



Débora Garcia Y. Narvaiza
Afonso Celso Pinto Nazário
Vânia Nosé Alberti
Edmund Chada Baracat
Geraldo Rodrigues de Lima

Disciplina de Ginecologia da
Universidade Federal de São
Paulo – Escola Paulista de
Medicina (Unifesp – EPM).

Trabalho vencedor do Prêmio
Alberto Coutinho 1998.

EXPRESSÃO DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR AO EPITÉLIO DA MAMA DE USUÁRIAS E NÃO-USUÁRIAS DE ANTICONCEPCIONAL HORMONAL COMBINADO ORAL

Rev bras Mastol 2000; 10 (3): 115-120

UNITERMOS

Mama normal;
Anticoncepcional
hormonal oral;
Antígeno nuclear de
proliferação celular.

RESUMO

O efeito dos anticoncepcionais hormonais orais na mama normal ainda é um tema controverso. Os poucos trabalhos referentes à cinética celular no epitélio mamário durante o uso de ACOs são conflitantes e foram realizados sem distinção do tipo de anticoncepcional. Por essa razão e pelo fato de serem usados extensivamente, propusemo-nos a avaliar a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) no epitélio mamário normal na vigência de dois ciclos, com intervalo de sete dias da associação de 0,15 mg de levonorgestrel e 0,03 mg de etinilestradiol.

Obtivemos as amostras de tecido mamário normal distando 1 cm de nódulo mamário benigno no momento da biópsia, que ocorreu do 22º ao 25º dia do segundo ciclo, de acordo com a data da menstruação e a dosagem de progesterona sérica.

O material foi fixado em formol a 10% por menos de 12 horas e processada a reação imuno-histoquímica com anticorpo anti-PCNA do tipo PC 10. No grupo estudo, a média da porcentagem da expressão do PCNA foi de 16,78% e, no controle, de 13,72% (teste de Mann Whitney $p = 0,4173$).

Nossos resultados demonstram não haver diferença estatística na expressão do antígeno nuclear de proliferação celular entre as usuárias de pílulas e o grupo controle, na segunda fase do ciclo.

Aceito para publicação em março de 2000

INTRODUÇÃO

A utilização de substâncias hormonais como método contraceptivo não é recente, tendo Haberlandt, já em 1924, recomendado o uso de hormônios ovarianos e placentários

para regular a fertilidade. Vários estudos posteriores foram realizados e culminaram, 30 anos depois, com o lançamento da primeira pílula⁶. Houve grande repercussão e, atualmente, mais de 70 milhões de mulheres, no mundo, utilizam as pílulas de baixa dosagem⁷.

O Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1996)⁵ realizou amplo estudo epidemiológico e, entre as suas principais conclusões, relatam que, em usuárias de contraceptivos orais, o risco de desenvolvimento de câncer mamário era significativamente aumentado, embora discreto durante o uso da medicação e mantinha-se até dez anos após o término da sua utilização. Entretanto, esse pequeno aumento do risco não se mantinha após o mesmo período.

Nos últimos anos, diversos trabalhos, por meio de diferentes técnicas, procuraram estudar a cinética celular no epitélio mamário glandular normal, demonstrando que na fase lútea, as atividades proliferativa e metabólica do lóbulo mamário são mais intensas; a divisão celular e a síntese de DNA atingem o máximo em torno do 25º dia do ciclo, coincidindo com o pico de progesterona e com a segunda elevação do estrogênio^{14,16,19}. A expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é um método imuno-histoquímico aceito para análise laboratorial de rotina e que, inclusive, já foi testada no epitélio mamário normal^{2,19}.

Em relação à influência dos ACOs sobre a cinética celular do tecido mamário, os trabalhos são escassos. Meyer (1977) observou índice proliferativo aparentemente maior, porém, não significativo, na vigência de ACOs nas duas fases do ciclo¹⁴, e Going et al. (1988) e Olsson et al. (1996) chegaram a índices estatisticamente similares nas duas fases do ciclo, comparativamente ao ciclo natural^{11,17}. Anderson et al. (1989) obtiveram variação do índice de proliferação nas duas fases, sendo comprovadamente maior somente na fase proliferativa tardia e com uma tendência a ser também maior na secretora tardia, em comparação ao ciclo natural¹. Williams et al. (1991) observaram maior proliferação somente uma semana antes da segunda fase nos ciclos artificiais. Estes dois últimos grupos observaram antecipação de uma semana na atividade proliferativa²⁰. Na realidade, os trabalhos apresentam resultados distintos, o que pode ser consequência da não padronização do tipo de ACOs usados e da heterogeneidade das amostras.

Embora os anticoncepcionais orais sejam largamente utilizados na prática clínica, o conhecimento de seus efeitos sobre a fisiologia da glândula mamária humana não parece ser uniforme. O estudo da proliferação celular na vigência da ministração de anticoncepcionais orais pode fornecer elementos que permitam inferir sobre a influência de seu uso quanto ao risco de câncer mamário pelo aumento ou não da proliferação celular. Esses fatos motivaram-nos a estudar a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) no epitélio mamário normal em ciclos naturais e durante o

uso de um anticoncepcional oral específico, de forma padronizada e prospectiva.

MÉTODO

Amostra

Selecionaram-se 24 mulheres com nódulo mamário circunscrito benigno, hígidas, eumenorréicas, com idade entre 19 e 34 anos, atendidas no Setor de Mastologia da Disciplina de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, no período de janeiro a agosto de 1997.

O projeto de estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética Médica do Hospital São Paulo/ Universidade Federal de São Paulo.

As pacientes foram divididas em dois grupos: 1) grupo A (estudo), constituído por mulheres que usaram anticoncepcional oral composto de levonorgestrel (0,15 mg) e etinilestradiol (0,03 mg), por dois ciclos consecutivos, com intervalo de sete dias entre um e outro; 2) grupo B (controle) era composto por mulheres que não tomaram qualquer medicação hormonal.

A caracterização da fase do ciclo menstrual foi estabelecida à mercê de parâmetros clínicos (data da menstruação que precedeu e sucedeu a exérese do nódulo) e laboratorial (dosagem de progesterona sérica).

A biópsia abrangeu a retirada do nódulo mamário e de parênquima adjacente macroscopicamente normal, isto é, cerca de um centímetro da lesão, cuja ausência de alterações patológicas foi verificada posteriormente pelo exame histopatológico^{16,20}.

Procedimento histopatológico

Os fragmentos teciduais foram fixados em solução a 10% de formol líquido tamponado por um período máximo de 12 horas e depois incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo, realizando-se cortes de 4 mm e montados em lâminas, uma série tendo sido corada com hematoxilina e eosina (HE) e outros cortes sem corar para o processamento imuno-histoquímico.

Procedimento imuno-histoquímico

Aplicou-se o anticorpo primário monoclonal anti-PCNA PC 10 Dako, código M 0879, lote 064 (301),

previamente testado e padronizado na diluição 1:1.000 (BSA-soro albumina bovina) e também usado o kit Strepto ABCComplex/HPR – *Duet mouse/rabbit* – Dako/K0492/ lote 126 (102), na diluição de 1:800¹⁰.

Procedimento quantitativo

A imunoexpressão do PCNA foi avaliada no epitélio dos ductos terminais e dos lóbulos mamários. A reação foi considerada positiva quando os núcleos exibiam cor castanha característica, independentemente da sua intensidade. Essa avaliação foi feita utilizando-se o sistema de análise digital de imagem *Kontron Imaging System KS 300*, que emprega um microscópio óptico (Axiolab-Standart 20, marca Carl-Zeiss) acoplado à videocâmera JVC colorida, modelo TK-1180V DC 12V-7W AC24V, 60 Hz-65w, que transmite a imagem a um microcomputador 486 DX2-66 com 16 MB de memória RAM, dotado de placa digitalizadora com o *software KS 300* da *Kontron*, em ambiente *Windows*.

A imunoexpressão foi avaliada no aumento de 400 vezes, tendo sido contados, no mínimo, 800 núcleos^{10,17}.

Procedimento estatístico

Para a análise dos resultados foram aplicados testes não paramétricos, devido à natureza da distribuição dos valores ou à variabilidade das medidas efetuadas. Para a verificação da homogeneidade de variâncias entre os grupos A (estudo) e B (controle), em relação às variáveis idade, paridade, dia do ciclo e expressão do PCNA foram utilizados os testes de Levene e Bartlett.

O teste de Mann Whitney foi utilizado para comparação das médias dos dois grupos em relação às variáveis idade, paridade e dia do ciclo e para comparar as proporções dos dois grupos quanto à variável de expressão do PCNA.

Em todos os testes e intervalos de confiança fixou-se em 0,05% ou 5% (alfa menor ou igual a 0,05) o nível de significância, ou seja, o nível para rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS

No grupo A (estudo), constituído por mulheres que utilizaram o anticoncepcional oral por dois ciclos

consecutivos, a média de núcleos corados em castanho pelo anticorpo anti-PCNA foi de 213 por 1.254 células contadas, o que representa 16,78%. No grupo B (controle) a média de núcleos corados foi de 153 por 1.103 células, o que representa 13,72%.

Observa-se que, nos grupos A e B, as médias dos núcleos corados pelo anticorpo anti-PCNA foram estatisticamente semelhantes, segundo o teste de Mann Whitney ($p = 0,4173$) (Tabela 1 e figuras 1A e 1B).

Os dois grupos mostraram-se homogêneos, ou seja, apresentaram variâncias iguais (teste de Levene e Bartlett) e médias iguais (teste de Mann Whitney) quanto às variáveis idade (Tabela 2), paridade, dia do ciclo e expressão do PCNA (Tabela 3).



Figura 1 – Fotomicrografia de corte do epitélio mamário dos grupos A – caso 8 (A) e B – caso 21 (B), mostrando os núcleos positivos corados em castanho (imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-PCNA) e contracolorados com hematoxilina. Aumento de 400 X

DISCUSSÃO

O ciclo menstrual decorre da complexa interação hormonal regida pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovariano. O

hipotálamo libera GnRH sob forma de pulsos que agem na hipófise e estimulam a liberação de gonadotrofinas, as quais, por sua vez, modulam a esteroidogênese ovariana. O estradiol, em doses pequenas, faz diminuir a amplitude dos pulsos de GnRH e, quando atinge valores de 300 pg/ml a 500 pg/ml, tem efeito *feedback* positivo, responsável pelo pico de LH, fundamental para ocorrer a ovulação. No evoluir da primeira fase do ciclo, o nível plasmático de estradiol cresce progressivamente em decorrência da produção ovariana, apresenta o ápice pré-ovulatório, sofre queda e novo aumento na fase lútea. A progesterona, por sua vez, encontra-se em níveis baixos na primeira fase, eleva-se a partir do pico de LH até atingir o máximo ao redor de oito dias após a ovulação, por volta do 22º ao 25º dias do ciclo¹⁸.

Os anticoncepcionais hormonais orais combinados bloqueiam a ovulação, pois inibem o eixo hipotálamo-hipofisário, impedindo o pico de gonadotrofinas^{4,13,15}. O nível de esteróides ovarianos endógenos, durante o uso da pílula e ao longo do ciclo, mantém-se menor ou

semelhante àquele encontrado na fase folicular do ciclo natural, por outro lado, a produção reduzida desses esteróides é compensada pelo etinilestradiol e pelo levonorgestrel da própria pílula^{4,8,12}. Como o etinilestradiol é, pelo menos, 200 vezes mais potente que o estradiol, 1 mg de estradiol micronizado equivale a 5 µg de etinilestradiol¹³, poderíamos supor que o ciclo artificial com ACOs seria equivalente ao natural, em relação à potência dos estrogênios e progestagênios.

A mama normal apresenta variações cíclicas que culminam com o pico da proliferação celular por volta do 25º dia do ciclo, coincidindo com o pico de progesterona e com a segunda elevação de estrogênio⁹. Assim sendo, iniciamos o estudo na segunda fase do ciclo para avaliar se o uso de ACOs aumenta ou não o pico de proliferação na mama normal.

Os receptores de estrogênio diminuem no epitélio mamário na segunda fase durante um ciclo natural, e são

Tabela 1: Médias das porcentagens de núcleos corados pelo anti-PCNA, nos grupos A (estudo) e B (controle)	
Grupo A (%)	Grupo B (%)
17,92	22,67
11,24	10,69
16,57	3,98
8,11	8,16
9,82	18,65
12,76	6,67
7,29	10,63
28,77	18,83
37,72	15,03
22,33	29,17
12,05	5,56
	21,34
	7,04
Média 16,78	13,72
Teste de Levene p = 0,889	Teste de Bartlett p = 0,536
Teste de Mann Whitney Grupo A x Grupo B p = 0,4173	

Tabela 2: Distribuição das idades dos grupos A e B			
Grupo A		Grupo B	
Caso	Idade	Caso	Idade
1	29	12	21
2	21	13	20
3	23	14	19
4	20	15	24
5	29	16	31
6	24	17	20
7	26	18	34
8	20	19	20
9	29	20	29
10	19	21	19
11	21	22	31
		23	28
		24	26
Média 23,7		Média 24,8	
Teste de Levene p = 0,073		Teste de Bartlett p = 0,201	
Teste de Mann-Whitney Grupo A x Grupo B p = 0,7281			

significativamente menores no ciclo artificial; já os receptores de progesterona mantêm-se iguais nas duas fases, porém, aumentam, de forma quantitativa, nos ciclos artificiais³.

A utilização de anticoncepcionais hormonais orais gera uma ampla gama de alterações, destacando-se: diminuição das concentrações endógenas de esteróides sexuais, em decorrência do bloqueio hipotálamo-hipofisário; concentração sérica de etinilestradiol e levonorgestrel fornecida exogenamente pela própria pílula; diminuição dos receptores de estrogênio e aumento quantitativo dos receptores de progesterona. É possível que, em consequência desse novo equilíbrio, o índice de proliferação se manteve estatisticamente igual nos dois grupos estudados.

Talvez o uso de dois ciclos de contraceptivos orais seja insuficiente para aquilatar a influência da pílula na cinética celular da glândula mamária. Em verdade, esse trabalho foi o início de uma linha de pesquisa uniforme e padronizada. Novos trabalhos avaliando a cinética celular, não apenas na segunda fase, mas também nas semanas que a antecedem, e seu uso mais prolongado (4, 6 e 12 meses), devem ser realizados a fim de elucidar, de forma inequívoca, a influência dos anticoncepcionais hormonais no epitélio da mama normal.

KEYWORDS

Normal human breast;
Oral contraceptives;
Proliferating Cell Nuclear
Antigen (PCNA).

ABSTRACT

CELL PROLIFERATION OF EPITHELIAL CELLS IN NORMAL HUMAN BREAST TISSUE DURING ARTIFICIAL MENSTRUAL CYCLES REGULATED BY ORAL CONTRACEPTIVES BY THE EXPRESSION OF PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN

The oral contraceptive effect on normal breast still remains unclear. The few reports related to cell kinetics on the normal breast epithelium during the use of oral contraceptives (OCs) are in disagreement and were made without discriminating the sort of OCs.

For those reasons and by the fact that they have been widely used, we propose to determine the proliferative activity evaluated by the PCNA expression in epithelial cells of normal breast tissue after the administration of levonorgestrel 0.15 mg and ethinyl stradiol 0.03 mg during to cycles of 21 days (with seven days between pill packs).

Normal breast tissue was collected at the time of benign lump biopsy by removing fragments of breast parenchima located at least 1 cm from the lesion. The biopsy took place between the 22nd and 25th day of menstrual cycle, and was determined on the basis of the date of the menstruation and of serum progesterone measurement at the moment of biopsy.

The material was fixed in 10% formalin for less than 12 hours and processed by immonohistochemistry (PC-10). In the study group the average PCNA expression was 16.78% where as in the control group was 13.72% (Mann Whitney test p = 0.4173).

Our results showed that there is no difference in PCNA expression among OCs users during two cycles of treatment.

Tabela 3: Mulheres dos grupos A e B segundo a paridade e o dia do ciclo

Paridade		Dia do ciclo	
Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B
VI	0	24º	25º
0	0	22º	25º
0	0	25º	23º
0	II	25º	25º
I	III	22º	25º
I	0	25º	24º
I	VI	23º	23º
0	0	25º	25º
0	0	25º	25º
0	0	23º	24º
0	II	24º	23º
	III		25º
	0		23º
Paridade		Dia do ciclo	
Teste de Levene	Teste de Bartlett	Teste de Levene	Teste de Bartlett
p = 0,517	p = 0,908	p = 0,492	p = 0,372
Grupo A x Grupo B		Grupo A x Grupo B	
Teste de Mann Whitney		Teste de Mann Whitney	
p = 0,5052		p = 0,5820	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON TJ, BATTERSBY S, KING RJB, MCPHERSON K, GOING JJ. Oral contraceptive use influences resting breast proliferation. *Human Pathol* 1989; 20: 1139-44.
2. BATTERSBY S, ANDERSON TJ. Correlation of proliferative activity in breast tissue using PCNA/ cyclin. *Human Pathol* 1990; 21: 781 [Letter].
3. BATTERSBY S, ROBERTSON BJ, ANDERSON TJ, KING RJB, MCPHERSON K. Influence of menstrual cycle, parity and oral contraceptive use on steroid hormone receptors in normal breast. *Br J Cancer* 1991; 65: 601-7.
4. COHEN BL, KATZ M. Pituitary and ovarian function in women receiving hormonal contraception. *Contraception* 1979; 20: 475-87.
5. COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53.297 women with breast cancer and 100.239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 1996; 347: 1713-27.
6. DICZFALUSY E. Gregory Pincus and steroidal contraception revisited. *Acta Obstet Gynecol Scand (Suppl)* 1982; 105: 7-15.
7. DRIFE JO. The benefits and risks of oral contraceptives today. 2nd ed. London: The Parthenon Publishing Group. 1996.
8. EL-RAGHY I, BACK DJ, MAKERAM M et al. Pharmacokinetics of oral contraceptives steroids in egyptian women: studies with ovral, nordette and norminest. *Contraception* 1986; 33: 379-85.
9. FERGUSON DJP, ANDERSON TJ. Morphological evaluation of cell turnover in relation to the menstrual cycle in "resting" human breast. *Br J Cancer* 1981; 44: 177-81.
10. GELB AB, KAMELOW, LEBRUN DP, WARNKE RA. Estimation of tumor growth fractions in archival formalin-fixed, paraffin embedded tissues using two anti-PCNA/ cyclin monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1992; 114: 1453-8.
11. GOING JJ, ANDERSON TJ, BATTERSBY S, MACINTYRE CCA. Proliferative and secretory activity in human breast during natural and artificial menstrual cycles. *Am J Pathol* 1988; 30: 193-204.
12. KUHNZ W, AL-YACOUB G, FUHRMEISTER A. Pharmacokinetics of levonorgestrel and ethinyles-tradiol in 9 women who received a low-dose oral contraceptive over a treatment period of 3 months and, after a wash-out phase, a single oral administration of the same contraceptive formulation. *Contraception* 1992; 46: 55-69.
13. LOBO RA, STANCZYK FZ. New knowledge in the physiology of hormonal contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 1499-507.
14. MEYER JS. Cell proliferation in normal human breast ducts, fibroadenomas, and other ductal hyperplasias measured by nuclear labeling with tritiated thymidine. *Human Pathol* 1977; 8: 67-81.
15. MISHALL JR DR, KLETZKY OA, BRENNER PF, ROY S, NICOLOFF J. The effect of contraceptive steroids on hypothalamic-pituitary function. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 128: 60-74.
16. NAZÁRIO ACP, LIMA GR, SIMÕES MJ, NOVO NF. Cell kinetics of the human mammary lobule during the proliferative and secretory phase of the menstrual cycle. *Bull Assoc Anat* 1995; 79: 23-7.
17. OLSSON H, JERNSTRÖM H, ALM P et al. Proliferation of the breast epithelium in relation to menstrual cycle phase, hormonal use, and reproductive factors. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 40: 187-96.
18. LIMA GR, BARACAT EC. *Ginecologia endócrina*. São Paulo: Atheneu. 1995.
19. TARRICONE JR V. Expressão do antígeno de proliferação celular (PCNA) no epitélio mamário normal nas fases folicular e lútea. São Paulo: 1997. Tese de Mestrado, Escola Paulista de Medicina – Unifesp.
20. WILLIAMS G, ANDERSON E, HOWELL A et al. Oral contraceptive (OCP) use increases proliferation and decreases oestrogen receptor content of epithelial cells in the normal human breast. *Int J Cancer* 1991; 48: 206-10.

Endereço para correspondência:

*Débora Garcia y Narvaiza
Rua Pintassilgo, 59, ap. 12B
04514-030 – São Paulo, SP*