

Avaliação Histomorfométrica de Micronúcleos e Colágeno como Métodos Adicionais no Diagnóstico Diferencial de Neoplasias Cutâneas

Histomorphometrical Evaluation of the Micronucleous and Collagen how Additional Methods in Skin Neoplasms Diagnosis

Mario Ribeiro de Melo Junior¹; Jorge Luiz Silva Araújo Filho²; Adriana Maria da Silva Telles³; Nicodemos Teles de Pontes Filho⁴

¹Doutor em Biotecnologia* e Professor Regente de Patologia da Associação Caruaruense de Ensino Superior - ASCES; ²Mestre em Patologia* ;

³Doutora em Nutrição*; ⁴Professor Titular do Departamento de Patologia*

*Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Recife (PE), Brasil.

Resumo Este estudo avaliou a densidade de micronúcleos e a distribuição do colágeno intersticial em tumores benignos e malignos de pele. Foram selecionados casos de ceratose seborréica, ceratose actínica, ceratoacantoma e carcinoma basocelular. Os resultados demonstraram um aumento significativo do número de micronúcleos nas lesões de carcinoma basocelular e ceratoacantoma. Por outro lado, houve uma redução da área média de colágeno intersticial nas lesões dos mesmos, em relação ao tecido normal. Conclui-se então, que este tipo de análise poderá ser utilizado como parâmetro complementar na diferenciação de lesões cutâneas difíceis de serem diagnosticadas apenas pelos métodos convencionais de análise histopatológica.

Palavras-chave Neoplasias; Colágeno; Pele.

Abstract This study established the density of micronuclei and distribution of the interstitial collagen in benign and malign skin tumors. Skin samples from basal cell carcinoma, keratoacanthoma, seborreic keratosis and actinic keratosis were used. The results showed a significant variation in the micronucleus number in the basal cell carcinoma and keratoacanthoma. On the other hand, the mean area of collagen was lower in these ones in relation to the normal tissue. It was concluded that this analysis can be used as complementar parameter in the differentiation of cutaneous lesions with hard diagnosis carried out by means of conventional methods of histopathological analysis.

Keywords Neoplasm; Collagen; Skin.

A dificuldade no diagnóstico de neoplasias cutâneas está relacionada a uma variedade de fatores como a grande diversidade de tipos histológicos e suas variantes, a pouca diferenciação celular e a similaridade das lesões. Além disso, muitos estudos são inconclusivos e contraditórios ao declararem que a verdadeira origem celular de muitas lesões tanto benignas quanto malignas.

Padrões aneuplóides de DNA, evidenciados pela presença de micronúcleos, são considerados fatores associados à malignidade de tumores e encontrados em diferentes graus de displasias incluindo os casos de lesões cutâneas benignas. Esses padrões aneuplóides têm demonstrado ter importante valor preditivo para o comportamento biológico dos tumores.¹ Os possíveis fatores desencadeantes das neoplasias de pele são os estímulos ambientais e/ou mutações genômicas, resultando na ativação de oncogenes, responsáveis pelo

crescimento celular e regulação da apoptose, além de ocorrer a inativação dos genes supressores. Com isso, a expansão clonal ocasiona mutações adicionais (progressão), induzindo heterogeneidade celular e conseqüente formação de um neoplasma maligno.²

É sabido que muitas lesões cutâneas mostram morfologia duvidosa e que apenas os recursos fornecidos pela histologia de rotina são muitas vezes insuficientes para distinção entre algumas lesões benignas e malignas.

A partir desses dados, o presente trabalho avaliou a ocorrência de micronúcleos das células tumorais e distribuição do colágeno intersticial no tecido cutâneo em pacientes portadores de lesões tumorais, a fim de se identificar novos parâmetros de análise histológica para diferenciação de lesões de pele. Para isso, foram utilizadas reações histoquímicas de Feulgen e tricrômico de Masson.

O protocolo experimental desenvolvido no presente trabalho foi submetido e aprovado pela comissão de ética do Centro de Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS-UFPE-Ofício 043/2003).

Foram selecionados blocos de parafina dos arquivos do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), órgão suplementar da Universidade Federal de Pernambuco contendo lesões de pele de pacientes com idades entre 45 e 80 anos. Através de triagem foram escolhidos blocos com os seguintes diagnósticos: Ceratose Seborréica (CS, n=10), Ceratose Actínica (CA, n=8), Ceratoacantoma (KA, n=10) e Carcinoma Basocelular (CBC, n=10). Para controle, foram utilizadas as regiões de borda, contendo tecido normal, dos mesmos fragmentos.

Todos os tecidos de pele foram submetidos à rotina histológica e em seguida corados pela reação de Feulgen (reativo de Schiff), para verificação da presença e quantificação de micronúcleos, realizada pelo método de estudo-cego por dois observadores, fazendo-se uma contagem de cinco campos aleatoriamente em cada lâmina, e contando o número de micronúcleos em um total de 10 células por campo do microscópio óptico.

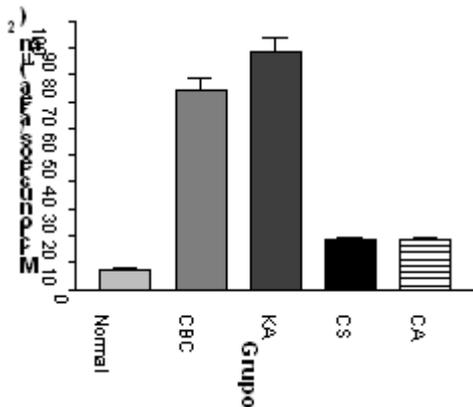
Para análise do colágeno intersticial foi utilizada a coloração de tricrômico de Masson, avaliando-se três campos aleatórios em cada caso e depois essas amostras foram submetidas à análise digitalizada de imagens para proceder a estudo histomorfométrico.

A análise das imagens das lâminas histológicas consistiu de um sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico (Olympus BH-2). O sistema interativo de análise de imagens utiliza o Software OPTIMAS® 6.1 e Câmera digital CCBBW 410 (Samsung).

O parâmetro morfométrico adotado foi a distribuição da área média de colágeno intersticial por campo captado na lâmina histológica (área total do campo = 12.234 μm^2). Todas as análises foram realizadas na magnificação de 400x. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando os testes de Tukey, com $p < 0,05$, através do programa PRISMA® 3.0.

Na análise histológica, foram contadas 1550 células, para identificação dos micronúcleos. Os critérios utilizados para identificação de micronúcleos foram: 1) presença de material nuclear. 2) ter intensidade de luz maior ou igual à do núcleo; 3) ter forma circular ou oval; 4) possuir área menor do que 1/5 do núcleo; 5) estar completamente separado do núcleo.³

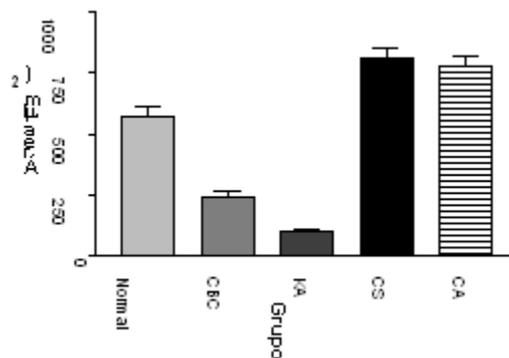
Gráfico 1. - Número de médio de micronúcleos em células tumorais de pele (Análise Digital de imagem. Área do campo = 12.234 μm^2)



A análise do número médio de micronúcleos (Gráfico 1) utilizada neste trabalho demonstrou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) nas lesões de CBC (74,02 \pm 3,7) e KA (88,4 \pm 4,42), quando comparados aos demais tumores testados (CS = 18,15 \pm 1,9 e CA = 18,8 \pm 1,94) e células normais (6,88 \pm 0,34). As células tumorais analisadas exibiram em média mais de cinco micronúcleos distribuídos nas posições intra e extranucleares.

A análise histológica do arranjo das fibras colágenas nos tecidos estudados exibiu um padrão intenso de marcação, principalmente, nas lesões benignas estudadas. Os resultados demonstram uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,01$) da área média (μm^2) de colágeno intersticial nas lesões de CBC (243,42 \pm 12,17) e KA (93,09 \pm 4,65), enquanto que a CS (811,52 \pm 40,57) e CA (781,31 \pm 39,06) apresentaram um aumento expressivo em relação ao tecido normal (573,70 \pm 26,68) e demais tumores (Gráfico 2).

Gráfico 2. Análise Digital de imagem da área média de colágeno intersticial de neoplasias cutâneas (Área do campo = 12.234 μm^2)



Estudos anteriores demonstram que esta distribuição de colágeno no CBC ocorre devido ao fato de que a matriz extracelular da lesão (tecido conjuntivo de suporte) sofrer a ação de substâncias oriundas das células neoplásicas, o que pode ocasionar uma redução da conectividade das células, favorecendo assim o processo de metástase.⁴⁻⁶

Pode-se observar que a reação modificada de Feulgen utilizando o corante reativo de Schiff associada a análise de imagens demonstrou ser eficiente para análise das alterações nucleares (evidenciação e contagem de micronúcleos) e da matriz extracelular (distribuição do colágeno intersticial), o que poderá ser utilizado como parâmetro complementar na diferenciação de lesões cutâneas difíceis de serem diagnosticadas apenas pelos métodos convencionais de análise histopatológica.

Somando-se a estes dados, outros estudos recentes de nosso grupo de pesquisa também avaliaram a eficiência da análise morfométrica através da análise digital em lesões de pele através de estudo imunohistoquímico⁷ para a identificação de células de Langerhans (células pertencentes ao tecido linfóide associado a pele) e histoquímica com lectinas⁸ a fim de ser investigar a distribuição dos carboidratos considerados importantes receptores antigênicos de superfície na resposta imune antitumoral.

Desta forma, conclui-se que outros parâmetros histológicos, como a quantidade relativa de micronúcleos obtidos por técnicas

histoquímicas simples, podem servir como novas ferramentas para diferenciação de lesões tumorais de pele com aspectos histopatológicos semelhantes e que tem o seu diagnóstico preciso limitado pelo uso apenas das técnicas histológicas de rotina.

Referências Bibliográficas

1. Dias VM, Oliveira RM, Santelli GMM. Using fluorescence for improvement of the quantitative analysis of micronucleus in cell culture. *Mutat Res.* 2005;565:173-9.
2. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Patologia estrutural e funcional.* 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
3. Reis SRA, Sadigursky M, Andrade MGS, Soares LP, Santo ARE, Bôas DSV. Genotoxic effect of ethanol on oral mucosa cells. *Pesq Odontol Bras.* 2002;16:221-5.
4. Korabiowska M, Cordon-Cardo C, Buschmann N, Stachura J, Fischer G, Brinck U. Comparison of DNA ploidy status and DNA ploidy-related parameters in malignant melanoma tissue microarrays and full sections. *Human Pathol.* 2004;35:887-91.
5. Korabiowska M, Brinck U, Kotthaus I, Berger H, Droese M. Analysis of the DNA content in the progression of recurrent and metastatic melanomas. *Anticancer Res.* 2000;20:2791-4.

6. Hardie DC, Gregory TR, Heberta PD. From pixel to picograms. A beginner's guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. *J Histochem Cytochem.* 2002;50:735-49.
7. Melo-Júnior MR, Araújo-Filho JLS, Patú VJRM, Mello LA, Carvalho Jr LB. Langerhans cells in cutaneous tumours: immunohistochemistry study using a computer image analysis system. *J Mol Histol.* 2006;37:321-5.
8. Melo-Júnior MR, Araújo-Filho JLS, Patú VJRM, Beltrão EIC, Carvalho Jr LB. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumour differential diagnosis. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;42:455-60.

Correspondência

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Mario Ribeiro de Melo Júnior
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)
Av. Prof. Moraes Rêgo s/n, Campus Universitário
50670-910 – Recife - PE
e-mail: marionmj@gmail.com
