELSEN, M.; WEWER, U.; ENGVALL E.; RUOSLAHTI, E. - Basement membrane changes in breast cancer detected by immunohistochemical staining for laminin. **Cancer Res.**, **41**:5076-81, 1981.
5. ALBRECHTSEN, R.; WEWER, M.U.; LIOTTA, L.A. - Basement membranes in human cancer. **Pathol. Ann.**, **21**: 251-76, 1986.
6. ALITALO, K.; KESKI-OJA J.; VAHERI, A. - Extracellular matrix proteins characterize human tumor cell lines. **Int. J. Cancer**, **27**:755-61, 1981.
7. BARSKY, S.H.; TOGO, S.; GARBISA, S.; LIOTTA, L.A. - Type IV collagenase immunoreactivity in invasive breast carcinoma. **Lancet**, **5**:296-7, 1983a.
8. BARSKY, H.; SIEGAL, G.P.; JANNOTTA, F.; LIOTTA, L.A. - Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. **Lab. Invest.**, **49**:140-7, 1983b.
9. BARSKY, S.H.; BAKER, A.; SIEGEL, G.P.; TOGO, S.; LIOTTA, L.A. - Use of anti basement membrane antibodies to distinguish blood vessel capillaries from lymphatic capillaries. **Am. J. Surg. Pathol.**, **7**:667-77, 1983c.

10. BARSKY, S.H.; RAO, N.C.; RESTREPO, C.; LIOTTA, L.A. - Immunocytochemical enhancement of basement membrane antigens by pepsin: Applications in diagnostic pathology. **Am. J. Clin. Pathol.**, **82**:191-4, 1984.
11. BIREMBAUT, P.; CARON, Y.; ADNET, J.J.; FOIDART, J.M. - Usefulness of basement membrane markers in tumoural pathology. **J. Pathol.**, **145**:283-96, 1985.
12. BIREMBAUT, P.; CARON, Y.; VAN CAUWENBERGE, D.; FOIDART, J.M. - Distribution of laminin, a basement membrane glycoprotein in epithelial proliferations. **Collagen Rel. Res.**, **3**:25-31, 1983.
13. BISSEL, M.J.; HALL, H.G.; PARRY, G. - How does the extracellular matrix direct gene expression? **J. Theor. Biol.**, **99**:31-8, 1982.
14. BORNSTEIN, P. & SAGE, H. - Structurally distinct collagen types. **Ann. Rev. Biochem.**, **49**:957-69, 1980.
15. BOSELLI, J.M.; MACARAK, E.J.; CLARK, C.C.; BROWNELL, A.G.; MARTINEZ-HERNANDEZ, A. - Fibronectin: its relationship to basement membrane I. Light microscopic studies. **Collagen Rel. Res.**, **1**:391-9, 1981.
16. BOSMAN, F.T.; HAVENITH, M.; CLEUTJENS, J.P.M. - Basement membranes in cancer. **Ultrastructural Pathol.**, **8**:291-304, 1985.
17. BRODERS, A.C. - Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium. **J. Am. Med. Assoc.**, **99**:1670-4, 1932.
18. BURGESSON, R.E.; ADLI, F.A.E.; KAITILA, I.I.; HOLLISTER, D.W. - Fetal membrane collagens: identification of two new collagen alpha chain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **73**:2579-83, 1976.
19. BURNS, J.; DIXON, A.J.; WOODS, J.C. - Immunoperoxidase localisation of fibronectin in glomeruli of formalin fixed paraffin processed renal tissue. **Histochemistry**, **67**:73-8, 1980.

20. BURTIN, P.; CHAVANEL, G.; FOIDART, J.M.; MARTIN, E. - Antigenes of the basement membrane and the peritumoral stroma in human colonic adenocarcinomas: An immunofluorescence study. **Int. J. Cancer**, **30**:13-20, 1982.
21. CAM, Y.; BELLON, G.; POULIN, G. - Distribution of type IV Collagen in the benign and malignant epithelial proliferations. An indirect immunofluorescence study on the breast, the lungs and the skin. **Invas. Metas.**, **4**:61-72, 1984.
22. CARTER, R.L.; BURMAN, J.F.; BARR, L.; GUSTERSON, B.A. - Immunohistochemical localization of basement membrane type IV collagen in invasive and metastatic squamous carcinomas of head and neck. **J. Pathol.**, **147**:159-64, 1985.
23. CARVALHO, F.M. - Câncer de colo uterino - Anatomia Patológica e Evolução. In: HALBE, H.W. - **Tratado de Ginecologia**. São Paulo, Editora Roca Ltda., 1987. p. 1505-18.
24. CAUFIELD, J.P. & FARQUHAR, M.G. - Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. **Lab. Invest.**, **39**:505-12, 1978.
25. CHUNG, E.; RHODES, R.K.; MILLER, E. - Isolation of three collagenous components of probable basement membrane origin from several tissues. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **71**:1167-70, 1976.
26. DE MORAGAS, J.M.; WINKELMANN, R.K.; JORDON, R.E. - Immunofluorescence of epithelial skin tumors II. Basement membrane. **Cancer**, **25**:1404-7, 1970.
27. EHRMANN, R.L.; DWYER, I.M.; YAVNER, D.; HANCOCK, W.W. - An immunoperoxidase study of laminin and type IV collagen distribution in carcinoma of the cervix and vulva. **Obstet. Gynecol.**, **72**:257-62; 1988.

28. FAGAN, J.B.; SOBEL, M.E.; YAMADA, K.M., DE CROMBRUGGHE, B.; PASTAN, I. - Effects of transformation of fibronectin gene expression using cloned fibronectin cDNA. **J. Biol. Chem.**, **256**:520-5, 1981.
29. FAVRET, M.; PAROLINI, S.; ROSA, D.; RAMPINELLI, F.; BIANCHI, V.A.; GRIGOLATO, P.G.; MOLINARI-TORSATTI, M.P.M. - Localizzazione immunistochemica di laminina, collagene IV e fibronectina nelle displasie e neoplasie della cervice uterina. **Pathologica**, **82**:479-86, 1990.
30. FIGO Cancer Committee: Staging announcement. **Gynecol. Oncol.**, **25**:383-5, 1986.
31. FOELMER, H.G.; MADRI, J.A.; FURTHMAYR, H. - Methods in laboratory investigation. Monoclonal antibodies to type IV collagen: Probes for study of structure and function of basement membranes. **Lab. Invest.**, **48**:639-49, 1983.
32. FOIDART, J.M.; BERE, E.W.; YAAR, M.; RENNARD, S.I.; GIULLINO, M.; MARTIN, G.R.; KATS, S.I. - Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a noncollagenous basement membrane glycoprotein. **Lab. Invest.**, **42**:336-42, 1980.
33. FOSTER, S.J.; TALBOT, C.; CRITCHLEY, D.R. - Laminin and fibronectin in rectal adenocarcinoma: Relationship to tumour grade, stage and metastasis. **Br. J. Cancer**, **50**:51-61, 1984.
34. FOSTER S.J.; TALBOT, I.C.; CLAYTON, D.G.; CRITCHELY, D.R. - Tumour basement membrane laminin in adenocarcinoma of the rectum: an immunohistochemical study of biological and clinical significance. **Int. J. Cancer**, **37**:813-7, 1986.
35. FRAPPART, L.; BERGER, G.; GRIMAUD, J.A.; CHEVALIER, M.; BREMOND, A.; ROCHET, Y.; FEROLDI, J. - Basement membrane of the uterine cervix: Immunofluorescence characteristics of the collagen epithelium and invasive carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, **13**:58-66, 1982.

36. FURNESS, P.N. & LAM, E.W.H. - Patterns of basement membrane deposition in benign, premalignant and malignant endometrium. **J. Clin. Pathol.**, **40**:1320-3, 1987.
37. GAY, S.; MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; RHODES, R.K.; MILLER, F.J. - The collagenous exocytoskeleton of smooth muscle cells. **Collagen Rel. Res.**, **1**:377-85, 1981.
38. GOULD, V.E. & BATTIFORA, H. - Origin and significance of the basal lamina and some interstitial fibrillar components in epithelial neoplasms. **Pathol. Annul.**, **11**:353-86, 1976.
39. GRIFFITHS, M.R.; SHEPHERD, M.; FERRIER, R.; SCHUPPAN, D.; JAMES, O.F.W.; BURT, A.D. - Light microscopic and ultrastructural distribution of type VI collagen in human liver: alterations in chronic biliary disease. **Histopathology**, **21**:335-44, 1992.
40. GUSTERSON, B.A.; CLINTON, S.S.; GOUGH, G. - Studies of early invasive and intraepithelial squamous cell carcinomas using and antibody to type IV collagen. **Histopathology**, **10**:161-9, 1986.
41. GUSTERSON, B.A.; WARBURTON, M.J.; MITCHELL, D.; KRAFT, N.; HANCOCK, W.W. - Invading squamous cell carcinoma can retain a basal laminin. An immunohistochemical study using a monoclonal antibody to type IV collagen. **Lab. Invest.**, **51**:82-9, 1984.
42. HAGLUND, C.; ROBERTS, P.J.; NORDLING, S.; EKBLUM, P. - Expression of laminin in pancreatic neoplasms and in chronic pancreatitis. **Am. J. Surg. Pathol.**, **8**:669-76, 1984.
43. HAVENITH, M.G.; CLEUTJENS, J.P.M.; BEEK, E.C.; VANDER LIDEN, E. DE GOEY, A.F.P.M.; BOSMAN, F.T. - Human specific anti-type IV collagen monoclonal antibodies, characterization and immunohistochemical application. **Histochemistry**, **87**:123-8, 1987.

44. HAYMAN, E.G.; OLDBERG, A.; MARTIN, G.R.; RUOSLAHTI, E. - Codistribution of heparan sulfate proteoglycan, laminin and fibronectin in the extracellular matrix of normal rat kidney cells and their coordinate absence in transformed cells. **J. Cell Biol.**, **94**:28-35, 1982.
45. HYNES R.O. - Cell surface protein and malignant transformation. **Biochem. Biophys. Acta**, **458**:73-107, 1976.
46. HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. - A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.**, **75**:734-8, 1981.
47. INOUE, S. - Ultrastructure of basement membrane. **Int. Rev. Cytol.**, **117**:57-99, 1989.
48. KANWAR, Y.S. & FARQUHAR, M.G. - Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **76**: 1303-7, 1979.
49. KEFALIDES, N.A. - Chemistry of basement membranes structure and biosynthesis. **Adv. Microc.**, **9**:295-322, 1980.
50. KEFALIDES, N.A.; ALPER, R.; CLARK, C.C. - Biochemistry and metabolism of basement membranes. **Int. Rev. Cytol.**, **61**:167-228, 1979.
51. KIVIAT, N.B. & KOUTSKY, L.A. - Specific human papillomavirus types as the causal agents of most cervical intraepithelial neoplasia: Implications for current views and treatment. **J. Nat. Cancer Inst.**, **85**:4-5, 1993.

52. KRAMER, R.H.; GONZALEZ, R.; NICOLSON, G.L. - Metastatic tumor cells adhere preferentially to the extracellular matrix underlying vascular endothelial cells. **Int. J. Cancer**, **26**:639-45, 1980.

53. KRAMER, R.H.; VOGEL, K.G.; NICOLSON, G.L. - Solubilization and degradation of subendothelial matrix glycoproteins and proteoglycans by metastatic tumor cells. **J. Biol. Chem.**, **257**:2678-86, 1982.

54. KRAMER, R.H.; VOGEL, G.; KATHRYN, G. - Selective degradation of basement membrane macromolecules by metastatic melanoma cells. **J. Natl. Cancer Inst.**, **72**:889-97, 1984.

55. LEE, A.K. - Basement membrane and endothelial antigens: their role in evaluation of tumor invasion and metastasis. In: DE LELLIS, R.A. - *Advances in Immunohistochemistry*. Raven Press. New York, 1988.

56. LI, Y.Y. & CHEUNG, H.T. - Basement membrane and its components on lymphocyte adhesion, migration and proliferation. **J. Immunol.**, **149**:3174-81, 1992.

57. LINDER, E.; VAHERI, A.; ROUSLAHTI, E.; WARTIOVAARA, J. - Distribution of fibroblast surface antigen in the developing chick embryo. **J. Exp. Med.**, **142**:41-9, 1975.

58. LIOTTA, L.A.; ABE, S.D.; ROBEY, P.G.; MARTIN, G.R. - Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **76**:2268-75, 1979.

59. LIOTTA, L.A.; TRYGGVASON, K.; GARBISA, S.; HART, I.; FOLTZ, C.M.; SHAFIE, S. - Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. **Nature**, **284**:67-8, 1980.

60. LIOTTA, L.A.; TRYGGVASON, K.; GARBISA, S.; GEHRON-ROHEY, P.; ABE, S. - Partial purification and characterization of a neutral protease which cleaves type IV collagen. **Biochemistry**, **20**:100-4, 1981.

61. LIOTTA, L.A. - Tumor invasion and metastases: Role of the Basement Membrane. **Am. J. Pathol.**, **117**: 339-48, 1984.

62. LIOTTA, L.A. Tumor invasion and metastases - Role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. **Cancer Res.**, **46**:1-7, 1986.

63. LIOTTA, L.A.; RAO, N.C.; BARSKY, S.H. - Tumour invasion and the extracelular matrix. **Lab. Invest.**, **49**:636-49, 1983.

64. LOPES DE FARIA, J.; MILANI, V.P.; ALBINO FILHO, J.; MOREIRA FILHO, D.J.C. - Geographic pathology and Epidemiology of cancer in Brazil (South America). In: E. GRUNDMANN (ed). - **Cancer Epidemiology**. Cancer Campaign, vol.6, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. New York, 1982. p.71-87.

65. MADRI, J.A.; ROLL, F.J.; FURTHMAYR, H.; FOIDART, J.M. - Ultrastructural localization of fibronectin and laminin in the basement membrane of the murine kidney. **J. Cell Biol.**, **86**:682-7, 1980.

66. MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; MARSH, C.A.; CLARK, C.C.; MACARAK, E.J.; BROWNELL, A.G. - Fibronectin: Its relationship to basement membranes. II Ultrastructural studies in rat kidney. **Collagen Rel. Res.**, **1**:405-13, 1982a.

67. MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; GRAY, S.; MILLER, E.J. - Ultrastructural localization of type V collagen in rat kidney. **J. Cell Biol.**, **92**:343-9, 1982b.

68. MARTINEZ-HERNANDEZ, M.D. & AMENTA, S.P. - The basement membrane in pathology. **Lab. Invest.**, **48**:656-77, 1983.

69. MINOR, R.R. - Collagen metabolism. **Am. J. Pathol.**, **98**:227-80, 1980.

70. OFFERHAUS, G.J.A.; GIARDELLO, F.M.; BRUIJN, J.A.; STIJNEN, T.; MOLYVAS, E.N.; FLEUREN, G.J. - The value of immunohistochemistry for collagen IV. Expression in colorectal carcinomas. **Cancer**, **67**:99-105, 1991.
71. OZZELLO, L. - The behavior of basement membranes in intraductal carcinoma of the breast. **Am. J. Pathol.**, **35**:887-99, 1959.
72. PERTSCHUK, L.P.; JOHN, D.; BOYCE, G.; FAGOG, M.D.; URCUYO, R. - An immunofluorescence study of basement membrane in squamous cell carcinoma of the cervix, vagina and vulva. **Obstet. Gynecol.**, **49**:417-20, 1977.
73. PITT, M.A.; HALL, R.J.; BUCKLLY, C.H. - The distribution of type IV collagen in invasive carcinoma of the uterine cervix. **Histopathology**, **20**:139-43, 1992.
74. RICHARDS, C.J. & FURNESS, P.N. - Basement membrane continuity in benign, premalignant and malignant epithelial conditions of the uterine cervix. **Histopathology**, **16**:47-52, 1990.
75. ROLL, F.J.; MADRI, J.A.; ALBERT, J.; FURTHMAYR, H. - Codistribution of collagen type IV and AB2 in basement membranes and mesangium of the kidney. Immunoferritin study of ultrathin frozen sections. **J. Cell Biol.**, **85**:597-616, 1980.
76. RYAN, G.B. & KARNOVSKY, M.J. - An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. **Kidney Int.**, **8**:219-32, 1975.
77. SANO, J.; FUJIWARA, S.; SATO, S.; ISHIZAKI, M.; SU, L. - AB (type V) and basement membrane (type IV) collagen in the bovine lung parenchyma: electron microscopic localization by the peroxidase labeled antibody method. **Biomed. Res.**, **2**:20-8, 1981.

78. SARIOLA, H.; EKBLUM, P.; RAPOLA, J.; VAHERI, A.; TIMPL, R. - Extracellular matrix and epithelial differentiation of Wilms' tumor. **Am. J. Pathol.**, **118**:96-107, 1985.

79. SCHAPERS, R.F.N.; PAUWELS, R.P.E.; HAVENITH, M.E.; SMEETS, A.W.G.B.; VAN DEN BRANDT, P.A.; BOSMAN, F.T. - Prognostic significance of type IV collagen and laminin Immunoreactivity in urothelial carcinomas of the bladder. **Cancer**, **66**:2583-8, 1990.

80. SHIELDS, S.E.; OGILVIE, D.J.; McKINNELL, R.G.; TARIN, D. - Degradation of basement membrane collagens by metalloproteases released by human murine and amphibian tumours. **J. Pathol.**, **143**:193-7, 1984.

81. SIEGAL, G.P.; BARSKY, S.H.; TERRANOVA, V.P.; LIOTTA, L.A. - Stages of neoplastic transformation of human breast tissue as monitored by dissolution of basement membrane components. **Invas. Metastasis**, **1**: 54-65, 1981.

82. SOINI, Y. & AUTIO-HARMAINEN, H. - Synthesis and degradation of basement membranes in benign and malignant salivary gland tumours. A study by in situ hybridization. **J. Pathol.**, **170**:291-6, 1993.

83. STANLEY, J.R.; FOIDART, J.M.; MURRAY, J.C.; MARTIN, G.R.; KATS, S.I. - The epidermal cell which selectively adheres to a collagen substrate is the basal cell. **J. Invest. Dermatol.**, **74**:54-8, 1980.

84. STENBÄCK, F.; WASENIUS, V.M.; RISTELLI, J.; RISTELLI, L. - Basement membrane in progressing intraepithelial cervical neoplasia an ultrastructural and immunohistochemical study with antibodies against human type IV collagen and laminin. **Gynaecol. Obstet. Invest.**, **20**:158-66, 1985.

85. STENMAN, S. & VAHERI, A. - Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. **J. Exp. Med.**, **147**:1054-64, 1978.

86. TERRANOVA, V.P.; ROHRBACH, D.H.; MARTIN, G.R. - Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. **Cell**, **22**:719-26, 1980.
87. TERREIRO, L.M. - Câncer de colo uterino - conceito, importância, incidência e fatores de risco. In: HALBE, H.W. - **Tratado de Ginecologia**. São Paulo, Editora Roca Ltda, 1987. p.1495-504.
88. THESLEFF, I. & EKBLÖM, P. - Distribution of keratin and laminin in ameloblastoma. Comparison with developing tooth and epidermoid carcinoma. **J. Oral. Pathol.**, **13**:85-93, 1984.
89. TIMPL, R.; WIEDMANN, H.; VAN DELDEN, V.; FURTHMAYR, H.; KÜHN, K. - A network for the organization of type IV collagen molecules in basement membrane. **Europ. J. Biochem.**, **120**:203-11, 1981.
90. TOIDA, M.; TAKEUCHI, J.; HARA, K.; SOBUE, M.; TSUKIDATE, K.; GOTO, K.; NAKASHIMA, N. - Histochemical studies of intercellular components of salivary gland tumors with special reference to glycosaminoglycans, laminin and vascular elements. **Virch. Arch. (Pathol. Anat.)**, **403**:15-26, 1984.
91. TOKI, N.; KAKU, T.; TSUKAMOTO, N.; MATSUMURA, M.; SAITO, T.; KAMURA, T.; MATSUYAMA, T.; NAKANO, H. - Distribution of basement membrane antigens in the uterine cervical adenocarcinomas: an immunohistochemical study. **Gynecol. Oncol.**, **38**:17-21, 1990.
92. UITTO, V.T.; SCHWARTZ, D.; VERS, A. - Degradation of basement membrane collagen by neutral proteases from human granulocytes. **Eur. J. Biochem.**, **105**:409-17, 1980.
93. VAN CAUWENBERGE, D.; PIERARD, G.E.; FOIDART, J.M.; LAPIERE, C.H.M. - Immunohistochemical localization of laminin, type IV and type V collagen in basal cell carcinoma. **Br. J. Dermatol.**, **108**:163-70, 1983.

94. VISSER, R.; VAN DER BEEK, J.M.H.; HAVENITH, M.G.; CLEUTJENS, J.P.M.; BOSMAN, F.T. - Immunocytochemical detection of basement membrane antigens in the histopathological evaluation of laryngeal dysplasia and neoplasia. **Histopathology**, **10**:171-80, 1986.
95. VISSER, R.; ARENDS, J.W.; LEIGH, M.I.; BOSMAN, F.T. - Patterns and composition of basement membranes in colon adenomas and adenocarcinomas. **J. Pathol.**, **170**:285-90, 1993.
96. VOGEL, H.P. & MENDELSON, G. - Laminin immunostaining in hyperplastic, dysplastic and neoplastic lesions of the endometrium and uterine cervix. **Obstetric. Gynecol.**, **69**:794-9, 1987.
97. WARTIOVAARA, J.; LEIVO, I.; VAHERI, A. - Expression of the cell surface associated glycoprotein, fibronectin, in the early mouse embryo. **Dev. Biol.**, **69**:247-57, 1979.
98. WEBER, M. - Basement membrane proteins. **Kidney Int.**, **41**:620-8, 1992.
99. WELLING, L.W.; GRANTHAM, J.J.; QUALLIZZA, P. - Physical properties of isolated perfused renal tubules and tubular basement membranes. **J. Clin. Invest.**, **51**: 1063-75, 1972.
100. WETZELS, R.H.W.; VAN DER VELDEN, L.A.; SCHAAFSMA, H.E.; MANN, J.J.; LEIGH, I.M.; VOOIJS, G.P.; RAMAEKERS, F.C.S. - Immunohistochemical localization of basement membrane type VII collagen and laminin in neoplasms of the head and neck. **Histopathology**, **21**: 459-64, 1992.
101. WILLEBRAND, D.; BOSMAN, F.T.; DE GOEJ, A.F.P.M. - Patterns of basement membrane deposition in benign and malignant breast tumours. **Histopathology**, **10**:1231-41, 1986.
102. YAOITA, H.; FOIDART, J.M.; KATS, S.I. - Localization of the collagenous component in skin basement membrane. **J. Invest. Dermatol.**, **70**:191-3, 1978.

103. YURCHENCO, P.D. & SCHITTNY, J.C. - Molecular architecture of basement membranes. **FASEB J.**, 4:1577-90, 1990.

*HERANY, M.L.G. - **Normas para Apresentação de Dissertações e Teses**/Maria Luiza Gugliano Herani - São Paulo, BIREME, 1990.