

**Bianca Bianco do Carmo**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE  
A CITOLOGIA CONVENCIONAL E A  
CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO NA  
DETECÇÃO DE LESÕES ESCAMOSAS  
INTRA-EPITELIAIS E INVASORAS DO  
COLO UTERINO ASSOCIADAS À  
INFECÇÃO PELO PAPILOMA VÍRUS  
HUMANO**

**Belo Horizonte**

**Faculdade de Farmácia da UFMG**

**2004**

**Bianca Bianco do Carmo**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE  
A CITOLOGIA CONVENCIONAL E A CITOLOGIA EM  
MEIO LÍQUIDO NA DETECÇÃO DE LESÕES  
ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS E INVASORAS DO  
COLO UTERINO ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO  
PAPILOMA VÍRUS HUMANO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup> Dra. Paula Ávila Fernandes

**Co-orientadora:**

Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes

**Belo Horizonte**

**Faculdade de Farmácia da UFMG**

**2004**

C287e Carmo, Bianca Bianco do.  
Estudo comparativo entre a citologia convencional e a citologia em meio líquido na detecção de lesões escamosas intra-epiteliais e invasoras do colo uterino associadas à infecção pelo papiloma vírus humano / Bianca Bianco do Carmo. – Belo Horizonte : [s.n.], 2004. 122 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Ávila Fernandes.  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Câncer – Colo uterino – Teses. 2. Citologia – Teses. 3. Vírus do papiloma – Teses. I. Fernandes, Paula Ávila. II. Fernandes, Ana Paula Salles Moura. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD:611.0181

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Paulo Roberto e Maristela, que sempre apoiaram meus estudos e projetos. Obrigada por todo o amor e por serem luz em minha vida.

Aos meus irmãos, Christiano e Paula, obrigada pelo amor e companheirismo.

Ao André, que esteve sempre ao meu lado me apoiando. Sem seu amor e dedicação este momento não seria possível.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Paula Ávila Fernandes, que nestes anos de convívio foi para mim exemplo de professora, orientadora e mulher. Obrigada pelo cuidado e carinho com que ajudou na elaboração deste trabalho.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Ana Paula Salles Moura Fernandes, que me orientou e acompanhou com dedicação e carinho. Muito obrigada.

Ao amigo e colega de mestrado Francisco Danilo Ferreira Paula, pela co-participação neste trabalho. Sua ajuda foi imprescindível para que ele fosse concluído. Obrigada por tudo.

Ao amigo farmacêutico-bioquímico Jarbas E. Cardoso, por sua experiência e dedicação ao trabalho, além do carinho sempre dedicado a mim.

À amiga e colega de pós-graduação Daniela Amorim M. G. do Bem. Obrigada pelos inúmeros ensinamentos, amizade e apoio.

Aos médicos Dr<sup>a</sup> Maria de Fátima D. S. Brito, Dr<sup>a</sup> Vera Lúcia Furtado, Dr. Lúcio, Dr<sup>a</sup>. Silvana Cló e Dr. Túlio Cezar Alvim, obrigada por terem participado da elaboração deste projeto e por ceder as pacientes, sem as quais não seria possível a realização deste projeto. Agradeço também pela dedicação e preocupação com o projeto.

A todas as mulheres que contribuíram voluntariamente com este estudo.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular, Fernanda Amorim M. Guimarães, Kelly Cristina de Sousa Zuquim, Daniela Diniz e Maristella Ayala. Obrigada pela colaboração e amizade.

Aos amigos de pós-graduação Cristiana, Karina Abdo, Andreza Belo, Rívia, Anna Letícia, Warly Barcelos, Adriano, Fernanda, Cássia, obrigada pelo constante apoio.  
Ao Prof. Geraldo Tadeu Generoso pelo apoio e ajuda constante.

Aos Profs. Rômulo T. de Mello e Míriam de O. Rocha, pelo apoio e amizade.

Ao Profs. Lauro Melo, Luci Dusse e Maria das Graças Carvalho pelo carinho e apoio.

À toda minha família, que de alguma forma contribuiu para a realização desta etapa.

Às minhas amigas Luísa, Flávia, Marcelle, Janaína, Cristiane Oliveira, Letícia, Danielle e Maira, pela amizade e companheirismo.

À Poliana La Rocca, pela orientação na análise estatística.

Aos professores, colegas e funcionários da pós-graduação da Faculdade de Farmácia da UFMG que acompanharam o desenvolver deste projeto.

*“Não só isso, mas nos gloriamos até das tribulações. Pois sabemos que a tribulação produz a paciência, a paciência prova a fidelidade e a fidelidade, comprovada, produz a esperança. E a esperança não engana.”*

*(Rm 5, 3-5)*

## RESUMO

A comparação entre os métodos de citologia em meio líquido (CML) e convencional (CC) na identificação de pacientes portadoras de lesões escamosas intra-epiteliais (LEI) e invasoras do colo uterino associadas à infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) foi o objetivo deste trabalho. Realizou-se a correlação dos achados citopatológicos com os resultados da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para HPV e com o diagnóstico histopatológico. Foram estudadas 174 pacientes provenientes dos Serviços de Propedêutica do Colo Uterino da Maternidade Odete Valadares de Belo Horizonte (MOV) e do Centro de Tratamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis do Distrito Centro-Sul da Prefeitura de Belo Horizonte (CTDST). A concordância diagnóstica entre os dois métodos citológicos foi de 89,7%. A CML detectou proporcionalmente mais LEI e invasoras do que a CC, resultando em um aumento de cerca de 20%. Dentre os casos discordantes, não houve nenhuma amostra cujo diagnóstico foi positivo na CC e negativo na CML. Pelo contrário, na maioria dos casos, a CML detectou lesões mais graves que aquelas identificadas na CC. Em 5,3% dos casos considerados negativos na CC, a CML foi positiva ( $\geq$  células escamosas atípicas de significado indeterminado - ASCUS). Dentre as pacientes com resultado citológico positivo, 52,7% foram positivas para a presença do HPV na PCR. A presença do HPV foi detectada em todos os diagnósticos de carcinoma invasor e em torno de metade dos casos de ASCUS e de LEI. A pesquisa de HPV através do método molecular constitui uma ferramenta auxiliar importante na detecção das anormalidades epiteliais do colo uterino.

**Palavras-chave:** HPV, PCR, citologia em meio líquido, câncer cervical, citologia

## ABSTRACT

The evaluation of the performance of liquid-based cytology (LBC) in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears (CS) in detecting cervical squamous intraepithelial lesions (SIL) and carcinoma was the goal of this study. Cytological findings have been correlated with Polimerase chain reaction (PCR) results for HPV and histopathological findings. One hundred seventy four patients from Serviço de Propedêutica do Colo Uterino da Maternidade Odete Valadares de Belo Horizonte (MOV) and Centro de Tratamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis do Distrito Centro-Sul da Prefeitura de Belo Horizonte (CTDST) were studied. The two methods reached an agreement of 89,7%. LBC detected proportionally more SIL and inductor than CC resulting in an increase of 20%. Among the discordant cases, there was no sample which result was positive in CS and negative in LBC. Instead, in most of cases, LBC has detected more severe lesions than CS. LBC was positive ( $\geq$  ASCUS) in 5,3% of negative CS cases. Among patients with positive cytological results, 52,7% were positive for the presence of HPV in PCR. HPV was detected in all cases of invasive carcinoma and for about half of ASCUS and SIL cases. HPV finding through molecular methods is an important tool in the detection of epithelial abnormalities of the cervix.

**Key words:** HP, PCR, liquid-based cytology, cervical cancer, Papanicolaou smear

## LISTA DE ABREVIATURAS

AO	Anticoncepcional oral
AGUS	Células glandulares atípicas de significado indeterminado
ASCUS	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
Ca	Carcinoma invasor
CC	Citologia convencional
CH	Captura híbrida
CML	Citologia em meio líquido
CS	<i>Conventionally prepared Papanicolaou smears</i>
CTDST	Centro de Tratamento de doenças sexualmente transmissíveis
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
E	<i>early</i>
EAB	Epitélio aceto-branco
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
GV	<i>Gardnerella vaginalis</i>
HPV	Papiloma Vírus Humano
IARC	<i>International Agency of Research in Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISH	Hibridação <i>in situ</i>
JEC	Junção escamo-colunar
L	<i>late</i>
LEI	Lesão escamosa intra-epitelial
LBG	Lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau
LBC	<i>Liquid-based cytology</i>
LAG	Lesão escamosa intra-epitelial de alto grau
MOV	Serviço de Propedêutica do Colo Uterino da Maternidade Odete Valadares
NEG	Diagnóstico negativo para anormalidades epiteliais

NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
pb	Pares de base
pRb	Proteína do Retinoblastoma
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
rpm	Rotações por minuto
SIL	<i>Squamous intraepithelial lesions</i>
SNC	Sinais não clássicos
TE	Tris-EDTA
TP	ThinPrep <sup>®</sup> Pap Test
TV	<i>Trichomonas vaginalis</i>
URR	<i>Upstream regulatory region</i>
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
ZTT	Zona de transformação típica

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, mostrando o produto da PCR-Globina .....	52
<b>FIGURA 2 -</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, mostrando o produto da PCR-HPV .....	53
<b>FIGURA 3 -</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, mostrando o produto da PCR-HPV com a presença de bandas inespecíficas .....	54
<b>FIGURA 4 -</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, mostrando o produto da PCR-HPV de amostras de pacientes .....	55
<b>FIGURA 5 -</b> Fotomicrografia de esfregaço cervical convencional. A: ASCUS, PCR positivo para HPV; B: ASCUS, PCR negativo para HPV. Coloração de Papanicolaou, 400x .....	72
<b>FIGURA 6 -</b> Fotomicrografia de esfregaço cervical com lesão escamosa intraepitelial de alto grau (casos concordantes). A: citologia em meio líquido; B: citologia convencional. Coloração de Papanicolaou, 400x .....	74
<b>FIGURA 7 -</b> Fotomicrografia de esfregaço cervical (casos discordantes). A: lesão escamosa intraepitelial de baixo grau, citologia convencional; B: lesão escamosa intraepitelial de alto grau, citologia em meio líquido. Coloração de Papanicolaou, 400x.....	75
<b>GRÁFICO 1-</b> Distribuição das pacientes por idade .....	56
<b>GRÁFICO 2-</b> Distribuição das pacientes em relação à paridade .....	57
<b>GRÁFICO 3-</b> Distribuição das pacientes em relação ao número de parceiros sexuais .....	57
<b>GRÁFICO 4-</b> Distribuição das pacientes em relação ao início da atividade sexual .....	58
<b>GRÁFICO 5-</b> Distribuição das pacientes em relação ao uso de AO .....	58
<b>GRÁFICO 6-</b> Distribuição das pacientes em relação ao hábito de fumar	59
<b>GRÁFICO 7-</b> Teste de Schiller realizado nas pacientes da MOV .....	63
<b>GRÁFICO 8-</b> Achados colposcópicos referentes às pacientes examinadas na MOV .....	64

<b>GRÁFICO 9-</b> Presença de condiloma exofítico nas pacientes dos dois Serviços .....	65
<b>GRÁFICO 10-</b> Porcentagem de PCR-HPV positivo das pacientes de ambos os Serviços .....	66
<b>GRÁFICO 11-</b> Agentes específicos diagnosticados nos dois Serviços ....	67
<b>GRÁFICO 12-</b> Resultados citopatológicos das pacientes de ambos os Serviços .....	68

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados na PCR, para amplificação dos segmentos genômicos específicos .....	47
<b>TABELA 2</b> - Correlação dos achados clínicos e moleculares das pacientes da MOV .....	60
<b>TABELA 3</b> - Correlação dos achados clínicos e moleculares das pacientes do CTDST .....	61
<b>TABELA 4</b> - Correlação dos achados clínicos e moleculares das pacientes dos dois Serviços .....	62
<b>TABELA 5</b> - Correlação entre os achados colposcópicos e a infecção por HPV .....	65
<b>TABELA 6</b> - Correlação entre os resultados citológicos e moleculares das pacientes da MOV.....	69
<b>TABELA 7</b> - Correlação entre os resultados citológicos e moleculares das pacientes da CTDST.....	69
<b>TABELA 8</b> - Correlação entre os resultados citológicos e moleculares das pacientes dos dois Serviços .....	70
<b>TABELA 9</b> - Frequência dos sinais citológicos não clássicos em esfregaços cervicais positivos de pacientes com e sem infecção pelo HPV nos dois Serviços .....	71
<b>TABELA 10</b> - Comparação entre a citologia convencional e a em meio líquido.....	73
<b>TABELA 11</b> - Classificação do coeficiente de Kappa .....	76
<b>TABELA 12</b> - Correlação entre os diagnósticos da CML e CC .....	76
<b>TABELA 13</b> - Correlação entre a positividade para HPV e os diagnósticos citológicos da CML e CC .....	77
<b>TABELA 14</b> - Comparação entre os resultados da citologia convencional e PCR para HPV .....	77
<b>TABELA 15</b> - Comparação entre os resultados da citologia em meio líquido e PCR para HPV .....	78
<b>TABELA 16</b> - Comparação entre citologia convencional e o diagnóstico histopatológico .....	79

<b>TABELA 17 - Comparação entre a Citologia em Meio Líquido e o diagnóstico histopatológico .....</b>	<b>79</b>
---	-----------

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA</b> .....	16
<b>2 - REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
2.1 - Infecção por HPV .....	21
2.1.1 - Importância e prevalência .....	21
2.1.2 - Características gerais do HPV e sua participação no desenvolvimento do câncer cervical .....	23
2.1.3 - Fatores de risco para infecção por HPV e câncer cervical .....	24
2.2 - Métodos de detecção da infecção pelo HPV e lesões escamosas cervicais associadas .....	27
2.2.1 - Exame clínico-colposcópico .....	27
2.2.2 - Diagnóstico histopatológico .....	28
2.2.3 - Diagnóstico citopatológico .....	29
2.2.3.1 - Citologia em Meio Líquido (CML) .....	32
2.2.4 - Diagnóstico molecular .....	35
<b>3 - OBJETIVOS</b> .....	38
3.1 Objetivo geral .....	39
3.2 Objetivos específicos .....	39
<b>4 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
4.1 - População estudada .....	41
4.2 - Coleta do material .....	42
4.3 - Processamento da amostra .....	43
4.4 - Diagnóstico clínico-colposcópico .....	44
4.5 - Diagnóstico molecular .....	44
4.5.1 - Extração de DNA .....	44
4.5.2 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	46
4.6 - Diagnóstico citopatológico .....	48
4.7 - Diagnóstico histopatológico .....	49
4.8 - Análise estatística .....	49
<b>5 - RESULTADOS</b> .....	51
5.1 - Padronização da técnica molecular .....	52

5.2 - Dados clínicos .....	55
5.3 - Achados clínico-colposcópicos .....	63
5.4 - Achados citopatológicos e moleculares .....	66
5.5 - Comparação entre a citologia convencional e em meio líquido .....	73
<b>6 - DISCUSSÃO</b> .....	80
6.1 - Dados clínicos .....	81
6.2 - Achados clínico-colposcópicos .....	84
6.3 - Achados citopatológicos e moleculares .....	85
6.4 - Comparação entre a CC e CML .....	91
<b>7 - CONCLUSÕES</b> .....	96
<b>8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	99
<b>9 - APÊNDICE</b> .....	115
<b>10 - ANEXO</b> .....	121

# **1 - INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA**

O câncer cervical constitui um grave problema de saúde pública, com aproximadamente 500.000 mulheres desenvolvendo esta doença a cada ano mundialmente (WAGGONER, 2003). No Brasil, estima-se que o câncer de colo do útero seja o terceiro mais freqüente (18,32/100.000) na população feminina, sendo superado apenas pelo câncer de pele não melanoma e pelo de mama (INCA, 2004). De acordo com dados absolutos sobre a incidência e mortalidade por câncer do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de colo uterino foi responsável pela morte de 3.953 mulheres em 2000. Para 2003, as estimativas sobre Incidência e Mortalidade por Câncer foram de 16.480 novos casos e 4.110 óbitos (INCA, 2004). Na região central do Brasil, o câncer cervical é a segunda causa de malignidade, excluindo o câncer de pele, e a segunda causa de morte entre mulheres (RABELO-SANTOS et al., 2003)

Apesar destes índices, tem havido uma diminuição no número de mortes devido ao câncer cervical nos últimos tempos em decorrência de sua detecção precoce através do exame citológico (TEZUKA *et al.*, 1996). Dessa forma, é fundamental que os serviços de saúde orientem sobre o que é e qual a importância do exame preventivo, pois a sua realização periódica permite reduzir em até 70% a mortalidade por câncer cervical na população de risco.

Entretanto, o método da CC não é infalível, uma vez que muitas mortes ainda ocorrem a cada ano devido ao câncer de colo uterino, mesmo entre mulheres que foram examinadas em intervalos adequados, indicando problemas relacionados ao método de análise (KOSS, 1989). Entre as causas de falhas deste método destacam-se os resultados falso-negativos (FN), em sua maioria decorrentes de erros na amostragem celular, fixação inadequada do material, informes clínicos insuficientes e erros de interpretação e observação. Os erros de interpretação podem ser advindos da inexperiência de certos citologistas na leitura do esfregaço e do tipo de lesão presente (PAIRWUTI, 1991; GUIMARÃES & SILVA, 1995; WANG *et al.*, 1997). Segundo FRANCO *et al.* (2001), aproximadamente metade das amostras coletadas produzem resultados FN; um terço destes resultados são devidos a erros de interpretação e dois terços, a pouca amostragem celular e preparação do esfregaço. WEINTRAUB & MORABIA (2000) e GUIDOS & SELVAGGI (1999) relatam que entre 5 a 50% dos esfregaços com resultado positivo são falsamente relatados como negativos, apesar de corresponderem a casos verdadeiros de ASCUS, LEI de baixo grau (LBG) ou LEI de alto grau (LAG).

Dentre os métodos que surgiram para melhorar estes resultados estão o Papnet<sup>®</sup> - método automatizado de análise citológica usado para *rescreening* dos esfregaços - e a CML (KEYHANI-ROFAGHAA, 1996; TEZUKA *et al.*, 1996; LINDER & ZAHNISER, 1997; BOLICK & HELLMAN, 1998; MCGOOGAN, 1998; BAANDRUP, 2000).

Há alguns estudos que comprovam uma diminuição de casos FN, de 5,6% na CC para 2,2% na CML (MCGOOGAN, 1998). Neste método, o material coletado a partir da ecto e endocérvice é colocado inicialmente em um tubo contendo solução conservante que homogeneiza e "lava" as células, permitindo o preparo de lâminas contendo células concentradas em uma área de 20 mm, com redução da sobreposição celular (TEZUKA *et al.*, 1996). A CML permite que as células permaneçam na lâmina em uma camada fina, sem sobreposições, facilitando a leitura das lâminas (LINDER & ZAHNISER, 1997). De acordo com MCGOOGAN (1998), ocorre uma melhora na visualização da amostra devido à remoção de alguns elementos obscuros, como sangue, exsudato inflamatório, debris menstrual e muco.

Sabe-se que determinados tipos de HPV são responsáveis pelo desenvolvimento do câncer cervical e de suas lesões precursoras (RICHART *et al.*, 1998). A possibilidade de identificar o HPV em programas de *screening* de câncer do colo uterino está sob avaliação há vários anos. Em 2001, na cidade de Bethesda, houve uma reunião de consenso cujo objetivo foi desenvolver protocolos de condutas baseados em evidências para o tratamento de pacientes com anormalidades citológicas em amostras cervicais. Segundo este consenso (WRIGHT *et al.*, 2002), a pesquisa de HPV estaria indicada em pacientes que apresentam resultados citológicos com diagnóstico de ASCUS, bem como em pacientes com diagnóstico citológico de LEI de repetição cujas biópsias falharam em confirmar o diagnóstico e a colposcopia foi insatisfatória ou negativa.

WRIGHT *et al.* (2002) e KIM *et al.* (2002) ressaltam que, quando se utiliza a CML, a mesma amostra pode ser usada para se fazer o esfregaço e também a pesquisa de HPV por método molecular. Isto é muito útil em mulheres com ASCUS, pois retira o inconveniente retorno para nova coleta, além de potencialmente diminuir os custos.

Considerando a escassez de estudos brasileiros analisando a eficácia da CML, foi proposto neste trabalho o estudo comparativo dos métodos de CML e CC na identificação de pacientes portadoras de LEI e invasoras do colo uterino

associadas a infecção pelo HPV, e correlacionar os achados citopatológicos com os resultados da PCR para HPV. A análise destes resultados permitiriam a determinação da acurácia de cada método utilizado para o diagnóstico, bem como a identificação dos métodos e/ou critérios diagnósticos mais adequados para serem usados rotineiramente no rastreamento de pacientes com infecção por HPV.

## **2 - REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 - INFECÇÃO POR HPV**

### 2.1.1 - Importância e prevalência

O número de casos de infecção por HPV vem aumentando progressivamente durante as últimas décadas e a infecção causada por este vírus é considerada a doença sexualmente transmissível mais prevalente por todo o mundo (CAVALCANTI *et al.*, 2000). Infecções assintomáticas causadas pelo HPV podem ser detectadas em 5 a 40% das mulheres em idade reprodutiva (FRANCO *et al.*, 2001). Segundo MILDE-LANGOSH & RIETHDORF (2003), cerca de 40 tipos de HPV (de aproximadamente 100 tipos já descritos) possuem tropismo para o epitélio do trato genital inferior (colo do útero, vulva, região perianal e anal). Os tipos de HPV 6 e 11 estão freqüentemente associados às verrugas genitais benignas e são classificados como de baixo risco para desenvolvimento de tumores malignos. O grupo de risco oncogênico intermediário inclui os tipos 31, 33, 35, 39, 51, 52 e 69. Entretanto, as neoplasias malignas estão mais freqüentemente associadas com os tipos oncogênicos 16 e 18, os quais são denominados de alto risco (CARTWRIGHT *et al.*, 1996; RICHART *et al.*, 1998).

A causa primária do desenvolvimento do câncer cervical é a presença do HPV. Mais de 90% das neoplasias escamosas invasoras cervicais contém o material genético (DNA - ácido desoxirribonucléico) do HPV (WAGGONER, 2003). FISHER (1994) relata que, na América Latina, países como Brasil e Colômbia possuem alta incidência anual de câncer genital. Segundo NORONHA *et al.* (1999), no Brasil, aproximadamente 40.000 novos casos são diagnosticados a cada ano. A doença é normalmente diagnosticada por volta dos 40-45 anos, alguns anos mais cedo que outros tipos de câncer, como os de mama, pulmão e ovário.

A infecção por HPVs de alto risco é freqüente entre mulheres sexualmente ativas, com uma incidência variando entre 15 a 40% (NORONHA *et al.*, 1999). HIDELSHEIM *et al.* (2001) relatam, entretanto, que a maioria das infecções são transitórias porque muitos indivíduos desenvolvem uma resposta imune específica. Quando a infecção persiste, lesões pré-cancerosas podem se desenvolver. Aproximadamente 1% da população geral tem verrugas genitais e 4% de toda população feminina apresenta lesões cervicais pré-cancerosas (MOUGIN *et al.*, 2001).

CAVALCANTI *et al.* (2000) descreveram em sua pesquisa feita em um hospital vinculado ao INCA que 343 (73,9%) de 514 biópsias cervicais com diagnósticos normais, pré-malignos e malignos, apresentaram HPV detectado pelo método de Hibridação *in situ* (ISH) e que um índice de prevalência similar havia sido descrito anteriormente quando vários métodos de detecção foram usados. NORONHA *et al.* (1999), em um estudo conduzido no Norte do Brasil, também detectaram 66% de infecção pelo HPV em lesões cervicais, utilizando a PCR e a hibridização por *dot-blot* como métodos de diagnóstico.

O Estudo Biológico Internacional sobre Câncer Cervical demonstrou que 92,9% das neoplasias cervicais de 22 países continham DNA de HPV, variando de 75 a 100% (BOSCH *et al.*, 1995). As variações na prevalência de DNA do HPV são altamente dependentes da técnica utilizada. Uma maior prevalência é encontrada quando se utiliza a PCR ao invés de outros métodos (SYRJANEN & SYRJANEN, 2000). Estudos realizados em amostras cervicais e de biópsias de pacientes brasileiras mostraram uma prevalência do HPV em câncer cervical invasivo variando de 55,2%, quando se empregava o método de ISH a 91%, com o uso da técnica de PCR (LORENZATO *et al.*, 2000; CAVALCANTI *et al.*, 2000).

A prevalência dos tipos de HPV encontrados no câncer cervical mostram variações geográficas em todo o mundo. No Brasil, o HPV 16 é o tipo predominante no Nordeste, Norte, Sudeste e Sul, apesar de haver variações regionais (NORONHA *et al.*, 1999). Em um estudo conduzido por RABELO-SANTOS *et al.* (2003) na cidade de Goiânia, foi encontrada uma prevalência total do HPV em 76% dos casos de biópsia de pacientes com câncer cervical. O tipo 16 foi o mais freqüente, seguido pelos tipos 33, 18 e 31.

Segundo CAVALCANTI *et al.* (2000), tipos oncogênicos de HPV (16 e 18) foram os tipos mais comuns em lesões malignas. HPVs 6 e 11 (de baixo risco) parecem não participar do processo de carcinogênese, pois raramente foram encontrados em lesões malignas. Estes resultados reforçam o papel dos HPVs 16 e 18 na patogênese do câncer cervical.

## 2.1.2 - Características gerais do HPV e sua participação no desenvolvimento do câncer cervical

O HPV é um vírus de DNA dupla fita e possui um capsídeo eicosaédrico. Contém um genoma de aproximadamente 8 kb de extensão. Seus genes dividem-se em dois grupos funcionais: os genes *early* (E) e *late* (L) (CRUM, 2000; RIVOIRE *et al.*, 2001).

Os genes E estão associados à replicação viral e à produção de proteínas relacionadas com o desenvolvimento de neoplasias. São sete genes E, os quais têm diferentes funções: E1 e E2 estão envolvidos na replicação viral e controle da transcrição; a região E4 codifica um grupo de proteínas que regula a maturação e replicação viral, além de interagir com proteínas do hospedeiro, que alteram a matriz de citoceratina, produzindo o coilócito. As proteínas E6 e E7 interagem com proteínas do hospedeiro, que possibilitam a transformação neoplásica das células infectadas pelo vírus (RICHART *et al.*, 1998).

Os dois genes L codificam proteínas do capsídeo viral. As proteínas codificadas por L1 são semelhantes em todos os tipos de HPV. Por outro lado, as proteínas codificadas por L2 são altamente variáveis e responsáveis pela diferenças na antigenicidade viral. Todas as proteínas associadas à região L são reguladas por proteínas produzidas apenas pelas células escamosas que sofrem maturação completa. Assim, a quantidade destas proteínas correlaciona-se com a diferenciação das células escamosas. Entre os genes E e L há uma região com seqüência não codificadora relacionada ao controle da transcrição viral e conhecida como URR - *upstream regulatory region* (região acima da região codificadora que regula a expressão do gene) (BIRLEY, 1995).

Segundo RIVOIRE *et al.* (2001), todos os tipos de HPV são replicados exclusivamente no núcleo da célula hospedeira. Em lesões benignas (HPVs de baixo risco), o genoma viral separa-se do DNA celular, surgindo como um plasmídeo extracromossomal. Entretanto, HPVs de alto risco têm a capacidade de se integrar ao genoma do hospedeiro e isto garante a expressão perpétua dos oncogenes virais (CRUM, 2000). Para que isto ocorra, é necessário que haja uma quebra no genoma viral, levando a uma perda da função dos genes E1 e E2 do vírus, acompanhada de

desregulação dos genes E6 e E7 e conseqüente transformação da célula hospedeira. Os produtos dos genes E6 e E7 inativam funcionalmente os produtos de dois importantes genes supressores de tumores, as proteínas p53 e proteína do Retinoblastoma (pRb), respectivamente, e dessa forma, E6 e E7 atuam como oncogenes (FERENCZY & FRANCO, 2002). As funções dos genes supressores de tumor incluem a regulação do ciclo celular e a resposta celular ao dano do DNA, início do reparo do DNA e sua replicação, indução de apoptose e promoção da diferenciação celular.

A importância das proteínas reguladoras do ciclo celular no processo de carcinogênese é claramente mostrada pelo fato de que a maioria delas têm sido identificadas como protooncogenes ou genes supressores de tumor em estudos experimentais (MILDE-LANGOSH & RIETHDORF, 2003).

Em muitos estudos sobre LEI cervicais e adenocarcinomas, a imunorreatividade da pRb não foi afetada pela infecção por HPVs de alto risco (PARKER *et al.*, 1997; SANO *et al.*, 1998). Entretanto, segundo AMORTEGUI *et al.*, (1995) a imunorreatividade por pRb foi mais freqüentemente encontrada em LEI e em carcinomas (93%) que em epitélio normal ou com atipia inflamatória (78%).

A inativação do gene supressor de tumor p53 está correlacionado ao desenvolvimento de muitas neoplasias. Isto pode ser devido a um número de eventos que incluem mutação do gene da p53 e sua ligação a proteínas virais ou celulares. No câncer cervical, a perda da função da p53 pode ocorrer pela interação com a proteína E6 dos HPV de alto risco (BREMER *et al.*, 1995).

### **2.1.3 - Fatores de risco para infecção por HPV e câncer cervical**

Segundo SCHIFFMAN & CASTLE (2003), a infecção pelo HPV é uma condição necessária, porém não suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical. Certamente, diferenças individuais na resposta imunológica ao HPV participam na determinação do destino da infecção. Além disso, a associação de diferentes fatores de risco pode levar ao estabelecimento e progressão do câncer.

Estudos epidemiológicos têm mostrado que o desenvolvimento de câncer cervical e suas lesões precursoras está relacionado ao número de parceiros sexuais e às condições sócio-econômicas, sendo a incidência maior em mulheres com múltiplos parceiros e naquelas pertencentes a classes sociais menos favorecidas (FERENCZY & FRANCO, 2002).

Segundo WAGGONER (2003), o fumo é um fator de risco independente na gênese do câncer cervical. Os carcinógenos específicos do tabaco (cotinina e nicotina) e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos têm sido identificados no muco cervical ou no epitélio de mulheres fumantes. O uso do cigarro pode aumentar o risco de câncer por gerar resíduos de desoxiguanosina capazes de induzir mutação gênica em oncogenes como *ras* e *myc* ou genes supressores de tumor como *p53* e *Rb*. Em um estudo realizado por ROTELI-MARTINS *et al.* (1998), o fumo e a detecção do DNA do HPV estavam significativamente associados a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) 2 e 3, com uma incidência de 6,6 vezes maior em mulheres fumantes quando comparadas com não fumantes.

Uma maior incidência de carcinoma cervical tem sido relatada em mulheres que utilizam anticoncepcional oral (AO) (CAVALCANTI *et al.*, 2000). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que tanto o estradiol quanto a progesterona estimulam o crescimento de células infectadas pelo HPV (KIM *et al.*, 2000). Mas isto ainda não está bem esclarecido, pois segundo relatam FERENCZY & FRANCO (2002), a associação de câncer do colo uterino com o uso de AO pode ser simplesmente devido a uma atividade sexual sem o uso de preservativo ou também a uma maior frequência de *screening* de mulheres que utilizam AO.

Outro fator de risco que tem sido associado ao desenvolvimento do câncer cervical é a paridade. Existe uma tendência linear na associação entre o número de partos e o risco de desenvolvimento de lesão, como observado em estudos realizados nas Américas Central, do Norte e do Sul (FRANCO *et al.*, 2001).

A idade da primeira relação também tem sido apontada como um fator de risco; alguns autores relatam que mulheres com início precoce da atividade sexual são mais vulneráveis ao desenvolvimento do câncer cervical. Entretanto, ROSSEAU *et al.* (2000) relatam que a probabilidade da infecção por HPVs dos tipos oncogênicos diminuíram acentuadamente no tocante à idade da primeira relação sexual.

Segundo PLANT & KOHN-SPEYER (*apud* ROSEMBLATT *et al.*, 2004), parceiras de homens que possuem câncer de pênis mostraram uma incidência de câncer cervical oito vezes maior, enquanto parceiros cujas mulheres tinham câncer cervical mostraram um risco maior para o desenvolvimento do câncer de pênis, indicando que a atividade sexual possui um papel importante na gênese destas neoplasias. Entretanto, em um estudo realizado por ROSEMBLATT *et al.* (2004), parceiros de mulheres com lesões pré-cancerosas foram investigados e nenhum deles apresentou lesões clínicas.

CAVALCANTI *et al.* (2000) sugerem ainda que as infecções por HIV e sífilis podem contribuir como co-fatores para a progressão de lesões causadas por HPV, através da ativação de mecanismos de transformação celular ou depressão da imunidade local.

A infecção por *Chlamydia trachomatis* tem sido considerada um possível co-fator para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas do colo uterino. Estudos recentes têm revelado a associação do sorotipo G com o desenvolvimento deste tumor (ANTTILA *et al.*, 2001; SMITH *et al.*, 2002). No entanto, os dados na literatura são conflitantes, de forma que, a correlação exata entre a *Chlamydia trachomatis* e a infecção pelo HPV permanece ainda desconhecida.

Segundo FERENCZY & FRANCO (2002), fatores como certas deficiências nutricionais e multiparidade poderiam também estar relacionados ao câncer cervical. Entretanto, FRANCO *et al.* (2001) descrevem que há evidências de que uma alta ingestão de alimentos contendo beta caroteno e vitamina C, e em menor extensão, vitamina A, podem reduzir o risco de câncer cervical.

## 2.2 - MÉTODOS DE DETECÇÃO DA INFECÇÃO PELO HPV E LESÕES ESCAMOSAS CERVICAIS ASSOCIADAS

### 2.2.1 - Exame colposcópico

Os achados colposcópicos contribuem para o diagnóstico da infecção por HPV e das lesões epiteliais associadas. Mediante a colposcopia, pode-se reconhecer, delimitar e diagnosticar os diferentes aspectos normais e anormais da ectocérvice e vagina. Para melhor entendimento entre os médicos, tem-se proposto a padronização da terminologia colposcópica e, ainda, de várias classificações colposcópicas, no sentido de unificar a linguagem desse método complementar. Dentre essas classificações, destaca-se a classificação colposcópica internacional aprovada em Roma em 1990 (ANEXO A).

O uso do colposcópico como parte da rotina básica de atendimento às mulheres que freqüentaram a Clínica de Medicina Genitourinária, na Inglaterra, melhorou a acurácia das observações clínicas do serviço. MOSS *et al.* (1994) relatam ainda que é instigante a experiência de identificar colposcopicamente anormalidades de alto grau em mulheres jovens onde um resultado citológico recente foi negativo.

Em um trabalho realizado na Índia, BASU *et al.* (2003) descrevem os achados colposcópicos mais comuns encontrados nesta população e analisam a acurácia da colposcopia em relação à biópsia. Entre os achados, pode-se citar: zona de transformação típica (ZTT), epitélio acetobranco (EAB) fino ou em relevo, ectrópio, pólipos, cisto de Naboth, sinais de inflamação e infecção, leucoplasia, condiloma e crescimento úlcero-proliferativo na cérvix. O resultado era considerado negativo quando, ao se proceder a colposcopia, eram encontrados ZTT; EAB translúcido ou duvidoso; linha branca se assemelhando a uma junção escamo-colunar (JEC) proeminente; EAB em pólipos endocervicais ou em cistos de Naboth; lesões acetobranças distantes da JEC. A colposcopia era considerada positiva quando qualquer um destes achados eram observados: EAB bem definido, demarcado e opaco; lesões acetobranças com ou sem margens tocando ou se aproximando da JEC; lesão acetobrança densa e circunferencial envolvendo os quatro quadrantes da

cérvice; presença de condiloma e leucoplasia próximo à JEC, tornando-se intensamente brancos após a aplicação do ácido acético; ou EAB denso, opaco na presença de processo úlcero-proliferativo da cérvice. Como resultado, os autores descrevem que a sensibilidade encontrada (60,7%) foi menor que em outros estudos em Zimbábwe (76,1%) e na Índia (88,6%), porém a especificidade (77%) foi maior do que as relatadas nestes mesmos estudos. Para BASU *et al.* (2003) isto poderia ser devido ao fato de que a colposcopia era realizada por profissionais pouco treinados e não por médicos ginecologistas.

Num estudo realizado por LONKY *et al.* (2003), foi estimada a efetividade do método de captura híbrida (CH) para a detecção de LAG em mulheres com resultado de ASCUS na citologia. De um total de 278 pacientes, 150 tiveram resultado negativo para CH; destas, 120 tiveram colposcopia negativa e 30 pacientes (6 com LAG), colposcopia positiva. As 128 pacientes restantes obtiveram resultado positivo na CH: 76 foram negativas na colposcopia e 56, positivas. Ao se somar um método de visualização ao teste citológico, pode-se observar um aumento na detecção de lesões (principalmente as de alto grau) nas quais a citologia e os métodos moleculares podem levar a resultados FN ressaltando o papel da colposcopia no diagnóstico das LEI e invasoras.

### **2.2.2 - Diagnóstico histopatológico**

O câncer do colo invasivo é precedido por uma série de modificações do epitélio original, que constituem as lesões pré-cancerosas. Estas lesões são chamadas LEI (antigamente denominadas displasias ou NICs) e são caracterizadas por graus variados de proliferação e diferenciação anormais. Histologicamente, ocorre uma desorganização da arquitetura do epitélio escamoso (diminuição ou ausência de maturação celular e de estratificação do epitélio), atipias nucleares (aumento de tamanho nuclear com aumento da relação núcleo/citoplasmática, hipercromasia e anisocariose), e figuras de mitose anormais (KURMAN & SOLOMON, 1994).

Na maioria dos estudos em que se deseja avaliar a acurácia do método citológico para a detecção de lesões escamosas, a biópsia é utilizada como padrão-

ouro. Porém, com o advento das técnicas moleculares, muitos estudos têm sido realizados na intenção de correlacionar o diagnóstico histopatológico com a presença do HPV através da PCR. Em um estudo realizado por SALVIA *et al.* (2004), 107 pacientes com resultado citológico anormal pertencentes a um serviço público de saúde na cidade de Campinas, Brasil, foram submetidas à colposcopia e a biópsia foi realizada em áreas suspeitas. A maioria das biópsias com NICs apresentaram positividade para o HPV (77,42%) e alta sensibilidade (88,89%), indicando que o diagnóstico histopatológico está altamente associado à presença do HPV.

### **2.2.3 - Diagnóstico citopatológico**

O diagnóstico da infecção por HPV é feito quando, no esfregaço cérvico-vaginal, são encontrados efeitos citopáticos produzidos por esse vírus.

Dentre estes efeitos destaca-se a coilocitose, a qual caracteriza-se pela presença de uma cavidade citoplasmática perinuclear clara e com borda citoplasmática periférica densa, associada a alterações nucleares. As alterações nucleares são representadas por aumento do volume nuclear, irregularidade da membrana nuclear, cromatina grosseira e mal distribuída. Uma outra alteração consiste na disqueratose, caracterizada por células que apresentam ceratinização anômala ou prematura, nem sempre acompanhada de características nucleares de malignidade (KURMAN & SOLOMON, 1994).

A associação de coilocitos e disqueratose tem sido considerada como critério citológico patognomônico para o diagnóstico da infecção pelo HPV. Entretanto, com o uso desses sinais, a frequência do diagnóstico é de 1 a 2% em pacientes assintomáticas (SCHNEIDER *et al.*, 1987).

Devido ao grande número de resultados FN nos exames citológicos, alguns autores, como SCHNEIDER *et al.* (1987), propuseram a utilização de “sinais não clássicos” (SNC) para ampliar o número de casos de infecção pelo HPV diagnosticados pela citologia.

Um estudo realizado por JORDÃO *et al.* (2003), avalia os critérios morfológicos para identificação do HPV e de acordo com o já descrito na literatura, estes critérios foram divididos em clássicos e não clássicos.

#### Critérios Clássicos:

- Coilocitose e disqueratose (descritas acima)

#### Critérios não clássicos:

- Bi ou multinucleação
- Núcleo hiper Cromático: representado pelo hiper Cromatismo nuclear e ausência de irregularidades, tanto na cromatina como na membrana nuclear.
- Células gigantes: apresentam alterações como bi ou multinucleação, macronucleose e macrocitose, circundados por halo com borda concêntrica que aparentemente separa estes núcleos do citoplasma.
- Escamas anucleadas: células escamosas com citoplasma queratinizado e ausência de núcleo.
- Halo perinuclear: apresenta-se como uma área clara nítida em volta do núcleo, formando um halo. O núcleo freqüentemente perde detalhes do envelope nuclear e a cromatina pode estar agrupada irregularmente.

A freqüência diagnóstica de HPV encontrada por JORDÃO *et al.* (2003), após a inclusão dos critérios não-clássicos, passou de 23,1% para 52,3%, ou seja, elevou-se em 29,2%. Neste mesmo trabalho é relatado que outros autores, em estudos com técnicas biológico-moleculares, não conseguiram provar uma relação significativa entre a infecção por HPV e os critérios não-clássicos.

Em 1961, NAIB & MASUKAWA publicaram um trabalho que continha descrições detalhadas de achados citológicos de 19 pacientes com condiloma acuminado na cérvix e na vagina. Entre os achados secundários (ou não clássicos) estavam halo perinuclear, vacúolos degenerativos citoplasmáticos, binucleação, picnose nuclear e cariorrexe. Outros autores como PUROLA & SAVIA (1977)

descrevem os mesmos achados, além da presença de corpos de inclusão no citoplasma.

SCHNEIDER *et al.* (1987) descrevem, em seu trabalho, 9 SNC: disceratose leve, coilocitose leve (ou esboço de coilocitose), citoplasma claro, grânulos de queratoialina, condensação dos filamentos citoplasmáticos, células *spindle*, núcleo hipercromático, bi ou multinucleação e halo perinuclear. A disceratose leve é diferenciada da sua forma clássica pelo tamanho e forma do núcleo enquanto a coilocitose leve, pela ausência de atipia nuclear e uma borda menos definida entre a cavidade central e o citoplasma periférico. Entretanto, os resultados do seu estudo indicaram que a coilocitose e a disceratose clássicas não são critérios altamente sensíveis na detecção da presença de infecção pelo HPV, identificando corretamente somente 15% de casos HPV-DNA positivos.

BORGES *et al.* (1989) relatam que a presença de células epiteliais em esfregaços cervicais de pacientes infectadas por HPV podem apresentar uma característica adicional, originalmente descrita como "uma célula dentro de outra célula". Esta característica era freqüentemente acompanhada por células apresentando coilocitose.

A hiperkeratose é listada como uma das indicações citológicas da infecção pelo HPV, mas não é considerada como altamente preditiva por esta infecção por si só; binucleação, células disceratóticas e coilócitos são variáveis muito mais independentes para a detecção de condiloma em material citológico (BORAS & DUGGAN, 1989).

Em seu trabalho, KERN (1991) relata que em 13 de um total de 304 casos com diagnóstico de condiloma ou lesão mais grave (confirmados pela biópsia) foram identificadas escamas anucleadas. O HPV foi responsável (em 10 dos 13 casos) pelas lesões epiteliais detectadas devido à presença de escamas nos esfregaços cervicais. Dados similares foram relatados por ANDREWS & MYIASAWA (1989).

Paraceratose é outro SNC descrito na literatura e pode estar associada à presença de HPV. Aparece como células escamosas superficiais com núcleos pequenos, picnóticos e hipercromáticos. A hiperkeratose e a paraceratose podem ser detectadas de 0,47% a 8% em esfregaços cervicais, sem a presença de HPV (KERN, 1991).

### 2.2.3.1 - Citologia em meio Líquido (CML)

A primeira metodologia a ser lançada foi o ThinPrep<sup>®</sup> Pap test (TP) (Cytic Corporation), aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1996, como um teste que poderia substituir a CC. O uso do TP em estudos de populações diferentes tem resultado em um aumento significativo na detecção de LBG e LAG e melhorado a adequabilidade da amostra quando comparado à citologia convencional (CARPENTER & DAVEY, 1999; WEINTRAUB & MORABIA, 2000). Três anos depois, outro método denominado AutoCyte PREP<sup>™</sup> (TriPath Imaging) foi também aprovado pelo FDA, e numerosos estudos publicados comparando esta técnica e o TP com o método convencional geralmente indicam um aumento na detecção de LEI com o uso da CML (BAKER, 2002).

**Vantagens da Citologia em Meio Líquido-** Na CML, há maior possibilidade de uniformidade da amostra, uma vez que esta é transferida para a lâmina de maneira randomizada (MCGOOGAN, 1998). Além disso, virtualmente, todas as células colhidas podem estar presentes na amostra a ser examinada, ou seja, parte da amostra coletada não permanece retida na espátula, como pode acontecer na CC.

MCGOOGAN (1998) descreve que, a princípio, é um método mais oneroso para o laboratório e também para a paciente; mas, este aumento no custo pode ser contrabalanceado com a redução do número de exames repetidos, além do encaminhamento desnecessário de pacientes para a colposcopia.

Segundo BOLICK & HELLMAN (1998), a longo prazo, este método terá um impacto positivo de custo através da redução na morbidade e mortalidade e na redução de visitas repetidas aos consultórios médicos devido à má preparação do espécime ou diagnóstico equivocado. Outra vantagem relatada por BUR *et al.* (1995) é a diminuição do tempo gasto com o *screening* dos esfregaços, provavelmente devido à redução da área observada e da disposição das células.

Diversos trabalhos (TEZUKA *et al.*, 1996; LINDER & ZAHNISER, 1997; BOLICK & HELLMAN, 1998) têm comparado a eficácia da CML com a CC demonstrando que a detecção de ASCUS, LBG ou lesão mais grave é maior na CML, resultando em maior precisão no diagnóstico das lesões epiteliais precursoras e neoplásicas do colo uterino.

WEINTRAUB & MORABIA (2000) encontraram uma chance 2,2 vezes maior de a CML diagnosticar lesões do que a CC. Por outro lado, a eficácia no diagnóstico de alterações inflamatórias é reduzida, uma vez que a área de leitura na lâmina é menor, com menor número de leucócitos, hemácias e de microorganismos (TEZUKA *et al.*, 1996).

Comparando 10.694 amostras de células em suspensão com 39.408 esfregaços convencionais, BOLICK & HELLMAN (1998) demonstraram que o novo método aumenta em mais de duas vezes o número de casos corretamente diagnosticados como NIC e que a relação ASCUS/NIC é reduzida em 55 %.

Segundo GUIDOS & SELVAGGI (1999), o TP mostra um aumento de 70% na detecção de casos indeterminados quando comparada com a CC; a taxa de ASCUS/NIC para o grupo do TP (0.73%) foi 54% menor do que o grupo do método convencional (1,57%)

A adequação do espécime está significativamente aumentada em relação à citologia convencional. CARPENTER & DAVEY (1999), em um estudo realizado comparando 2.727 TP com 5.000 esfregaços convencionais, encontraram um aumento de 80% para 89,2% em relação à adequabilidade total da amostra com a implementação da CML, com melhora de 11,5%. Os autores relatam uma diminuição na taxa de "satisfatório porém limitado" de 46%, e isto provavelmente é devido à diminuição da presença de fatores obscuros.

Além de potencialmente diminuir a taxa de casos FN, as células em meio líquido permitem testes adicionais, como a pesquisa de HPV através de diversos métodos moleculares, tais como a PCR e CH (LINDER & ZAHNISER, 1997; PEYTON *et al.*, 1998, WEINTRAUB & MORABIA, 2000).

**Desvantagens da Citologia em Meio Líquido** - MCGOOGAN (1998) descreve que a avaliação de preparados citológicos em meio líquido requer familiaridade com muitos parâmetros morfológicos diferentes da CC. Sugere também que os colhedores devem receber treinamento apropriado para coletar a amostra cervical, garantindo que toda a JEC foi atingida, bem como parte da ecto e endocérvice.

Alguns estudos recentes indicam que a transferência de células do instrumento de coleta para o líquido pode ser variável e incompleto. Este processo crítico de transferência de células requer mais estudos, pois este processo foi

creditado como um dos grandes benefícios em relação ao método convencional (BAANDRUP, 2000).

Outro fator observado foi a ausência de componentes da JEC quando se realizava a citologia em meio líquido. CARPENTER & DAVEY (1999) relatam que a taxa de amostras satisfatórias, porém limitadas por ausência de elementos da JEC, foi maior na TP do que na citologia convencional (9,8% *versus* 5,5%).

MCGOOGAN (1998) avalia que a CML apresenta custo superior ao método convencional, podendo ser este um dos principais fatores que impeçam sua utilização na rotina de um laboratório.

Em um estudo de metanálise realizado por ABULAFIA *et al.* (2003) foram avaliados dez trabalhos (de 1995 a 2001) que comparavam a CC com a CML em termos de sensibilidade e especificidade, considerando o resultado de biópsia como padrão-ouro. Foi observada uma grande variação de sensibilidade (de 50 a 90%) entre os estudos para ambos os métodos, com uma sensibilidade total maior (76%) na CML do que na CC (68%). A CML também foi mais específica (86%) que a CC (79%), com especificidade variando de 80 a 90%.

Na comparação de ambos métodos citológicos, a literatura tem relatado dois tipos de estudo: *split-sample* (amostras pareadas) e *direct-to-vial* (coletas separadas).

No estudo do tipo *split-sample*, as duas citologias são colhidas da paciente em um mesmo momento. No outro, são avaliadas amostras de dois grupos distintos de pacientes (um de CC e o outro, CML). Segundo BERNSTEIN *et al.* (2001), com a coleta de amostras pareadas pode ocorrer uma diminuição potencial da transferência de células suficientemente necessárias para se realizar um diagnóstico correto. Apesar dos estudos do tipo *direct-to-vial* serem incapazes de comparar diretamente amostras da mesma paciente, têm indicado uma melhora estatisticamente significativa na detecção de células endocervicais.

Em um estudo do tipo *split-sample* realizado por HUTCHINSON *et al.* (1999), foram avaliadas a sensibilidade e a especificidade dos dois métodos citológicos. A CML se mostrou mais sensível (55,6%) que a CC (44,3%). Entretanto, a especificidade da CC foi ligeiramente maior (98%) que a da em meio líquido (93%), mas pode-se observar que ambos os métodos são bastante específicos.

Alguns autores também relatam uma superioridade da sensibilidade da CML em relação à CC em estudos realizados a partir da análise de amostras de pacientes diferentes (GUIDOS & SELVAGGI, 1999; VASSILAKOS *et al.*, 2000; WEINTRAUB & MORABIA, 2000; BAKER, 2002).

#### 2.2.4 – Diagnóstico molecular

Os membros da família do HPV não se desenvolvem em meios de cultura *in vitro*; sendo assim, a detecção do HPV depende estritamente de análises moleculares da seqüência do seu DNA. Testes para o HPV utilizando sondas de ácidos nucléicos vêm sendo disponibilizadas comercialmente desde o início da década de 80, mas estes testes iniciais eram de difícil realização, em muitos casos envolvendo sondas de ácidos nucléicos marcadas com fósforo radioativo ( $^{32}\text{P}$ ) em uma hibridação do tipo *slot-blot*. Estes testes não tiveram seu uso muito difundido, devido ao fato de não detectarem todos os tipos oncogênicos do HPV e, além disso, tinham baixa sensibilidade. Já no final dos anos 80, uma variedade de outros testes envolvendo ISH do DNA do HPV foram desenvolvidos (HUBBARD, 2003).

O padrão-ouro para análise genômica do HPV é o *Southern blot*, utilizada nos primeiros testes para a detecção do vírus (SOUTHERN, 1975). Já o ISH é uma técnica muito semelhante à imuno-histoquímica (HUANG *et al.*, 1998). Estes testes são chamados de "ensaios de sonda diretos" e apresentam desvantagens como baixa sensibilidade, tempo longo para realização e utilização de quantidade elevada de DNA purificado.

Métodos bastante sensíveis para detectar a infecção pelo HPV têm sido recentemente desenvolvidos, destacando-se os de hibridação como a CH e os de amplificação do DNA como PCR.

A CH é um ensaio de hibridação molecular de captura do tipo "sanduíche" que usa a detecção quimioluminescente. Amostras contendo o DNA pesquisado (no caso, DNA do HPV) são hibridadas com um ácido ribonucléico específico. O híbrido resultante é capturado pela superfície do tubo de ensaio previamente marcado com um anticorpo anti-híbrido ácido ribonucléico/DNA. O híbrido imobilizado reage com

um anticorpo conjugado a fosfatase alcalina e é detectado com um substrato quimioluminescente. Como o substrato é clivado pela fosfatase alcalina, uma luz é emitida a qual é medida como unidades relativas de luz em um luminômetro. A intensidade da luz emitida é proporcional à quantidade de DNA pesquisado na amostra da paciente (PEYTON *et al.*, 1998). A CH é um método de amplificação de sinal, a qual é uma extensão do ensaio de sonda direto, porém mais sensível por causa da adição de camadas de moléculas sinalizadoras presentes em sondas de DNA (SAMBROOK, 2001). O teste comercial atualmente utilizado na detecção do HPV é o *kit* HC2 da Digene, o qual detecta virtualmente todos os tipos oncogênicos de HPV de alto risco, assim como a maioria dos HPVs não oncogênicos (baixo risco). Neste teste, sondas genótipo-específicas são misturadas em um coquetel de baixo-alto e alto-baixo riscos (HUBBARD, 2003); isto permite que este teste seja uma excelente ferramenta para a triagem de pacientes com anormalidades no exame de Papanicolaou, mas, em contrapartida, não determina o tipo específico do HPV presente.

Os métodos de amplificação do ácido nucléico alvo, mais notavelmente a PCR, são tecnologias promissoras no que tange os aspectos dos testes para a detecção do HPV (MONK *et al.*, 1994). A PCR é uma valiosa ferramenta porque permite a multiplicação *in vitro* de regiões únicas do DNA em questão, além de ser a técnica existente mais sensível de análise do DNA. Segundo GRAVITT *et al.* (2000), a PCR pode ser usada na detecção, quantificação da carga viral, sequenciamento do DNA e análise de mutações, em amostras de lavado cervicovaginal. Porém, a técnica de PCR está sujeita à contaminação do ambiente porque o material anteriormente amplificado (amplicons) pode contaminar amostras potencialmente negativas levando a resultados falso-positivos (FP) (HUBBARD, 2003).

Para a detecção do HPV, os oligonucleotídeos de consenso MY09 e MY11 são os mais utilizados, porque flanqueiam a região L1 do genoma viral. Esta região é conservada na maioria dos HPVs, variando somente em algumas seqüências, as quais determinam o tipo viral. Ao contrário do método de CH, a PCR é uma tecnologia capaz de genotipar o HPV, através da técnica de Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), por exemplo (WANG *et al.*, 1999). Outra alternativa é a utilização de oligonucleotídeos genótipo-específicos, os quais identificam tipos individuais de HPV baseados no polimorfismo das regiões E6 e E7 (KADO *et al.*, 2001).

A técnica de PCR tem se mostrado extremamente sensível na detecção do DNA de HPV em pacientes portadoras de lesões cancerosas ou pré-cancerosas e também em pacientes portadoras de infecções assintomáticas ou subclínicas. Além da grande sensibilidade, esta técnica é capaz de detectar o tipo e conseqüentemente o potencial carcinogênico do vírus. A técnica de PCR também pode ser um método de escolha para a confirmação de resultados conflitantes entre a colpocitologia, a colposcopia e a histopatologia (GOMES *et al.*, 2002).

O custo ao se avaliar uma paciente utilizando um protocolo no qual se combina citologia e detecção de HPV por PCR representa somente 0,6% do custo de um único tratamento de câncer cervical avançado (LORENZATO *et al.*, 2000). Neste estudo, concluiu-se que a detecção do HPV por métodos moleculares é um método mais seguro e efetivo que o *screening* citológico na identificação de pacientes em risco de desenvolver neoplasia cervical.

## **3 - OBJETIVOS**

### **3.1 - OBJETIVO GERAL**

Verificar a acurácia da CC e da CML na identificação de pacientes portadoras de LEI e invasoras do colo uterino, e correlacionar estes achados com os resultados da PCR para a infecção do HPV.

### **3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Padronizar a técnica de PCR a partir do espécime coletado
- Determinar a prevalência da infecção por HPV na população estudada
- Verificar a associação entre os dados epidemiológicos e a infecção por HPV
- Analisar, microscopicamente, os esfregaços quanto a amostragem celular, presença de microorganismos, alterações inflamatórias e anormalidades epiteliais
- Correlacionar os dados clínico-colposcópicos, citopatológicos, histopatológicos e moleculares.

## **4 - MATERIAL E MÉTODOS**

## 4.1 - POPULAÇÃO ESTUDADA

Participaram deste estudo pacientes encaminhadas a dois serviços distintos:

- 1) Pacientes do Serviço de Propedêutica do Colo Uterino da Maternidade Odete Valadares (MOV) de Belo Horizonte por apresentarem alguma alteração clínica, colposcópica e/ou citológica do colo uterino;
- 2) Pacientes do Centro de Tratamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis (CTDST) do Distrito Centro-Sul da Prefeitura de Belo Horizonte, as quais procuraram espontaneamente o serviço ou foram encaminhadas dos postos de saúde municipais, pelo fato de elas próprias ou seus parceiros apresentarem sintomas relacionados a doenças sexualmente transmissíveis (DST).

As pacientes foram alocadas em grupos de acordo com o procedimento de coleta das amostras adotado, como descrito a seguir:

- Grupo 1: constituído por pacientes encaminhadas aos Serviços em primeira consulta, cujas amostras citológicas foram coletadas através da técnica utilizada habitualmente na CC;
- Grupo 2: constituído por pacientes encaminhadas aos Serviços em primeira consulta, cujas amostras citológicas foram coletadas através da técnica utilizada na CML;
- Grupo 3: constituído por pacientes que retornaram ao Serviço da MOV com resultados histopatológicos negativos para infecção pelo HPV. Estas pacientes foram subdivididas em dois grupos: pacientes com amostras coletadas através da técnica da CC e outras com amostras colhidas através da CML.

No decorrer da execução do trabalho, foi observado um número reduzido de pacientes com as características descritas acima, o que prejudicaria a finalização do trabalho no tempo previsto. Dessa forma, iniciou-se a coleta de um outro grupo (4):

- Grupo 4: constituído por pacientes encaminhadas aos Serviços em primeira consulta, cujas amostras citológicas foram coletadas através da técnica utilizada na CML e CC, em um mesmo momento (amostras pareadas).

A coleta referente às amostras das pacientes do grupo 3 foi interrompida e seus dados não foram utilizados nas análises posteriores.

Em todas as pacientes foram realizados testes moleculares através da PCR para detecção da infecção por HPV, variando-se a forma de coleta, conforme especificado adiante.

O projeto do presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

## 4.2 - COLETA DO MATERIAL

- Grupo 1: Com a utilização da *cytobrush*, foi coletado inicialmente material da endocérvice, JEC e ectocérvice para ser submetido ao teste molecular (PCR). Este material foi esgotado em 1 mL de PBS pH 7,4 estéril em tubo *ependorf*. Após nova coleta nas mesmas regiões, porém utilizando-se a espátula de Ayre para a coleta do ectocérvice e a *cytobrush* para endocérvice e JEC, foi confeccionado um esfregaço sobre lâmina de vidro e posteriormente corado pelo método de Papanicolaou.
- Grupo 2: O material foi coletado segundo as instruções fornecidas pelo *kit* para realização da técnica da CML descrita abaixo. A coleta habitualmente é feita com uma “escova”, que atinge a endocérvice, JEC e ectocérvice. A “escova” contendo o material é colocada num tubo com 1 mL de solução que preserva as células, possibilitando tanto o estudo molecular como a preparação do esfregaço para a coloração de Papanicolaou.

- Grupo 3: O material das pacientes foi coletado conforme descrito nos Grupos 1 e 2.
- Grupo 4: Primeiramente, o material foi coletado para a CML na endocérvice, JEC e ectocérvice e após nova coleta nas mesmas regiões, porém utilizando-se a espátula de Ayre para a coleta do ectocérvice e a *cytobrush* para endocérvice e JEC, foi confeccionado um esfregaço sobre lâmina de vidro posteriormente corado pelo método de Papanicolaou. O estudo molecular foi realizado a partir do material coletado para a CML.

### 4.3 - PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

Os esfregaços colhidos de forma convencional foram fixados em álcool etílico a 95% e, posteriormente, corados pelo método de Papanicolaou (GOMPEL & KOSS, 1997).

A técnica de CML empregada no trabalho foi a do Sistema DNA-CITOLIQ<sup>®</sup> (Digene do Brasil). Esta técnica tem como princípio transferir todo material celular coletado para um meio líquido, com propriedade de preservar as estruturas morfológicas e as moleculares, como as proteínas e os ácidos nucléicos. Para a preparação da lâmina citológica, o material é submetido a processos técnico-laboratoriais, como homogeneização e filtragem, que visam retirar hemácias, debris, muco e infiltrado inflamatório. Para o material colhido em meio líquido, procedia-se da seguinte maneira: homogeneizava-se o tubo; pipetava-se a amostra; dispensava-se sobre uma membrana de policarbonato; realizava-se *imprint*, transferindo-se, para a lâmina, todo o material não filtrado pela membrana. Esta lâmina era fixada e corada da mesma forma que na CC. Para a realização do diagnóstico molecular através da PCR, homogeneizava-se o tubo novamente e retirava-se uma alíquota da amostra.

## 4.4 - DIAGNÓSTICO CLÍNICO-COLPOSCÓPICO

A anamnese das pacientes foi realizada pelo médico ginecologista e os dados clínicos anotados em um protocolo para posterior análise. O APÊNDICE A corresponde ao protocolo utilizado na MOV e o APÊNDICE B do CTDST. A seguir, o médico procedeu ao exame ginecológico e às coletas necessárias.

O exame colposcópico foi realizado apenas no serviço da MOV. Anotou-se os aspectos observados no APÊNDICE A. A classificação utilizada foi aquela preconizada pelo Congresso de Roma (ANEXO A). A hipótese diagnóstica era formulada segundo os parâmetros clínicos e colposcópicos observados.

## 4.5 - DIAGNÓSTICO MOLECULAR

### 4.5.1- Extração de DNA

A extração de DNA foi conduzida de acordo com o protocolo descrito a seguir (VILLA *et al.*,1995). Este protocolo foi aplicado tanto para as amostras contidas em PBS quanto em meio líquido.

- 1- Homogeneizar por alguns segundos as amostras.
- 2- Pipetar 30  $\mu\text{L}$  de cada amostra e transferir para tubo *ependorf* estéril.
- 3- Adicionar 370  $\mu\text{L}$  de solução Tris-EDTA (TE).
- 4- Adicionar 100  $\mu\text{L}$  da solução de lise:

Proteinase K 20mg/mL	0,5 $\mu\text{L}$
SDS a 10%	5,0 $\mu\text{L}$
Solução TE qsp	100 $\mu\text{L}$
- 5- Deixar 18 horas no banho-maria a 56°.
- 6- Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de fenol-clorofórmio 1:1. Homogeneizar até formar uma emulsão.
- 7- Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos à temperatura ambiente (25°C).

- 8- Transferir o sobrenadante para outro tubo *ependorf* estéril e anotar o volume.
- 9- Repetir a extração, adicionando fenol-clorofórmio em igual volume ao do sobrenadante. Homogeneizar até formar uma emulsão.
- 10- Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos à temperatura ambiente (25°C).
- 11- Transferir o sobrenadante para outro tubo *ependorf* estéril e anotar o volume.
- 12- Adicionar igual volume de clorofórmio. Homogeneizar até formar uma emulsão.
- 13- Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos à temperatura ambiente (25°C).
- 14- Transferir o sobrenadante para outro tubo *ependorf* estéril e anotar o volume.
- 15- Adicionar 70 µL de acetato de amônio 7,5 mM.
- 16- Adicionar o mesmo volume total de isopropanol gelado. Homogeneizar aproximadamente 50 vezes.
- 17- Precipitar 18 horas a - 20°C.
- 18- Centrifugar a 14000 rpm durante 30 minutos a 4° C. Observar se houve a formação de sedimento de DNA.
- 19- Desprezar o sobrenadante. Adicionar 1 mL de etanol 70% resfriado para lavar o sedimento de DNA.
- 20- Centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- 21- Descartar o etanol e deixar o sedimento de DNA secar em temperatura ambiente.
- 22- Ressuspender em solução de TE (20 a 100 µL dependendo do tamanho do sedimento).
- 23- Deixar em banho-maria por 1h a 65°C ou 1 dia à temperatura ambiente.
- 24- Estocar a 4°C ou - 20°C.

Cabe ressaltar que, a princípio, as amostras foram extraídas sem utilização da Proteinase K e com o decorrer do estudo, percebeu-se a necessidade do uso desta para a melhora do processo de extração.

#### 4.5.2 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Inicialmente, foram empregadas para otimização das condições da PCR, amostras sabidamente positivas ou negativas, testadas pelo método de CH. Em seguida, a PCR otimizada foi empregada na análise de amostras de pacientes com diagnóstico histopatológico positivo ou negativo. Posteriormente, as amostras das pacientes participantes deste projeto foram analisadas.

Entre as variáveis testadas para a padronização das condições da reação de PCR, foram avaliados o melhor protocolo de extração do DNA, a melhor temperatura de anelamento, o número ideal de ciclos e as concentrações ótimas para cada um dos reagentes utilizados na amplificação do segmento específico.

O DNA das amostras de captura híbrida contidas em solução não desnaturante foi extraído, utilizando solução de lise contendo Proteinase K e uma mistura de fenol-clorofórmio 1:1. A reação de PCR foi feita com 0,5  $\mu\text{L}$  de DNA extraído (sedimento de DNA solubilizado em TE).

A reação de PCR foi preparada, utilizando-se as seguintes concentrações e quantidades de reagentes, com um volume final de 10,5  $\mu\text{L}$  :

- 0,25  $\mu\text{L}$  de cada dNTP (0,2 mM), totalizando 1  $\mu\text{L}$ ;
- 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq polimerase (1 UI);
- 1  $\mu\text{L}$  do tampão ( $\text{MgCl}_2$ ; KCl; Tris/HCl);
- 1  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo para HPV (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) (MY09 e MY11) e 0,5  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo para Globina (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) (PC03 e PC04);
- 1,5  $\mu\text{L}$  de solução de DNA extraído da amostra;
- Água Mili-Q<sup>®</sup> autoclavada
- Uma gota de óleo mineral

Os 40 ciclos da PCR foram realizados em uma máquina modelo PTC-100<sup>TM</sup> Programmable Thermal Controller da marca MJ Research sob as seguintes condições: 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e mais 5 minutos de alongação a 72 °C.

Durante a otimização, diversas reações foram realizadas, variando-se a temperatura de anelamento, as concentrações de oligonucleotídeos, o número de ciclos, etc, com o intuito de se obter um bom sinal de amplificação, minimizar amplificações inespecíficas e encontrar a concentração ótima de cada reagente.

Os produtos da PCR, juntamente com o padrão de peso molecular "DNA Ladder 1000 pares de bases (pb)" da GIBCO® BRL foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e corados pela prata (SANTOS *et al.*, 1993).

Foram utilizados os oligonucleotídeos MY09 e MY11 que amplificam uma seqüência de 452 pb do genoma do HPV, chamada de região L1 (que é homóloga para a maioria dos tipos de HPV conhecidos), permitindo a detecção de uma ampla variedade de tipos desse vírus (MANOS *et al.*, 1989). Os oligonucleotídeos PC03 e PC04 amplificam uma seqüência de 100 pb do gene da  $\beta$ -globina humana e funcionam como controle interno da reação: são responsáveis pela verificação da integridade e qualidade do DNA extraído (SAIKI *et al.*, 1988).

As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados encontram-se listados na TAB. 1.

TABELA 1 - Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados na PCR, para amplificação dos segmentos genômicos específicos.

	Oligonucleotídeo Senso	Oligonucleotídeo Anti-senso
HPV	MY11: 5'GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3' (MANOS <i>et al.</i> , 1989)	MY09: 5'CGTCCMARRGGAWACTGATC 3' (MANOS <i>et al.</i> , 1989)
□Globina	PC03: 5'ACACAACACTGTGTTCACTAGC 3' (SAIKI <i>et al.</i> , 1988)	PC04: 5'CAACTTCATCCACGTTTACC 3' (SAIKI <i>et al.</i> , 1988)

M = A+C ; R = A+G ; W = A+T ; Y = C+T

O controle de qualidade dos reagentes e de todo o processo da reação foi feito através do controle negativo ("branco"), que contém todos os reagentes, exceto o DNA e que foi submetido a todas as etapas da PCR. Os controles positivos utilizados foram os testados pelo método de CH.

Todos os materiais usados para extração e amplificação do DNA eram novos e autoclavados: ponteiras com filtro e sem filtro, tubos *ependorf* e tubos *Falcon*.

## 4.6 - DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO

Cada lâmina foi identificada numericamente, em ordem crescente. Os esfregaços foram analisados de forma aleatória, sem o conhecimento do resultado da análise molecular, examinando-se a princípio a CML e posteriormente a CC. Os diagnósticos foram classificados segundo o Sistema Bethesda (KURMAN & SOLOMON, 1994), e relatados em laudos (APÊNDICE C) de acordo com a Nomenclatura aprovada pela Sociedade Brasileira de Citopatologia (SBC, 2002).

Utilizou-se os seguintes critérios citológicos para a identificação das LEI e das células atípicas de significado indeterminado (GOMPEL & KOSS, 1997; SOLOMON & NAYAR, 2004):

- LBG (Displasia leve/NIC I/Efeito citopático da infecção por HPV): células intermediárias e superficiais com núcleos discretamente aumentados, hipercromáticos, cuja cromatina apresenta-se de forma homogênea ou finamente reticular. Presença de ligeira anisocitose ou inversão da relação núcleo-citoplasmática pouco marcada. Estão incluídas também nesta categoria as alterações citopatológicas decorrentes da infecção por HPV: coilocitose e disceratose.
- LAG (Displasia moderada / Displasia acentuada / Carcinoma *in situ* / NIC II / NIC III): células intermediárias, parabasais e basais com núcleos grandes e inversão da relação núcleo-citoplasmática, que variam em forma e tamanho. Núcleos hipercromáticos, com cromatina granulosa, frequentemente com cromocentros uniformes e ausência de nucléolos. A membrana nuclear costuma estar reforçada e irregular.
- ASCUS: os núcleos possuem aproximadamente duas e meia a três vezes a área dos núcleos das células intermediárias normais; leve aumento da relação núcleo-citoplasma; hipercromasia nuclear mínima e irregularidade na distribuição da cromatina ou na forma nuclear; anormalidades nucleares associadas a um citoplasma denso e orangeofílico ("paraceratose atípica").

- AGUS: células glandulares cujas alterações vão além dos típicos processos reativos benignos, porém não suficientes para um diagnóstico de adenocarcinoma; células com aumento do tamanho nuclear e citoplasma mais abundante que o das endocervicais.

Na análise comparativa dos resultados citopatológicos com os outros métodos diagnósticos utilizados neste trabalho considerou-se como resultados negativos aqueles esfregaços de padrão normal ou inflamatório. Esfregaços com diagnóstico de ASCUS e/ou AGUS, LBG, LAG e carcinoma invasor foram considerados positivos.

Os esfregaços cervicais foram ainda examinados quanto à presença de alguns SNC da infecção por HPV descritos por SCHNEIDER *et al.* (1987). Foram avaliados 3 sinais: coilocitose leve, disceratose leve e bi ou multinucleação. Os critérios utilizados para a identificação de cada um desses sinais foram os mesmos estabelecidos pelos autores.

#### **4.7- DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO**

Foram avaliados os diagnósticos histopatológicos somente das pacientes da MOV, perfazendo um total de 79 pacientes. Após terem sido realizadas as análises citológicas e moleculares no laboratório, os diagnósticos histopatológicos foram recuperados dos prontuários das pacientes no próprio serviço. Os resultados histopatológicos não foram revisados.

#### **4.8- ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para a comparação de diferenças entre proporções, no caso de tabelas balanceadas, foi realizado o teste Qui-quadrado de Pearson, e, no caso de

desbalanceamento (pelo menos uma célula da tabela ter frequência esperada menor que 5) foi utilizado o Teste Exato de Fisher.

Para verificar a concordância entre os métodos diagnósticos foi utilizado o Coeficiente de Kappa Ponderado, em que os pesos têm a propriedade de a concordância ser maior nas células mais próximas à diagonal principal.

Para todos os testes foi considerado o nível de significância  $\alpha = 0,05$ . Os pacotes estatísticos utilizados foram o SPSS 10.0 e o StatXact 3.0.

Para a construção de tabelas, os resultados foram categorizados da seguinte forma:

#### 1. Dados clínicos

- Idade: 15 a 19 (1) ; 20 a 29 (2); 30 a 39 (3); 40 a 59 (4) e 60 ou mais (5)
- Paridade: 0 a 4 partos (1) / 5 ou mais partos (2)
- Número de parceiros: 0 a 4 parceiros (1) / 5 ou mais parceiros (2)
- Idade do início da atividade sexual: 10 a 15 (1) ; 16 a 19 (2); 20 a 24 (3) e 25 ou mais (4)
- Usuárias de anticoncepcional oral: (1) / Não usuárias: (0)
- Fumantes: (1) / Não fumantes: (0)

#### 2. Resultados Citopatológicos

- Esfregaços de padrão normal ou inflamatório foram considerados negativos e categorizados como 0 (zero)
- Esfregaços com resultado de ASCUS ou AGUS: 1
- Esfregaços com resultado de LBG: 2
- Esfregaços com resultado de LAG: 3
- Esfregaços com resultado de carcinoma de células escamosas invasor: 4

Para a normalização do conteúdo da presente dissertação foi utilizado o livro *Manual para normalização de publicações técnico-científicas* (FRANÇA, 2003).

## **5 - RESULTADOS**

## 5.1 - PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA MOLECULAR (PCR)

A primeira etapa deste trabalho teve como objetivo padronizar as condições da PCR para o HPV. A reação de PCR foi padronizada, inicialmente, em amostras testadas anteriormente pelo método de CH e, portanto, sabidamente positivas ou negativas para o HPV. Estas amostras foram gentilmente cedidas pelo laboratório Humberto Abrão e utilizadas, posteriormente, como controles positivos e negativos da reação, na análise das amostras das pacientes do estudo.

Foi observada, em todas as amostras, uma banda de DNA de 100 pb (seta) referente à amplificação de fragmento do gene para a  $\beta$ -globina humana (FIG. 1). A amplificação do DNA do HPV (fragmento de 450 pb) pode ser visualizada pelas setas da FIG. 2.

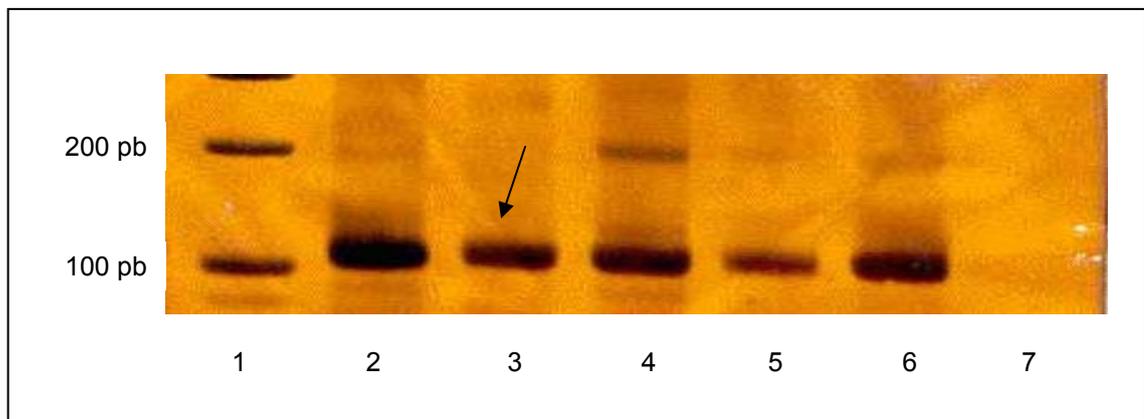


FIGURA 1- Eletroforese em gel de poli-acrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, mostrando o produto da PCR- $\beta$ -globina humana

Canaleta 1 - Padrão de peso molecular (*1 kb plus DNA LADDER- GIBCO BRL<sup>®</sup> - São Paulo, SP*)

Canaletas 2, 3, 4, 5 e 6 - Fragmento de 100 pb, correspondente ao perfil da banda para  $\beta$ -globina humana

Canaleta 7 - Controle negativo da reação

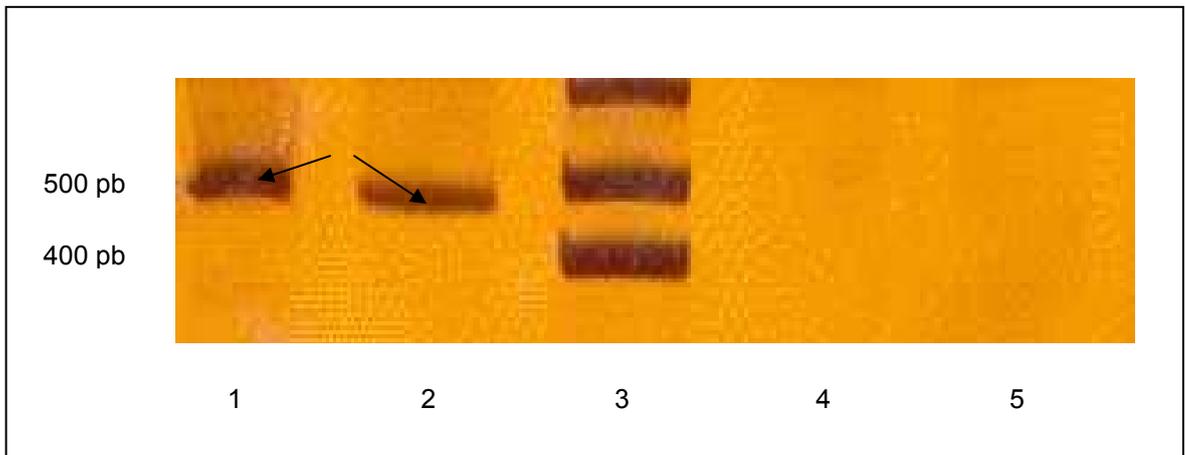


FIGURA 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, mostrando o produto da PCR-HPV

Canaletas 1 e 2 - Fragmento de 452 pb, correspondente ao perfil da banda para HPV, para amostras de CH sabidamente positivas

Canaleta 3 - Padrão de peso molecular (*1 kb plus DNA LADDER- GIBCO BRL® - São Paulo, SP*)

Canaleta 4 - Amostra de captura híbrida com resultado negativo para HPV

Canaleta 5 - Controle negativo da reação

Ainda na fase de padronização, processaram-se algumas amostras de pacientes da MOV, com diagnóstico histopatológico de infecção por HPV e LEI e/ou invasora. As amostras foram colhidas através de CC e PBS, e outras em CML.

Procedeu-se à extração de DNA com volumes de 30 e 400  $\mu$ L de PBS. Observou-se que, para as mesmas amostras, o volume inicial de extração (30 ou 400  $\mu$ L) interferia no resultado da PCR. Então, fez-se diluição 1:10 do DNA extraído a partir dos 400  $\mu$ L de PBS e foi observada a presença de bandas. Portanto, ficou padronizado o volume de 30  $\mu$ L para se iniciar a extração.

As amostras coletadas através da CML foram submetidas ao mesmo tipo de extração de DNA utilizado até então e, dessa maneira, procedeu-se a reação de PCR. Porém, foi observada a presença de bandas inespecíficas (seta, FIGURA 3).

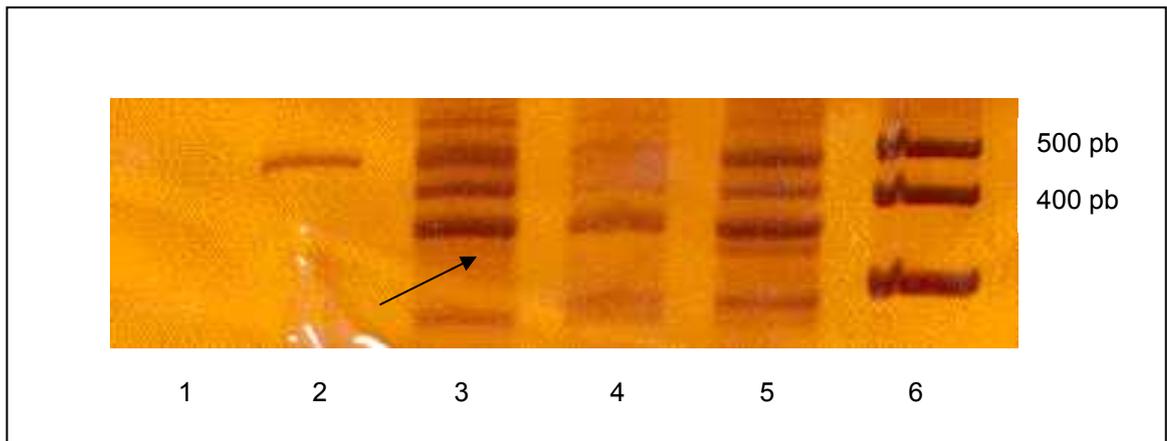


FIGURA 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, mostrando o produto da PCR-HPV com a presença de bandas inespecíficas

Canaleta 1 - Amostra de captura híbrida com resultado negativo para HPV  
 Canaleta 2 - Fragmento de 452 pb, correspondente ao perfil da banda para HPV

Canaletas 3,4 e 5 - Amostras de pacientes com presença de bandas inespecíficas

Canaleta 6 - Padrão de peso molecular (*1 kb plus DNA LADDER- GIBCO BRL® - São Paulo, SP*)

Para a otimização da PCR, foram, então, avaliadas algumas alterações na temperatura de anelamento e na quantidade de DNA extraído utilizado na reação de PCR. Com a temperatura de anelamento igual a 56°C, 1UI de Taq e volume de 1,5 µL de DNA, tanto para as amostras colhidas em PBS quanto em meio líquido, observou-se que ocorria amplificação da banda específica para HPV (setas) e as ampliações inespecíficas foram minimizadas (FIG. 4).

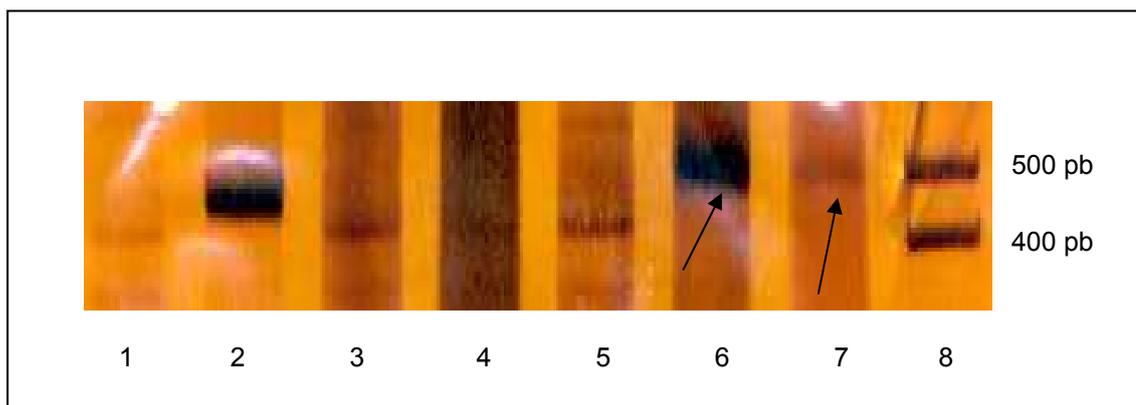


FIGURA 4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pelo nitrato de prata, mostrando o produto da PCR-HPV das pacientes do estudo

Canaleta 1 - Amostra de captura híbrida com resultado negativo para HPV  
 Canaleta 2 - Fragmento de 452 pb, correspondente ao perfil da banda para HPV (amostra de captura híbrida com resultado positivo para HPV)  
 Canaletas 3, 4 e 5 - Amostras de pacientes com resultado negativo para HPV  
 Canaletas 6 e 7 - Amostras de pacientes com resultado positivo para HPV  
 Canaleta 8 - Padrão de peso molecular (*1 kb plus DNA LADDER- GIBCO BRL*<sup>®</sup> - São Paulo, SP)

## 5.2 - DADOS CLÍNICOS

Fizeram parte deste estudo 109 pacientes provenientes do Serviço de Propedêutica da MOV e 65 pacientes do CTDST. Das 109 pacientes da MOV, 30 eram do Grupo 1, cinco faziam parte do Grupo 2 e 74 eram do Grupo 4. No CTDST, das 65 pacientes, 10 fizeram parte do Grupo 1, 12 do Grupo 2 e 43 pacientes eram do Grupo 4.

Foram avaliados, totalizando todos os grupos estudados, os dados clínicos de 174 pacientes. As pacientes provenientes do Serviço de Propedêutica da MOV apresentaram idade média de 37,9 anos, com idade mínima de 15 anos e máxima de 76 anos. O número médio de partos foi de 2,6 (variação de zero a 14 partos) e o número de parceiros variou de um a 20, com média de 3,6. Uma paciente (profissional do sexo) relatou mais de 100 parceiros sexuais. A idade média do início da atividade sexual foi aos 18,1 anos, com variação de 11 aos 31 anos. O hábito de fumar foi relatado por 23 pacientes (21,1%) e 29 pacientes (26,6%) relataram o uso de AO.

Entre as 65 pacientes oriundas do CTDST, a idade variou de 16 a 59 anos (idade média de 28,7 anos) e o número médio de partos foi de 1,47 (variando de zero a oito). O número médio de parceiros foi de 4,12 (variando de um a 20) e a idade do início da atividade sexual variou de 10 a 24 anos, com média aos 16,8 anos. O uso de AO foi relatado por 20 (30,7%) das 65 pacientes. O hábito de fumar foi relatado por 11 pacientes (16,9%), embora 34 (52,3%) não relataram (NR) esta informação.

Os GRÁF. 1, 2, 3, 4, 5 e 6 ilustram estes resultados.

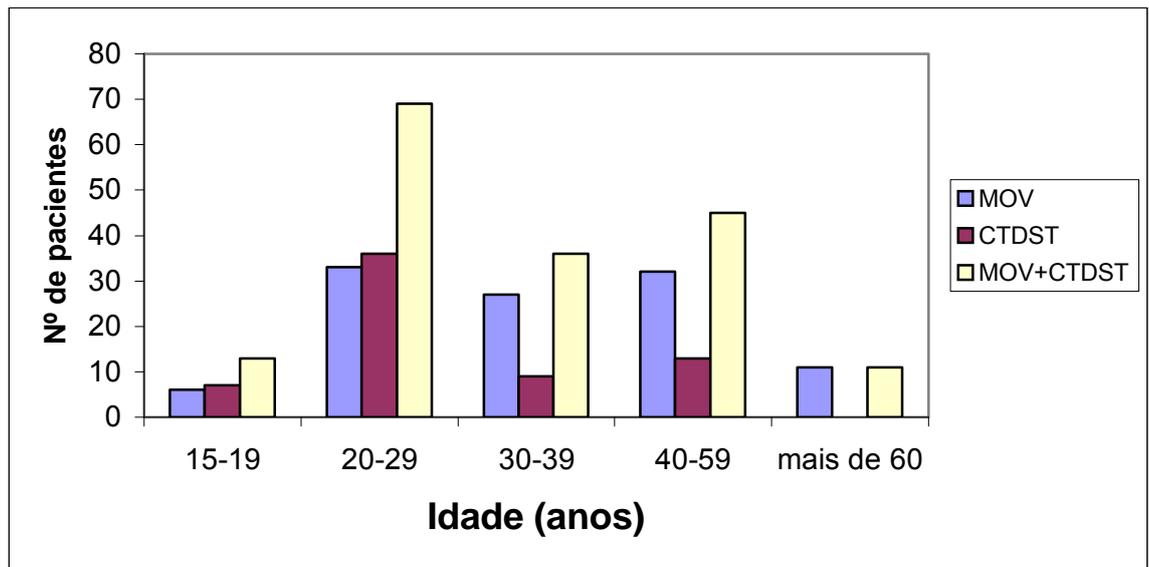


GRÁFICO 1 - Distribuição das pacientes por idade

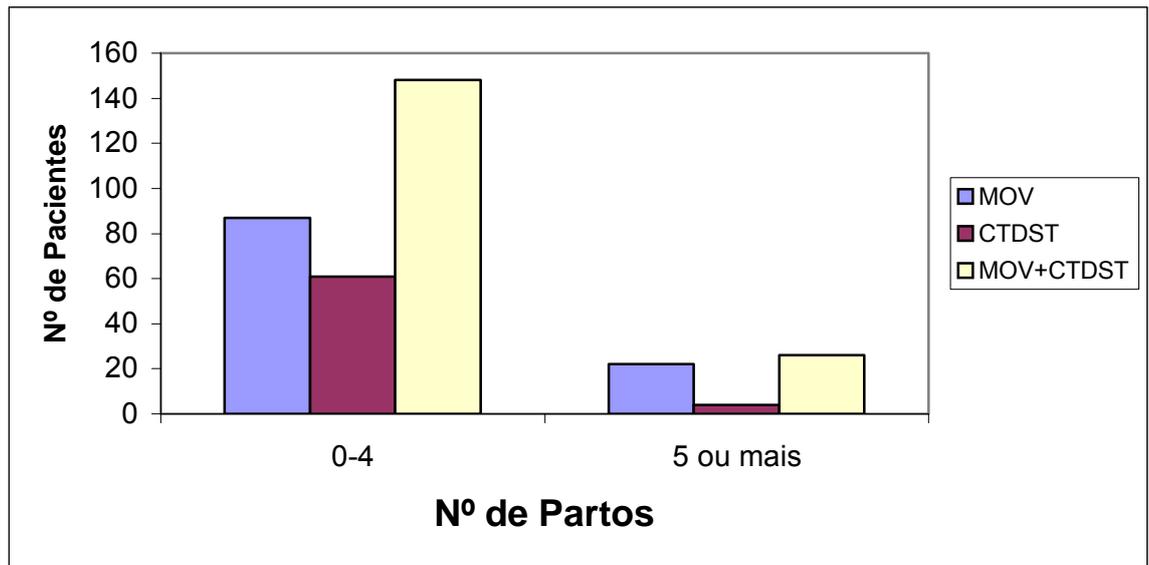


GRÁFICO 2 - Distribuição das pacientes em relação à paridade

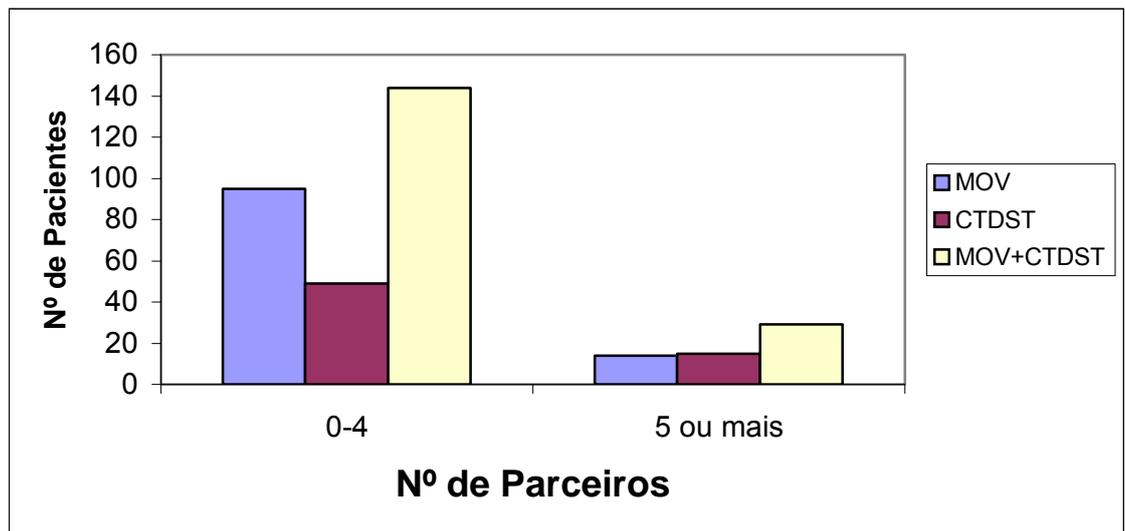


GRÁFICO 3 - Distribuição das pacientes em relação ao número de parceiros sexuais

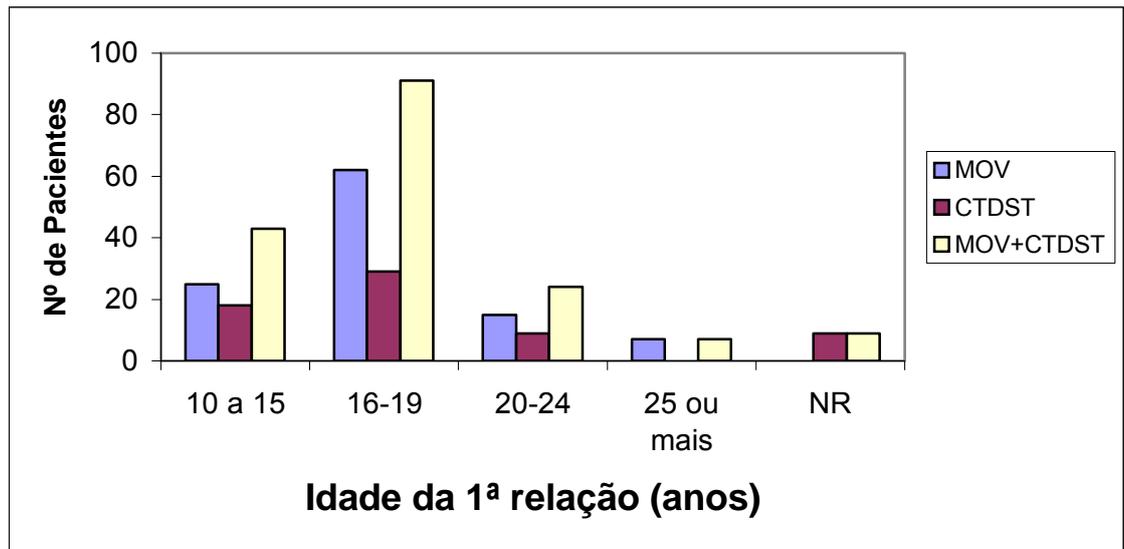


GRÁFICO 4 - Distribuição das pacientes em relação ao início da atividade sexual

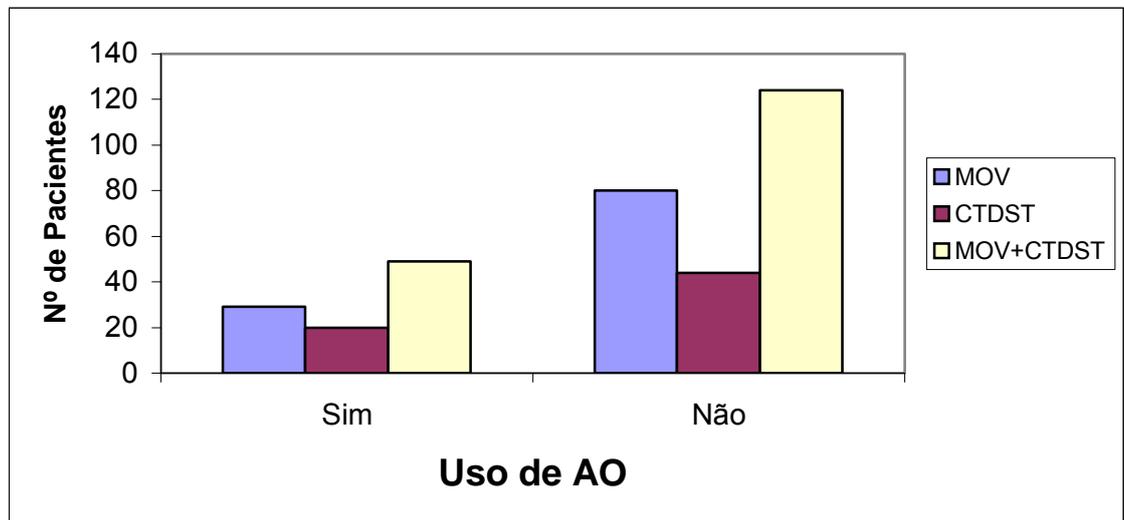


GRÁFICO 5 – Distribuição das pacientes em relação ao uso de AO

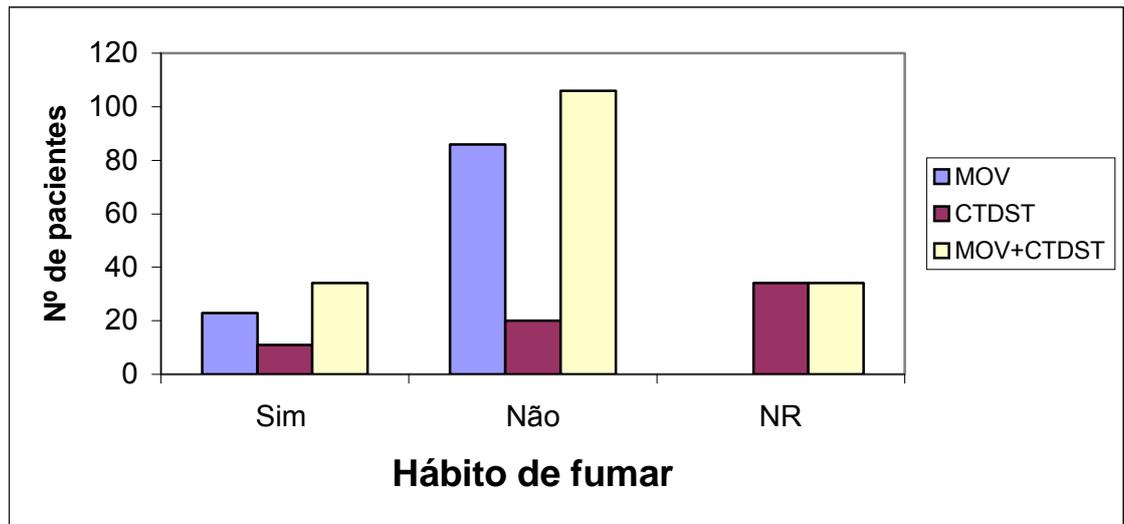


GRÁFICO 6 - Distribuição das pacientes em relação ao hábito de fumar

A TAB. 2 apresenta a correlação entre os achados clínicos das pacientes da MOV e os resultados do teste molecular (PCR) para a detecção de HPV. Dentre os casos positivos para HPV, observa-se uma frequência aumentada de positividade em mulheres mais velhas (com 60 anos ou mais), com maior número de partos, maior número de parceiros sexuais, com início da atividade sexual entre 20 e 24 anos, fumantes e em uso de AO. Foi detectada associação significativa ( $p = 0,043$ ) entre o fato de a paciente fumar e o resultado da PCR (39,1% fumantes *versus* 16,3% não fumantes).

TABELA 2 - Correlação dos achados clínicos e moleculares das pacientes da MOV (n=109)

Variáveis	Categoria	HPV/DNA Positivo		HPV/DNA Negativo		Valor <i>p</i>
		n	%	n	%	
Idade	15 a 19	1	16,7	5	83,3	0,650 <sup>b</sup>
	20 a 29	8	24,2	25	75,8	
	30 a 39	5	18,5	22	81,5	
	40 a 59	5	15,6	27	84,4	
	60 ou mais	4	36,4	7	63,6	
Paridade	0 a 4	18	20,7	69	79,3	0,778 <sup>b</sup>
	5 ou mais	5	22,7	17	77,3	
Nº Parceiros	0 a 4	19	19,8	77	80,2	0,467 <sup>b</sup>
	5 ou mais	4	30,8	9	69,2	
Idade 1ª relação	13 a 15	5	18,5	22	81,5	0,382 <sup>b</sup>
	16 a 19	11	18,3	49	81,7	
	20 a 24	6	37,5	10	62,5	
	25 ou mais	1	16,7	5	83,3	
Uso de AO	Sim	8	27,6	21	72,4	0,425 <sup>a</sup>
	Não	15	18,8	65	81,3	
Fumo	Sim	9	39,1	14	60,9	0,024 <sup>b*</sup>
	Não	14	16,3	72	83,7	

a: Teste qui-quadrado.

b: Teste exato de Fisher.

\*: Estatisticamente significativo.

Na TAB. 3, encontram-se apresentados os resultados das pacientes do CTDST, nos quais a positividade para o HPV foi maior nas pacientes mais jovens, com menor número de partos e usuárias de AO. Em relação ao hábito de fumar e ao número de parceiros sexuais, o número de pacientes com e sem HPV foi semelhante. Não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa entre as variáveis e a presença da infecção pelo HPV.

TABELA 3 - Correlação dos achados clínicos e moleculares das pacientes do CTDST (n=65)

Variáveis	Categoria	HPV/DNA Positivo		HPV/DNA Negativo		Valor <i>p</i>
		n	%	n	%	
Idade	16 a 19	3	42,8	4	57,2	0,807 <sup>b</sup>
	20 a 29	13	36,1	23	63,9	
	30 a 39	3	33,3	6	66,7	
	40 a 59	3	23,1	10	76,9	
Paridade	0 a 4	22	36,1	39	66,9	0,291 <sup>b</sup>
	5 ou mais	0	0	4	100	
Nº Parceiros	0 a 4	17	34,7	33	65,3	1,000 <sup>b</sup>
	5 ou mais	5	33,3	10	66,7	
Idade 1ª relação	10 a 15	8	44,4	10	55,6	0,262 <sup>b</sup>
	16 a 19	12	41,4	17	58,6	
	20 a 24	1	11,1	8	88,9	
	NR	1	11,1	8	88,9	
Uso de AO	Sim	9	45	11	55	0,232 <sup>a</sup>
	Não	13	27,3	32	72,7	
Fumo	Sim	4	36,4	7	64,6	1,000 <sup>b</sup>
	Não	7	35	13	65	
	NR	11	32,4	23	67,6	

a: Teste qui-quadrado.

b: Teste exato de Fisher.

A TAB. 4 demonstra o resultado dos dois Serviços em conjunto. Pode-se observar que, dentre os casos positivos para HPV, houve uma maior positividade para as pacientes com menor número de partos, maior número de parceiros, início precoce da atividade sexual, usuárias de AO e fumantes. A associação entre estes fatores e a infecção por HPV não foi estatisticamente significativa, exceto pelo fumo; o valor *p* encontrado para esta variável foi de 0,029. Quanto à idade das pacientes, nota-se maior frequência de positividade para HPV nos pólos opostos das faixas etárias consideradas (pacientes mais jovens e mais velhas), refletindo a diferença dos dois serviços.

TABELA 4 - Correlação dos achados clínicos e moleculares das pacientes dos dois Serviços (n=174)

Variáveis	Categoria	HPV/DNA Positivo		HPV/DNA Negativo		Valor <i>p</i>
		n	%	n	%	
Idade	15 a 19	4	30,8	9	69,2	0,471 <sup>b</sup>
	20 a 29	21	30,4	48	69,6	
	30 a 39	8	22,2	28	77,8	
	40 a 59	8	17,8	37	82,2	
	60 ou mais	4	36,4	7	63,6	
Paridade	0 a 4	40	27,0	108	73,0	0,402 <sup>a</sup>
	5 ou mais	5	19,2	21	80,8	
Nº Parceiros	0 a 4	37	25,0	111	75,0	0,536 <sup>a</sup>
	5 ou mais	8	30,8	18	69,2	
Idade 1ª relação	10 a 15	13	28,9	32	71,1	0,920 <sup>b</sup>
	16 a 19	24	24,5	74	75,5	
	20 a 24	7	28,0	18	72,0	
	25 ou mais	1	16,7	5	83,3	
Uso de AO	Sim	17	34,0	33	66,0	0,099 <sup>a</sup>
	Não	28	22,0	97	78,0	
Fumo	Sim	13	38,2	21	61,8	0,029 <sup>a*</sup>
	Não	21	19,8	85	80,2	
	NR	11	32,4	23	67,6	

a: Teste qui-quadrado.

b: Teste exato de Fisher.

\*: Estatisticamente significativo.

### 5.3 - ACHADOS CLÍNICO-COLPOSCÓPICOS

Para a análise dos dados clínico-colposcópicos, foram consideradas as pacientes pertencentes aos grupos 1, 2 e 4 de ambos os Serviços (109 pacientes da MOV e 65 do CTDST).

O Teste de Schiller foi realizado somente na MOV. De um total de 109 pacientes, o teste foi positivo em 58 (54,1%) (GRÁF. 7).

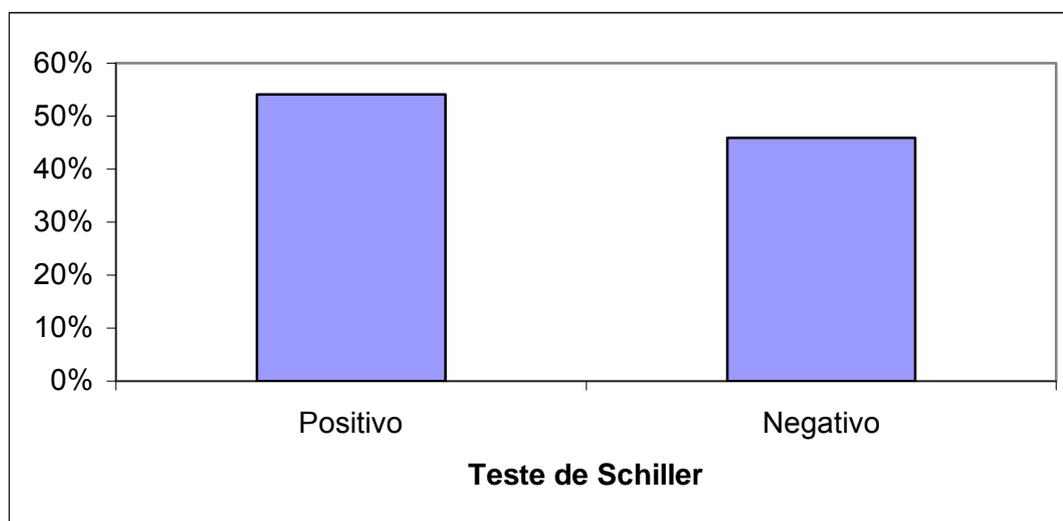


GRÁFICO 7 - Teste de Schiller realizado nas pacientes da MOV

Conforme relatado no item Material e Métodos, definiu-se os achados colposcópicos segundo a nomenclatura preconizada pelo Congresso de Roma (ANEXO A) a qual é adotada pelos médicos da MOV.

Das 109 pacientes da MOV, foram encontrados achados colposcópicos normais em 43 pacientes (39,5%), as quais mostraram zona de transformação típica (ZTT). Dentre as 60 pacientes (55,1%) com achados colposcópicos anormais, 22 (20,2%) apresentaram EAB, 31 (28,4%) tinham EAB plano, sete (6,4%) mostraram EAB em relevo, 10 (9,2%) apresentaram pontilhado, 13 (11,9%) apresentaram mosaico, dos quais oito eram esboço. Leucoplasia foi encontrada em uma paciente (0,9%); a colposcopia foi insatisfatória em quatro pacientes (3,6%), como demonstra

o GRÁF. 8. Achados vários foram encontrados em uma paciente (0,9%) com condiloma exofítico e uma (0,9%) que apresentou decíduose.

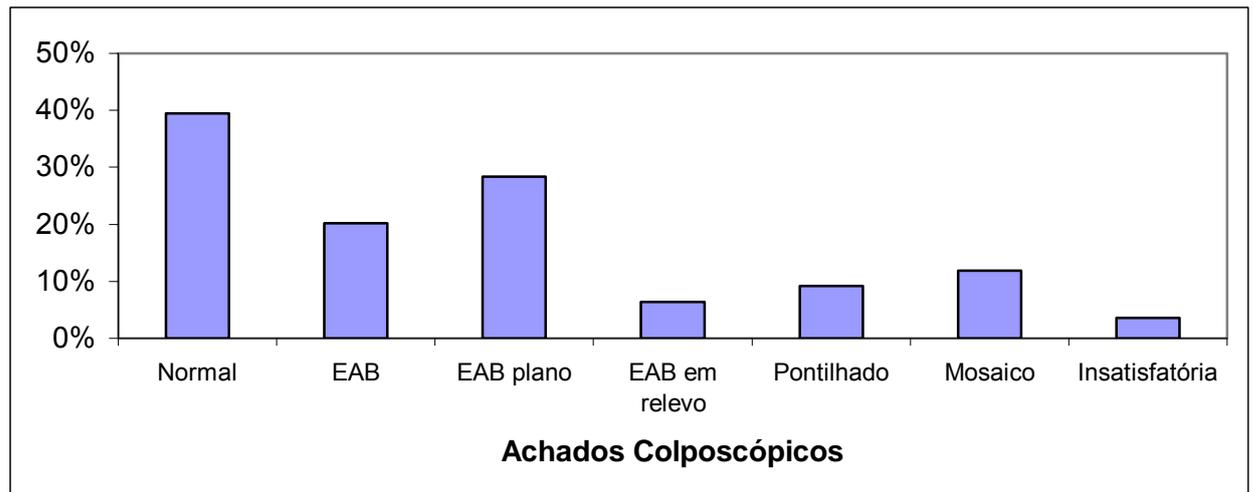


GRÁFICO 8 - Achados colposcópicos referentes às pacientes examinadas na MOV

A TAB. 5 demonstra os achados colposcópicos referentes às pacientes da MOV e a correlação com os resultados moleculares para infecção por HPV. Dentre os casos positivos para infecção por HPV, pode-se observar uma maior positividade nos achados colposcópicos anormais (28,3%). Para a realização do teste estatístico, a categoria “insatisfatório” em achados colposcópicos foi retirada. Entretanto, não foi detectada associação estatisticamente significativa entre os achados colposcópicos e o resultado da PCR ( $p > 0,05$ ).

TABELA 5 - Correlação entre os achados colposcópicos e a infecção por HPV

Variáveis	Categoria	HPV-DNA Positivo		HPV-DNA Negativo		Valor <i>p</i>
		n	%	n	%	
Achados colposcópicos	Normais	6	14,0	37	86,0	0,183 <sup>b</sup>
	Anormais	17	28,3	43	71,7	
	Vários	0	0	2	100,0	

b: Teste exato de Fisher.

Os achados macroscópicos de condiloma exofítico foram relatados nos dois Serviços. O GRÁF. 9 demonstra estes resultados. Na MOV, uma (0,9%) das 109 pacientes tinha quadro de condiloma acuminado na região perianal e era positiva para o HPV na PCR. Já no CTDST, 26 (40%) das 65 pacientes apresentavam condiloma vulvar e a positividade para HPV foi observada em 14 (53,8%) das 26 pacientes.

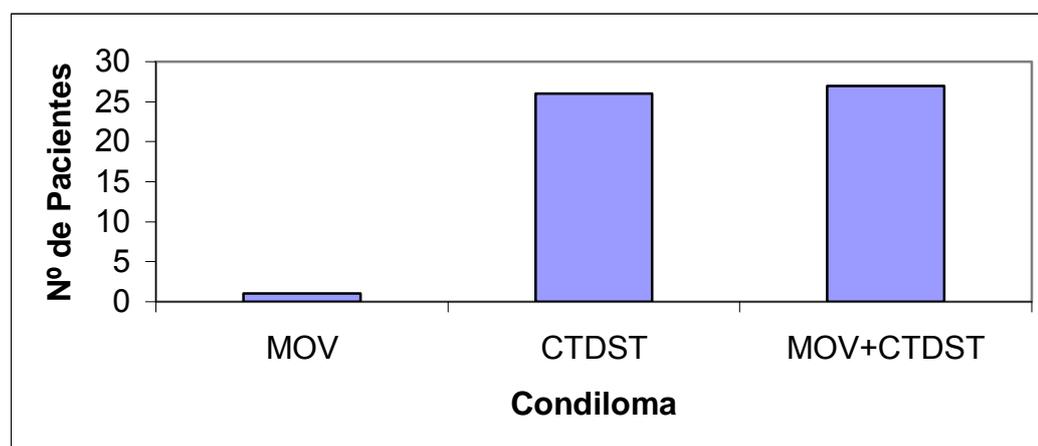


GRÁFICO 9 - Presença de condiloma exofítico nas pacientes dos dois Serviços

## 5.4 – ACHADOS CITOPATOLÓGICOS E MOLECULARES

Na análise dos resultados moleculares e citopatológicos foram computados os dados de 174 pacientes pertencentes aos grupos 1, 2 e 4 de ambos os Serviços. No caso do grupo 4, em que a coleta da citologia era pareada, o diagnóstico citológico considerado para a análise foi aquele obtido na citologia em meio líquido.

A PCR para HPV foi realizada nas amostras das 174 pacientes estudadas. Detectou-se uma positividade para o HPV em 23 (21,1%) das 109 pacientes na MOV e em 22 (34%) das 65 pacientes no CTDST. No total, foram 45 pacientes (26%) com resultado molecular positivo para HPV (GRÁF.10).

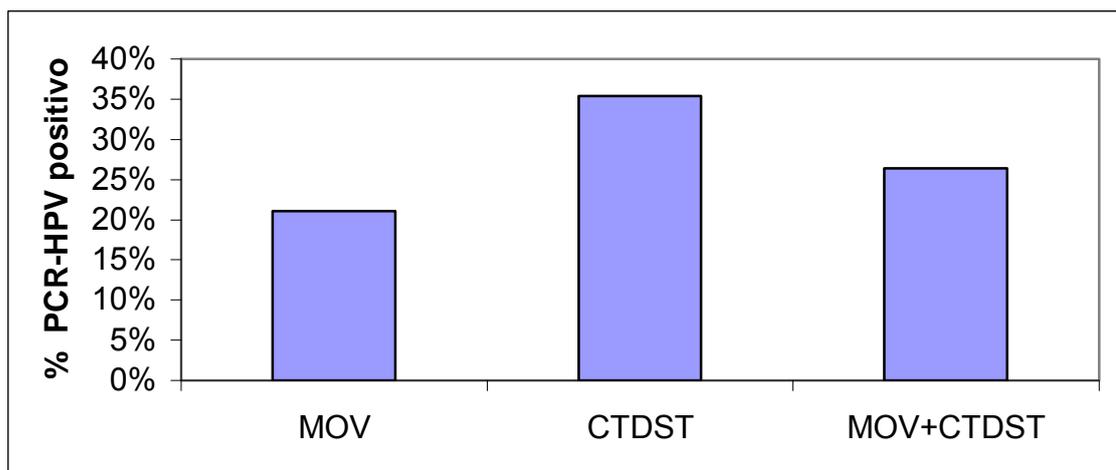


GRÁFICO 10 - Porcentagem de PCR-HPV positivo das pacientes de ambos os Serviços

O GRÁF. 11 apresenta os resultados relativos à porcentagem de agentes específicos presentes nas amostras analisadas dos dois Serviços. Entre as 109 pacientes da MOV, sete (6,4%) apresentaram *Gardnerella vaginalis* (GV); uma (0,9%) com *Trichomonas vaginalis* (TV) e cinco (4,6%) com *Candida* sp. No CTDST, 11 pacientes (16,9%) tinham GV, três (4,6%) com TV e nove (13,8%) com diagnóstico de infecção por *Candida* sp.

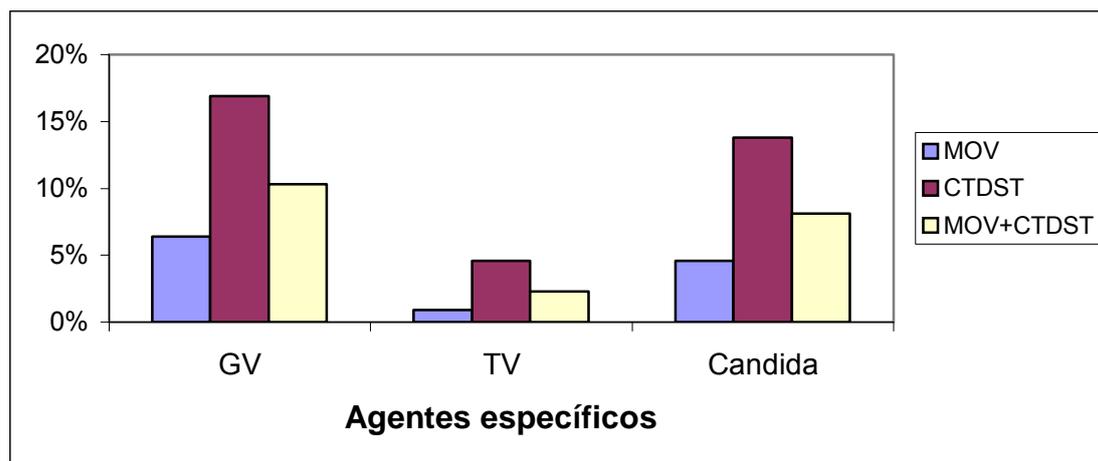


GRÁFICO 11 - Agentes específicos diagnosticados nos dois Serviços

No GRÁF. 12 encontram-se demonstrados os resultados citopatológicos dos dois Serviços. Das 109 pacientes da MOV, 84 (77,1%) tiveram diagnóstico negativo para anormalidades epiteliais (NEG), quatro pacientes (3,7%) com diagnóstico de ASCUS, oito (6,4%) com diagnóstico de LBG, 10 (9,2%) com LAG e duas (1,8%) com carcinoma invasor. Uma amostra (0,9%) citológica foi considerada insatisfatória (devido a intensa hemorragia) e excluída da análise. Das 65 pacientes do CTDST, 53 (81,5%) foram diagnosticadas como NEG, cinco pacientes (7,7%) tiveram resultado citológico de ASCUS e sete (10,8%), diagnóstico de LBG. Considerando os dois Serviços, 79,2% das amostras citológicas foram negativas, 5,2% tiveram diagnóstico de ASCUS, 8,7% de LBG, 5,8% de LAG e 1,1% de carcinoma invasor.

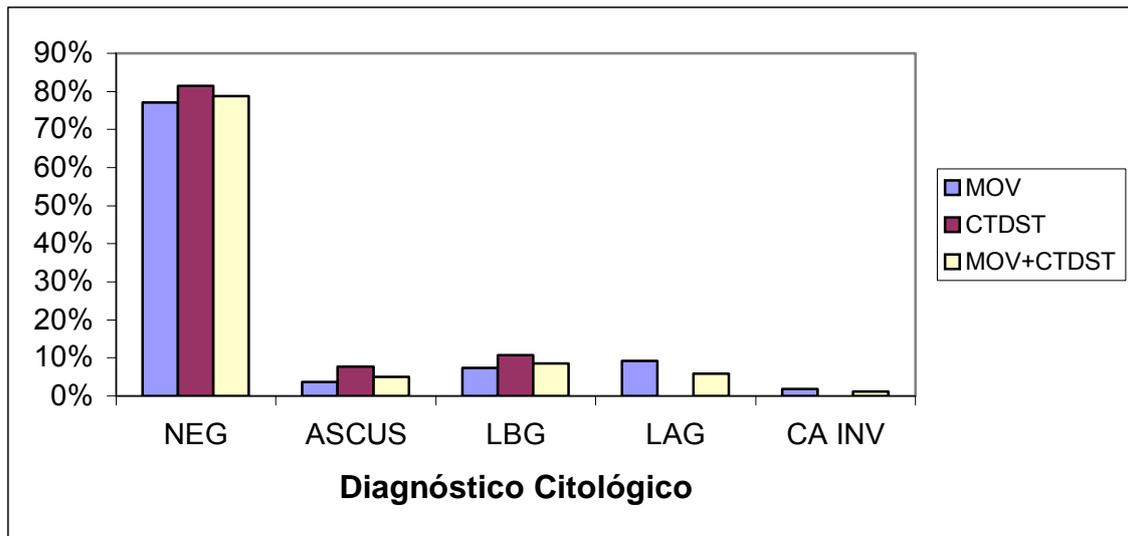


GRÁFICO 12 - Resultados citopatológicos das pacientes de ambos os Serviços

Foi observada maior frequência (estatisticamente significativa) de anormalidades citológicas em pacientes HPV positivas da MOV (TAB. 6). De um total de 23 pacientes com resultado molecular positivo para HPV, 12 (52,2%) mostraram alteração citológica, ao passo que, das 85 pacientes HPV negativas, 12 (14,1%) apresentaram anormalidade citológica. Verificou-se também que a proporção da detecção do HPV aumenta à medida que as categorias do diagnóstico citológico ficam mais graves, exceto em LAG, sendo a infecção por HPV detectada em todos os casos de carcinoma.

TABELA 6 - Correlação entre os resultados citológicos e moleculares das pacientes da MOV (n=108)

Variáveis	Categoria	HPV/DNA Positivo		HPV/DNA Negativo		Valor $p$
		n	%	n	%	
Citologia	Negativa	11	13,1	73	86,9	0,000 <sup>b*</sup>
	ASCUS	1	25,0	3	75,0	
	LBG	5	62,5	3	37,5	
	LAG	4	40,0	6	60	
	Carcinoma	2	100	0	-	

b: Teste exato de Fisher.

\*: Estatisticamente significativo.

A TAB. 7 apresenta os dados relativos à análise da correlação dos dados citológicos e moleculares das pacientes do CTDST. A positividade para HPV na PCR foi maior em pacientes cujo resultado citológico foi de ASCUS. Os resultados citológicos neste serviço foram estatisticamente significativos em relação à positividade do HPV ( $p = 0,037$ ). Das 22 pacientes HPV positivas, sete (31,8%) apresentaram anormalidades citológicas e cinco (11,6%) das 43 pacientes HPV negativas tiveram resultado citológico positivo.

TABELA 7 - Correlação entre os resultados citológicos e moleculares das pacientes do CTDST (n=65)

Variáveis	Categoria	HPV/DNA Positivo		HPV/DNA Negativo		Valor $p$
		n	%	n	%	
Citologia	Negativa	15	28,3	38	71,7	0,037 <sup>b*</sup>
	ASCUS	4	80	1	20	
	LBG	3	42,9	4	57,1	

b: Teste exato de Fisher.

\*: Estatisticamente significativo.

Na TAB. 8, encontram-se descritos os resultados da correlação entre o diagnóstico citológico e molecular para os dois Serviços. A presença do HPV foi

detectada em todos os diagnósticos de carcinoma invasor e em torno de metade dos casos de ASCUS, LBG E LAG, havendo associação estatisticamente significativa entre os diagnósticos molecular e citológico, confirmando os resultados obtidos anteriormente para os dois serviços separadamente. De um total de 45 pacientes positivas para HPV, 19 (42,2%) mostraram alteração citológica, ao passo que, das 128 pacientes com resultado molecular negativo para o HPV, 17 (13,3%) apresentaram anormalidade citológica. Das 36 pacientes cujo resultado citológico era positivo, 19 (52,7%) foram positivas para a presença do HPV na PCR.

TABELA 8 - Correlação entre os resultados citológicos e moleculares das pacientes dos dois Serviços (n=173)

Variáveis	Categoria	HPV/DNA Positivo		HPV/DNA Negativo		Valor p
		n	%	n	%	
Citologia	Negativa	26	18,9	111	81,1	0,000 <sup>b*</sup>
	ASCUS	5	55,6	4	44,4	
	LBG	8	53,3	7	46,7	
	LAG	4	40,0	6	60,0	
	Carcinoma	2	100,0	0	0	

b: Teste exato de Fisher.

\*: Estatisticamente significativo.

A presença de SNC para a infecção por HPV foi assinalada durante o exame dos esfregaços. Na MOV, foram encontradas 12 amostras contendo SNC, das quais oito (66,6%) eram positivas para o HPV; nove amostras (75%) apresentaram disceratose leve, quatro (33,3%) tinham bi ou multinucleação e uma (8,3%) apresentava coilocitose leve. No CTDST, cinco amostras tinham SNC e em duas delas (40%) foi detectada a presença do HPV pelo teste molecular; duas (40%) tinham disceratose leve, duas (40%) apresentaram bi ou multinucleação e três (60%) tinham coilocitose leve. A TAB. 9 demonstra estes resultados. A presença destes SNC estava associada com os diagnósticos de ASCUS, LBG, LAG e carcinoma

invasor na MOV e com ASCUS e LBG no CTDST. De um total de 9 casos de ASCUS, 3 (33,3%) apresentaram SNC. Dos 4 casos de ASCUS com resultado negativo na PCR, apenas 1 (25%) apresentava SNC (FIG. 5).

TABELA 9 – Frequência dos sinais citológicos não clássicos em esfregaços cervicais positivos de pacientes com e sem infecção pelo HPV nos dois Serviços

Sinais não clássicos	HPV/DNA Positivo (n=10)		HPV/DNA Negativo (n=7)	
	n	%	n	%
coilocitose leve	2	50	2	50
disceratose leve	7	63,6	4	36,4
bi ou multinucleação	4	66,7	2	33,3

A sensibilidade para a coilocitose leve foi de 20% e a especificidade, 71,4%. A disceratose leve obteve uma sensibilidade maior (70%), e especificidade de 42,9%. A sensibilidade encontrada para bi ou multinucleação foi de 40% e sua especificidade foi igual à da coilocitose leve (71,4%).

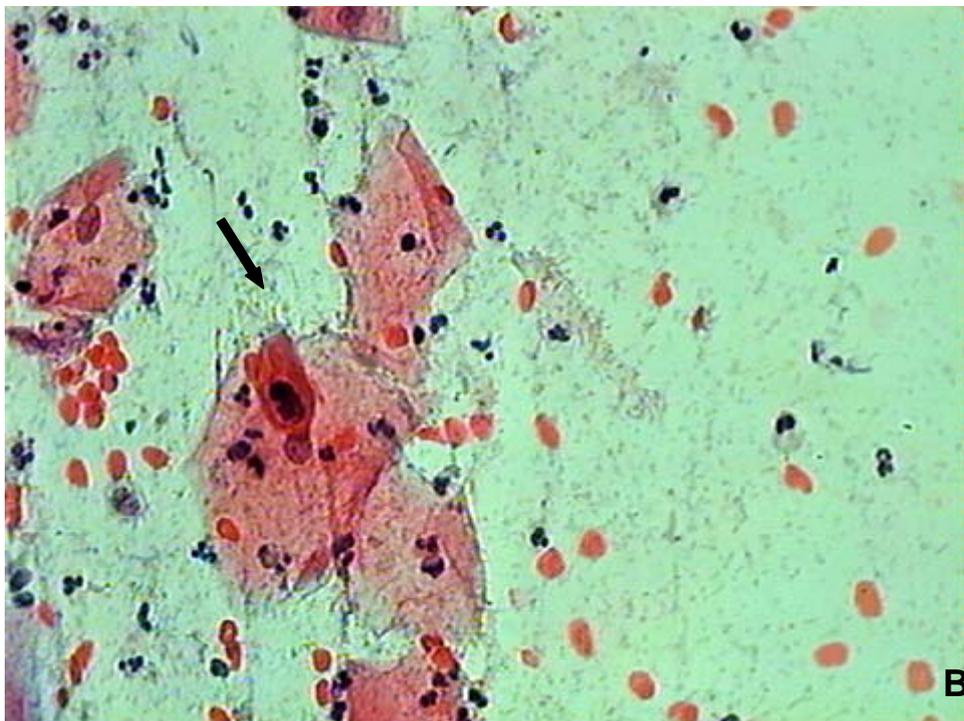
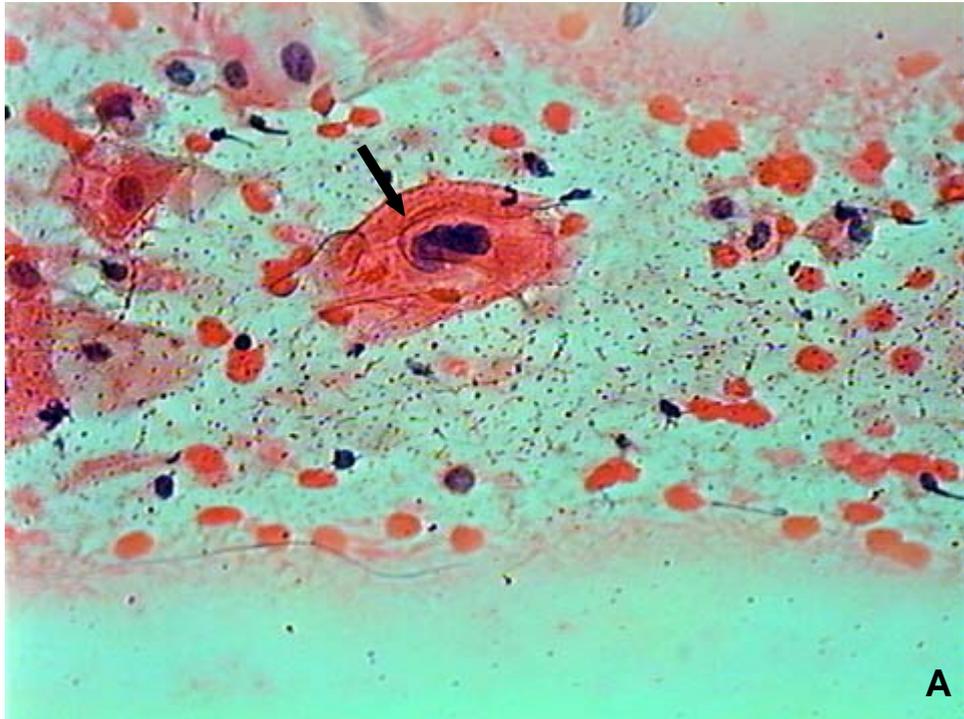


FIGURA 5: Fotomicrografia de esfregaço cervical convencional.  
A: ASCUS, PCR positivo para HPV; B: ASCUS, PCR negativo para HPV. Coloração de Papanicolaou, 400x.

## 5.5 - COMPARAÇÃO ENTRE A CITOLOGIA CONVENCIONAL E EM MEIO LÍQUIDO

Para a comparação entre os dois métodos citológicos, foram analisados somente os resultados do Grupo 4 (coleta pareada), do qual fizeram parte 117 pacientes.

Em relação à representação de células da JEC de todos os esfregaços examinados, notou-se que, em esfregaços convencionais, 95,4% apresentavam amostra satisfatória, 4% das amostras estavam sem representação das células da JEC e 0,6% foram consideradas insatisfatórias. Nos esfregaços da CML, 95,2% tinham amostra satisfatória, 3,6% estavam sem representação das células da JEC e 1,2% das amostras foram consideradas insatisfatórias.

A TAB. 10 sumariza os resultados da concordância entre CC e a CML destas pacientes. Como pode ser observado, os dois métodos citológicos mostraram uma concordância de 89,7% (105/117 pacientes) para as cinco categorias diagnósticas (FIG. 6 e 7).

TABELA 10 - Comparação entre a citologia convencional e a em meio líquido

Citologia convencional	Citologia em meio líquido											
	NEG		ASCUS		LBG		LAG		Ca		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
NEG	89	94,7	3	3,2	2	2,1	-	-	-	-	94	80,3
ASCUS	-	-	2	40	2	40	1	20	-	-	5	4,3
LBG	-	-	1	8,3	9	75	2	16	-	-	12	10,3
LAG	-	-	-	-	-	-	4	80	1	20	5	4,3
Ca	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1	0,8
Total	89	76,1	6	5,1	13	11,1	7	6	2	1,7	117	100

■ Concordância entre os diagnósticos dos métodos citológicos

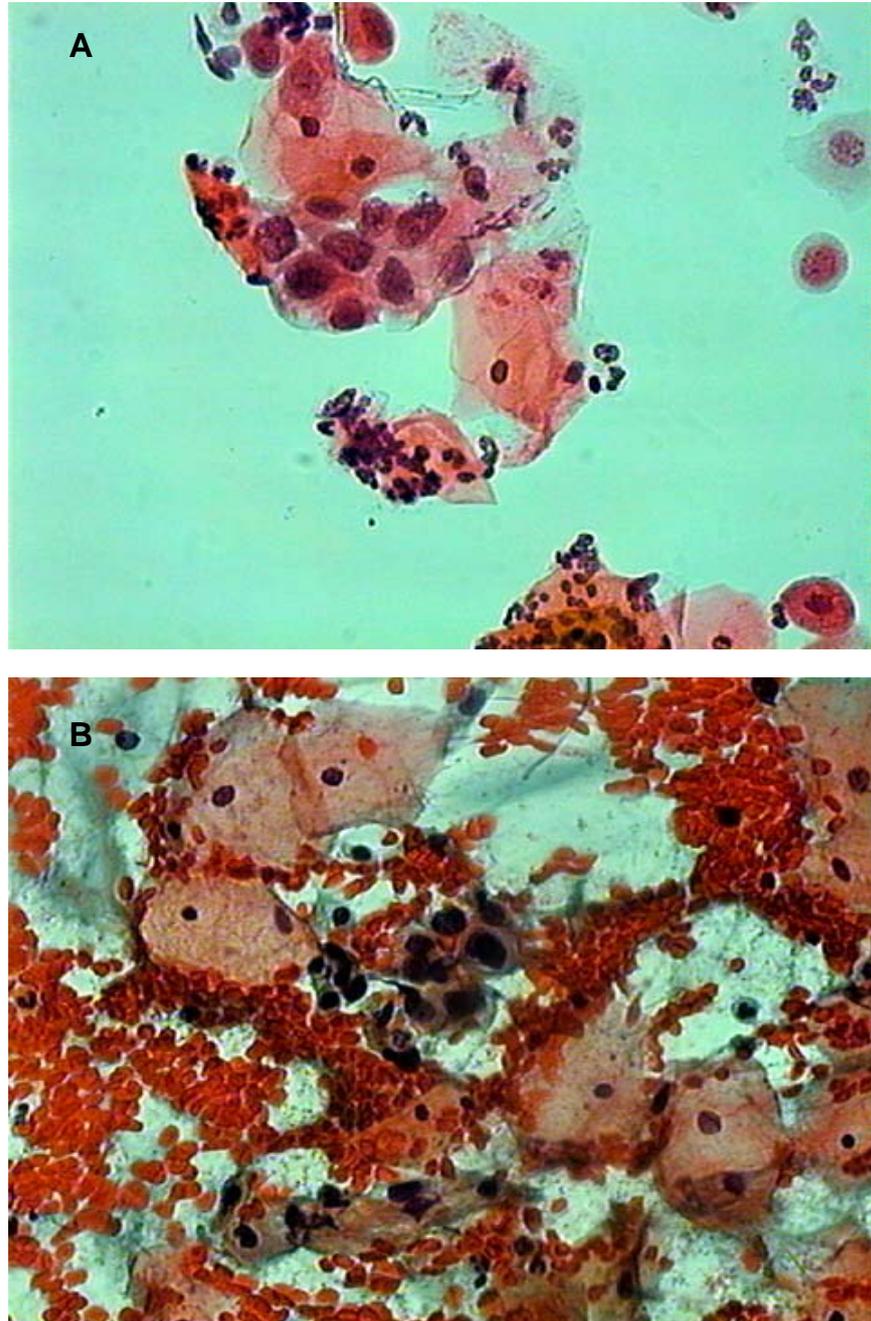


FIGURA 6: Fotomicrografia de esfregaço cervical com lesão escamosa intraepitelial de alto grau (casos concordantes). A: citologia em meio líquido; B: citologia convencional. Coloração de Papanicolaou, 400x.

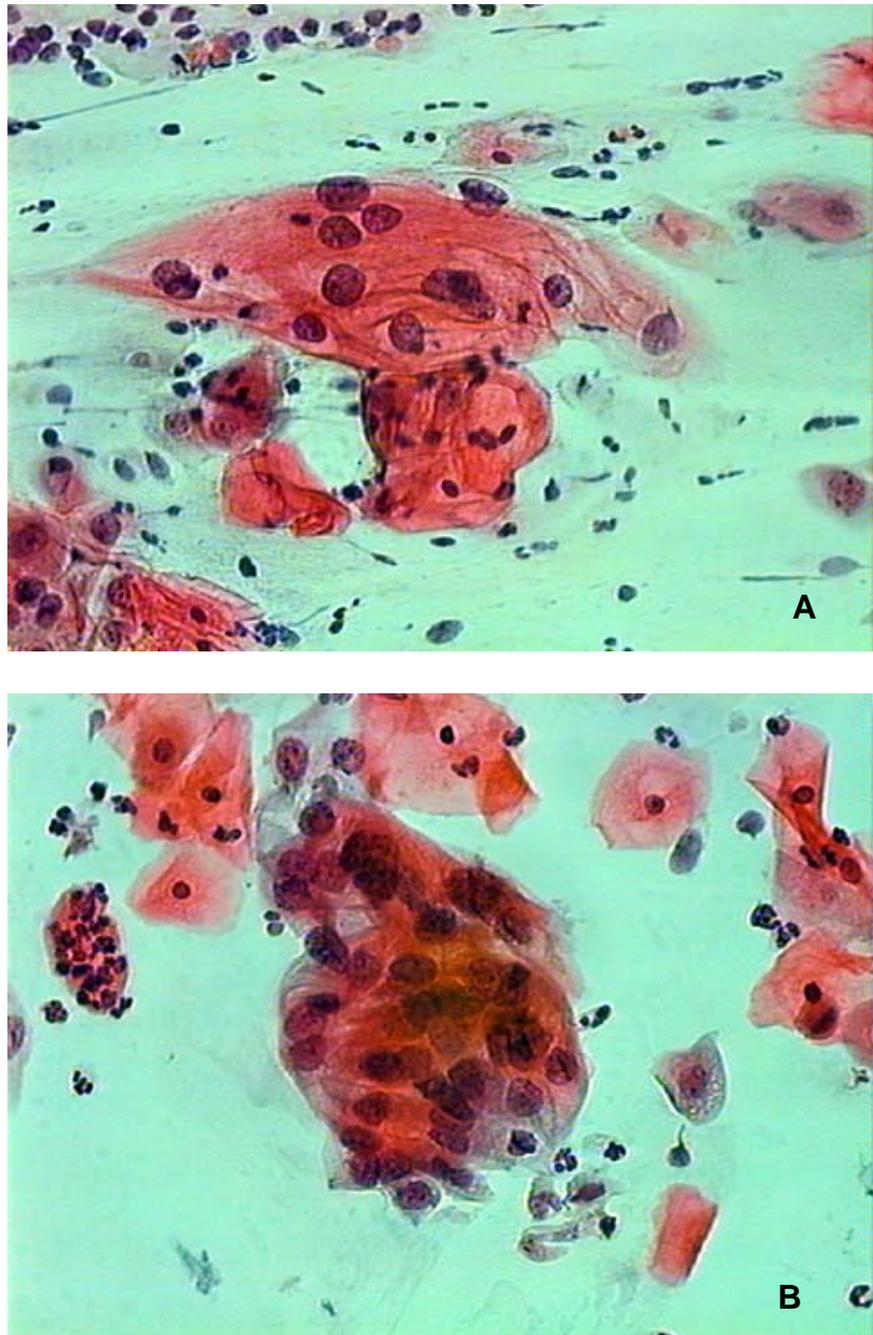


FIGURA 7: Fotomicrografia de esfregaço cervical (casos discordantes). A: lesão escamosa intraepitelial de baixo grau, citologia convencional; B: lesão escamosa intraepitelial de alto grau, citologia em meio líquido. Coloração de Papanicolaou, 400x.

Considerando somente os casos nos quais o diagnóstico citológico foi positivo, a CML teve maior capacidade de diagnosticar estes casos (28/117, 23,9%) que a CC (23/117, 19,7%). Com a realização do teste estatístico, pode-se observar que o valor do Kappa ponderado foi de 0,9035. Segundo a classificação sugerida na TAB. 11, conclui-se que a CC e a CML possuem uma concordância quase perfeita.

TABELA 11 - Classificação do coeficiente de Kappa \*

Coeficiente de Kappa	Força de concordância
< 0,00	Pobre
0,00 - 0,20	Pequena
0,21 - 0,40	Razoável
0,41 - 0,60	Moderada
0,61 - 0,80	Substancial
0,81 - 1,00	Quase perfeita

\* Classificação como referência para a descrição do grau de concordância entre informações medido pelo coeficiente de Kappa (LANDIS & KOCH; 1977; WANG et al., 1994).

A CML detectou 18,7% de lesões escamosas intraepiteliais e invasoras, ao passo que, na convencional, o índice de detecção foi mais baixo (15,6%). A CML detectou 39% a mais de LAG e 112% a mais de carcinomas (TAB. 12).

TABELA 12 - Correlação entre os diagnósticos da CML e CC

Diagnósticos	CML	CC
NEG	76,1%	80,3%
ASCUS	5,1%	4,3%
LBG	11,1%	10,3%
LAG	6,0%	4,3%
Carcinoma	1,7%	0,8%

Relação ASCUS/LEI	0,32	0,29
-------------------	------	------

A TAB. 13 mostra a positividade da PCR em cada categoria diagnosticada pelos dois métodos citológicos. A PCR foi positiva em 30 (25,7%) das 117 pacientes, sendo a infecção por HPV detectada em todos os casos de carcinoma e entre 40-60% dos casos de LAG. Dos quatro casos com PCR positiva e resultado citopatológico de ASCUS na CC, um mostrou a presença de SNC (discreta leve) para infecção por HPV. Na CML, dos dois casos de ASCUS positivos para a presença do HPV, um apresentou SNC.

TABELA 13 – Correlação entre a positividade para HPV e os diagnósticos citológicos da CML e CC

Diagnóstico	Citologia Convencional	% PCR-HPV Positiva	Citologia em meio líquido	% PCR-HPV Positiva
Negativo	94	17 (18,1%)	89	16 (18,0%)
ASCUS	5	4 (80,0%)	6	2 (33,3%)
LBG	12	5 (41,7%)	13	7 (53,8%)
LAG	5	3 (60,0%)	7	3 (42,9%)
Ca invasor	1	1 (100%)	2	2 (100%)

A TAB. 14 demonstra os dados comparativos entre a CC e a PCR para HPV. Pode-se observar que, do total de 157 pacientes, somente 29 (18,5%) foram positivas na CC, enquanto que o método molecular teve a capacidade de detectar a presença do HPV em 37 (23,6%) pacientes.

TABELA 14 - Comparação entre os resultados da CC e PCR para HPV

Citologia convencional	PCR		TOTAL			
	Negativa	Positiva	n	%		
Negativa	n	%	n	%	n	%
Negativa	107	83,6	21	16,4	128	81,5
Positiva	13	44,8	16	55,2	29	18,5

TOTAL	120	76,4	37	23,6	157	100
-------	-----	------	----	------	-----	-----

Na TAB. 15, encontram-se apresentados os resultados da CML e da PCR. Para a CML, a análise foi feita de um total de 134 pacientes pertencentes aos grupos 2 e 4 da MOV e do CTDST. Das 134 pacientes, 30 (22,4%) foram positivas na CML; entretanto, a PCR foi positiva em um maior número de pacientes: 38 (28,4%).

TABELA 15 - Comparação entre os resultados da CML e PCR para HPV

Citologia em meio líquido	PCR					
	Negativa		Positiva		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
Negativa	82	78,8	22	21,2	104	77,6
Positiva	14	46,7	16	53,3	30	22,4
TOTAL	96	71,6	38	28,4	134	100

Conforme relatado no item Material e Métodos, foi possível recuperar os diagnósticos histopatológicos de parte das pacientes atendidas na MOV. A TAB. 16 mostra a correlação dos resultados da CC e da biópsia de 77 pacientes. A concordância para as cinco categorias diagnósticas foi de 36/77 (46,7%) e o Coeficiente de Kappa Ponderado foi igual a 0,3145. De acordo com a tabela sugerida anteriormente, esta concordância é razoável. A sensibilidade encontrada para a CC foi de 34,8%, especificidade de 90,3%, valor preditivo positivo (VPP) de 84,2% e valor preditivo negativo (VPN) de 48,3%. Detectou-se 9,7% (3/31) de casos FP e 51,7% de FN (30/58).

TABELA 16 - Comparação entre CC e o diagnóstico histopatológico

Citologia convencional	Diagnóstico Histopatológico									
	NEG		ASCUS		LBG		LAG		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
NEG	28	48,3	1	1,7	22	37,9	7	12,1	58	75,3
ASCUS	-	-	-	-	2	66,7	1	33,3	3	3,8
LBG	2	28,6	-	-	2	28,6	3	42,8	7	9,1
LAG	1	12,5	-	-	1	12,5	6	75	8	10,3
Carcinoma	-	-	-	-	-	-	1	100	1	1,5
Total	31	40,3	1	1,5	27	35,1	18	23,1	77	100

A TAB. 17 mostra os dados da CML e da biópsia de 59 pacientes. Foi observada uma concordância de 52,2% (35/67 pacientes) para as cinco categorias diagnósticas. O Coeficiente de Kappa ponderado encontrado foi de 0,3959, indicando que existe uma concordância razoável entre o diagnóstico histopatológico e a citologia em meio líquido. A sensibilidade encontrada foi de 45,7%, especificidade, 87,5%; VPP, 84,2% e VPN, 52,5%. Pode-se observar uma taxa menor de casos falso-negativos (47,5%, 19/40) e maior de falso-positivos (12,5%) em relação à CC.

TABELA 17 - Comparação entre a CML e o diagnóstico histopatológico

CML	Diagnóstico Histopatológico									
	NEG		ASCUS		LBG		LAG		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
NEG	21	52,5	1	2,5	13	32,5	5	12,5	40	67,8
ASCUS	1	25	-	-	2	50	1	25	4	6,8
LBG	1	16,7	-	-	2	33,3	3	50	6	10,2
LAG	1	14,3	-	-	2	28,6	4	57,1	7	11,9
Carcinoma	-	-	-	-	-	-	2	100	2	3,3
Total	24	40,7	1	1,7	19	32,8	15	24,8	59	100



## **6 – DISCUSSÃO**

O objetivo principal deste trabalho foi verificar a acurácia da CC e da CML na identificação de pacientes portadoras de LEI e invasoras do colo uterino, e a correlação destes achados com os resultados da PCR para a infecção do HPV. Inicialmente, a coleta das amostras foi feita de forma separada (um grupo de pacientes para cada tipo de citologia). Entretanto, foi observado que havia um número reduzido de pacientes, o que prejudicaria a finalização do mesmo no tempo previsto. Portanto, iniciou-se a coleta de um outro grupo (4), no qual as amostras da CC e da CML foram coletadas em um mesmo momento (amostras pareadas).

Estas duas formas de coleta são descritas na literatura para análise comparativa dos métodos citológicos. BERNSTEIN *et al.* (2001), em um estudo do tipo metanálise, comparam os dois tipos de coleta (amostra separada ou pareada). O estudo do tipo *split-sample* (pareado) tem sido considerado um método de análise aceitável, pois alguns trabalhos mostram que mais de 80% das células coletadas permanecem na *cytobrush*, mesmo após a preparação do esfregaço convencional. Os autores relatam que o estudo do tipo *direct-to-vial* (amostras separadas) também é eficiente, desde que as amostras de CC e CML sejam coletadas de uma mesma população, mesmo que em pacientes diferentes. Entretanto, o fato de se colocar a *cytobrush*, logo após a coleta, diretamente na solução que preserva as células (ao invés de se esgotar o restante do material, como feito em amostras pareadas), leva a uma diferença significativa na porcentagem de amostras consideradas adequadas para avaliação.

O modo de coleta do presente trabalho é diferente do descrito por outros autores, pois para a CC, coletava-se com uma escova e esta depois era descartada; logo após, coletava-se para a CML com a escova pertencente ao seu *kit*.

## 6.1 - DADOS CLÍNICOS

É bem estabelecido o papel do HPV na gênese do câncer cervical. Entretanto, somente a infecção pelo HPV não é suficiente para causar o câncer de colo uterino; outros fatores podem coexistir levando ao risco de progressão de uma infecção para o carcinoma invasor.

No presente trabalho, avaliou-se os dados clínicos de 174 pacientes, procurando-se identificar possíveis fatores epidemiológicos associados à infecção pelo HPV na população estudada. São bem conhecidos os fatores de risco sexuais e reprodutivos associados à infecção por HPV e câncer de colo uterino, especialmente o início precoce da atividade sexual, o número de parceiros e a multiparidade (FINAN *et al.*, 2001; CASTELLSAGUÉ & MUÑOZ, 2003; NONNENMACHER *et al.*, 2003).

Considerando as pacientes atendidas nos dois Serviços em conjunto verificou-se, embora estatisticamente não significativo, maior positividade para HPV em pacientes com maior número de parceiros sexuais e com início precoce da atividade sexual, semelhante ao relatado por outros autores (COSTE *et al.*, 2003; SIERRA-TORRES *et al.*, 2003).

Em relação à paridade, pode-se observar que, ao compilar os dados das pacientes dos dois Serviços, a frequência de positividade para o HPV foi maior naquelas pacientes com menor número de partos (zero a quatro partos), diferentemente de outros achados da literatura. Em um estudo realizado pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*), a probabilidade para o desenvolvimento de câncer cervical em mulheres com sete partos ou mais foi quatro vezes maior que em pacientes nulíparas, indicando uma possível associação entre a paridade e a infecção pelo HPV (CASTELLSAGUÉ & MUÑOZ, 2003). No entanto, NONNENMACHER *et al.* (2003) verificaram maior positividade de HPV por método molecular em pacientes nulíparas, detectando associação estatisticamente significativa entre a paridade e a infecção por HPV.

A relação entre o uso de AO e o desenvolvimento de neoplasias cervicais ainda é alvo de discussão entre pesquisadores. No mesmo estudo da IARC (CASTELLSAGUÉ & MUÑOZ, 2003), relata-se uma associação moderada entre o uso de AO e risco de câncer (*odds ratio* = 1,4) e portanto, uma maior incidência de HPV em usuárias de AO. No presente estudo, a infecção pelo HPV foi mais freqüente nas pacientes usuárias de AO de ambos os Serviços. Porém, não foi observada associação significativa entre o uso de AO e presença do HPV. É possível que a maior prevalência do vírus esteja relacionada a uma maior freqüência do *screening* das pacientes usuárias de AO.

Dentre os fatores epidemiológicos pesquisados, o único que mostrou associação significativa com a infecção por HPV foi o hábito de fumar, em

consonância com os achados descritos na literatura. FINAN *et al.* (2001) relatam uma positividade para o HPV de 56,4% para as pacientes que fumam. No Brasil, em estudo realizado por DERCHAIN *et al.* (1995), identificou-se o hábito de fumar como fator de risco independente para o desenvolvimento de NIC 1 e condiloma cervical em adolescentes. Em estudo posterior deste mesmo grupo de pesquisadores (ROTELI-MARTINS *et al.*, 1998), constatou-se que o fumo e a detecção do DNA de HPV de alto risco estavam significativamente associados a NIC 2 e 3, com uma incidência 6,6 vezes maior em mulheres fumantes quando comparadas a não fumantes.

Quanto à idade das pacientes, nota-se maior frequência de positividade para HPV nos pólos opostos das faixas etárias consideradas: pacientes mais jovens e mais velhas. Apesar da infecção por HPV ser mais prevalente em pacientes jovens (NONNENMACHER *et al.*, 2003; SIERRA-TORRES *et al.*, 2003), a positividade encontrada nos pólos opostos provavelmente reflete a diferença nas características dos dois Serviços. O CTDST é um centro que atua na prevenção e tratamento de DSTs, sendo procurado predominantemente por pacientes mais jovens, enquanto que a MOV possui um serviço específico de propeidêutica do colo uterino, que atende pacientes cerca de 10 anos mais velhas que no CTDST.

NONNENMACHER *et al.* (2003), em um estudo transversal realizado com 975 pacientes brasileiras entre 15 e 70 anos, detectaram maior frequência de HPV através do método molecular em mulheres com idade abaixo de 24 anos. Em um trabalho de revisão realizado por SCHIFFMANN & CASTLE (2003), é relatado que, nos Estados Unidos e Leste Europeu, a prevalência da infecção diminui bruscamente e atinge níveis bem baixos por volta dos 50 anos. Porém, em outros países, como na Costa Rica, não se percebe esta diminuição da prevalência do HPV com a idade; ao invés disso, a curva aumenta ou não declina substancialmente. Portanto, a variação no padrão das idades é importante na estratégia de *screening* de cada Serviço. Investigações semelhantes a do presente estudo, porém em diferentes serviços, contribuiriam para a determinação da prevalência da infecção por HPV de acordo com a faixa etária na nossa região, uma vez que estes dados ainda não são disponíveis.

## 6.2 - ACHADOS CLÍNICO-COLPOSCÓPICOS

Foram encontrados achados colposcópicos normais em 43 (39,5%) pacientes. Em 60 (55,1%) pacientes foram relatados achados anormais. Das 23 pacientes com resultado molecular positivo para o HPV, 6 (26,1%) apresentaram ZTT, ao passo que as outras 17 (73,9%) pacientes tinham achados colposcópicos anormais. Valores próximos foram relatados por SCHNEIDER *et al.* (1988). Em um estudo com 150 casos positivos para o HPV por técnicas de hibridação molecular, 104 (70%) pacientes foram positivas na colposcopia e 46 (30%), negativas.

Por outro lado, verificou-se no presente trabalho que, dentre as 82 pacientes com resultado negativo para a presença do vírus, 43 (52%) tinham uma zona de transformação atípica. Segundo BASU *et al.* (2003), uma das maiores limitações da colposcopia é a sua baixa especificidade. As áreas acetobranças devidas à presença de metaplasia escamosa imatura e lesões inflamatórias parecem ser as responsáveis pelo grande número de achados FP.

REID *et al.* (1984) avaliaram as possíveis causas de discrepância entre a avaliação colposcópica e o exame histopatológico. A primeira está relacionada a erros inerentes à técnica, em que algumas lesões não apresentam padrões específicos para permitir uma identificação colposcópica (lesões muito pequenas e/ou localizadas em locais de difícil visualização). A outra causa pode ser devida a erros relacionados com a experiência do colposcopista e do patologista, no momento de interpretação de uma lesão, em que o colposcopista pode, por exemplo, não diferenciar uma metaplasia escamosa imatura de uma LEI.

No presente trabalho, observou-se que 26,1% dos resultados colposcópicos eram FN. Estes resultados podem ser devidos a problemas na colposcopia ou também a infecções latentes. Em relação à colposcopia, sua principal desvantagem é a incapacidade de detectar lesões na endocérvice. As lesões precursoras que ocorrem nas pacientes em idade reprodutiva estão localizadas principalmente no ectocérvice e são facilmente detectadas pela colposcopia, ao contrário do que ocorre em pacientes na menopausa. Alguns estudos em pacientes sem infecção demonstrável na colposcopia evidenciaram a presença de HPV 16 e 18 por técnicas moleculares em 3 a 43% dos casos, embora não seja clara por este estudo como foi diagnosticada a normalidade ou a ausência da infecção pelo HPV (WRIGHT &

RICHART, 1990). CAMPION (1987), todavia, relata que 48% das mulheres de uma clínica para DST eram positivas para o HPV, mesmo apresentando citologia e colposcopia negativas.

Ao exame clínico, condiloma acuminado da região perianal e/ou vulvar foi observado em 27 pacientes (uma da MOV e 26 do CTDST), das quais 55,5% foram positivas para HPV à PCR em amostras colhidas do colo uterino. BROWN *et al.* (1993), ao analisar a presença do HPV por técnicas moleculares em mulheres com condiloma, detectou uma positividade de 97%. Entretanto, pode-se inferir que esta diferença de positividade deve-se ao fato de que, no presente trabalho, a amostra analisada era coletada no colo do útero, ao passo que, naquele outro estudo, a análise era feita a partir de biópsia do próprio condiloma.

Outro fato a se analisar é a diferença da presença de condiloma acuminado entre as pacientes dos dois Serviços. No CTDST, quase a metade das pacientes tinha condiloma e na MOV, este achado somente foi relatado em uma paciente. Este resultado já era esperado, devido às características inerentes a cada Serviço.

### **6.3 - ACHADOS CITOPATOLÓGICOS E MOLECULARES**

Os agentes específicos encontrados mais freqüentemente em ambos os serviços foram, respectivamente, a *Gardnerella vaginalis*, *Candida sp* e *Trichomonas vaginalis*. Estes achados foram mais freqüentes nas pacientes do CTDST, o que também seria esperado, uma vez que este Serviço atende prioritariamente mulheres com suspeita clínica de DST.

Em um trabalho realizado em Belo Horizonte para se verificar a ocorrência de agentes específicos em 100.000 exames citopatológicos de rotina, foi observado uma incidência muito parecida com a encontrada no CTDST: 18,15% de pacientes com *Gardnerella vaginalis*, 12,47% com *Candida sp* e 6,23% com *Trichomonas vaginalis* (TAFURI & RASO, 1991; RASO & TAFURI, 1992a; RASO & TAFURI, 1992b). No entanto, é descrita na literatura variação nas freqüências dos diferentes agentes específicos, de acordo com a idade da população estudada e da época em que ocorreu este estudo, podendo-se observar uma diminuição da freqüência da

infecção por TV e um aumento desta para *Candida sp*, especialmente na última década (ADAD *et al.*, 2001).

Considerando os dois Serviços, 79,2% das amostras citológicas foram negativas, 5,2% tiveram diagnóstico de ASCUS, 8,7% de LBG, 5,8% de LAG e 1,1% de carcinoma invasor. Casos de ASCUS e LBG foram mais freqüentes no CTDST, enquanto que LAG e carcinoma invasor foram detectados apenas na MOV. Ressalta-se, portanto, a diferença na freqüência das lesões encontradas em cada Serviço. Enquanto que nas pacientes atendidas no CTDST predominam as lesões de baixo grau e a presença de condiloma acuminado, na MOV, são mais freqüentes as lesões mais graves, sugerindo infecção persistente por HPV. Esta diferença pode ser explicada pelas características de cada Serviço. Pode-se ainda supor que, caso fosse feito a tipagem viral, diferenças significativas entre HPVs de alto e baixo risco poderiam ser encontradas entre os dois Serviços.

No total, 26% das pacientes apresentaram resultado molecular positivo para HPV. Este índice de positividade é menor do que o relatado por outros autores (NORONHA *et al.*, 1999; CAVALCANTI *et al.*, 2000; LORENZATO *et al.*, 2000; RABELO-SANTOS *et al.*, 2003). Estudos de prevalência da presença do HPV na mucosa cervical publicados recentemente têm demonstrado que esta depende não somente da população estudada e da técnica de diagnóstico utilizada em sua detecção, como também do tipo de espécime utilizado. Tem-se observado que a prevalência do vírus em amostras obtidas a partir de biópsia é até 50% maior do que aquelas de exsudato cervical (MUNOZ *et al.*, 1992). Por exemplo, pacientes adolescentes representam um grupo particularmente afetado. Em estudo realizado com 312 adolescentes (idade média de 16 anos), a prevalência de HPV cervical detectado por PCR foi de 64%. A maioria destas pacientes (51,6%) mostrou resultados citopatológicos normais, apesar da positividade para HPV (TARKOWSKI *et al.*, 2004).

No Brasil, estudos realizados em serviços de rastreamento de câncer do colo uterino têm mostrado uma prevalência da infecção por HPV de cerca de 15 a 27% detectada por CH ou PCR (NONNENMACHER *et al.*, 2002; LIMA SOARES *et al.*, 2003). Em pacientes com câncer cervical, o encontro de DNA-HPV tem variado entre 55,2% a 91%, na dependência do método e material utilizados (ELUF-NETO *et al.*, 1994; BOSCH *et al.*, 1995; GONÇALVES *et al.*, 1999; NORONHA *et al.*, 1999; CAVALCANTI *et al.*, 2000; LORENZATO *et al.*, 2000).

Na cidade de Goiânia, RABELO-SANTOS *et al.* (2003) detectaram uma prevalência de 76% de HPV em biópsias com diagnóstico de NIC 3 e carcinoma invasivo. Em Recife, LORENZATO *et al.* (2000) observaram que 44,7% das amostras testadas (incluindo casos negativos e positivos) apresentaram DNA-HPV detectado através de PCR em amostras cervicais coletadas em tampão fosfato. No Rio de Janeiro, CAVALCANTI *et al.* (2000) verificaram uma prevalência de 66,7% de HPV detectado por ISH em material de biópsias negativas e positivas. Em Belém, NORONHA *et al.* (1999) também detectaram 65,8% de HPV em biópsias positivas e negativas através das técnicas de PCR e hibridação por *dot-blot*.

CAMARA *et al.* (2003), no Distrito Federal, pesquisando HPV apenas em pacientes com diagnóstico citológico de neoplasias invasoras, LEI e com ASCUS/AGUS através da técnica de PCR em amostras cervicais coletadas em tampão, detectou uma prevalência de 62%. No presente trabalho, apesar da utilização do mesmo método molecular, a positividade para HPV variou de 21,1% a 35,4%, na MOV e CTDST, respectivamente. PEYTON *et al.* (1998), em um estudo realizado com um grupo de 208 pacientes com história pregressa ou não de LEI, obtiveram uma prevalência de 24,5%, por PCR. Este dado se aproxima do obtido no presente trabalho e, mais importante, aplicando técnicas de diagnóstico e população estudada muito parecidas.

CARRILLO *et al.* (2004), em uma primeira análise, encontraram que 37,6% dos casos foram positivos na amplificação com os oligonucleotídeos MY09/11, em amostras de raspado cervical. Com o propósito de aumentar a capacidade de detecção do HPV, nas amostras previamente negativas com os oligonucleotídeos MY09/11, decidiu-se empregar outros dois conjuntos de oligonucleotídeos universais (GP5/GP6 e L1C1/L2C2), que amplificam diferentes fragmentos da região L1 do HPV. Foi observado que o uso de mais de um par de oligonucleotídeos universais aumentam a margem de detecção para este vírus. No total, em 60,4% das amostras foi detectado o DNA de algum tipo de HPV. Dado que os oligonucleotídeos MY09/11 têm se mostrado muito úteis em outros estudos, não se descarta que a baixa eficiência obtida se deve a problemas técnicos. Os resultados de CARRILLO *et al.* (2004) mostram que os oligonucleotídeos LC1/2 e GP5/6 puderam ser mais eficientes que MY09/11 na amplificação de um material que não se encontra em um estado total de pureza. Por outro lado, sabe-se que em um DNA fragmentado, os fragmentos pequenos se amplificam melhor que os grandes. Os oligonucleotídeos

MY09/11 amplifica fragmentos de 450 pb, ao passo que LC1/2 amplifica 250 pb e GP5/6 150 pb, o que os faria mais eficientes nestas condições. Com estes achados, sugere-se que o uso dos três pares de oligonucleotídeos universais aumentaria indiscutivelmente a detecção do DNA do HPV em diferentes amostras do colo uterino.

Estudos recentes têm sugerido algumas possibilidades para explicar a ocorrência de resultados FN, principalmente em LAG e carcinoma invasor. A integração linear do genoma circular do HPV no cromossomo da célula hospedeira pode afetar a região-alvo da PCR. Apesar de o alvo preferencial de ruptura ser a região E2, em alguns casos as seqüências dos oligonucleotídeos podem coincidir com as regiões interrompidas da região L1 e afetar a detecção do HPV. De acordo com WALBOOMERS *et al.* (1999), a ocorrência de resultados FN é devida aos eventos de integração afetando as seqüências L1 que ocorrem em diferentes tipos de HPV. Outro fator, apesar de raro, corresponde aos genótipos que demonstram menor eficiência de amplificação, que não são detectados pelos oligonucleotídeos atualmente usados.

Dentre as pacientes com resultado citológico positivo, 52,7% foram positivas para a presença do HPV na PCR. A presença do HPV foi detectada em todos os diagnósticos de carcinoma invasor e em torno de metade dos casos de ASCUS, LBG e LAG, havendo associação estatisticamente significativa entre os diagnósticos molecular e citológico, confirmando os resultados obtidos para os dois serviços separadamente.

Em um estudo realizado por MUNOZ *et al.* (2003), o DNA do HPV foi detectado, através de PCR, em 90,7% de pacientes com câncer cervical. Em cerca de 50% a 70% das pacientes com diagnóstico de LBG e LAG se detecta a presença do HPV, enquanto que a positividade em pacientes sem anormalidades epiteliais cervicais é de aproximadamente 5% a 20% (KOUTSKY, 1997; CUSCHIERI, 2004; ROSENBLATT *et al.*, 2004).

**CARRILLO *et al.* (2004) encontraram resultados semelhantes com os do presente trabalho, exceto nas LAG. Entre as pacientes com resultado molecular positivo, 23,1% tinham citologia negativa para anormalidades epiteliais, 66,7% tiveram diagnóstico de LBG, 91,6% com LAG e 95,5% com carcinoma invasor. Estas diferenças também foram altamente significativas (*p***

= 0,0001). Quando se verificou a positividade total de HPV, 83,8% das pacientes apresentaram anormalidades epiteliais.

Outros autores, como NONNENMACHER *et al.* (2002) relatam uma positividade para o HPV nos casos de ASCUS bem menor (26,8%) do que a encontrada neste trabalho (55%, em média); em contrapartida, a porcentagem para a presença do vírus no diagnóstico de LAG foi relativamente próxima (50,0%).

Anormalidades citológicas foram observadas também em pacientes HPV negativas, embora em menor proporção, em 14,1% das pacientes da MOV, 11,6% no CTDST e em 13,3% das pacientes, considerando os dois Serviços. Quatro (23,5%) dessas pacientes nos dois Serviços tiveram diagnóstico de ASCUS, podendo-se supor que provavelmente estas pacientes representaram resultados FP na citologia.

Por outro lado, detectou-se casos de pacientes positivas para HPV à PCR e negativas na citologia, sendo 47,8% das pacientes da MOV, 68,2% no CTDST e em 57,7% das pacientes no conjunto. Estes índices são superiores aos 5% a 20% relatados na literatura (KOUTSKY, 1997; CUSCHIERI, 2004; ROSENBLATT *et al.*, 2004), e poderiam ser decorrentes tanto de casos FN como de casos de infecção latente, em que não são visualizados os efeitos citopáticos do HPV.

As altas taxas de resultados FN na citologia foi anteriormente observada em vários trabalhos. KOSS (1993) descreve que a causa de erro mais provável relaciona-se ao processo de *screening*. A monotonia deste tipo de trabalho e a fadiga poderiam explicar sua deficiência. O autor divide estes erros em dois grupos: erros de omissão e erros relativamente incomuns de interpretação inadequada das evidências citológicas. Estes últimos podem ser advindos da inexperiência de certos citologistas na leitura do esfregaço e do tipo de lesão presente. Outras causas de falhas deste método são decorrentes de erros na amostragem celular, fixação inadequada do material e informes clínicos insuficientes. (PAIRWUTI, 1991; GUIMARÃES & SILVA, 1995; WANG *et al.*, 1997). Segundo FRANCO *et al.* (2001), aproximadamente metade das amostras coletadas produzem resultados FN; um terço destes resultados são devidos a erros de interpretação e dois terços, a pequena amostragem celular e preparação do esfregaço.

Além disso, sabe-se que a citologia é um método no qual o diagnóstico é um tanto subjetivo, havendo variação inter e intraobservador importante no diagnóstico citopatológico, principalmente nas LBG (JOSTE *et al.*, 1996). Cinco patologistas revisaram 200 esfregaços diagnosticados originalmente como ASCUS e seus resultados foram correlacionados com a detecção do HPV por métodos moleculares. Entretanto, a concordância dos diagnósticos citológicos entre os observadores atingiu somente 29% dos esfregaços. Por outro lado, todos os esfregaços diagnosticados unanimemente como LEI foram associados com a presença do DNA do HPV, principalmente os de alto risco, levando a pensar na utilização do teste de HPV no controle de qualidade na citologia (SHERMAN *et al.*, 1994).

A presença de SNC para a infecção por HPV foi detectada em 17 casos, dos quais 10 foram positivos à PCR e sete negativos. O número de casos de infecção pelo HPV detectados através do exame citológico ainda é pequeno, gerando vários resultados FN (PAIWURTI, 1990). No entanto, segundo alguns autores (SCHNEIDER *et al.*, 1987; CAVALCANTI *et al.*, 1997), o reconhecimento dos SNC nos esfregaços poderia aumentar o número de casos de infecção pelo HPV diagnosticado pela citologia. Isto seria muito importante, uma vez que tem sido verificado um número considerável de esfregaços negativos em pacientes com alterações clínicas sugestivas da infecção pelo vírus, cujo diagnóstico é confirmado através de outros métodos, como por exemplo, a biópsia e as técnicas moleculares.

Entre os SNC, a presença de disceratose leve e bi ou multinucleação foram os sinais mais freqüentes observados nos casos positivos à PCR, enquanto que a coilocitose leve foi igualmente observada em amostras positivas e negativas. CRAMER *et al.* (1997) mostraram que a bi ou multinucleação estavam associados à infecção por HPVs de alto risco, estando presente em 62,8% dos esfregaços que apresentavam diagnóstico de DNA-HPV (alto-risco) positivo por técnicas de ISH. Por outro lado, CAVALCANTI *et al.* (1997) encontraram forte associação entre coilocitose leve e HPVs de baixo risco. Este sinal esteve presente em 27,3% dos esfregaços que eram positivos pelo método molecular. Já a disceratose leve esteve relacionada com a infecção pelo HPV de maneira geral, estando presente em 38,1% dos esfregaços positivos para infecção pelo HPV.

## 6.4 – COMPARAÇÃO ENTRE A CC E CML

Em relação à representação de células da JEC de todos os esfregaços examinados, notou-se que as amostras foram igualmente satisfatórias nos dois métodos citológicos (95,4% no convencional *versus* 95,2 na CML). Em 4% dos esfregaços convencionais não havia representação das células da JEC, enquanto que na CML este índice foi de 3,6%. Por outro lado, amostras insatisfatórias foram mais freqüentes na CML que na CC (1,2% *versus* 0,6%).

A adequação de amostras coletadas para a CML foi estudada por vários autores. Houve uma variação de 80 a 98% de amostras satisfatórias, quando se realizava a coleta em pacientes diferentes e aproximadamente 75% de espécimes satisfatórios no estudo do tipo *split-sample*. Entretanto, muitos estudos relatam que na CML existe um maior número de casos de amostras sem representação da JEC, ao contrário do encontrado no presente trabalho (LEE *et al.*, 1997; BOLICK & HELLMAN, 1998; PAPILO *et al.*, 1998; DIAZ-ROSARIO & KABAWAT, 1999; GUIDOS & SELVAGGI, 1999; WEINTRAUB & MORABIA, 2000).

Comparações dos índices de casos insatisfatórios têm variado, com alguns trabalhos relatando aumento da taxa na CML, em outros, diminuição, e ainda, casos em que não houve diferença entre os dois métodos (BOLICK & HELLMAN, 1998; CARPENTER & DAVEY, 1999; GUIDOS & SELVAGGI, 1999). A maioria dos casos relatados como insatisfatórios ocorreu principalmente nas amostras da MOV e resultaram de intensa hemorragia, a qual impossibilitava a análise citológica. De acordo com o relato dos médicos ginecologistas deste Serviço, é comum a presença de ectrópios extensos nas pacientes que são encaminhadas ao setor, favorecendo o sangramento com facilidade no momento da coleta. Na nossa experiência, o grande número de hemácias presente em esfregaços confeccionados a partir da CML prejudica mais intensamente a análise citológica do que quando observada na CC.

A concordância entre os dois métodos citológicos foi de 89,7%, com valores de Kappa indicando uma concordância quase perfeita, semelhante ao relatado em outros estudos, com índices de 85,8 % e 89% (HUTCHINSON *et al.*, 1999; ABULAFIA *et al.*, 2003). A CML detectou proporcionalmente mais LEI e invasoras do que a CC (18,7% *versus* 15,6%), resultando em um aumento de quase 20%. Esta

diferença foi mais evidente nos casos diagnosticados como LAG e carcinoma invasor, que resultaram em aumento de 39% de LAG e 112% de carcinomas.

O aumento na detecção de LEI é um achado comum em estudos sobre CML, sendo esta constatação a principal responsável pela implementação da CML em vários serviços. Aumentos de 12%, 41%, 52,2%, 65%, 75,1% e 279% têm sido relatados (LEE *et al.*, 1997; ROBERTS *et al.*, 1997; PAPILLO *et al.*, 1998; BOLICK & HELLMAN, 1998; DUPREE *et al.*, 1998; DIAZ-ROSÁRIO & KABAWAT, 1999).

DIAZ-ROSÁRIO & KABAWAT (1999) relataram que a CML detectou 71,65% e 102,54% mais casos de LAG e LBG, respectivamente. Por outro lado, a detecção de carcinoma diminuiu 26,14%, quando comparada à CC. Embora vários autores relatem um aumento significativo na detecção de LBG através da CML, um estudo de metanálise desenvolvido por BERNSTEIN *et al.* (2001) indica que a CML proporciona, em relação à CC, melhores índices de detecção tanto de LBG como de LAG.

Estes índices são variáveis de acordo com a amostra estudada, se oriundas de pacientes de centros de alto ou baixo índice de detecção de LEI, por exemplo, se de centros hospitalares, com população de alto risco, ou de centros de rastreamento de câncer cervical, com população de baixo risco. Ao que parece, a CML proporciona aumento significativo de LEI em população de baixo risco, ao passo que são modestos os aumentos verificados nos centros hospitalares (HUTCHINSON *et al.*, 1992). É possível que o aumento da detecção na CML, principalmente nos casos de LAG e carcinoma invasor, tenha refletido as características das pacientes da MOV, já que no CTDST não foram observados nenhum diagnóstico de LAG e carcinoma invasor.

Outro aspecto que deve-se considerar em relação aos resultados obtidos, quando comparados com a maioria dos estudos disponíveis na literatura, relaciona-se ao tipo de CML utilizada. Enquanto que o Sistema DNA-CITOLIQ<sup>®</sup> foi utilizado no presente trabalho, a maioria dos trabalhos consultados usaram o TP. ALVES *et al.* (2004), ao compararem estes dois sistemas, relataram algumas diferenças em suas características morfológicas. Uma distribuição uniforme foi freqüentemente observada na maioria das amostras do TP e não no DNA-CITOLIQ<sup>®</sup>. Os artefatos não estavam presentes nas amostras do DNA-CITOLIQ<sup>®</sup> e eram raros no TP. Células superpostas foram encontradas em 31,42% dos casos do TP, ao passo que,

no DNA-CITOLIQ<sup>®</sup>, esta porcentagem foi maior (68%). A presença de infiltrado inflamatório foi relatada nos dois sistemas, porém, foi mais freqüente no DNA-CITOLIQ<sup>®</sup>.

Muitos trabalhos têm relatado uma diminuição da relação ASCUS/NIC na CML. DIAZ-ROSÁRIO & KABAWAT (1999) encontraram uma diminuição de 2,07 na CC para 1,26 na CML (39,1%). GUIDOS & SELVAGGI (1999) relatam um aumento de 70% na detecção dos casos de ASCUS na CML, porém, a relação ASCUS/NIC para o meio líquido (0,73%) foi 54% menor que na CC (1,57%). Entretanto, no presente estudo esta relação foi 10,3% maior na CML do que na CC. Apesar de ter sido diagnosticado mais casos de LBG na CML, a relação ASCUS/NIC 1 não diminuiu. Tanto na CML quanto na CC, a relação ASCUS/NIC foi relativamente menor do que a relatada por COSTA & FERNANDES (2003) em um estudo realizado em Minas Gerais, no qual esta relação foi de 1,16. Uma possibilidade a ser considerada é a pequena familiarização dos observadores do presente estudo com a CML, fazendo com que as alterações citológicas evidenciadas fossem classificadas como ASCUS em vez de LBG. Ressalta-se que dos quatro casos de ASCUS diagnosticados na CML e que foram biopsiados, apenas um foi negativo no estudo histopatológico.

A concordância entre os dois métodos citológicos com o diagnóstico histopatológico foi de aproximadamente 50%, com os valores de Kappa indicando uma concordância razoável; porém, observa-se que o valor de Kappa da CML foi um pouco maior que o da CC (0,3959 *versus* 0,3145). HUTCHINSON *et al.* (1999) encontraram uma concordância de 85,4% entre a biópsia e a CML e de 88,8% entre a biópsia e a CC. A acurácia da CC e da CML foi semelhante quando comparada com o método histopatológico, com os dois métodos demonstrando baixa sensibilidade e alta especificidade. No entanto, a sensibilidade da CML foi um pouco maior que a da CC (45,7% *versus* 34,8%). Estes índices são inferiores aos relatados na literatura, embora ABULAFIA *et al.* (2003), ao identificar estudos que comparavam os dois métodos e correlacionavam com diagnóstico histopatológico, observaram que a sensibilidade dos métodos variou de 50 a 90%, com o ThinPrep<sup>®</sup>, na maioria das vezes, apresentando sensibilidade maior que a CC. A especificidade geralmente varia entre 80 a 90%, estando de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho. Dados contraditórios existem, no entanto, como o relatado por

COSTE *et al.* (2003), em um estudo do tipo *split-sample*, em que a CC mostrou sensibilidade e especificidade equivalentes ou superiores a CML na detecção das LEI cervicais.

DIAZ-ROSÁRIO & KABAWAT (1999) descrevem três possíveis explicações para a maior sensibilidade da CML. A primeira se baseia na melhora da coleta da amostra pelo intenso aumento no número de células que são liberadas da *cytobrush* no meio líquido. Uma outra explicação é que, na CML, ocorre uma diminuição de elementos obscuros, permitindo a detecção de células anormais que, no esfregaço convencional, não estariam tão visíveis. A terceira explicação é que a maior preservação destas células anormais na CML permitiria uma melhor categorização da amostra como sendo LEI ao invés de classificá-las como ASCUS.

Chama a atenção nos resultados do presente trabalho que, dentre os casos discordantes, não houve nenhuma amostra cujo diagnóstico foi positivo na CC e negativo na CML. Pelo contrário, na grande maioria dos casos, a CML detectou lesões mais graves que aquelas identificadas na CC. Em apenas um caso, o diagnóstico na CC foi de LBG e na CML de ASCUS. Em 5,3% dos casos considerados negativos na CC, a CML foi positiva ( $\geq$  ASCUS).

O número de casos FN foi um pouco maior na CC que na CML (51,7% *versus* 47,5%), enquanto que o número de casos FP foi maior na CML (12,5% *versus* 9,7%). No entanto, quando se considera todos os casos (15) de LEI diagnosticados na CC, verifica-se que, na biópsia, 60% (9/15) foram classificados como LAG e 20% (3/15) como LBG. Em relação às LEI detectadas através da CML (13 casos), 53,8% (7/13) foram identificadas na biópsia como LAG e 30,7% (4/13) como LBG. Estes dados indicam que uma maior proporção de casos de LBG (53,5%) são confirmados na biópsia após um diagnóstico de LEI através da CML, em comparação com a CC. Dados semelhantes foram relatados por outros autores (PAPILLO *et al.*, 1998; CARPENTER & DAVEY, 1999). Contrariamente, HUTCHINSON *et al.* (1999) detectaram maior número de casos de LAG na biópsia após um diagnóstico de LEI ou ASCUS na CML. Em um grande estudo *split-sample*, ROBERTS *et al.* (1997) também relataram uma melhora na detecção de LAG na CML confirmada pela biópsia.

A PCR foi positiva em todos os casos de carcinoma e em torno de 50% dos casos de LEI, tanto na CML como na CC, demonstrando que a gravidade dos diagnósticos está fortemente associada à detecção do HPV. HUTCHINSON *et al.*

(1999) utilizaram a CH para detectar o DNA do HPV. Na CML, houve positividade para o HPV em 62,4% das LBG, 73,9% de LAG e em 81,8% dos carcinomas, ao passo que na CC, o resultado para LBG foi cerca de 50% menor, se assemelhando ao obtido no presente trabalho.

Em relação aos cinco casos de ASCUS diagnosticados na CC, chama a atenção a positividade de 80% para HPV. Destes cinco casos, três foram biopsiados e todos mostraram LEI. Na CML, seis casos foram diagnosticados como ASCUS, dos quais 33% foram positivos para HPV à PCR. Destes seis, quatro foram biopsiados, três mostraram LEI e apenas um foi negativo. Estes dados, apesar da amostragem muito reduzida, ilustram o papel importante que a pesquisa de HPV através de método molecular pode desempenhar nos casos de atipia indeterminada. E ainda, sugere que os casos classificados como ASCUS na CC estariam mais associados à infecção por HPV/LEI do que aqueles identificados na CML. Estudos com amostragem maior permitiriam averiguar esta possibilidade.

Observa-se que, através do método molecular, foi possível detectar um número maior de pacientes "positivas" do que através dos métodos citológicos: 18,5% e 23,6% (CC e PCR) *versus* 22,4% e 28,4% (CML e PCR, respectivamente). Estes resultados indicam que a pesquisa de HPV através de método molecular constitui uma ferramenta auxiliar importante na detecção das anormalidades epiteliais do colo uterino. Estudos de tipagem viral estão em andamento e deverão enriquecer estes resultados.

## **7 - CONCLUSÕES**

Foram avaliados os dados epidemiológicos, clínico-colposcópicos, citopatológicos e moleculares de 174 pacientes provenientes da MOV e do CTDST. Realizou-se o estudo comparativo da CML e CC na identificação de pacientes portadoras de LEI e invasoras do colo uterino associadas à infecção pelo HPV. Estabeleceu-se a correlação dos achados citopatológicos com os resultados da PCR para HPV e do diagnóstico histopatológico para a avaliação da acurácia de cada método. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. A concordância entre os dois métodos citológicos foi de 89,7%, no entanto, a CML detectou proporcionalmente mais LEI e invasoras do que a CC (18,7% *versus* 15,6%). Esta diferença foi mais evidente nos casos diagnosticados como LAG e carcinoma invasor, que resultaram em aumento de 39% de LAG e 112% de carcinomas.
2. Dentre os casos discordantes nos dois métodos citológicos, não houve nenhuma amostra cujo diagnóstico foi positivo na CC e negativo na CML. Pelo contrário, na grande maioria dos casos, a CML detectou lesões mais graves que aquelas identificadas na CC. A CML foi positiva ( $\geq$ ASCUS) em 5,3% dos casos considerados negativos na CC.
3. Dentre os fatores epidemiológicos pesquisados, o único que mostrou associação significativa com a infecção por HPV foi o hábito de fumar, em consonância com os achados descritos na literatura.
4. A positividade para HPV variou de 21,1% a 34%, de acordo com o Serviço analisado, com média de 26%.

5. Das pacientes com resultado citológico positivo ( $\geq$  ASCUS), 52,7% apresentaram resultado positivo na PCR. A presença do HPV foi detectada em todos os diagnósticos de carcinoma invasor e em torno de metade dos casos de ASCUS, LBG e LAG, havendo associação estatisticamente significativa entre os diagnósticos molecular e citológico, ressaltando a importância do HPV na gênese do câncer cervical.
  
6. A pesquisa de HPV através de método molecular pode se constituir em uma ferramenta auxiliar importante na detecção das anormalidades epiteliais do colo uterino.

## **8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABULAFIA, O.; PEZZULLO, J.C.; SHERER, D.M. Performance of ThinPrep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey. *Gynecol. Oncol.*, v. 90, p. 137-144, 2003.

ADAD, S.J.; DE LIMA, R.V.; SAWAN, Z.T.E.; SILVA, M.L.G.; DE SOUZA, M.A.H.; SALDANHA, J.C.; FALCO, V.A.A.; DA CUNHA, A.H.; MURTA, E.F.C. Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp* and *Gardnerella vaginalis* in cervical vaginal smears in four different decades. *São Paulo Med. J.*, v. 119, p. 200-205, 2001.

ALVES, V.A.; BIBBO, M.; SCHMITT, F.C.; MILANEZI, F.; LONGATTO-FILHO, A. Comparison of manual and automated methods of liquid-based cytology. A morphologic study. *Acta Cytol.*, v. 48, p. 187-193, 2004.

AMORTEGUI, A.J.; MEYER, M.P.; ELBORNE, V.L.; AMIM, R.M. P53, retinoblastoma gene product, and cyclin protein expression in human papillomavirus DNA-positive cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer. *Mod. Pathol.*, v. 55, p.907-912, 1995.

ANDREWS, S.; MIYAZAWA, K. The significance of negative Papanicolaou smear with hyperkeratosis or parakeratosis. *Obstet. Gynecol.*, v. 73, p. 751-753, 1989.

ANTILLA, T.; SAIKKU, P.; KOSKELA, P.; BLOING, A.; DILLMER, J.; IKAHEIMO, L.; JELLUM, E.; PAAVONEN, J. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA*, v. 285, p. 47-51, 2001.

BAANDRUP, U. Sampling, sampling errors and specimen preparation. *Acta Cytol.*, v. 44, p. 944-948, 2002.

BAKER, J.J. Conventional and liquid-based cervicovaginal cytology: a comparison study with clinical and histologic follow-up. *Diagn. Cytopathol.*, v. 27, p. 185-188, 2002.

BASU, P.S.; SANKARANARAYANAN, R.; MANDAL, R.; ROY, C.; DAS, P.; CHOUDHURY, D.; BHATTACHARYA, D.; CHATTERJEE, R.; DUTTA, K.; BARIK, S.;

TSU, V.; CHAKRABARTI, R.N. Visual inspection with acetic acid and cytology in the early detection of cervical neoplasia in Kolkata, India. *Int. J. Gynecol. Cancer*, v. 13, p. 626-632, 2003.

BERNSTEIN, S.J.; SANCHEZ-RAMOS, L.; NDUBISI, B. Liquid-based cervical cytologic smear study and conventional Papanicolaou smears: a metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 185, p. 308-317, 2001.

BIRLEY, H.D.L. Human Papillomaviruses, cervical cancer and the developing world. *Annals of Trop. Medicine and Parasitol.*, v. 89, p. 453-463, 1995.

BOLICK, D. R.; HELLMAN, D.J. Laboratory implementation and efficacy assessment of the ThinPrep<sup>®</sup> Cervical Cancer Screening System. *Acta Cytol.*, v. 42, p. 209-213, 1998.

BORAS, V.F.; DUGGAN, M.A. Cervical dyskeratotic cells as predictors of condilomatous changes on biopsy. *Acta Cytol.*, v. 33, p. 223-227, 1989.

BORGES, R.J.; GARCIA-TAMAYO, J.; ZAITSMAN, M. Cytologic and ultrastructural findings of peculiar alteration in cervical cells from patients with Human Papillomavirus infections. *Acta Cytol.*, v. 33, p. 314-318, 1989.

BOSCH, F.X.; MANOS, M.M.; MUNOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A.M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M.H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, K.V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 87, p. 796-802, 1995.

BREMER, G.L.; TIEBOSCH, A.T.; VAN DER PUTTEN, H.W.; DE HAAN, J.; ARENDS, J.W. p 53 tumor suppressor gene protein expression in cervical cancer: relationship to prognosis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, v. 63, p. 55-59, 1995.

BROWN, D.R.; BRYAN, J.T.; CRAMER, H.; FIFE, K.H. Analysis of human papillomavirus types in exophytic condylomata acuminata by Hybrid Capture and Southern Blot techniques. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, p. 2667-2673, 1993.

BUR, M.; KNWOLES, K.; PEKOW, P. Comparison of ThinPrep preparations with conventional cervicovaginal smears. *Acta Cytol.*, v. 39, p. 631-642, 1995.

CAMARA, N.L.; CERQUEIRA, D.M.; OLIVEIRA, A.P.G.; SILVA, E.O.; CARVALHO, G.S.; MARTINS, C.R.F. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 879-883, 2003.

CAMPION, M.J. Clinical manifestations and natural history of genital human papillomavirus infection. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, v. 14, p. 363-388, 1987.

CARTWRIGHT, N.H.; SANT CASSIA, L.J.; MORRIS, A.G. Detection of Human Papillomavirus in vulval carcinoma using semi-nested PCR and restriction enzyme typing: a rapid and sensitive technique. *J. Clin. Pathol.*, v. 49, p. 236-239, 1996.

CARPENTER, A.B.; DAVEY, D.D. ThinPrep<sup>®</sup> Pap Test. *Cancer Cytopathol.*, v. 87, p. 105-112, 1999.

CARRILLO, A.; MOHAR, A.; MENESES, A.; FRIAS-MENDIVIL, M.; SOLORZA, G.; LIZANO, M. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud Pub. México*, v. 49, p. 7-15, 2004.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3: Co-factors in human papillomavirus carcinogenesis - role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J. Natl. Inst. Monogr.*, v. 31, p. 20-28, 2003.

CAVALCANTI, S.M.B.; ZARDO, L.G.; OLIVEIRA, L.H.S. Human papillomavirus infection: correlation of colposcopy, cytology, histopathology and in situ hybridization. *J. Bras. Patol.*, v. 33, p. 62-69, 1997.

CAVALCANTI, S.M.B.; ZARDO, L.G.; PASSOS, M.R.L.; OLIVEIRA, L.H.S. Epidemiological aspects of Human Papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. *J. of Infection*, v. 40, p. 80-87, 2000.

COSTA, C.R.P.; FERNANDES, P.A. Campanha nacional de combate ao câncer do colo uterino: a contribuição do laboratório de anatomia patológica da Santa Casa de Misericórdia de Passos (MG). *Rev. Bras. Cancerol.*, v. 49, p. 33-37, 2003.

COSTE, J.; PRIOLLET-COCHAND, B.; CREMOUX, P.; LE GALES, C.; CARTIER, I.; MOLINIÉ, V.; LABBÉ, S.; VACHER-LAVENU, M.C.; VIELH, P. Cross sectional study of conventional cervical smear, monolayer cytology, and human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening. *BMJ*, v. 326, p. 1-5, 2003.

CRAMER, H.M.; SKINNER-WANNEMVEHLER, B.S.; BROWN, D.R.; KATZ, B.P.; FIFE, K.H. Cytomorphologic correlates of human papillomavirus infection in the "normal" cervicovaginal smear. *Acta Cytol.*, v. 4, p. 261-268, 1997.

CRUM, C.P. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host and the stem cell. *Mod. Pathol.*, v. 13, p. 243-251, 2000.

CUSCHIERI, KS. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J. Clin. Pathol.*, v. 57, p. 68-72, 2004.

DE PALO, G. *Colposcopia e patologia do trato genital inferior*. Rio de Janeiro: Medsi Local, 1993. 435 p.

DERCHAIN, S.F.M.; ANDRADE, L.A.L.A.; PINTO E SILVA, J.L.C.; PINTO-NETO, A.M.; NEVES-JORGE, J.P. Risk factors of cervical condyloma in sexually active female adolescents. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 41, p. 130-134, 1995.

DIAZ-ROSARIO, L., KABAWAT, S. Performance of a fluid-based, thin-layer Papanicolaou smear method in the clinical setting of a independent laboratory and an

outpatient screening population in New England. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 123, p. 817-821, 1999.

DUPREE, W.B.; SUPRUN, H.Z.; BECKWITH, D.G.; SHANE, J.J.; LUCENTE, V. The promise and risk of a new technology: The Lehigh Valley Hospital's experience with liquid-based cervical cytology. *Cancer*, v. 84, p. 202-207, 1998.

ELUF-NETO, J.; BOOTH, M.; MUNOZ, N.; BOSCH, F.X.; MEIJEI, C.J.L.M.; WALBOOMERS, J.M. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br. J. Cancer*, v. 69, p. 114-119, 1994.

FERENCZY, A.; FRANCO, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *The Lancet Oncol.*, v. 3, p. 11-16, 2002.

FINAN, R.R.; IRANI-HAKIME, N.; TAMIM, H.; SHARIDE, H.E.; DACCACHE, J.L.; ALMAWI, W.Y. Detection of human papillomavirus genotypes in cervico-vaginal scrapes of women with normal and abnormal cytology. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 7, p. 688-692, 2001.

FISHER, S.G. Epidemiology: a tool or a study of Human Papillomavirus – related carcinogenesis. *Intervirology*, v. 37, p. 215-225, 1994.

FRANÇA, J.L. *Manual para normalização de publicações técnico científicas*. 6ª ed. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2003. 230 p.

FRANCO, E.L.; DUARTE-FRANCO, E.; FERENCZY, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*, v. 164, p. 1017-1025, 2001.

GOMES, D.H.; BIDOIA, C.C.G.; IRIE, M.M.T.; SUZUKI, L.E.; CONSOLARO, M.E.L.; KANESHIMA, E.N. Padronização da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico da infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV) em amostras endocervicais de pacientes portadoras de lesões pré-cancerosas ou

cancerosas atendidas no LEPAC/UEM de Maringá-PR. *Rev. Bras. Anál. Clínicas*, v. 34, p. 89-93, 2002.

GOMPEL, C.; KOSS, L.G. *Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas*. São Paulo: Manole, 1997. 200 p.

GONÇALVES, M.A.; MASSAD, E.; BURATTINI, M.N.; VILLA, L.L. Relationship between human papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City, São Paulo, Brazil. *Int. J. Std. AIDS*, v. 10, p. 803-807, 1999.

GRAVITT, P.E.; PEYTON, C.L.; ALESSI, T.Q. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 357-361, 2000.

GUIDOS, B.J.; SELVAGGI, S.M. Use of the ThinPrep<sup>®</sup> Pap Test in clinical practice. *Diag. Cytopathol.*, v. 20, p. 70-73, 1999.

GUIMARÃES, E.M.; SILVA, A.M. Erros em citopatologia ginecológica: por que ocorrem? *J. Bras. Ginecol.*, v.105, p. 397-403, 1995.

HILDESHEIM, A.; SHIFFMAN, M.; BROMLEY, C. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 93, p. 315-318, 2001.

HUANG, C.C.; QIU, J.T.; KASHIMA, M.L.; KURMAN, R.J.; WU, T.C. Generation of type-specific probes for the detection of single-copy human papillomavirus by a novel in situ hybridization. *Mod. Pathol.*, v. 11, p. 971-977, 1998.

HUBBARD, R.A. Human papillomavirus testing methods. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 127, p. 940-945, 2003.

HUTCHINSON, M.L.; AGARWAL, P.; DENAUT, T. A new look at cervical cytology: ThinPrep multicenter trial results. *Acta Cytol.*, v. 36, p. 499-504, 1992.

HUTCHINSON, M.L.; ZAHNISER, D.J.; SHERMAN, M.E.; HERRERO, R.; ALFARO, R.; BRATTI, M.C.; HILDESHEIM, A.; LORINCZ, A.T.; GREENBERG, M.D.; MORALES, J.; SCHIFFMAN, M. Utility of liquid-based cytology for cervical screening. *Cancer Cytopathol.*, v. 87, p. 48-55, 1999.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). *Câncer do Colo do Útero*. 2004. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 23 maio 2004.

JORDÃO, A.V.; RUGGERI, L.S.; CHIUCHETA, G.I.R.; PIVA, S.; CONSOLARO, M.E.L. Importância da aplicação de critérios morfológicos não clássicos para o diagnóstico citológico de papilomavírus humano. *J. Bras. de Patol. e Med. Laboratorial*, v. 39, p. 81-89, 2003.

JOSTE, N.E.; RUSHING, L.; GRANADOS, R.; ZITZ, J.C.; GENEST, D.R.; CRUM, C.P.; CIBAS, E.S. Bethesda classification of cervicovaginal smears: reproducibility and viral correlates. *Hum. Pathol.*, v. 27, p. 581-585, 1996.

KADO, S.; KAWAMATA, Y.; SHINO, Y. Detection of human papillomaviruses in cervical neoplasias using multiple sets of generic polymerase chain reaction primers. *Gynecol. Oncol.*, v. 81, p. 47-52, 2001.

KERN, S.B. Significance of anucleated squames in Papanicolaou-stained cervicovaginal smears. *Acta Cytol.*, v. 35, p. 89-93, 1991.

KEYHANI-ROFAGHAA, S.; PALMAA, T.; O'TOLLE, R. An automated screening for quality control using Papnet: a study of 638 negative Pap smears. *Diagn. Cytopathol.*, v. 14, p. 316-320, 1996.

KIM, C.J.; UM, S.J.; KIM, T.Y. Regulation of cell growth and HPV genes by exogenous estrogen in cervical cancer cells. *Int. J. Gynecol. Cancer*, v. 10, p. 157-164, 2000.

KIM, J.J.; WRIGHT, T.C.; GOLDIE, S.J. Cost-effectiveness of alternative triage strategies for atypical squamous cells of undetermined significance. *JAMA*, v. 287, p. 2382-2390, 2002.

KOSS, L.G. The Papanicolaou test for cervical detection: a triumph and a tragedy. *JAMA*, v. 262, p. 32-33, 1989.

KOSS, LG. Cervical (Pap) smear: new directions. *Cancer*, v. 71, p. 406-412, 1993.

KOUTSKY L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am. J. Med.*, v.102, p. 3-8, 1997.

KURMAN, R.J.; SOLOMON, D. *The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses* - Definitions, criteria and explanatory notes for terminology and specimen adequacy. New York: Springer, 1994. 81 p.

LANDIS J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v. 33, p. 159-174, 1977.

LEE, K.R.; ASHFAQ, R.; BIRDSONG, G.G.; CORKILL, M.E.; McINTOSH, K.M.; INHORN, S.L. Comparison of conventional Papanicolaou smears and a fluid-based, thin-layer system for cervical cancer screening. *Obstet. Gynecol.*, v. 90, p. 278-284, 1997.

LIMA SOARES, V. Sexually transmitted infection in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. *Trop. Med. Int. Health.*, v. 8, p.595-603, 2003.

LINDER, J.; ZAHNISER, D. The ThinPrep<sup>®</sup> Pap test – a review of clinical studies. *Acta Cytol.*, v. 41, p. 30-38, 1997.

LONKY, N.N.; FELIX, J.C.; NAIDU, Y.M. Triage of atypical squamous cells of undetermined significance with Hybrid Capture II: colposcopy and histologic human papillomavirus correlation. *Obstet. Gynecol.*, v. 101, p. 481-489, 2003.

LORENZATO, F.; HO, L.; TERRY, G.; SINGER, A.; SANTOS, L.C.; BATISTA, R.L.; LUBAMBO, T. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brasil). *Int. J. Gynecol. Cancer*, v.10, p. 143-150, 2000.

MANOS, M.M.; TING, Y.; WRIGHT, D.K.; LEWIS, A.I.; BROKER, T.R.; WOLINSKY, S.M. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*, v. 7, p. 209-214, 1989.

MCGOOGAN, E. Cell preparation methods and criteria for sample adequacy. *Acta Cytol.*, v. 42, p. 25-32, 1998.

MCCOOGAN, E.; SEAGAR, A.L.; CUBIE, H.A. Detection of high risk human papillomavirus nucleic acid in archival cervical smears. *Acta Cytol.*, v. 42, p. 1079-1083, 1998.

MILDE-LANGOSH, K.; RIETHDORF, S. Role of cell-cycle regulatory proteins in gynecological cancer. *J. Cell. Physiol.*, v. 196, p. 224-244, 2003.

MONK, B.J.; COOK, N.; A.H.N, C.; VASILEV, S.A.; BERMAN, M.L.; WILCZYNSKI, S.P. Comparison of the polimerase chain reaction and Southern blot analysis in detecting and typing human papiloma virus deoxyribonucleic acid in tumors of the lower female genital tract. *Diagn. Mol. Pathol.*, v. 3, p. 283-291, 1994.

MOSS, T.R.; HAWKSWELL, J.; FOGARTY, B.; DADSWELL, C. The value of primary colposcopy in genitourinary medicine - a six year review. *Genito Urinary Med.*, v. 70, p. 191-195, 1994.

MOUGIN, C.; DALSTEIN,V.; PRÉTET, J.L.; GAY, C.; SCHAAL, J.P.; RIETHMULLER, D. Epidémiologie des infections cervicales à papillomavirus. *Recent Knowledge. Presse Med.*, v. 30, p. 1017-1023, 2001.

MUNOZ, L.; BOSCH, FX.; DE SANJOSE, S.; TAFUR, L.; IZARZUGAZA, I.; GILI, M. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a

population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int. J. Cancer*, v. 52, p. 743-749, 1992.

MUNOZ, L.; BOSCH, FX.; DE SANJOSE, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUE, X.; SHAH, KV.; SNIJDERS, PJ.; MEIJER, CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.*, v. 348, p. 518-527, 2003.

NAIB, Z.N.; MASUKAWA, N. Identification of condiloma acuminata cells in routine vagina smears. *Obstet. Gynec.*, v. 13, p. 735-738, 1961.

NONNENMACHER, B.; BREINTENBACH, V.; VILLA, L.L.; PROLLA, J.C.; BOZZETTI, M.C. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Rev. Saúde Pública*, v. 36, p. 95-100, 2002.

NORONHA, V.; MELLO, W.; VILLA, L.; BRITO, A.; MACEDO, R.; MOTA, R.; MONTEIRO, T.; LINHARES, A. Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. *Rev. Soc. Bras. Medicina Trop.*, v. 32, p. 235-250, 1999.

PAIRWUTI, S. False negative Papanicolaou smears from women with cancerous and precancerous lesions of the uterine cervix. *Acta Cytol.*, v. 35, p. 40-46, 1991.

PAPILLO, J.; ZARKA, M.; ST JOHN, T. Evaluation of the ThinPrep Pap test in clinical practice - a seven-month, 16.314-case experience in Northern Vermont. *Acta Cytol.*, v. 42, p. 202-206, 1998.

PARKER, M.F.; ARROYO, G.F.; GERADTS, J.; SABICHI, A.L.; PARK, R.C.; TAYLOR, R.R.; BIRNER, M.J. Molecular characterization of adenocarcinoma of the cervix. *Gynecol. Oncol.*, v. 64, p. 242-251, 1997.

PEYTON, C.L.; SCHIFFMAN, M.; LORINCZ, A.T.; HUNT, W.C.; MIELZYNSKA, I.; BRATTI, C.; EATON, S.; HILDESHEIM, A.; MORERA, L.A.; RODRIGUEZ, A.C.; HERRERO, R.; SHERMAN, M.E.; WHEELER, C. M. Comparison of PCR- and hybrid

capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 3248-3254, 1998.

PLANT, A.; KOHN-SPEYER, A.C. The carcinogenic action of smegma. *Science*, v. 105, p. 391-393, 1947 *apud* ROSEMBLATT, C.; LUCON, A.M.; PEREYRA, E.A.G.; PINOTTI, J.A.; ARAP, S.; RUIZ, C.A. HPV prevalence among partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Gynecol. Obstet.*, v. 84, p. 156-161, 2004.

PUROLA, E.; SAVIA, E. Cytology of gynecology condiloma acuminatum. *Acta Cytol.*, v. 21, p. 26-31, 1977.

RABELO-SANTOS, S.H.; ZEFERINO, L.; VILLA, L.L.; SOBRINHO, J.P.; AMARAL, R.G.; MAGALHÃES, A.V. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 181-184, 2003.

RASO, P.; TAFURI, L.W. *Gardnerella vaginalis*: sua freqüência em 100.000 exames citológicos cérvico-vaginais em Belo Horizonte, Minas Gerais. *J. Bras. Ginecol.*, v. 102, p. 173-177, 1992a.

RASO, P.; TAFURI, W.L. Incidência de *Candida albicans* em 100.000 exames citopatológicos cérvico-vaginais consecutivos (1984-1989), em Belo Horizonte, Minas Gerais. *J. Bras. Ginecol.*, v. 102, p. 305-308, 1992b.

REID, R.; HERSCHMAN, R.; CRUM, C.P.; BRAUN, L.; SHAH, K.Z.; STANHOPE, R. Genital warts and cervical cancer: the tissue basis of colposcopic change. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 149, p. 293-330, 1984.

RICHART, R.M.; MASOOD, S.; SYRJÄNEN, K.J.; VASSILAKOS, P.; KAUFMAN, R.H.; MEISELS, A.; OLSZEWSKI, W.T.; SAKAMOTO, A.; STOLER, M.H.; VOOIJS, G.P.; WILBUR, D.C. Human Papillomavirus – IAC Task Force Summary. *Acta Cytol.*, v. 42, p. 50-58, 1998.

RIVOIRE, W.A.; CAPP, E.; CORLETA, H.V.E.; SILVA, I.S.B. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. *Rev. Bras. Cancerologia*, v. 47, p. 179- 184, 2001.

ROBERTS, J.M.; GURLEY, A.M.; THURLOE, J.K.; BOWDITCH, R.; LAVERTY, C.R. Evaluation of the ThinPrep Pap test as an adjunct to the conventional Pap smear. *Med. J. Aust.*, v. 167, p. 466-469, 1997.

ROSEMBLATT, C.; LUCON, A.M.; PEREYRA, E.A.G.; PINOTTI, J.A.; ARAP, S.; RUIZ, C.A. HPV prevalence among partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Gynecol. Obstet.*, v. 84, p. 156-161, 2004.

ROSSEAU, M.C.; FRANCO, E.L.; VILLA, L.L.; SOBRINHO, J.P.; TERMINI, L.; PRADO, J.M.; ROHAN, T.E. A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infections. *Cancer Epidem. Biomarkers & Prev.*, v. 9, p. 469-476, 2000.

ROTELI-MARTINS, C.M.; PANETTA, K.; ALVES, V.A.F.; SIQUEIRA, S.A.C.; SYRJANEN, K.J.; DERCHAIN, S.F.M. Cigarette smoking and high-risk HPV DNA as predisposing factors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in young Brazilian women. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, v. 77, p. 678-682, 1998.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; EHRlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, p. 487-491, 1988.

SALVIA, P.N.D.; BERGO, S.M.; BONESSO-SABADINI, P.I.P.; TAGLIARINI, E.B.; HACKEL, C.; DE ANGELO ANDRADE, L.A.L. Correlation between histological criteria and human papillomavirus presence based on PCR assay in cervical biopsies. *Int. J. Gynecol. Cancer*, v. 14, p. 126-132, 2004.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: A laboratory*. 3<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001:3.

SANO, T.; OYAMA, T.; KASHIWABARA, K. FUKUDA, T.; NAKALIAMA, T. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol. Int.*, v. 48, p. 580-585, 1998.

SANTOS, F.R.; PENA, S.D.P.; EPPLEN, J.T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorfism with a single non-isotopic technique. *Hum. Genet.*, v. 90, p. 955-956, 1993.

SBC (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CITOPATOLOGIA). *Nomenclatura brasileira para laudos de citopatologia cervical uterina*. 2002. Disponível em: <<http://www.citopatologia.org.br>>. Acesso em: 19 set. 2003.

SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P.E. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 127, p. 930-934, 2003.

SCHNEIDER, A.; MEINHARDT, G.; DE-VILLERS, E.M.; GISSMANN, L. Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hibridization studies. *Diag. Citopathol.*, v. 3, p. 250-255, 1987.

SCHNEIDER, A.; STERZIK, K.; BUCK, G.; DE VILLERS, E.M. Colposcopy is superior to cytology for the detection of early genital human papillomavirus infection. *Obstet. Gynecol.*, v. 71, p. 236-241, 1988.

SHERMAN, M.E.; SCHIFFMAN, M.H.; LORINCZ, A.T.; MANOS, M.M.; SCOTT, D.R.; KURMAN, R.J.; KIVIAT, N.B.; STOLER, M.; GLASS, A.G.; RUSH, B.B. Toward objective quality assurance in cervical cytopathology.: correlation of cytopathologic diagnoses with detection of high-risk human papillomavirus types. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 102, p. 182-187, 1994.

SIERRA-TORRES, C.H.; TYRING, S.K.; AU, W.W. Risk contribution of sexual behavior and cigarette smoking to cervical neoplasia. *Int. J. Gynecol. Cancer*, v. 13, p. 617-625, 2003.

SMITH, J.S.; MUNOZ, N.; HERRERO, R.; ELUF-NETO, J.; NGELANGEL, C.; FARNCESCHI, S.; BOSH, F.X.; WALBOOMERS, J.M.; PEELING, R.W. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J. Infect. Diseases*, v. 185, p. 324-331, 2002.

SOLOMON, D.; NAYAR, R. (ed). *The Bethesda System for reporting cervical cytology: definitions, criteria and explanatory notes*. 2<sup>a</sup> ed. New York: Springer-Verlag, 2004. 191 p.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, v. 98, p. 503-517, 1975.

SYRJANEN, K.J; SYRJANEN, S.M. Diagnostics techniques in HPV detection. In: *Papillomavirus infections in human pathology*. John Wiley & Sons, Chichester, p. 89-115, 2000.

TAFURI, L.W.; RASO, P. Ocorrência de *Trichomonas vaginalis* em 100.000 exames citopatológicos cérvico-vaginais diagnosticados entre os anos de 1984 a 1989, em Belo Horizonte, Minas Gerais. *J. Bras. Ginecol.*, v. 101, p. 519-522, 1991.

TARKOWSKI T.A.; KOUMANS, E.H.; SAWYER M.; PIERCE A.; BLACK, C.M.; PAPP, J.R.; MARKOWITZ, L.; UNGER, E.R. Epidemiology of human papillomavirus infection and abnormal cytologic test results in an urban adolescent population. *J. Infect. Dis.*, v.89, p. 46-50, 2004.

TEZUKA, F.; OIKAWA, H.; SHUKI, H.; HIGASHIIWAI, H. Diagnostic efficacy and validity of the ThinPrep method in cervical cytology. *Acta Cytol.*, v. 40, p. 513-518, 1996.

VASSILAKOS, P.; SCHWARTZ, D.; MARVA, F.; YOUSFI, L.; BROQUET, G.; MATHEZ-LOIC, F.; CAMPANA, A.; MAJOR, A. Biopsy-based comparison of liquid-based, thin-layer preparations to conventional Pap smears. *J. Reprod. Med.*, v. 45, p. 11-16, 2000.

VILLA, L.L.; CABALLERO, O.L.; LEVI, J.E.; PENA, S.D.J; SIMPSON, A. J.G. An approach to human papillomavirus identification using low stringency single specific primer PCR. *Molecular and Cellular Probes*, v. 9, p. 45-48, 1995.

WAGGONER, S.E. Cervical cancer. *Lancet*, v. 361, p. 2217-2225, 2003.

WALBOOMERS, J.M.; JACOBS, M.V.; MANOS, M.M.; BOSCH, F.X.; KUMMER, J.A.; SHA, K.V.; SNIJDERS, P.J.; PETO, J.; MEIJER, C.J.; MUNOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.*, v. 189, p. 12-19, 1999.

WANG, F.; SEMCHUK, K.M.; LOVE, E.J. Reliability of environmental and occupational exposure data provided by surrogate respondents in a case-control study of Parkinson's disease. *J. Clin. Epidemiol.*, v. 47, p. 797-807, 1994.

WANG, S.E.; RITCHIE, M.; ATKINSON, B.F. Cervical cytologic smear false negative fraction - Reduction in a small community hospital. *Acta Cytol.*, v. 41, p. 1690-1696, 1997.

WANG, T.S; CHOU, H.F.; LIU, W.M.; CHOO, K.B. Semiautomated typing human papillomaviruses by restriction fragment length polymorphism analysis of fluorescence-labeled PCR fragments. *J. Med. Virol.*, v. 59, p. 509-514, 1999.

WEINTRAUB, J.; MORABIA, A. Efficacy of a liquid-based thin layer method for cervical cancer screening in a population with a low incidence of cervical cancer. *Diag. Cytopathol.*, v. 22, p. 52-59, 2000.

WRIGHT, T.C.; RICHART, R.M. Role of human papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer. *Gynecol. Oncol.*, v. 37, p. 151-154, 1990.

WRIGHT, T.C. Jr.; COX, J.T.; MASSAD, L.S.; TWIGGS, L.B.; WILKINSON, E.J. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA*, v. 287, p. 2120-2129, 2002.

## **9 - APÊNDICE**

### APÊNDICE A - Protocolo dos dados clínicos e colposcópicos (MOV)

**Nome:** \_\_\_\_\_ **Frasco n.:** \_\_\_\_\_  
**Número de registro** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_  
**Idade:** \_\_\_\_\_ **Menarca:** \_\_\_\_\_  
**G P A:** \_\_\_\_\_  
**UM:** \_\_\_\_\_ **UP:** \_\_\_\_\_  
**Número de parceiros:** \_\_\_\_\_  
**Idade da primeira relação:** \_\_\_\_\_  
**Raça:** ( ) Branca ( ) Negra ( ) Outras \_\_\_\_\_  
**Contraceção:** ( ) Nenhuma ( ) Oral ( ) DIU ( ) Condon  
( ) Diafragma ( ) Outros \_\_\_\_\_  
**TRH:** ( ) Sim ( ) Não  
**Fumo:** ( ) Sim ( ) Não **Cigarros/dia:** \_\_\_\_\_ **Anos:** \_\_\_\_\_  
**DST anterior:** ( ) Sim ( ) Não **Disúria:** ( ) Sim ( ) Não  
  
Sangramento no coito: ( ) Sim ( ) Não  
Leucorréia: ( ) Sim ( ) Não  
**Odor:** ( ) Sim ( ) Não  
**Cor/aspecto:** \_\_\_\_\_  
**Quantidade:** ( ) escassa ( ) moderada ( ) abundante  
**Teste de Schiller:** ( ) Negativo ( ) Positivo  
**COLPOSCOPIA:**

**HIPÓTESE DIAGNÓSTICA:** \_\_\_\_\_

**DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO/N.EXAME:** \_\_\_\_\_

**DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO/N.EXAME:** \_\_\_\_\_

**APÊNDICE B - Protocolo dos dados clínicos e colposcópicos (CTDST)**

Nome: \_\_\_\_\_

Número de registro \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Menarca: \_\_\_\_\_

G P A: \_\_\_\_\_

UM: \_\_\_\_\_ UP: \_\_\_\_\_

Número de parceiros: \_\_\_\_\_

Idade da primeira relação: \_\_\_\_\_

Raça: ( ) Branca ( ) Negra ( ) Outras \_\_\_\_\_

Contraceção: ( ) Nenhuma ( ) Oral ( ) DIU ( ) Condon

( ) Diafragma ( ) Outros \_\_\_\_\_

TRH: ( ) Sim ( ) Não

DST anterior: ( ) Sim ( ) Não Disúria: ( ) Sim ( ) Não

Leucorréia: ( ) Sim ( ) Não

Odor: ( ) Sim ( ) Não

Cor/aspecto: \_\_\_\_\_

Quantidade: ( ) escassa ( ) moderada ( ) abundante

Queixas (espontâneas): \_\_\_\_\_

Teste de Schiller: ( ) Negativo ( ) Positivo

**COLPOSCOPIA:**

HIPÓTESE DIAGNÓSTICA: \_\_\_\_\_

DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO/N.EXAME: \_\_\_\_\_

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO/N.EXAME: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE C - Protocolo dos achados citológicos e moleculares

### 1- Amostra

Satisfatória     Ausência de elementos da JEC     Hemorragia     Ressecamento  
 Exsudato purulento     Outros \_\_\_\_\_

Insatisfatória

**2- Tipo de Descamação**     Superficial     Intermediária     Profunda

**3- Células Endocervicais**     Presente     Ausente

**4- Metaplasia Escamosa: Madura**  Presente  Ausente **Imatura**  Presente  Ausente

**5- Células Endometriais**     Presente     Ausente

**6- Leucócitos**     ausente     raros     +     ++     +++

**7- Histiócitos**     ausente     raros     +     ++     +++

**8- Hemácias**     ausente     raras     +     ++     +++

**9- Flora**  Lactobacilar     citólise discreta     citólise moderada     citólise acentuada

Lactobacilar Não Citolítica

Bacilos supracitoplasmáticos (sugestivos Gardnerella vaginalis/Mobiluncus)

Escassa, não classificável

Mista (cocos e bacilos não Doederlein)

Mista com lactobacilos

Outros \_\_\_\_\_

**10- Agente específico**     Presente     Ausente \_\_\_\_\_

### 11- Alterações celulares benignas

Inflamação     Leve     Moderada     Acentuada

Reparação

Metaplasia Escamosa Imatura

Atrofia com inflamação

Radiação

Outros \_\_\_\_\_

### 12- Atipias celulares

#### 12.1 Células epiteliais atípicas de significado indeterminado

Escamosas

Glandulares

Possivelmente não neoplásica

Não se pode afastar a possibilidade de lesão de alto grau

De origem indefinida

#### 12.2 Atipia celular em células escamosas

LEIBG - NIC I e HPV

LEIAG - NIC II e NIC III

LEIAG, não podendo excluir invasão

Carcinoma epidermóide invasor

#### 12.3 Atipia celular em células glandulares

Adenocarcinoma "in situ"

Adenocarcinoma invasor

Endocervical

Endometrial

SOE (sem outras especificações)

Outras neoplasias malignas

**13- Observações**

---

---

---

**14- Conclusão (Diagnóstico descritivo)**

- Dentro dos limites da normalidade no material examinado
- Alterações celulares benignas
- Atipias celulares

**15- Resultado da PCR**

- HPV
- Chlamydia trachomatis*

## APÊNDICE D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### DIAGNÓSTICOS CITOPATOLÓGICOS E MOLECULARES DAS INFECÇÕES PELO PAPILOMA VÍRUS HUMANO E *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EM PACIENTES COM LESÕES EPITELIAIS PRECURSORAS DO CÂNCER CERVICAL, UTILIZANDO-SE A CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO E CONVENCIONAL.

Prezada Senhora,

A senhora está sendo convidada a participar de um estudo que será desenvolvido na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais que tem por finalidade estudar as alterações das infecções pelo Papiloma Vírus Humano e *Chlamydia trachomatis* no colo uterino.

Para sua participação no estudo, durante o exame ginecológico realizado pelo médico ginecologista, serão colhidas amostras contendo células do colo uterino. O exame não apresenta risco algum à saúde, sendo realizado de rotina em muitos exames ginecológicos. Nesta coleta, serão utilizados materiais de coleta descartáveis e de boa qualidade.

Os dados clínicos e o material coletado serão usados somente para esta pesquisa, e os resultados serão mantidos em sigilo. Seu nome e sua participação na pesquisa não serão divulgados.

O resultado do seu exame será encaminhado ao médico ginecologista que tomará as medidas necessárias para seu tratamento, caso seja necessário.

Os exames serão gratuitos e não haverá compensação financeira na sua participação nesta pesquisa.

Caso você tenha alguma dúvida sobre o estudo, poderá contactar as pesquisadoras deste estudo, Dra. Paula Ávila Fernandes e/ou Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes, pelos telefones 3339-7646 ou 3339-7649, na Faculdade de Farmácia da UFMG, localizada na Av. Olegário Maciel, n.2360, 6.andar, salas 610-A e 702.

Acredito ter sido suficientemente esclarecida a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim descrevendo o estudo: **Diagnósticos citopatológicos e moleculares das infecções pelo Papiloma Vírus Humano e *Chlamydia trachomatis* em pacientes com lesões epiteliais precursoras do câncer cervical, utilizando-se a citologia em meio líquido e convencional**, e estou de acordo em participar desta pesquisa.

---

Assinatura do paciente/representante legal

Data

---

Assinatura da testemunha

Data

## **10 - ANEXO**

## **ANEXO A – Classificação dos achados colposcópicos**

Classificação dos achados colposcópicos (Comitê de Nomenclatura Colposcópica, 7<sup>o</sup> Congresso Mundial de Patologia Cervical/Uterina e Colposcopia/Roma – 1990).

### **A – Achados colposcópicos normais**

1. Epitélio escamoso original
2. Epitélio colunar
3. Zona de transformação normal (típico) – ZTT

### **B – Achados colposcópicos anormais**

1. Epitélio aceto-branco – EAB
  - 1.1. Plano
  - 1.2. Em relevo (microcircunvoluções, ou micropapilar)
2. Pontilhado
3. Mosaico
4. Leucoplasia
5. Vasos atípicos
6. Zona iodo-negativa
7. Achados sugestivos de câncer invasor

### **C – Achados colposcópicos insatisfatórios**

1. Junção escamo-cilíndrica não visível
2. Inflamação ou atrofia intensa
3. Colo não visualizado

### **D – Achados vários**

1. Condiloma exofítico
2. Colpite
  - 2.1. Difusa
  - 2.2. Focal
  - 2.3. Senil
  - 2.4. Em pontos brancos
3. Atrofia
4. Úlcera
5. Decidua
6. Outros achados