

Os efeitos do tabagismo na densidade das células de Langerhans do colo uterino

Nelson Shozo Uchimura^{1*}, Julisa Chamorro Lascasas Ribalta², José Focchi², Taqueco Teruya Uchimura³, Manuel Jesus Simões⁴ e Eraldo Schunk Silva⁵

¹Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá. ²Departamento de Tocoginecologia, Universidade Federal de São Paulo-EPM. ³Departamento de Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá. ⁴Departamento de Morfologia, Universidade Federal de São Paulo-EPM. ⁵Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Maringá. *Autor para correspondência. e-mail: nuchimura@irapida.com.br

RESUMO. A importância do tabagismo na oncogênese do colo uterino é conhecida, e a elevada concentração de derivados de tabaco como a nicotina tem sido associada à depressão das células de Langerhans (CL). A alta taxa de regressão da infecção por HPV e a evolução de alguns casos para malignização sugerem a existência de múltiplos fatores associados na imunodepressão. Objetivou-se estudar a influência do fumo nas alterações das CLs em mulheres com Captura Híbrida negativa. Foram estudadas 30 mulheres por meio do método clínico colposcópico, histopatológico, imuno-histoquímico, histométrico e teste de hibridização molecular. Dividiu-se a amostra em dois grupos: fumantes (n=8) e não-fumantes (n=22). Utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon (*Ran sun test*). As médias das densidade das CLs no epitélio foram de 232,41 células/mm² para fumantes e de 221,08 células/mm² para não-fumantes, sendo estes valores não significativos. Concluiu-se não haver diferença significativa na densidade dessas células entre fumantes e não-fumantes.

Palavras-chave: células de Langerhans, colo uterino, tabaco, tabagismo, papilomavírus humano.

ABSTRACT. Effects of smoking on the density of the uterine cervix Langerhans' cells. The role of smoking in the chemical carcinogenesis is well-known, and the high concentration of tobacco derivatives such as nicotine has been associated with the depression of the Langerhans' cells (LCs). The high regression rate of the human papillomavirus (HPV) infection and the evolution of some cases into malignancy suggest the existence of multiple associated factors in the neoplastic immunosurveillance. A study was undertaken on the effects of the smoking on the alterations of LCs in women with negative Hybrid Capture. Thirty women were studied through the clinical method, colposcopy, histopathology, immunohistochemistry, histometry and hybridization assay. The sample was divided into two groups: smokers (n=8) and non-smokers (n=22). The nonparametric Wilcoxon rank-sum test was employed for statistical analysis. The averages of LCs densities in the epithelium were of 232.41 cells/mm² for smokers, and 221.08 cells/mm² for non smokers (p>0,05). Results did not show significant difference in LCs densities between smokers and non smokers.

Key words: Langerhans' cells, human papillomavirus, uterine cervix, smoking, tobacco.

Introdução

O câncer do colo uterino continua sendo uma das mais freqüentes neoplasias da mulher nos países em desenvolvimento. Com incidência de 18,86 casos novos por 100 mil mulheres-ano, a neoplasia cervical uterina constitui, no Brasil, o segundo tumor mais freqüente da mulher (Inca, 2001).

Múltiplos fatores estão relacionados com a etiopatogenia do câncer do colo uterino, destacando-se o papel fundamental da atividade sexual e dos múltiplos parceiros. Acrescente-se que o início precoce da atividade sexual na adolescência seria susceptível aos microtraumas do coito, por apresentar o epitélio do colo imaturo (Shew *et al.*, 1994).

Há um consenso do importante papel que o Papilomavírus humano (HPV) desempenha para o desenvolvimento do câncer de colo uterino (Zur Hausen, 1994). Por outro lado, dentre os fatores comportamentais de importância na sociedade moderna, pela sua popularização e pelo interesse econômico, está o tabagismo. Seu efeito na oncogênese já é conhecido, sendo Winkelstein (1977) o primeiro a correlacionar o tabaco ao câncer de colo uterino. A alta concentração de derivados de tabaco, como a nicotina, tem sido isolada em muco cervical (Sasson *et al.*, 1985).

O tabagismo é um fator de risco associado tanto para a infecção genital de HPV como para o câncer de colo uterino (Nuñez *et al.*, 2002; Winer *et al.*,

2003). A regressão espontânea da infecção do HPV, na maioria dos casos, e a evolução para malignização, somente em alguns casos, sugere a necessidade de outros fatores, além do HPV, para desencadear o processo de oncogênese, tais como: fumo, anticoncepcionais orais e a infecção por Herpes simples tipo 2 (Dalling *et al.*, 1996).

Acrescente-se que o tabaco e seus derivados podem induzir diversas alterações no sistema imunológico, principalmente nas células *natural killer* e nas células de Langerhans (Sasson, 1985; Barton *et al.*, 1988). Em estudos experimentais, Zeid e Muller (1995) verificaram que solução de tabaco aplicada na pele de camundongo desencadeou o aparecimento de células de Langerhans (LCs) arredondadas ou alongadas com poucos dendritos e desenvolvimento de neoplasia; enquanto a supressão do tabaco apresentou LCs com numerosos dendritos associados ao infiltrado linfocitário e à regressão da neoplasia. As células de Langerhans são componentes importantes no sistema de vigilância imunológica celular pois são apresentadoras de antígeno e ativam especificamente os linfócitos T-CD4. Assim, as alterações nessas células, sugerem uma imunodeficiência localizada de grande importância na carcinogênese (Poppe *et al.*, 1995).

Diversos métodos podem ser utilizados para a detecção de DNA do HPV, tais como: hibridização *in situ*, captura híbrida e reação de polimerase em cadeia (PCR), todos com sensibilidade e especificidade equivalentes em mais de 90% (Uchimura, 2002).

Diante da importância do tabaco como fator de risco, associado ao desenvolvimento de câncer de colo uterino, este trabalho objetivou estudar a influência do fumo nas alterações das células de Langerhans do colo uterino em mulheres com captura híbrida negativa, isto é, sem a ação oncogênica do HPV.

Material e métodos

Foram estudadas 30 mulheres, atendidas no ambulatório da Clínica da Mulher, da Secretaria de Saúde do Município de Maringá, Estado do Paraná, que apresentavam amostras de biópsias de colo uterino negativas para HPV. A ausência de DNA do HPV foi confirmada pela Captura Híbrida. As pacientes, com idade variável de 18 a 46 anos e média de 30 anos, foram examinadas no período de agosto de 1999 a novembro de 2001.

Foram excluídas as gestantes, as lactantes, e as menopausadas, as usuárias de imunossuppressores e de imunostimuladores nos últimos 3 meses, bem como as usuárias de drogas e de narcóticos e as portadoras de doenças autoimunes, de neoplasias e diabetes.

Foi realizado atendimento inicial com o preenchimento da Ficha Clínica específica para estudo e agendamento de retorno para a primeira fase do ciclo menstrual, a fim de efetuar a biópsia dirigida pela colposcopia.

Foram estudadas as variáveis: idade, menarca, idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais, idade da primeira gestação, número de gestações, uso de hormônios independente do tipo e do tempo de uso, antecedentes de cauterizações de colo uterino e número de cigarros consumidos por dia, independente do tempo de uso (Tabela 1).

Cada uma das amostras da biópsia foi subdividida em outras duas partes: a primeira foi encaminhada ao exame anatomopatológico e imuno-histoquímico, e a segunda foi colocada em conservante, congelada a -20°C e encaminhada para exame de Captura Híbrida para HPV.

Para o método histopatológico, os fragmentos cervicais obtidos foram fixados em formalina a 10% e encaminhados para processamento e impregnação em parafina. O bloco de material parafinado foi cortado em micrótomo rotativo manual, em espessura de 4 a 5 µm, colocado em lâmina e corado com hematoxilina de Harris e eosina. A lâmina preparada foi analisada em microscópio de luz.

No método imuno-histoquímico cada amostra teve, em média, cinco cortes histológicos de 3 a 4 µm, distribuídos em lâminas silanizadas e incubadas com anticorpo S-100 (Dako), em solução 1/5000, durante 16 horas, a 4°C, e foram incubadas com anticorpo de cabra anti-coelho (Vector Laboratories), por 30 minutos, a 37°C. A reação anticorpo-antígeno foi localizada pelo método do complexo Estreptavidina-biotina-peroxidase, usando substrato cromogênico preparado com diaminobenzidina (Sigma, USA) 0,6%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetilsulfóxido a 1% em PBS. Os cortes assim preparados foram contracolorados com hematoxilina de Harris e avaliados por meio de microscópio de luz, com 400 vezes de aumento, adaptado à microcâmera sua imagem foi digitalizada pelo *software Cytoviewer*. A contagem das células foram expressadas em número de núcleos / mm² ou

Tabela 1. Distribuição das 30 pacientes segundo as variáveis estudadas. Maringá, Estado do Paraná, 2001.

Idade (anos)	Menarca (anos)	Idade 1º coito (anos)	Nº parceiros	Idade 1ª Gestação (anos)	Nº gestação	Uso Hormônio	Antecedentes	Cauterização	Nº Cigarros/dia
28	13	21	3	24	1	N	N	N	0
40	13	17	1	18	3	N	N	S	0
25	13	16	10	16	1	N	N	S	4
23	13	22	1	-	0	N	N	N	0
32	15	15	2	16	4	N	N	N	0

46	14	17	1	17	9	N	N	0
31	14	19	1	23	2	N	N	0
37	13	18	1	19	2	N	N	0
22	13	17	3	18	1	N	N	0
32	13	23	1	24	4	N	S	0
31	13	19	3	26	1	N	N	0
34	12	22	1	23	2	N	N	0
38	14	18	1	18	3	N	N	0
19	12	18	1	19	1	S	N	0
27	13	22	1	-	0	S	N	0
37	14	28	1	29	1	S	N	1
27	12	18	1	22	2	N	N	0
19	15	18	1	-	0	N	N	0
34	12	17	1	29	1	S	N	0
36	12	25	2	30	1	S	N	3
28	13	17	2	17	2	N	N	0
27	16	16	1	17	3	N	S	0
34	13	18	1	18	2	N	N	8
18	12	18	1	-	0	N	N	0
36	13	20	2	20	2	N	N	7
42	11	18	1	20	2	N	N	0
37	13	15	4	19	3	N	N	10
30	10	13	3	14	5	N	N	10
19	13	15	4	-	0	S	N	3
27	12	19	1	21	2	N	N	0

S= sim N= não

perfis citoplasmáticos / mm² de cortes histológicos (medido pela câmara graduada de Neubauer). As células de Langerhans S-100 positivas foram identificadas pela coloração marrom de seus citoplasmas, que se apresentavam, conforme o eixo de corte histológico, em perfis citoplasmáticos de diversas formas, como ponto, vírgula, filiformes ou mesmo arboriformes. Quantificaram-se os perfis citoplasmáticos e os núcleos da células de Langerhans separadamente, segundo sua localização nas camadas do epitélio escamoso (superficial, intermediária e basal) e do estroma.

O presente estudo foi aprovado pela Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital São Paulo – Universidade Federal de São Paulo, conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

Foram realizados os testes de diferenças das médias das variáveis fumante (n=8) e não-fumante (n=22), com as variáveis independentes (idade, menarca, idade da 1ª relação sexual, número de parceiros sexuais, idade da 1ª gestação e número de gestações) por meio do teste de Mann-Whitney. Para as variáveis qualitativas (uso de hormônios e antecedentes de cauterização de colo uterino), utilizou-se o teste de associação de Fisher. Calcularam-se a média aritmética e os respectivos desvio padrão do número das células de Langerhans por milímetro quadrado. Utilizou-se o teste não-paramétrico de soma das ordens de Wilcoxon (*Rank-sum test*). Para todos os testes estatísticos, considerou-se o nível de significância de 5% (p<0,05).

Resultados e discussão

As características das variáveis estudadas nos grupos fumantes e não-fumantes, com respectivas médias e desvio padrão, estão representados na Tabela 2. Observou-se homogeneidade dos grupos quanto a essas variáveis, com exceção de número de parceiros, em que as médias entre fumantes e não fumantes foi de 3,37 (DP $\pm 2,92$) e 1,36 (DP $\pm 0,72$), diferença estatisticamente significativa (p=0,0050).

Na Tabela 3, observou-se homogeneidade na distribuição das variáveis qualitativas (uso de hormônios e número de cauterizações) nos dois grupos.

O fumo e seus derivados aumentam a densidade das células de Langerhans, tornando-as arredondadas ou alongadas com poucos dendritos, e, na ausência dos efeitos da nicotina e de seus derivados, as células dendríticas se apresentam bem desenvolvidas (Zeid e Muller, 1995). Alterações semelhantes foram descritas por Barton *et al.* (1988) em tecido de colo uterino com lesão intraepitelial de baixo grau. Neste estudo, não se observaram alterações morfológicas significativas, sendo que as LCs se localizavam principalmente nas camadas intermediárias do epitélio, tanto em fumantes como em não-fumantes.

O tabagismo e sua importância na oncogênese do colo uterino já é conhecido, e a alta concentração de derivados de tabaco, como a nicotina, tem sido associada à redução das densidades das células de Langerhans, tanto em fumantes e ex-fumantes quanto em mulheres com HPV e em mulheres sem alterações imuno-histoquímica para HPV. Verificaram-se também uma dose de dependência com o número de cigarros e a diminuição da densidade das células de Langerhans (Barton *et al.*, 1988). Resultados semelhantes foram observados por Nuñez *et al.* (2002), em que as profissionais do sexo, fumantes há

mais de 5 anos ou que fumam mais de 20 cigarros/dia, apresentaram um risco elevado de desenvolver neoplasia intraepitelial cervical (NIC) ou câncer invasor. Os estudos de Poppe *et al.* (1995) também confirmaram esses resultados, tanto em ectocérvice quanto em zona de transformação do colo uterino das fumantes, porém, não encontraram a correlação com a dose-dependência.

Neste estudo, as células de Langerhans foram evidenciadas pelo método imuno-histoquímico e histométrico. Dessa forma, as médias das densidade das células de Langerhans no epitélio foram de 232,41 células/mm² para fumantes e de 221,08 células/mm² para não-fumantes. Esses valores não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, tanto no estudo do epitélio total quanto em camadas histológicas (Tabela 4), confirmando as observações de Derchain (1996), que estudou 20 adolescentes fumantes e 29 não-fumantes com condiloma cervical ou neoplasia intraepitelial cervical, não observando redução significativa da densidade das LCs, mesmo entre pacientes com e sem NIC. A dose dependência não pôde ser estudada neste trabalho, devido ao tamanho pequeno da amostra.

Os benefícios da interrupção do tabaco foram citados por Szarewski *et al.* (2001), ao observarem a regressão significativa da lesão cervical de baixo grau, após 6 meses, estando associada com a redução do número das células de Langerhans, dos linfócitos CD8 e de linfócitos totais no tecido cervical. Do mesmo modo, os estudos de Poppe *et al.* (1995) demonstraram uma redução significativa dos linfócitos CD4 na zona de transformação do colo uterino das fumantes, confirmando a existência de um estado de imuno-depressão, localizado ao nível do colo uterino em fumantes. Estes resultados são de aplicação clínica, pois a interrupção do consumo de cigarro pode reverter a imunocompetência local mediada por essas células, com melhoria no sistema de vigilância anti-tumoral e anti-viral.

Tabela 2. Distribuição das médias, desvio padrão, valores mínimo e máximo para as variáveis relacionadas ao uso de fumo. Maringá, Estado do Paraná, 2001.

Variável	Parâmetro	Fumantes (n=8)	Não-fumantes (n=22)	p*
Idade (anos)	Média (DP**)	31,75 (6,62)	30,09 (7,55)	0,480
	Min-Máx***	19-37	18-46	4
Menarca (anos)	Média (DP**)	12,62 (1,18)	13,09 (1,19)	0,653
	Min-Máx***	10-14	11-16	4
Idade 1ª relação Sexual (anos)	Média (DP**)	18,75 (5,28)	18,59 (2,13)	0,505
	Min-Máx***	13-28	15-23	8
Nº parceiros	Média (DP**)	3,37 (2,92)	1,36 (0,72)	0,005
	Min-Máx***	1-10	1-3	0
Idade 1ª gestação (anos)	Média (DP**)	20,85 (6,22)	20,61 (3,61)	0,807
	Min-Máx***	14-30	16-29	8
Nº gestação	Média (DP**)	1,87 (1,55)	2,04 (1,96)	0,885
	Min-Máx***	0-5	0-9	0

*p - nível descritivo do teste de diferença das médias de Mann-Whitney. **DP - desvio padrão. *** valores mínimo e máximo.

Tabela 3. Distribuição do número e percentagem de mulheres segundo variáveis independentes e o uso de fumo. Maringá, Estado do Paraná, 2001.

Variável	Parâmetro	Fumantes		Não-fumantes		p*
		(n=8)	%	(n=22)	%	
Uso hormônios	Sim	3	37,5	3	13,6	0,1746
	Não	5	62,5	19	86,4	
Nº cauterizações	Sim	1	12,5	3	13,6	0,7165
	Não	7	86,5	19	86,4	

*p - nível descritivo do teste de Fisher.

Tabela 4. Distribuição das médias e desvio padrão das densidades de células de Langerhans (/mm²) no epitélio e camadas histológicas. Maringá, Estado do Paraná, 2001.

Epitélio	Tabagismo				p*
	Não (n=22)		Sim (n=8)		
	Média	DP	Média	DP	
Total	221,08	145,78	232,41	191,52	0,3991
Camadas histológicas					
Superficial	9,15	17,92	2,62	3,46	0,2547
Intermediária	108,33	93,71	126,62	104,81	0,2967
Basal	28,03	31,83	31,47	29,18	0,3723

*p - nível descritivo do teste de diferença das médias de Wilcoxon rank-sum test.

Conclusão

O tabagismo atua na oncogênese de epitélio cervical pela depressão da imunocompetência local, apesar de este trabalho não ter encontrado diferença significativa na densidade das células de Langerhans em colo uterino entre fumantes e não-fumantes. O resultado controverso em relação à literatura se deve provavelmente à dose de nicotina absorvida pelo organismo e ao tempo de exposição a seus derivados. Novos estudos deverão ser conduzidos com um número maior de casos para resultados definitivos quanto ao efeito adverso do tabaco sobre as células de Langerhans.

Referências

- BARTON, S.E. *et al.* Effect of cigarette smoking on cervical epithelial immunity: a mechanism for neoplastic change? *Lancet*, London, v. 2, n. 8612, p. 652-654, 1988.
- DALLING, J.R. *et al.* The relationship of Human papillomavirus-related cervical tumors to cigarette smoking, oral contraceptive use, and prior Herpes simplex virus type 2 infection. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, Baltimore, v. 5, n. 7, p. 541-548, 1996.
- DERCHAIN, S.F.M. Langerhans' cell in cervical condyloma and intraepithelial neoplasia in smoking adolescents. *Acta Derm. Venereol.*, Stockholm, v. 76, n. 6, p. 493-494, 1996.
- INSTITUTO NACIONAL DE CANCER-INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa2001/bras.html>> Acesso 15 Mai. 2002.
- NUÑEZ, J.T. *et al.* Smoking as a risk factor for preinvasive and invasive cervical lesions in female sex workers in Venezuela. *Int. J. Gynecol. Obstet.*, Limerick, v. 79, n. 1, p. 57-60, 2002.

- POPPE, W.A.J. *et al.* Tobacco smoking impairs the local immunosurveillance in the uterine cervix. *Gynecol. Obstet. Invest.*, Basel, v. 39, p. 34-38, 1995.
- SASSON, I. *et al.* Cigarette smoking and neoplasia of the uterine cervix. Smoke constituents in cervical mucus. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 312, p. 315-316, 1985.
- SHEW, M.I. *et al.* Interval between menarche and first sexual intercourse, related to risk of human papillomavirus infection. *J. Pediatr.*, St. Louis, v. 125, n. 661-666, 1994.
- SZAREWSKI, A. *et al.* The effect of stopping smoking on cervical Langerhans' cells and lymphocytes. *BJOG.*, Oxford, v. 108, n. 3, p. 295-303, 2001.
- UCHIMURA, NS. *Alterações das células de Langerhans e sua relação com lesão histopatológica do colo uterino por Papilomavírus humano em pacientes com captura híbrida positiva.* 2002. Tese (Doutorado)- Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2002.
- WINER, R.L. *et al.* Genital Human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am. J. Epidemiol.*, Baltimore, v. 15, n. 3, p. 218-226, 2003.
- WINKELSTEIN, W. Smoking and cancer of the uterine cervix. Hypothesis. *Am. J. Epidemiol.*, Baltimore, v. 106, p. 257-259, 1977.
- ZEID, N.A.; MULLER, H.K. Tobacco smoke condensate cutaneous carcinogenesis: changes in Langerhans' cells and tumour regression. *Int. J. Exp. Pathol.*, Oxford, v. 76, n. 1, p. 75-83, 1995.
- ZUR HAUSEN, H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific HPV types. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, Berlin, v. 186, p. 131-156, 1994.

Received on July 29, 2004.

Accepted on November 17, 2004.