

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA E DE CRITÉRIOS NÃO  
CLÁSSICOS EM AMOSTRAS CERVICAIS ASSOCIADAS OU  
NÃO AO HPV E À ATÍPIAS CITOLÓGICAS**

DANDARA EMERY MORAIS SANA

OURO PRETO  
2011

DANDARA EMERY MORAIS SANA

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA E DE CRITÉRIOS NÃO  
CLÁSSICOS EM AMOSTRAS CERVICAIS ASSOCIADAS OU  
NÃO AO HPV E À ATÍPIAS CITOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Cláudia Martins Carneiro

OURO PRETO  
2011

*Dedico este trabalho...*

*Aos meus avôs maternos, João Pedro e Marilda;*

*Aos meus avôs paternos, José Cirilo e Ana;*

*A todos familiares e amigos que tornam a vida mais plena de sentido.*

*A Deus, por todas as bênçãos recebidas e pela certeza de Sua presença e direção em toda a minha vida.*

*Em Especial, a Professora Cláudia Martins Carneiro, exemplo de competência e dedicação à ciência, por guiar meus passos na pesquisa científica. Muito obrigada por me orientar, no sentido mais amplo da palavra e por compartilhar comigo mais uma conquista.*

*À Professora Angélica Alves Lima, pela colaboração na realização das PCRs e pelas oportunas sugestões na fase de qualificação desta dissertação.*

*Aos amigos do Laboratório Piloto de Análises Clínicas, Bruna, Mariana, Nayara, Priscila e Roney, pela convivência harmoniosa e cooperativa, indispensáveis para a realização deste trabalho.*

*Aos funcionários da Escola de Farmácia, em especial ao Maurício José Guimarães, pelo carinho e disponibilidade.*

*Aos amigos do mestrado, os quais compreendem bem as pedras no caminho e o valor desta conquista.*

*Aos Professores Sandra Aparecida Lima de Moura e Wanderson Geraldo de Lima, que se dispuseram a contribuir para o aperfeiçoamento deste trabalho.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade.*

*Ao Karol, pelo amor, companheirismo, incentivo e compreensão.*

*Aos meus pais, João José e Angela, pelo incentivo e por tudo que fizeram pela minha formação educacional.*

*Aos meus familiares pelo constante apoio, carinho e compreensão.*

*Enfim, a todos que contribuíram para que este trabalho fosse realizado com sucesso!*

*Muito Obrigada!*

O objetivo deste trabalho foi avaliar amostras cervicais associadas ou não ao HPV e à atipias citológicas quanto ao aumento da razão núcleo/citoplasma (AN/AC) e a presença de critérios citológicos não clássicos para o diagnóstico do papiloma vírus humano (HPV). No período compreendido entre abril de 2008 e julho de 2010, foram coletadas 569 amostras cervicais para a detecção do DNA/HPV por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) e para a realização do exame citológico de Papanicolaou. De acordo com os resultados da análise molecular e citológica, as amostras foram distribuídas em quatro grupos de estudo, com 20 lâminas em cada: HPV-ATIPIA-, HPV-ATIPIA+, HPV+ATIPIA- e HPV+ATIPIA+. Para a análise morfológica, foram capturados 60 campos de cada lâmina (subdivididas em região da espátula e da escova) em uma objetiva de 40x e ocular de 10x com o auxílio instrumental de uma câmera digital Leica DFC340FX acoplada ao microscópio Leica DM5000B. Foram mensurados os parâmetros área nuclear (AN) e área citoplasmática (AC) por meio do *software* de morfometria Image J 1.43 para Windows Vista/7 e determinada a razão núcleo/citoplasma (AN/AC). Para a análise dos critérios citológicos não clássicos foram utilizadas as mesmas imagens adquiridas para a análise morfológica, nas quais foram observados os seguintes critérios: bi ou multinucleação, disqueratose leve, queratinização, núcleo hiper cromático, núcleo em borrão, núcleo em fibra, coilocitose leve, halo perinuclear, cariorréxe, grânulos querato-hialinos, condensação em filamentos, escamas anucleadas, células fantasmas, células em fibra, células gigantes, células parabasais coilocitóticas. A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism 5 com intervalo de confiança de 95%. Nas células avaliadas tanto na região da espátula quanto na região da escova, os testes estatísticos indicaram que a razão AN/AC dos grupos HPV-ATIPIA+ e HPV+ATIPIA+ foram significativamente maiores em relação ao grupo HPV-ATIPIA-. Quanto aos resultados obtidos na análise dos critérios citológicos não clássicos, no grupo HPV-ATIPIA- apenas três lâminas apresentaram quatro ou mais critérios não clássicos, sendo que as demais lâminas apresentaram três (nove), dois (sete) ou um (uma) critérios não clássicos, sendo consideradas realmente negativas. Nos grupos HPV-ATIPIA+, HPV+ATIPIA- e HPV+ATIPIA+ foi possível observar quatro ou mais critérios não clássicos na maioria das lâminas. A presença do HPV não foi determinante na indução de alterações morfológicas significativas utilizando-se os parâmetros AN, AC e razão AN/AC, tanto na região da espátula quanto na região da escova nos esfregaços avaliados. A inclusão de critérios citológicos não clássicos não obteve validade para definir a presença do HPV morfológicamente.

The objective of this study was to evaluate cervical samples associated or not with HPV and cytological atypias, such as the increase in the nuclear/cytoplasmic ratio (NA/CA) and the presence of non-classical cytological criteria for the diagnosis of human papillomavirus (HPV). Between April 2008 and July 2010, 569 cervical samples were collected for the detection of DNA/HPV using the polymerase chain reaction (PCR) and to realize the cytological test of Papanicolaou. According to the results of cytological and molecular analysis, the samples were distributed in the following groups: HPV-ATYPIA-, HPV-ATYPIA+, HPV+ATYPIA- and HPV+ATYPIA+. For the morphometric analysis, 60 fields were captured for each sample (subdivided into region of the spatula and brush) at a magnification of 40x and eyepiece 10x with the instrumental help of a digital camera Leica DFC340FX attached to the microscope Leica DM5000B. Were measured the parameters nuclear area (NA), cytoplasmic area (CA) through the morphometry software Image J 1.43 for Windows Vista/7 and determined the nuclear/cytoplasmic ratio (NA/CA). For the analysis of cytological criteria were used the same images acquired for morphometric analysis, in which were observed the following criteria: bi or multi-nucleation, mild dyskeratosis, keratinization, hyperchromatic nucleus, smudge nucleos, spindle nucleos, mild koilocytosis, perinuclear halo, karyorrhexis, keratohyalin-like granules, condensation of filaments, anucleate squames, ghost cells, spindle cells, macrocytes and koilocytotic parabasal cells. Statistical analysis were realized using GraphPad Prism 5 with confidence interval of 95%. Significantly larger NA/CA ratios were found for the HPV-ATYPIA+ and HPV+ATYPIA+ compared to HPV-ATYPIA- for cells collected by either a spatula or a brush. Only 3 samples from the group HPV-ATIPIA- showed 4 or more parameters in the samples collected with a spatula, whereas the other samples showed three (nine), two (seven) or one (one) non-classic criteria, being considered truly negative. Among those collected with a brush, were observed four or more non-classical criteria in most of the samples. The presence of HPV was not decisive in the induction of significant changes using morphometric parameters NA, CA and NA/CA ratio for cells collected by either a spatula or a brush. The inclusion of non-classic cytological criteria received no validity to define morphologically the presence of HPV.

**Figura 1:** A: Representação da junção entre o epitélio estratificado escamoso e o epitélio glandular endocervical. B: Representação do carcinoma escamoso invasor. Jayshree *et al.*, 2009 (adaptado)..7

**Figura 2:** Fotomicrografias de esfregaços cérvico-vaginais corados pela coloração de Papanicolaou. Critérios citológicos não clássicos para o diagnóstico de HPV. .... 15

**Figura 3:** Distribuição dos grupos de acordo com os resultados da pesquisa viral para detecção do HPV e do diagnóstico citológico de Papanicolaou (N=20 por grupo). HPV-ATIPIA- representado em branco, HPV-ATIPIA+ representado em cinza claro, HPV+ATIPIA- representado em cinza escuro e HPV+ATIPIA+ representado em preto. ....24

<b>Tabela 1:</b> Distribuição dos microorganismos no grupo HPV+ATIIPIA-.....	31
<b>Tabela 2:</b> Distribuição dos resultados citológicos e moleculares no grupo HPV+ATIIPIA+.....	31
<b>Tabela 3:</b> Área Nuclear, Área Citoplasmática e Razão Núcleo/Citoplasma observadas em células escamosas da região coletada com auxílio de espátula nos grupos HPV-ATIIPIA-, HPV-ATIIPIA+, HPV+ATIIPIA- e HPV+ATIIPIA+.....	33
<b>Tabela 4:</b> Área Nuclear, Área Citoplasmática e Razão Núcleo/Citoplasma observadas em células escamosas da região coletada com auxílio de escova nos grupos HPV-ATIIPIA-, HPV-ATIIPIA+, HPV+ATIIPIA- e HPV+ATIIPIA+.....	34
<b>Tabela 5:</b> Critérios não clássicos observados por lâmina nos grupos HPV-ATIIPIA-, HPV-ATIIPIA+, HPV+ATIIPIA- e HPV+ATIIPIA+, independente da intensidade.....	37
<b>Tabela 6:</b> Critérios não clássicos observados por lâmina nos grupos HPV-ATIIPIA-, HPV-ATIIPIA+, HPV+ATIIPIA- e HPV+ATIIPIA+, independente da intensidade, excluindo-se os critérios que não foram observados em nenhum dos grupos avaliados e os critérios que foram observados em todos os grupos.....	38



**Quadro 1:** Classificação dos HPVs pertencentes ao gênero alpha quanto ao potencial de risco oncogênico. .... 5

**Quadro 2:** Principais parâmetros fornecidos pela análise morfométrica..... 17

- Gráfico 1:** Microorganismos identificados nas amostras cervicais das pacientes pertencentes aos grupos HPV-ATIPIA-, HPV-ATIPIA+, HPV+ATIPIA- e HPV+ATIPIA+. ..... 28
- Gráfico 2:** Tipos de HPV identificados nos grupos HPV+ATIPIA- e HPV+ATIPIA+. ..... 29
- Gráfico 3:** Atipias observadas nos grupos HPV-ATIPIA+ e HPV+ATIPIA+. ..... 30
- Gráfico 4:** Análise morfométrica da razão núcleo/citoplasma observados em células escamosas das regiões coletadas com auxílio de espátula e de escova no grupo HPV-ATIPIA-, considerando-se os diferentes microorganismos que podem ser encontrados na flora cervical. .... 32
- Gráfico 5:** Análise morfométrica da razão núcleo/citoplasma, observados em células escamosas das regiões coletadas com auxílio de espátula e de escova. Cada círculo representa uma lâmina em cada grupo. A linha tracejada representa a mediana obtida a partir do somatório dos valores provenientes de todos os grupos em cada região..... 35
- Gráfico 6:** Número de critérios não clássicos observados na região coletada com auxílio de espátula e de escova, por grupo, independente da intensidade de cada critério. Cada círculo representa uma lâmina em cada grupo. A linha tracejada representa a mediana obtida a partir do somatório do número de critérios em todos os grupos avaliados. .... 40

- AC:** área citoplasmática
- AG:** antígeno
- AGC:** células glandulares atípicas
- AGC-NEO:** células glandulares atípicas possivelmente neoplásicas
- AGC-SOE:** células glandulares atípicas sem outras especificações
- AGUS:** células glandulares atípicas de significado indeterminado
- AIS:** adenocarcinoma *in situ*
- ALTS:** *ASCUS/LSIL Triage Study*
- AN:** área nuclear
- AN/AC:** área nuclear/área citoplasmática
- ASC:** células escamosas atípicas
- ASCUS:** células escamosas atípicas de significado indeterminado
- ASC-US:** células escamosas atípicas de significado indeterminado
- ASC-H:** células escamosas atípicas em que não se pode excluir lesão de alto grau
- E:** *early region*
- HPV:** papiloma vírus humano
- HSIL:** lesão intra-epitelial escamosa de alto grau
- JEC:** junção escamo-colunar
- L:** *late region*
- LCR:** *long control region*
- LSIL:** lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau
- NCI:** *United States National Cancer Institute's*
- NIC:** neoplasia intra-epitelial cervical
- NIC I:** neoplasia intra-epitelial cervical grau I
- NIC II:** neoplasia intra-epitelial cervical grau II
- NIC III:** neoplasia intra-epitelial cervical grau III
- NUPEB:** Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
- OMS:** Organização Mundial de Saúde
- ORF:** *open reading frames*
- PAP:** reação de peroxidase-antiperoxidase
- PV:** papilomavírus
- PCR:** reação em cadeia de polimerase
- SIL:** lesão intra-epitelial escamosa
- URR:** *upstream regulatory region*

<b>1 - Introdução</b> .....	1
<b>2 - Revisão de Literatura</b> .....	3
2.1 - Características Gerais do Papiloma Vírus Humano (HPV) .....	4
2.2 - Ciclo de Vida do HPV e Associação com a Carcinogênese Cervical .....	5
2.3 - História Natural do Câncer do Colo do Útero .....	7
2.4 - Epidemiologia da Infecção pelo HPV e do Câncer do Colo do Útero .....	8
2.5 - Métodos de Detecção do DNA/HPV .....	9
2.6 - Citologia .....	10
2.6.1 - Métodos de Coleta .....	10
2.6.2 - Nomenclatura e Critérios Morfológicos .....	11
2.8 - Análise Morfométrica .....	16
<b>3 - Objetivos</b> .....	20
3.1 - Objetivo Geral .....	21
3.2 - Objetivos Específicos .....	21
<b>4 - Material e Métodos</b> .....	22
4.1 - Período e População Estudada .....	23
4.2 - Coleta e Processamento das Amostras .....	23
4.3 - Análise Morfométrica .....	23
4.4 - Análise dos Critérios Citológicos Não Clássicos para o Diagnóstico do HPV .....	25
4.5 - Análise Estatística .....	26
<b>5 - Resultados</b> .....	27
5.1 - Caracterização dos Grupos .....	28
5.1.1 - Microorganismos Identificados nos Grupos HPV-ATIPIA-, HPV-ATIPIA+, HPV+ATIPIA- e HPV+ATIPIA+ .....	28
5.1.2 - Tipos de HPV Identificados nos Grupos HPV+ATIPIA- e HPV+ATIPIA+ .....	29
5.1.3 - Atipias Observadas nos Grupos HPV-ATIPIA+ e HPV+ATIPIA+ .....	29
5.1.4 - Associação entre os Microorganismos e os Tipos de HPV Identificados .....	30
5.2 - Avaliação Morfométrica .....	32
5.3 - Avaliação dos Critérios Não Clássicos para o Diagnóstico Citológico da Infecção pelo HPV .....	36
<b>6 - Discussão</b> .....	41
<b>7 - Conclusões</b> .....	52
<b>8 - Referências</b> .....	54
<b>9 - Anexos</b> .....	65



O câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais frequente entre as mulheres, com aproximadamente 500 mil novos casos por ano em todo o mundo, sendo responsável pelo óbito de cerca de 230 mil mulheres por ano. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países em desenvolvimento quando comparada aos países desenvolvidos (WHO, 2010).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de 253.030 casos novos de câncer para o sexo feminino. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma (60 mil casos novos), serão os cânceres de mama (49 mil) e de colo do útero (18 mil) (INCA, 2010).

O exame citopatológico do colo do útero ou exame de Papanicolaou continua sendo a estratégia mais adotada para o rastreamento do câncer de colo do útero (WHO, 2010). Estima-se que possa haver uma redução de cerca de 80% da mortalidade por esse câncer por meio do rastreamento de mulheres na faixa etária compreendida entre 25 e 65 anos com subsequente tratamento das lesões precursoras com alto potencial de malignidade ou carcinoma *in situ* (INCA, 2010).

O diagnóstico citopatológico baseia-se no reconhecimento de critérios morfológicos em vários tipos celulares e, apesar de muitos destes critérios serem bem definidos para cada categoria diagnóstica, a literatura tem demonstrado marcante variabilidade interobservadores e até mesmo intraobservador. Estima-se que 20% dos resultados falso-negativos são devidos às falhas nas análises microscópicas, cujas taxas de discordância podem variar de 10% a 100% entre diferentes observadores (Gupta *et al.*, 2001; Vaucher *et al.*, 2006).

A análise computadorizada de imagens, surgida nas últimas décadas, tem sido utilizada para eliminar a variabilidade diagnóstica em amostras cito e histopatológicas, uma vez que é um método de alta precisão e reprodutibilidade. Tal método tem por objetivo à mensuração bidimensional de parâmetros tais como área, perímetro e o diâmetro médio de núcleos e/ou células além do reconhecimento de suas formas ou intensidade de coloração (Eldar *et al.*, 1999; Strefezzi *et al.*, 2003).

Dessa forma, a morfometria fornece ao observador (citopatologista ou histopatologista) valores quantitativos precisos que permitem a formação de uma base de dados de diversos parâmetros, possibilitando a categorização das células ou tecidos em normais, pré-neoplásicos ou neoplásicos, somando-se a isso, a capacidade de detectar variações sutis na forma, tamanho e/ou textura celular ou tecidual, que muitas vezes são imperceptíveis ao olho humano, mesmo com auxílio de microscopia óptica e eletrônica (Dardick & Payne, 1992).



## 2.1 - Características Gerais do Papiloma Vírus Humano (HPV)

Os papilomavírus (PV) constituem a família *Papillomaviridae*, um grupo taxonômico composto por vírus de DNA que estão relacionados a uma variedade de hospedeiros animais há milhões de anos (Chen *et al.*, 2007). Os HPVs fazem parte da família *Papillomaviridae* e estão agrupados dentro de 16 gêneros distintos, sendo que a maioria dos HPVs pertence aos gêneros *alpha e beta* (De Villiers *et al.*, 2004; Bernard, 2005).

Os HPVs são vírus não envelopados compostos por uma dupla fita de DNA circular de aproximadamente 8.000 pares de bases nitrogenadas. Têm seu genoma organizado em três regiões: região precoce (E – *early*), composta geralmente por seis unidades de tradução denominadas ORF (*open reading frames*); região tardia (L – *late*), composta por duas ORFs, as quais codificam proteínas estruturais do capsídeo viral e região reguladora, denominada URR (*upstream regulatory region*) ou LCR (*long control region*), responsável pela regulação da transcrição e replicação viral (Janicek & Averette, 2001).

Tipos distintos de HPVs apresentam diferenças superiores a 10% na sequência de nucleotídeos da região L1 do genoma (Bravo & Alonso, 2007). Até o momento, foram descritos mais de 200 tipos de HPVs (Forslund *et al.*, 2007). Tais vírus podem ser classificados quanto ao tropismo tecidual em cutâneo ou mucoso e de acordo com o potencial oncogênico em baixo, alto, provável alto e indeterminado (Schiffman *et al.*, 2005).

O gênero *alpha* compreende HPVs com tropismo por mucosas e apenas alguns tipos de HPVs com tropismo cutâneo tais como HPV 2, HPV 3 e HPV 10. Os HPVs pertencentes ao gênero *beta* estão associados principalmente a infecções cutâneas inaparentes, entretanto, podem também induzir lesões em indivíduos imunossuprimidos (De Villiers *et al.*, 2004).

O quadro 1 exhibe a classificação quanto ao potencial de risco oncogênico dos tipos de HPVs pertencentes ao gênero *alpha* (Muñoz *et al.*, 2006).



**Quadro 1:** Classificação dos HPVs pertencentes ao gênero *alpha* quanto ao potencial de risco oncogênico.

HPV	HPV	Risco	HPV	HPV	Risco	HPV	HPV	Risco	
Espécies Alpha	Genótipo	indeterminado	Espécies alpha	Genótipo	indeterminado	Espécies Alpha	Genótipo	indeterminado	
1	HPV32	Indeterminado	6	HPV30	Indeterminado	10	HPV6	Baixo	
	HPV42	Baixo		HPV53	Provável alto		HPV11	Baixo	
2	HPV28	Indeterminado	7	HPV56	Alto	11	HPV13	Baixo	
	HPV3	Indeterminado		HPV66	Provável alto		HPV74	Indeterminado	
	HPV10	Indeterminado		HPV59	Alto		HPV44	Baixo	
	HPV29	Indeterminado		HPV18	Alto		HPV55	Indeterminado	
	HPV77	Indeterminado		HPV45	Alto		13	HPV34	Indeterminado
3	HPV61	Baixo	HPV70	Baixo	HPV73	Provável alto			
	HPV72	Baixo	HPV39	Alto	15	HPV54	Baixo		
	HPV62	Indeterminado	HPV68	Provável alto		HPV71	Indeterminado		
	HPV81	Baixo	HPV85	Indeterminado	HPV90	Indeterminado			
	HPV83	Indeterminado	8	HPV91	Indeterminado	9	HPV52	Alto	
	HPV89	Baixo		HPV7	Indeterminado			HPV67	Indeterminado
	HPV84	Indeterminado		HPV40	Baixo			HPV33	Alto
4	HPV57	Indeterminado	9	HPV43	Baixo	HPV58	Alto		
	HPV2a	Indeterminado		HPV16	Alto	HPV31	Alto		
	HPV27	Indeterminado		HPV35	Alto				
5	HPV26	Provável alto							
	HPV69	Indeterminado							
	HPV51	Alto							
	HPV82	Provável alto							

Muñoz *et al.*, 2006 (adaptado)

## 2.2 - Ciclo de Vida do HPV e Associação com a Carcinogênese Cervical

No epitélio estratificado escamoso o ciclo de vida do HPV está intimamente vinculado a fatores de diferenciação expressos nas várias camadas celulares do tecido hospedeiro, entretanto, a biologia da infecção viral em outros tipos teciduais que não apresentam estratificação, tais como o epitélio glandular endocervical ainda é desconhecida (Wheeler, 2008).

A junção escamo-colunar (JEC), é a região do colo uterino onde ocorre o encontro do epitélio estratificado escamoso com o epitélio glandular endocervical. O nível em que se encontra a JEC varia em função de fatores como idade, paridade, assistência obstétrica e cervicites. Em cerca de 20% a 25% das mulheres, a JEC encontra-se na altura do óstio cervical; nos demais casos, a JEC encontra-se para fora do orifício uterino, o chamado ectrópio ou ectopia, podendo se situar em qualquer posição entre a borda externa do colo e a fenda cervical. Com a exposição do epitélio glandular endocervical ao pH vaginal ocorre estímulo e proliferação das células glandulares de reserva, as quais têm como função recompor o epitélio glandular no processo de renovação celular. Então, a partir da hiperplasia de tais células, desenvolve-se por um processo de metaplasia, um novo epitélio escamoso que substitui progressivamente o epitélio glandular endocervical evertido de forma completa e madura, constituindo-se assim a zona de transformação. A zona de transformação,

que tem como limites a JEC original e a atual JEC, reveste-se da máxima importância no que se refere a alterações pré-neoplásicas e neoplásicas escamosas (Burghardt & Östör, 1983) (Figura 1).

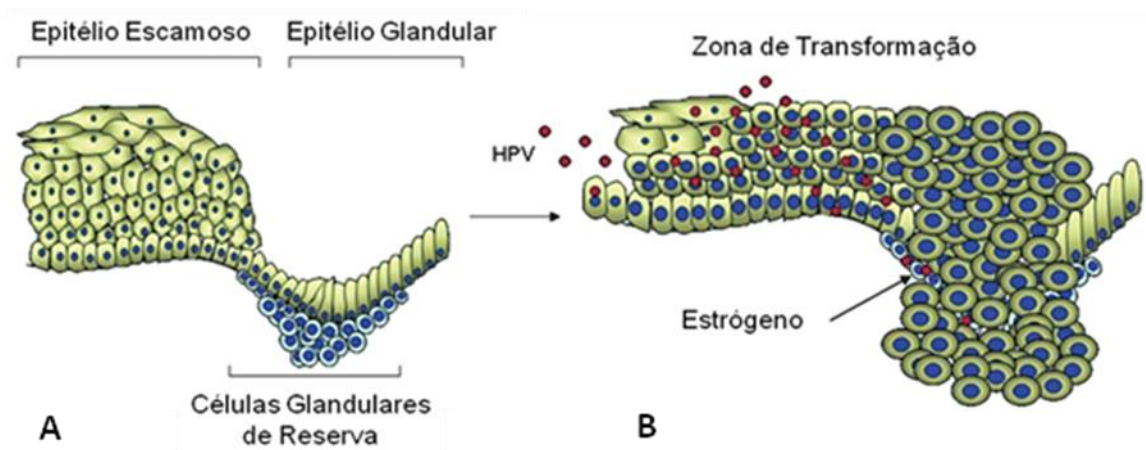
A infecção pelo HPV denominada produtiva inicia-se quando vírions penetram nas células escamosas basais através de micro traumatismos na mucosa. Ao se dividirem, as células infectadas distribuem equitativamente o DNA viral entre as células filhas, sendo que parte delas inicia o processo de diferenciação e outra parte permanece na forma episomal e atua como reservatório do DNA viral. Na camada intermediária ocorre a amplificação do genoma viral e o empacotamento em partículas infectantes que serão liberadas ao alcançar a superfície do epitélio, reiniciando-se o ciclo (Doorbar, 2006).

Define-se persistência de infecção pelo HPV, quando é possível detectar o mesmo tipo viral em amostras obtidas em um intervalo de tempo específico, porém, ainda não existe consenso na definição deste intervalo de tempo, o qual pode variar entre 6, 12 ou 18 meses (Schiffman *et al.*, 2005).

Na infecção denominada não produtiva, a persistência da infecção interrompe o ciclo de vida normal do vírus e está associada à instabilidade genética das células hospedeiras. Não se conhece totalmente o que desencadeia este processo bem como os cofatores requeridos; a literatura relata que em infecções persistentes ocorre um processo de integração entre o genoma viral e o do hospedeiro repercutindo na inativação do gene E2, por deleção ou corte no sítio de inserção do vírus. Como uma das funções de E2 é atuar como regulador da expressão dos genes E6 e E7, sua inativação resulta na expressão exacerbada de E6 e E7, que por sua vez, codificam oncoproteínas que se complexam as proteínas celulares codificadas pelos genes supressores tumorais p53 e pRb, respectivamente, inativando-as (Szostek *et al.*, 2006; Doorbar, 2006).

Normalmente, se o DNA da célula está danificado, a proteína expressa pelo gene p53 liga-se a p21 e interrompe o ciclo celular visando o reparo do DNA pela DNA polimerase e outras enzimas de reparo ou, alternativamente induz a célula a apoptose. As oncoproteínas codificadas pelo gene E6 promovem a quebra de p53 mediada por ubiquitina, o que resulta na perda da atividade da p53 e repercute na manutenção da replicação celular mesmo se o DNA estiver danificado (Tommasino *et al.*, 2003).

Analogamente, na ausência de interferência, a proteína expressa pelo gene Rb, quando não fosforilada liga-se ao complexo de transcrição E2F, que é um promotor da replicação celular, inativando-o. Em decorrência disso, a célula se mantém no estágio G zero do ciclo celular, isto é, antes que ocorra a replicação do DNA. Porém, quando as oncoproteínas codificadas pelo gene E7 se ligam a pRb ocorre a dissociação do complexo pRb-E2F, o que promove a entrada da célula na fase S da mitose (Cho *et al.*, 2002).



**Figura 1:** **A:** Representação da junção entre o epitélio estratificado escamoso e o epitélio glandular endocervical. **B:** Representação do carcinoma escamoso invasor. Jayshree *et al.*, 2009 (adaptado)

### 2.3 - História Natural do Câncer do Colo do Útero

Estudos longitudinais têm demonstrado que a maioria das infecções pelo HPV não são detectáveis dentro de um a dois anos após sua observação inicial. Cerca de 50% das infecções pelo HPV em mulheres com citologia normal e 90% das mulheres com diagnóstico normal ou neoplasia intra-epitelial cervical grau I (NIC I) terão resolução espontânea. De fato, a maioria das infecções pelo HPV são assintomáticas e transitórias e por isso, a maioria das mulheres desconhecem a presença da infecção (Schlecht *et al.*, 2003; Plummer *et al.*, 2007).

Estudos de coorte revelam que a depuração do HPV parece resultar de resposta imune específica contra este vírus. Ainda não está claro se a infecção pelo HPV pode apresentar um estado de latência nas células basais e ainda, se existe a possibilidade de reativação da infecção no futuro, sendo assim, não é possível fazer a distinção entre nova infecção e reativação de infecção latente. A taxa de exposição acumulada ao vírus é difícil de quantificar, pois grande parte das infecções é transitória e os resultados sorológicos são inconclusivos, isto é, apenas 60% das mulheres sabidamente infectadas pelo HPV irão desenvolver anticorpos específicos detectáveis (Wheeler, 2008).

A maioria das mulheres no mundo provavelmente será infectada com um ou mais tipos de HPV ao longo da sua vida, porém, apenas uma pequena parcela desenvolverá lesão de alto grau e câncer. Estima-se que o tempo decorrido entre a infecção inicial e o desenvolvimento do câncer seja maior do que 20 anos, por conseguinte, tal diagnóstico é raro entre mulheres jovens (Bray *et al.*, 2005; Sherman *et al.*, 2005).

É crescente o consenso que qualifica a persistência da infecção viral como causa necessária, mas insuficiente para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas e

adenocarcinomas, ou seja, não é possível haver lesão na ausência de infecção, todavia, reconhece-se ser possível existir infecção e não existir lesão (Muñoz *et al.*, 2004; 2006).

## 2.4 - Epidemiologia da Infecção pelo HPV e do Câncer do Colo do Útero

Considera-se que o HPV seja de transmissão preferencialmente sexual. Contudo, existe a possibilidade de contaminação da região ano-genital por meio de material altamente transmissível e a transmissão congênita. Neste caso, a infecção é adquirida no momento do parto e o recém-nascido poderá desenvolver um quadro de papilomatose laríngea (Kashima & Shah, 1987). O período de incubação do vírus varia de três semanas a oito meses ou até mesmo anos (Maw *et al.*, 1998).

Estudos envolvendo mulheres jovens que se tornaram sexualmente ativas recentemente têm detectado alta taxa de incidência de infecção pelo HPV (aproximadamente 50% das mulheres foram infectadas até três anos após o início da atividade sexual). Verifica-se, portanto, que grande parte das infecções são adquiridas nos primeiros anos após o início da atividade sexual, refletindo o pico de prevalência de 20% a 30% observado em mulheres na faixa etária entre 16 e 25 anos de idade. Após os 25 anos esta taxa declina como consequência da resolução espontânea da maioria das infecções e atinge um índice de 5% em mulheres com mais de 45 anos de idade (Winer *et al.*, 2003; Giuliano *et al.*, 2008).

Em todo o mundo, estima-se que 291 milhões de mulheres estejam infectadas pelo HPV (Smith *et al.*, 2007). O HPV 16 é o tipo de alto risco oncogênico mais comum, sendo detectado em aproximadamente 50% das lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (HSIL) e dos carcinomas invasores. Esta taxa é significativamente maior para o HPV 16 quando comparado com todos os outros tipos virais de alto risco oncogênico (Muñoz *et al.*, 2003; Castle *et al.*, 2005). Por outro lado, o HPV 18 é encontrado em maior proporção em adenocarcinomas do que em carcinomas de células escamosas (Castellsagué *et al.*, 2006).

Os outros tipos de HPV de alto risco oncogênico contribuem com 5% ou menos dos casos de câncer cervical em todo o mundo, incluindo-se os tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82.

Os demais tipos de HPV que infectam o trato ano-genital são considerados de baixo risco oncogênico ou não carcinogênico, incluindo-se os tipos 6 e 11, os quais são responsáveis por mais de 90% das verrugas ano-genitais (Wheeler, 2008).

Estudos que avaliam o risco de desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial cervical grau III (NIC III) ou câncer cervical em mulheres infectadas pelo HPV demonstram resultados consistentes no envolvimento de cofatores na progressão das lesões, dentre os quais se destacam o tabaco, a infecção por *Chlamydia trachomatis*, fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro, tais

como HLA classe I e classe II além de tipo, carga e integração viral (McIntyre-Seltman *et al.*, 2005; Appleby *et al.*, 2006).

Além do descrito acima, em mulheres infectadas com tipos de HPV de alto risco oncogênico, o uso prolongado de contraceptivo oral pode aumentar significativamente o risco de desenvolvimento de lesões de alto grau e câncer (Smith *et al.*, 2003).

Em contrapartida, a participação de outras infecções sexualmente transmissíveis como pelo vírus herpes simples e *Trichomonas vaginalis* e fatores nutricionais como ingestão de frutas, vegetais e álcool, não possuem consequências bem estabelecidas na evolução das lesões (Hildesheim & Wang, 2002; Castle & Giuliano, 2003).

Tem sido descrito na literatura que quando se compara o *clearance* de tipos virais de baixo e alto risco oncogênico, os tipos de baixo risco apresentam *clearance* rápido, os tipos de alto risco 31, 33, 35, 52 e 58 *clearance* intermediário enquanto o tipo de alto risco 16 exibe *clearance* significativamente mais lento (Molano *et al.*, 2003).

## 2.5 - Métodos de Detecção do DNA/HPV

Existem várias técnicas de detecção do DNA/HPV, dentre as quais se destacam a captura híbrida e a reação em cadeia de polimerase (PCR).

A captura híbrida baseia-se em uma reação de hibridização molecular que utiliza sondas não radioativas com a amplificação da detecção de híbridos por quimioluminescência. Permite a detecção de 18 tipos de HPVs que infectam o trato ano-genital e a avaliação da carga viral com uma sensibilidade de 1 pg/mL de DNA/HPV. O grupo A possui sondas para os tipos virais de baixo risco 6, 11, 42, 43 e 44 enquanto o grupo B possui sondas para os tipos virais de alto risco 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68. Todavia, por meio desta técnica, não é possível especificar o tipo viral nem detectar tipos que possam estar presentes na amostra, mas que não apresentam homologia com as sondas testadas (Lörincz & Richart, 2003).

A PCR é uma técnica de síntese de ácidos nucleicos em que um segmento específico de DNA é replicado. Para que a reação ocorra é necessário haver substrato (ex.: DNA extraído de secreção cérvico-vaginal), um par de *primers* ou iniciadores de reação, desoxirribonucleotídeos trifostato-dNTPs (unidades do DNA) e *Taq DNA polimerase*, enzima que adiciona os dNTPs às novas fitas. A reação ocorre basicamente em três etapas: desnaturação do DNA, anelamento dos *primers* com as sequências complementares do DNA molde e extensão (Castle *et al.*, 2002).

Estudos que avaliaram diferentes sistemas de iniciadores sugeriram que a sensibilidade e a especificidade da PCR podem variar de acordo com o sistema de iniciadores utilizado, o tamanho do fragmento amplificado, as condições da reação e a qualidade da *Taq DNA polimerase* utilizada,

bem como o espectro de tipos detectados e a capacidade de detecção de infecções múltiplas, pois alguns iniciadores podem amplificar preferencialmente certos tipos de HPV, e com isto, subestimar a prevalência de infecção por múltiplos tipos (Castle *et al.*, 2002; Clifford *et al.*, 2006).

Diversos estudos concluíram que a pesquisa de DNA/HPV por meio da captura híbrida ou da PCR é substancialmente mais sensível do que o exame citológico de Papanicolaou. A sensibilidade da pesquisa de DNA/HPV variou de 63% a 100% com uma média de aproximadamente 92%. Em contraste, a sensibilidade do exame de Papanicolaou obteve valores entre 20% e 86% com valor médio de 58% (Lörincz & Richart, 2003).

## 2.6 - Citologia

### 2.6.1 - Métodos de Coleta

Os métodos de coleta mais utilizados na avaliação oncótica cérvico-vaginal são a coleta convencional (dupla ou tríplice) e a coleta em meio líquido.

Para a coleta convencional dupla (recomendada pelo Ministério da Saúde), utiliza-se a espátula de Ayre para a obtenção de células da ectocérvice e a escova cilíndrica para adquirir células da endocérvice, confeccionando-se o esfregaço em apenas uma lâmina (Arbyn *et al.*, 2008). O uso combinado de espátula de Ayre e de escova endocervical tem demonstrado bons resultados, e por isso, é a técnica de escolha para a citologia cérvico-vaginal convencional (Boon *et al.*, 1989).

Na coleta convencional tríplice (VCE), colhe-se material de três áreas na mesma lâmina, onde V representa o material obtido do fundo de saco vaginal lateral, C representa a ectocérvice (incluindo a JEC) e E representa o canal endocervical (INCA, 2000).

A citologia em meio líquido surgiu para atender à demanda do escrutínio computadorizado realizado por aparelhos automatizados para citologia cérvico-vaginal (Takahashi & Naito, 1997). Esta metodologia é resultado de mais de uma década de pesquisas, na busca de um meio com condições de preparo citológico de excelência em fixação, preservação celular e também adequado para estudo biomolecular.

Existem várias metodologias de preparo de citologia em meio líquido tais como DNA-Citoliq® (Digene-Brasil), Thin Prep® (Cytoc Corp., USA) e Aytocyte® (Tripath, USA).

O método de coleta DNA-Citoliq® (Digene-Brasil), por exemplo, consiste na utilização de uma única escova de formato cônico com desenho anatômico e extremidade destacável que permite a esfoliação das células da ectocérvice, da JEC e da endocérvice. Após a coleta, a escova é desconectada do cabo e acondicionada em um tubo plástico com capacidade para 10 mL contendo líquido preservante e/ou fixador, que permite o posterior preparo do material citológico em lâmina

para microscopia. Dessa forma, o material colhido fica disponibilizado de forma homogênea e randômica possibilitando o preparo de várias lâminas (Velasco, 2001).

### 2.6.2 - Nomenclatura e Critérios Morfológicos

O exame citológico de Papanicolaou foi a principal iniciativa no que se refere à prevenção do câncer cervical nos últimos 70 anos reduzindo drasticamente a incidência e mortalidade da doença notadamente em países desenvolvidos, onde os programas de rastreamento são bem estruturados.

Contudo, mesmo com a favorável relação entre a história natural do câncer do colo do útero e os programas de rastreamento da doença, existem falhas que podem ser atribuídas aos problemas de amostragem, os quais são apontados como responsáveis por 66% dos resultados falso-negativos e ocorrem quando não se consegue obter células provenientes das lesões devido a sua localização, aderência intercelular por desmossomos ou quando a confecção ou a fixação do esfregaço é realizada de forma inadequada.

Já os erros de leitura podem repercutir em resultados falso-positivos e falso-negativos e referem-se às falhas no reconhecimento de alterações celulares. A fadiga do *screening* é reconhecida como a principal causa dos resultados falso-negativos e é exacerbada devido à sobrecarga de trabalho (Robertson *et al.*, 1993).

A nomenclatura tradicional em citologia foi introduzida por Papanicolaou nos anos 40 e classifica os esfregaços cervicais em cinco grupos: Classe I, citologia normal, Classe II, citologia atípica, porém não neoplásica, Classe III, citologia suspeita de malignidade, Classe IV, citologia fortemente suspeita de malignidade e Classe V, citologia sugestiva de malignidade (Papanicolaou & Traut, 1997).

O termo displasia foi introduzido por Reagan e Hamonic em 1956 para descrever a proliferação de células atípicas que lembram o epitélio basal, mas que apresentam atipia nuclear, perda de polaridade e aumento da razão núcleo/citoplasma. Tais alterações foram divididas em displasia leve, moderada e acentuada de acordo com a extensão de epitélio comprometido (Reagan & Hamonic, 1956). Estudos posteriores demonstraram a relação entre a progressão das displasias e o desenvolvimento de câncer cervical, resultando na utilização do termo neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) por Richart, as quais foram subdivididas em NIC I, II e III, correspondendo à displasia leve, moderada e acentuada, respectivamente (Richart, 1967).

Em 1988, em uma tentativa de padronizar o relato da citologia cérvico-vaginal, o Instituto Nacional de Saúde adotou o Sistema de Bethesda, o qual foi modificado em 1991 e 2001. O Sistema de Bethesda categoriza as amostras em dentro dos limites da normalidade ou apresentando

atípias epiteliais, separando dessa forma, alterações celulares secundárias associadas a processos inflamatórios e de reparo, daquelas relacionadas às lesões precursoras de câncer.

O Sistema de Bethesda 1988 introduziu a categoria células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS) para agrupar as atípias que não estão relacionadas à reatividade nem a lesões pré-neoplásicas e neoplásicas (Solomon, 1991).

Devido à baixa reprodutibilidade da interpretação do diagnóstico de ASCUS, uma nova categoria foi criada, a de células escamosas atípicas (ASC) e um novo conceito foi proposto no Sistema de Bethesda 2001 como sendo “alterações celulares sugestivas de lesão intra-epitelial escamosa que são insuficientes quantitativamente ou qualitativamente para uma interpretação definitiva”. Tal categoria foi subdividida em ASC de significado indeterminado (ASC-US) e ASC em que não se pode excluir lesão de alto grau (ASC-H).

A lesão intra-epitelial escamosa (SIL) abrange o espectro de atípias escamosas não invasivas associadas ao HPV, que variam desde alterações celulares associadas a uma infecção transitória pelo HPV até alterações celulares anormais que representam precursores de alto grau para um câncer escamoso invasor. Esse espectro se divide nas categorias de baixo grau (LSIL) e de alto grau (HSIL). As lesões de baixo grau abrangem as alterações celulares anteriormente denominadas displasia leve e NIC I ao passo que as lesões de alto grau abrangem displasia moderada, displasia acentuada ou NIC II, NIC III.

De forma análoga, a categoria células glandulares atípicas de significado indeterminado (AGUS) foi introduzida no Sistema de Bethesda em 1988 e revista no Sistema de Bethesda 2001 sendo reclassificada em três categorias: células glandulares atípicas sem outras especificações (AGC-SOE), células glandulares atípicas possivelmente neoplásicas (AGC-NEO) e adenocarcinoma endocervical *in situ* (AIS). Os achados glandulares atípicos devem ser categorizados, sempre que possível, como um tipo celular de origem (endocervical ou endometrial), mas em outras circunstâncias, a terminologia genérica células glandulares atípicas (AGC) pode ser utilizada (Solomon *et al.*, 2002).

Os critérios clássicos para o diagnóstico citológico do HPV, que acometem as células escamosas são representados pela (1) coilocitose, que pode ser definida como alteração em células escamosas maduras contendo um, dois ou mais núcleos discarióticos apresentando uma grande cavidade ou área clara que circunda o núcleo proeminente, com bordas bem definidas e a zona periférica amíu-de em borrão (Koss & Durfee, 1956; Meisels & Fortin, 1976); e pela (2) disqueratose que é um processo anormal de maturação das células profundas que se apresentam arredondadas, com citoplasma densamente eosinofílico e núcleo picnótico (Purola & Savia, 1977).

Apesar de a literatura ser unânime em apresentar a coilocitose como critério patognomônico para o diagnóstico de HPV e sugerir que ela exprime a atividade viral, muitos autores destacam que



este não é o critério mais frequentemente encontrado nos esfregaços cérvico-vaginais (Azocar *et al.*, 1990; Yoshinouchi *et al.*, 1999). Morse *et al.* (1988) ao compararem hibridização molecular com citologia, verificaram que quando se utiliza somente a coilocitose como critério, a concordância entre os diagnósticos é de 48%, no entanto, quando mais critérios são utilizados, como por exemplo disqueratose, coilocitose leve, binucleação e multinucleação, a concordância ocorre em 75% dos casos.

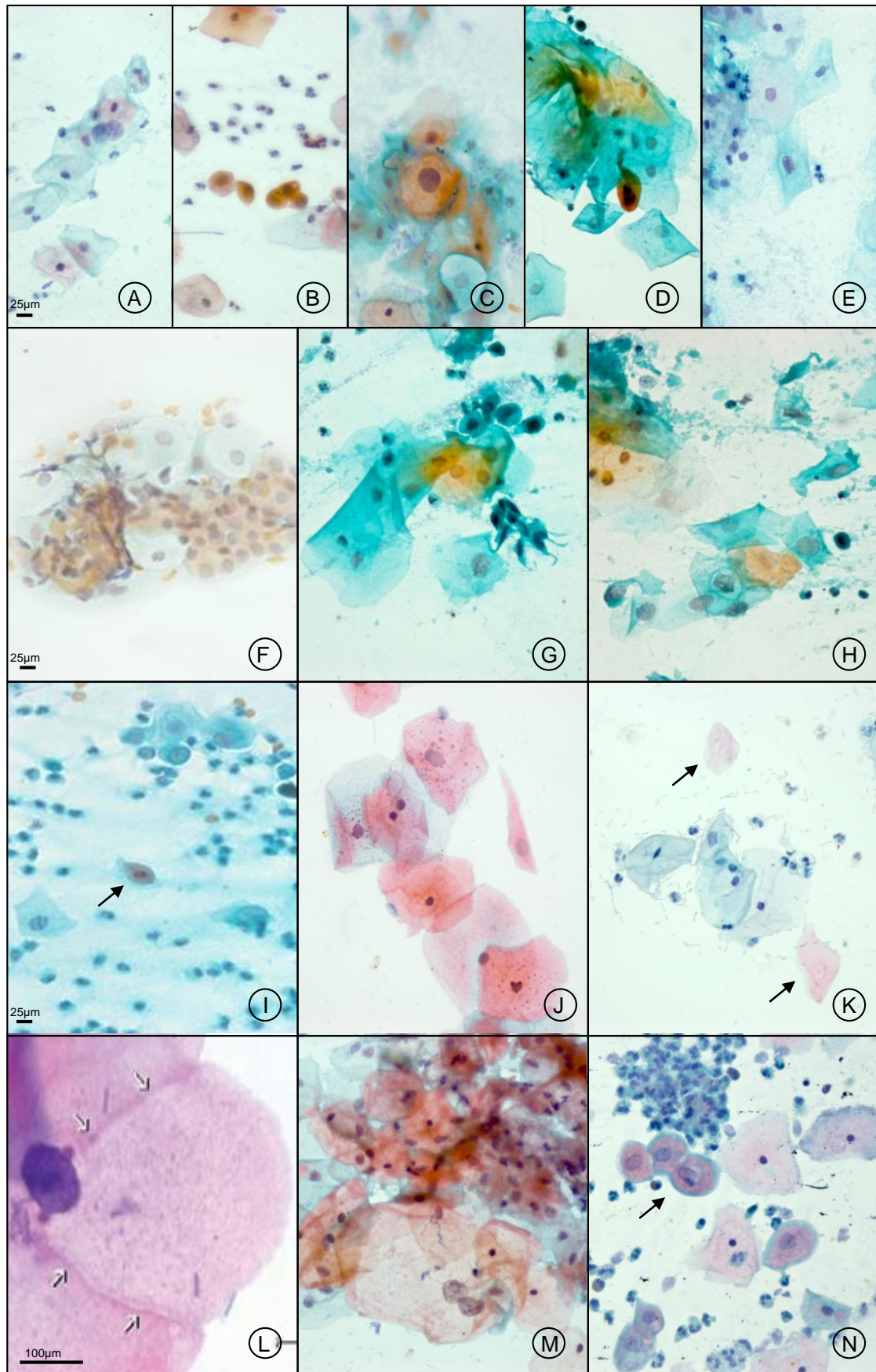
Em decorrência disso, tem-se estudado a introdução de novos critérios morfológicos denominados não clássicos ou secundários para o diagnóstico de HPV com o objetivo de ampliar a sensibilidade do teste de Papanicolaou aproximando-se da sensibilidade obtida em análises histológicas e em métodos de detecção do DNA/HPV por captura híbrida ou reação em cadeia da polimerase (Collaço & Pinto, 1994).

Os critérios não clássicos para o diagnóstico citológico do HPV, que acometem as células escamosas são (Figura 2):

- Bi ou Multinucleação (Luzzatto *et al.*, 1990); (Figura 2A)
- Disqueratose Leve (De Borges *et al.*, 1989); (Figura 2B)
- Núcleo Hiper Cromático: representado pelo hiper cromatismo nuclear e ausência de irregularidades, tanto na cromatina como na membrana nuclear (Cecchini *et al.*, 1990); (Figura 2C)
- Núcleo em Borrão: células com citoplasma orangeofílico, às vezes apresentando núcleo aumentado, irregular, hiper cromático, podendo ser único ou duplo. A cromatina, na maioria das vezes, aparece em borrão (Cavaliere *et al.*, 1990); (Figura 2D)
- Queratinização (Hudock *et al.*, 1995); (Figura 2F)
- Núcleo em Fibra: consiste em uma distorção do contorno nuclear a partir da configuração arredondada normal ou ovalada do núcleo. A cromatina aparece grumosa e no citoplasma pode aparecer clareamento perinuclear com numerosos tonofilamentos (Schneider *et al.*, 1987); (Figura 2G)
- Células em Fibra: são células com citoplasma alongado como uma fibra. Representam a forma mais pronunciada da disqueratose e são diferenciadas das células similares encontradas no carcinoma escamoso queratinizante pelo padrão regular da cromatina (Schneider *et al.*, 1987); (Figura 2G)
- Coilocitose Leve (Cecchini *et al.*, 1990); (Figura 2H)
- Halo Perinuclear: apresenta-se como uma área clara nítida em volta do núcleo que forma um halo. O núcleo frequentemente perde detalhes do envelope nuclear e a cromatina pode estar agrupada irregularmente (Naib & Masukawa, 1961; Meisels & Fortin, 1976); (Figura 2E)

- Cariorréxe: condensação periférica da cromatina que permanece como massas agregadas depois do desaparecimento da borda ou limite nuclear (Nuovo, 1990); (Figura 2I)
- Grânulos Querato-Hialinos: são condensações de coloração basofílicas ou eosinofílicas. Frequentemente as células são anucleadas e, às vezes, todas as substâncias citoplasmáticas estão condensadas em grânulos, formando células com aspecto de “sarampo” (Bollmann *et al.*, 2005); (Figura 2J)
- Condensação em Filamentos: o citoplasma é visto com fissuras ou com aspecto de vidro quebrado e com coloração fraca (Schneider *et al.*, 1987); (Figura 2L)
- Escamas Anucleadas: trata-se de células escamosas com citoplasma queratinizado e ausência de núcleo (Kern, 1991); (Figura 2K)
- Células Fantasmas: são células que apresentam clareamento citoplasmático, com uma evidente falta de substâncias citoplasmáticas não coradas, entre o núcleo e a borda celular (Schneider *et al.*, 1987); (Figura 2K)
- Células Gigantes: apresentam alterações como binucleação, multinucleação, macronucleose e macrocitose, circundados por halo com borda concêntrica que, aparentemente, separa estes núcleos do citoplasma (Luzzatto *et al.*, 1990); (Figura 2M)
- Células Parabasais Coilocitóticas: são células pequenas, contendo núcleo maior, fortemente corado e irregular. O citoplasma é anfófilico ou cianofílico e, às vezes, mostra área clara na proximidade do núcleo (Yamamoto *et al.*, 2004); (Figura 2N)

É importante ressaltar que apesar do exame de Papanicolaou ter sido preconizado, fundamentalmente, para o reconhecimento de alterações celulares pré-neoplásicas que acometem, notadamente, o epitélio escamoso do colo do útero, é possível também sugerir a presença de agentes inflamatórios com alta correlação aos testes considerados padrão ouro. Portanto, a identificação ou suspeita diagnóstica de vírus Herpes simples, Citomegalovírus, *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus sp.*, *Candida sp.* e *Trichomonas vaginalis* são informes adicionais do exame citopatológico de Papanicolaou (Adad *et al.*, 2001).



**Figura 2:** Fotomicrografias de esfregaços cérvico-vaginais corados pela coloração de Papanicolaou. Critérios citológicos não clássicos para o diagnóstico de HPV.

## 2.7 - Detecção do HPV e Atipias Citológicas

O diagnóstico citológico de ASC é o mais frequente entre todas as categorias citológicas, entretanto, é também o diagnóstico menos reprodutível entre citopatologistas. É possível detectar HPV de alto risco oncogênico em torno de 40% a 51% e 74% a 88% das mulheres com resultado citológico de ASC-US e de ASC-H, respectivamente (Manos *et al.*, 1999; Sherman *et al.*, 2001). Similarmente, a prevalência de NIC II e NIC III é maior em mulheres com citologia evidenciando ASC-H do que ASC-US. Em 2004, um estudo de meta-análise apontou que ao se considerar mulheres com diagnóstico citológico de ASC-US e ASC-H, os testes de detecção de HPV são mais sensíveis para avaliar a progressão para NIC II e NIC III do que a repetição da citologia (Arbyn *et al.*, 2004; Kulasingam *et al.*, 2006).

O diagnóstico citológico de LSIL está altamente correlacionado a presença de HPV. O estudo de triagem ASCUS/LSIL (ALTS) do United States National Cancer Institute's (NCI) ao realizar testes de detecção de DNA para 38 tipos de HPV observou 85% de positividade entre as mulheres com citologia evidenciando LSIL (Castle *et al.*, 2008). A prevalência de histologia evidenciando NIC II, NIC III e carcinoma invasor entre mulheres com LSIL variou de 12 a 17%.

O diagnóstico citológico de HSIL está ainda mais associado à infecção pelo HPV, isto é, detecta-se a presença de HPV em mais de 85% dos casos de HSIL (Smith *et al.*, 2007). Estima-se também, que cerca de 53% a 66% das mulheres apresentam histologia evidenciando NIC II ou NIC III e que 2% das mulheres desenvolverão carcinoma invasor (Massad *et al.*, 2001; Dunn *et al.*, 2003).

Apesar do diagnóstico de AGC ser pouco comum e frequentemente associado a condições benignas, como por exemplo, às alterações celulares reativas, parte das mulheres com AGC desenvolvem neoplasias intra-epiteliais significantes como NIC II, NIC III e AIS bem como carcinoma invasor (3% a 17%) (Derchain *et al.*, 2004).

Por outro lado, também se identifica HPV em mulheres que apresentam resultado citológico negativo para malignidade. No trabalho de Vince *et al.* (2001), das 44 (9,4%) pacientes que obtiveram diagnóstico citológico de alterações celulares benignas, 4,5% apresentaram HPV de baixo risco oncogênico e 20,5% apresentaram HPV de alto risco oncogênico evidenciados por meio de captura híbrida.

## 2.8 - Análise Morfométrica

Morfometria é a descrição quantitativa dos achados geométricos de estruturas de qualquer dimensão (Buhmeida, 2006). Subdivide-se em planimetria, que é o processo de medição horizontal,

ou seja, é a medida das áreas das superfícies planas, e estereometria que está relacionada à medida dos sólidos (Meijer, 1997). O quadro 2 mostra diversos parâmetros que podem ser obtidos por meio da planimetria.

**Quadro 2:** Principais parâmetros fornecidos pela análise morfométrica.

Parâmetro	Descrição
Área	Medida por meio do número de <i>pixels</i> no polígono
Perímetro	Comprimento do limite externo do polígono
Coefficiente de arredondamento	Fornece um valor entre 0 e 1; quanto maior o valor, mais redondo é o objeto. Se a relação for igual a 1, o objeto é um círculo perfeito
Alongamento	Relação do comprimento do eixo principal com o comprimento do eixo secundário. O resultado é um valor entre 0 e 1. Se o alongamento for 1, o objeto é aproximadamente circular ou quadrado; se o resultado for <1, o objeto se torna mais alongado
Comprimento do eixo principal	Comprimento da linha mais longa que pode ser desenhada pelo objeto
Ângulo do eixo principal	Ângulo entre os eixos horizontal e principal, em graus
Comprimento do eixo secundário	Comprimento da linha mais longa que pode ter o objeto perpendicular ao eixo principal
Ângulo do eixo secundário	Ângulo entre o eixo horizontal e o eixo secundário, em graus.

De Andrea *et al.*, 2008 (adaptado)

As mensurações de imagens microscópicas são tão antigas quanto o próprio microscópio. Antonie van Leeuwenhoek, no século XVII, desenvolveu um método para mensurar objetos microscópicos, tendo como referência grãos de areia e fios de cabelo de tamanhos diferentes. Em 1674, ao utilizar essa metodologia, ele descobriu que o eritrócito humano era 25 mil vezes menor do que um grão de areia pequeno, correspondendo a 8,5 $\mu$ m (Meijer, 1997).

No século XX, Jacoby (1925) constatou que o volume de uma célula normal duplica antes da divisão celular. Heiberg & Kemp (1929) foram provavelmente os primeiros a comprovar a impressão subjetiva de que os núcleos de células malignas são maiores do que os de células normais. Nas décadas de 50 e 60, o aumento do interesse entre anatomistas e biólogos impulsionou fortemente a morfologia e a análise morfométrica na biomedicina. Já nas décadas de 70 e 80, a aplicação da análise morfométrica em patologia tornou-se popular e amplamente utilizada, especialmente no câncer.

A morfometria nuclear estuda alguns parâmetros do núcleo como tamanho, forma e padrão cromatínico. Tais características nas células malignas são sabidamente diferentes daquelas observadas nas células benignas. Com base nessas diferenças, vários autores propuseram que a morfometria nuclear seja utilizada para aprimorar os parâmetros diagnósticos, fornecer fatores prognósticos confiáveis e avaliar a resposta terapêutica (Baak, 1987; Carr & Pettigrew, 1991; Millot & Dufer, 2000).

As observações de alterações de parâmetros morfométricos nucleares em células localizadas na periferia de neoplasias malignas sugerem a hipótese de que alterações morfológicas ocorram nas células antes da manifestação clínica do tumor. Portanto, a morfometria nuclear poderia atuar como biomarcador na avaliação de alterações displásicas e o seu potencial carcinogênico (Boone *et al.*, 2000).

Em 1982, Diamond *et al.* utilizaram pela primeira vez a medida da área nuclear como fator prognóstico em adenocarcinomas de próstata. Outros autores realizaram o mesmo experimento em outros órgãos, e confirmaram que as metástases são mais frequentemente observadas em neoplasias cujos núcleos são grandes. Em contrapartida, neoplasia com núcleos pequenos exibem melhor prognóstico (Högberg *et al.*, 1992).

Apel *et al.* (1985) estudaram morfometricamente os núcleos de 16 casos de osteossarcoma central de alto grau, que foram subdivididos em dois grupos com base no grau de necrose à quimioterapia pré-operatória: respondedores e não respondedores. As células nos dez casos respondedores apresentaram marcado pleomorfismo nuclear e aumento de tamanho, tanto celular como nuclear. Além disso, os núcleos se apresentavam hiper cromáticos e multinucleados.

No campo da citopatologia cérvico-vaginal, a morfometria nuclear foi utilizada para avaliar vieses relacionados a diagnósticos limítrofes, os quais representam grande parte da variabilidade interobservadores, tais como ASC-US e LSIL. O desempenho de observadores com diferentes graus de experiência revelou que observadores humanos têm dificuldade de discernir alterações similares e que o tamanho do núcleo contribui substancialmente para a variabilidade entre os diagnósticos de ASC-US/LSIL (Schmidt *et al.*, 2008).

Athanassiadou *et al.* (2001) estudaram a razão núcleo/citoplasma em esfregaços cérvico-vaginais classificados como NIC I, NIC II e NIC III associados ou não a presença de alterações celulares compatíveis com a presença do HPV para avaliar se a morfometria é mais sensível no diagnóstico da NIC. Foi observado que o aumento do grau da NIC é acompanhado do aumento dos valores da razão núcleo/citoplasma, independente da presença do HPV, ou seja, não foram observadas evidências significativas nos valores médios da razão núcleo/citoplasma entre os grupos de NIC com e sem infecção pelo HPV.

O acentuado aumento do interesse da aplicação da patologia quantitativa para diagnóstico e prognóstico do câncer é devido principalmente à crescente demanda de quantificação e objetividade, à melhoria e ampla disponibilidade de tecnologia adequada, a melhoria das possibilidades terapêuticas para pacientes com câncer e a consciência de que alterações que escaparam da análise convencional poderiam ser detectadas por meio da análise quantitativa (Buhmeida, 2006).

Diante do exposto, verifica-se que existe forte correlação entre a detecção do HPV e a observação de atipias citológicas ao exame de Papanicolaou, isto é, espera-se que em amostras cervicais que apresentam HPV seja possível observar também atipias citológicas e, da mesma forma, amostras cervicais que não apresentam o HPV não seja possível observar atipias citológicas.

Todavia, existe uma significativa parcela de amostras cervicais em que se identifica a presença de HPV, mas que não apresentam diagnóstico citológico positivo e amostras cervicais em que não se identifica a presença de HPV, mas que apresentam diagnóstico citológico positivo.

Portanto, este trabalho foi proposto para investigar se a análise quantitativa dos parâmetros área nuclear (AN), área citoplasmática (AC) e razão núcleo/citoplasma, bem como a utilização de critérios citológicos não clássicos para o diagnóstico do HPV, são capazes de fornecer informações que não tenham sido perceptíveis na análise citológica convencional e, em decorrência disso, explicar os resultados discordantes entre as análises molecular e morfológica.





### **3.1 - Objetivo Geral**

Avaliar amostras cervicais associadas ou não ao HPV e à atipias citológicas quanto ao aumento da razão núcleo/citoplasma e a presença de critérios citológicos não clássicos para o diagnóstico do HPV.

### **3.2 - Objetivos Específicos**

- Definir área nuclear, área citoplasmática e razão núcleo/citoplasma em células escamosas das regiões da cérvix uterina coletadas com auxílio de espátula e de escova;
- Avaliar as amostras levando-se em consideração os critérios citológicos não clássicos para diagnóstico do HPV em células escamosas das regiões da cérvix uterina coletadas com auxílio de espátula e de escova;
- Correlacionar os resultados morfométricos com aqueles obtidos na avaliação dos critérios citológicos não clássicos para o diagnóstico do HPV.



#### 4.1 - Período e População Estudada

Durante a realização deste trabalho foram avaliadas 569 amostras cervicais de mulheres com idade variando entre 18 e 75 anos, residentes na região de Ouro Preto no período compreendido entre abril de 2008 a julho de 2010. A realização deste projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética Institucional da UNIFESP sob o número de protocolo CEP 0832/08.

#### 4.2 - Coleta e Processamento das Amostras

Médicos e enfermeiros da equipe de saúde da família de Ouro Preto colheram o material para identificação e tipagem de HPV bem como para a realização do exame citológico de Papanicolaou (método convencional). Após a introdução do espéculo e visualização do colo do útero da paciente, girou-se duas vezes 360° em sentido horário a espátula de Ayre sobre o epitélio de revestimento externo do colo do útero, para a coleta de células da ectocérvice. A seguir, distendeu-se delicadamente em sentido vertical sobre uma lâmina de vidro devidamente identificada com as iniciais, data de nascimento da paciente e número da amostra. Para a coleta das células da endocérvice girou-se duas vezes 360° em sentido horário a escova dentro do canal endocervical e em seguida distendeu-se delicadamente o material obtido em sentido horizontal sobre a lâmina.

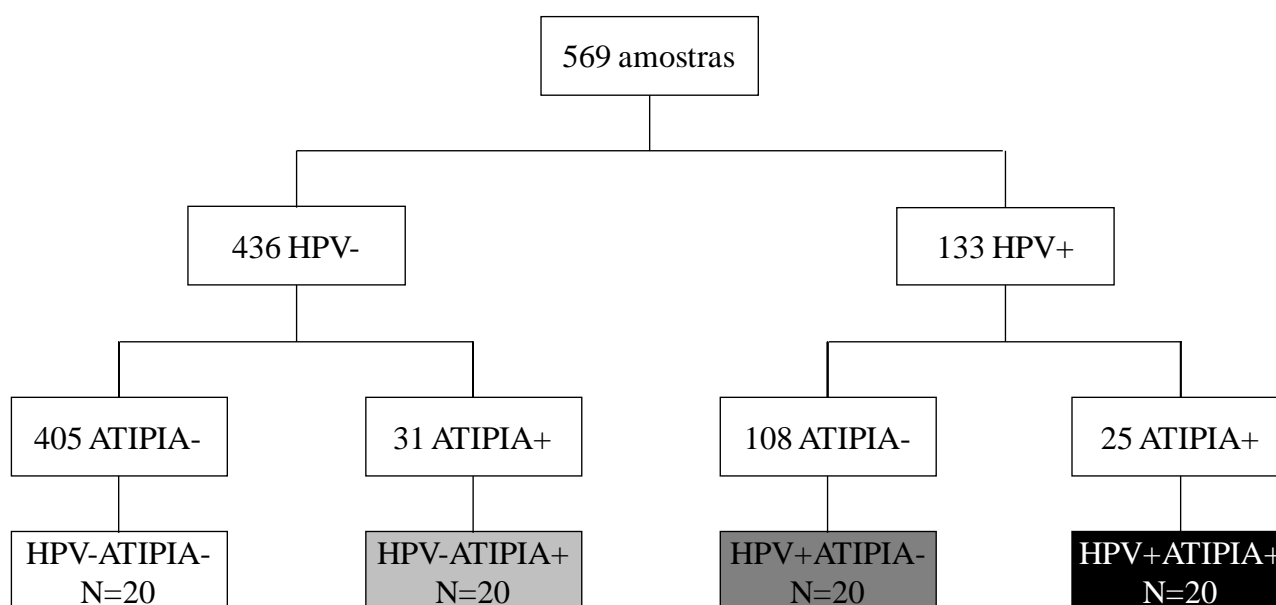
Os esfregaços foram fixados imediatamente em álcool 95% e encaminhados para o Laboratório de Citologia Clínica da Escola de Farmácia, onde foram corados utilizando-se a técnica de coloração de Papanicolaou modificada (Anexo I) e montados com Entellan. A avaliação microscópica para emissão do laudo foi realizada por meio das objetivas de 10x e 40x, classificando-se as amostras de acordo com o Sistema Bethesda para Citopatologia Cérvico-Vaginal (Solomon *et al.*, 2002) e a Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais (Anexo II).

Posteriormente, a escova foi colocada em tubos contendo 1mL de tampão de coleta e desconectada do cabo. As amostras foram refrigeradas imediatamente (entre 2°C e 10°C), armazenadas a -80°C no Laboratório Piloto de Análises Clínicas da Escola de Farmácia e encaminhadas para o Laboratório de Genética e Oncogênese Viral do Instituto Butantan – São Paulo, para pesquisa viral (Miranda, 2010).

#### 4.3 - Análise Morfométrica

As amostras foram distribuídas em quatro grupos de acordo com os resultados da pesquisa viral e da análise citológica. O número de amostras foi fixado em 20 amostras por grupo. O Grupo 1 (HPV-ATIPIA-) constou de 20 amostras HPV negativo com resultado citológico negativo para displasias e/ou neoplasias; o Grupo 2 (HPV-ATIPIA+) constou de 20 amostras HPV negativo apresentando como resultado citológico ASC-US, ASC-H, SIL ou carcinoma e/ou lesão glandular de qualquer natureza; o Grupo 3 (HPV+ATIPIA-) constou de 20 amostras HPV positivo com resultado citológico negativo para displasias e/ou neoplasias e o Grupo 4 (HPV+ATIPIA+) constou de 20 amostras HPV positivo apresentando como resultado citológico ASC-US, ASC-H, SIL ou carcinoma e/ou lesão glandular de qualquer natureza, conforme observado na Figura 3.

Para a captura das imagens, foram selecionadas amostras que apresentaram condições técnicas satisfatórias para este tipo de estudo, sendo considerados como critérios de inclusão: amostras homogêneas, bem fixadas e com boa representação da junção escamo-colunar e de exclusão: amostras com coloração inadequada, sobreposição e aglomerado celular. Para os Grupos HPV-ATIPIA- e HPV+ATIPIA-, particularmente, foram selecionados esfregaços cervicais considerando os diferentes microorganismos mais frequentemente identificados durante o exame de Papanicolaou, sendo estes grupos constituídos por lâminas que apresentaram *Lactobacillus sp.* (cinco e seis, respectivamente), *Gardnerella vaginalis* (cinco), *Candida sp.* (cinco e quatro, respectivamente) e *Trichomonas vaginalis* (cinco). Nos Grupos HPV-ATIPIA+ e HPV+ATIPIA+, as amostras foram selecionadas aleatoriamente quanto aos microorganismos, levando-se em conta apenas o quesito positivo para atipia.



**Figura 3:** Distribuição dos grupos de acordo com os resultados da pesquisa viral para detecção do HPV e do diagnóstico citológico de Papanicolaou (N=20 por grupo). HPV-ATIPIA- representado em branco, HPV-ATIPIA+ representado em cinza claro, HPV+ATIPIA- representado em cinza escuro e HPV+ATIPIA+ representado em preto.

As imagens dos campos citológicos foram capturadas utilizando-se microscopia convencional em campo claro em uma objetiva de 40x e ocular de 10x, por uma microcâmara digital Leica DFC340FX acoplada ao microscópio Leica DM5000B no Laboratório Multiusuário do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), UFOP.

Primeiramente, para definir o número de campos a serem documentados em cada lâmina, delimitaram-se em duas lâminas de cada grupo a região da espátula, por sua representatividade em células escamosas, e a região da escova por sua representatividade em células da junção escamo-colunar. Foram capturados de forma consecutiva ao longo do esfregaço, 100 campos da região da espátula e 50 campos da região da escova, devido à celularidade de cada região.

A avaliação morfométrica das células foi realizada por meio do software de morfometria Image J 1.43 para Windows Vista/7, disponível gratuitamente na Internet (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Após a calibração do programa e definição da escala de medida ( $\mu\text{m}$ ), foi avaliada em cada lâmina, uma célula por campo apresentando limites nucleares e citoplasmáticos nítidos, os quais foram contornados, traçando-se suas margens com o auxílio de um *mouse*. Determinou-se então, manualmente, a área nuclear (AN), área citoplasmática (AC) e conseqüentemente a razão núcleo/citoplasma (AN/AC) para cada célula. Os valores obtidos para cada variável pela análise morfométrica foram registrados em planilhas do Excel em que foram plotados gráficos para definir o número de células suficientes para a obtenção do *plateau*. Verificou-se, experimentalmente, que seriam necessárias 30 células de cada região de coleta.

Após a padronização da metodologia, seguiu-se a avaliação das 20 lâminas de cada grupo, sendo assim, foram avaliadas 60 células em cada lâmina (sendo 30 de cada região de coleta), totalizando 1.200 células em cada grupo.

#### **4.4 - Análise dos Critérios Citológicos Não Clássicos para o Diagnóstico do HPV**

Para esta análise, as mesmas imagens adquiridas para a análise morfométrica foram avaliadas morfológicamente quanto à presença do HPV, na tela de um computador dotado de processador Pentium® Dual Core Intel® de 2,0GHz, 3,0 GB de memória RAM e monitor de 15,4 polegadas. Os critérios citológicos não clássicos utilizados para identificação do HPV foram bi ou multinucleação, disceratose leve, queratinização, núcleo hiper cromático, núcleo em borrão, núcleo em fibra, coilocitose leve, halo perinuclear, cariorréxe, grânulos querato-hialinos, condensação em filamentos, escamas anucleadas, células fantasmas, células em fibra, células gigantes, células parabasais coilocitóticas.

#### 4.5 - Análise Estatística

Os resultados obtidos para cada variável pela análise morfométrica foram registrados em planilhas do Excel e em seguida utilizou-se o GraphPad Software para aplicar o teste de *Grubbs* para a detecção de *outliers* com nível de significância de 5%. Os *outliers* significativos foram excluídos e uma nova análise foi realizada.

Para verificar a significância estatística entre os quatro grupos foram utilizados os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino e Pearson e Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student, uma vez que os dados apresentaram distribuição *gaussiana*. Já na comparação dos valores encontrados entre as diferentes categorias de microorganismos do grupo HPV-ATIPIA utilizou-se o teste estatístico de Mann Whitney para amostra não paramétrica, pois os testes de normalidade revelaram que os dados não apresentaram distribuição *gaussiana*. As análises foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5 com intervalo de confiança de 95%.

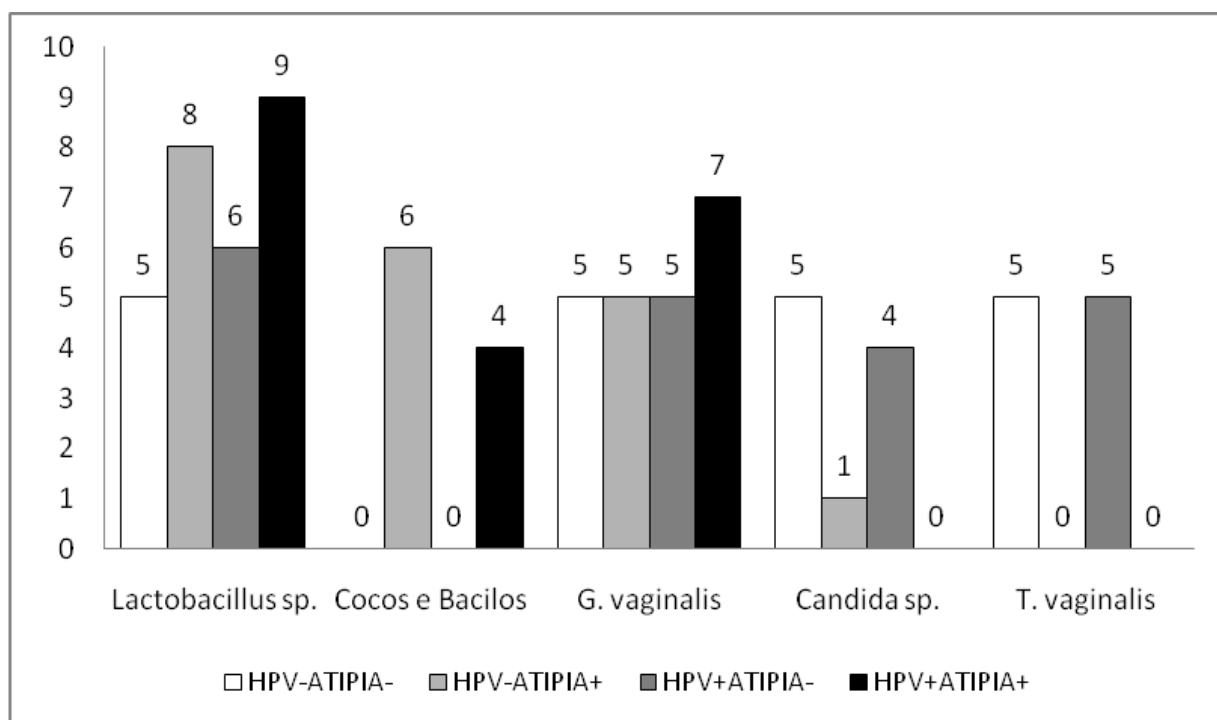


## 5.1 - Caracterização dos Grupos

### 5.1.1 - Microorganismos Identificados nos Grupos HPV-ATIIPIA-, HPV-ATIIPIA+, HPV+ATIIPIA- e HPV+ATIIPIA+

O Gráfico 1 mostra a distribuição dos microorganismos encontrados na flora cervical das pacientes pertencentes aos quatro grupos de estudo. A distribuição homogênea identificada nos grupos HPV-ATIIPIA- e HPV+ATIIPIA-, deve-se a seleção das amostras considerando-se os microorganismos mais frequentemente identificados ao exame de Papanicolaou. Dessa forma, constituíram-se os subgrupos *Lactobacillus sp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida sp.* e *Trichomonas vaginalis*. No grupo HPV+ATIIPIA- não foi possível alocar cinco amostras contendo *Candida sp.* e em decorrência disso o subgrupo *Lactobacillus sp.* possui uma amostra adicional.

A heterogeneidade dos grupos HPV-ATIIPIA+ e HPV+ATIIPIA+ deve-se a seleção ao acaso dos esfregaços pertencentes a tais grupos. Assim, no grupo HPV-ATIIPIA+ foram identificados oito esfregaços contendo *Lactobacillus sp.*, seis contendo Cocos e Bacilos, cinco contendo *Gardnerella vaginalis* e um contendo *Candida sp.*. Já no grupo HPV+ATIIPIA+ foram encontrados nove esfregaços contendo *Lactobacillus sp.*, quatro contendo Cocos e Bacilos e sete contendo *Gardnerella vaginalis*.



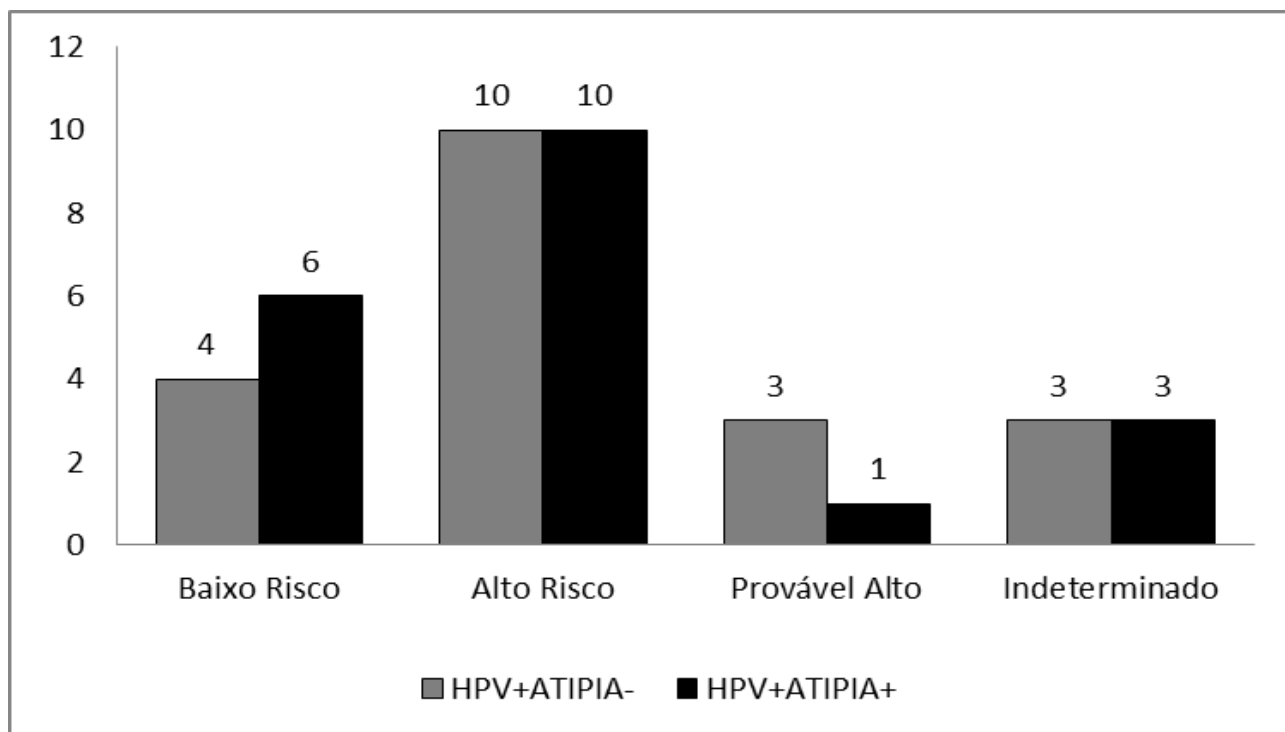
**Gráfico 1:** Microorganismos identificados nas amostras cervicais das pacientes pertencentes aos grupos HPV-ATIIPIA-, HPV-ATIIPIA+, HPV+ATIIPIA- e HPV+ATIIPIA+.



### 5.1.2 - Tipos de HPV Identificados nos Grupos HPV+ATIIPIA- e HPV+ATIIPIA+

Dentre as amostras positivas para HPV pertencentes ao grupo HPV+ATIIPIA-, foi possível verificar o predomínio de tipos virais de alto risco oncogênico (dez), seguido por tipos de baixo risco (quatro), risco provavelmente alto (três) e risco indeterminado (três).

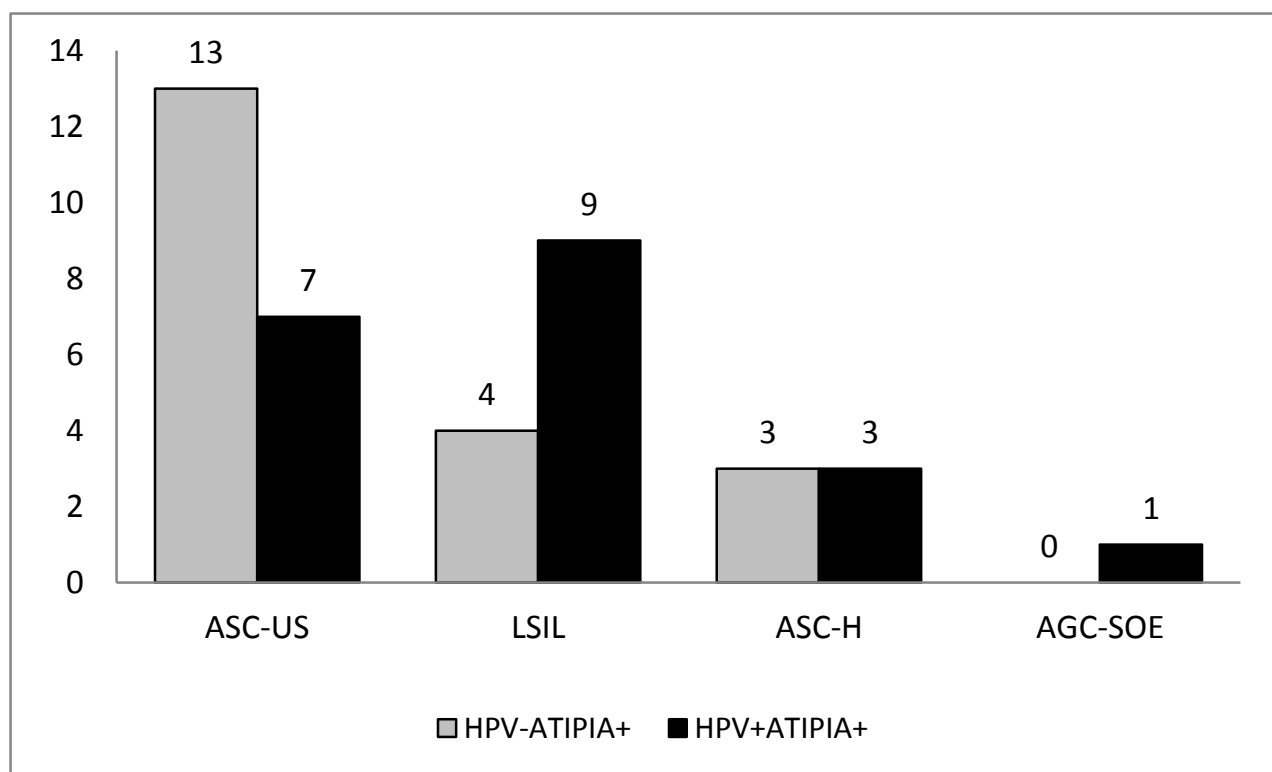
Em relação às amostras do grupo HPV+ATIIPIA+, também foi identificado predomínio de tipos virais de alto risco oncogênico (dez), seguido por baixo risco oncogênico (seis), risco indeterminado (três) e risco provavelmente alto (uma) (Gráfico 2).



**Gráfico 2:** Tipos de HPV identificados nos grupos HPV+ATIIPIA- e HPV+ATIIPIA+.

### 5.1.3 - Atipias Observadas nos Grupos HPV-ATIIPIA+ e HPV+ATIIPIA+

No Gráfico 3 está representado o número de diagnósticos citológicos positivos nos grupos HPV-ATIIPIA+ e HPV+ATIIPIA+. Entre as amostras com atipias citológicas o diagnóstico mais frequente no grupo HPV-ATIIPIA+ foi ASC-US com índice de 65% (13), seguido por 20% de LSIL (quatro) e 15% de ASC-H (três). No grupo HPV+ATIIPIA+, detectou-se 45% de diagnósticos de LSIL (nove), seguido por 35% de ASC-US (sete), 15% de ASC-H (três) e 5% de AGC-SOE (um).



**Gráfico 3:** Atipias observadas nos grupos HPV-ATIPIA+ e HPV+ATIPIA+.

#### 5.1.4 - Associação entre os Microorganismos e os Tipos de HPV Identificados

Analisando-se em conjunto os resultados citológicos e moleculares dos grupos que apresentaram HPV positivo, verifica-se que no grupo HPV+ATIPIA-, 33% (dois) dos esfregaços constituídos por flora lactobacilar apresentaram HPV de alto risco oncogênico, 33% (dois) de risco indeterminado, 17% (um) de baixo risco e 17% (um) de risco provavelmente alto. Nos esfregaços constituídos por flora de padrão anaeróbio (*G. vaginalis*), 60% (três) dos casos apresentaram HPV de alto risco e 40% (dois) de risco provavelmente alto. Nos esfregaços contendo *Candida sp.*, em 50% (dois) dos casos detectou-se HPV de alto risco, 25% (um) de baixo risco e 25% (um) de risco indeterminado. Nos esfregaços em que houve presença de *T. vaginalis*, em 60% (três) dos casos detectou-se HPV de alto risco e 40% (dois) de baixo risco (Tabela 1).

**Tabela 1:** Distribuição dos microorganismos no grupo HPV+ATIIA-.

Citologia	HPV				Total
	Baixo Risco	Alto Risco	Provavelmente Alto	Indeterminado	
<i>Lactobacillus sp.</i>	1	2	1	2	6
<i>G. vaginalis</i>	-	3	2	-	5
<i>Candida sp.</i>	1	2	-	1	4
<i>T. vaginalis</i>	2	3	-	-	5
<b>Total</b>	4	10	3	3	20

No grupo HPV+ATIIA+, em 57% (quatro) dos casos de ASC-US foi identificado HPV de baixo risco oncogênico, 29% (dois) de alto risco e 14% (um) de risco provavelmente alto. Nos casos de LSIL confirmou-se a presença de 45% (quatro) de HPV de alto risco, 33% (três) de risco indeterminado e 22% (dois) de baixo risco. Nos casos de ASC-H (três) e AGC-SOE (um), todas as amostras foram positivas para HPV de alto risco (Tabela 2).

**Tabela 2:** Distribuição dos resultados citológicos e moleculares no grupo HPV+ATIIA+.

Citologia	HPV				Total
	Baixo Risco	Alto Risco	Provavelmente Alto	Indeterminado	
ASC-US	4	2	1	-	7
LSIL	2	4	-	3	9
ASC-H	-	3	-	-	3
AGC-SOE	-	1	-	-	1
<b>Total</b>	6	10	1	3	20

AGC-SOE: células glandulares atípicas sem outras especificações

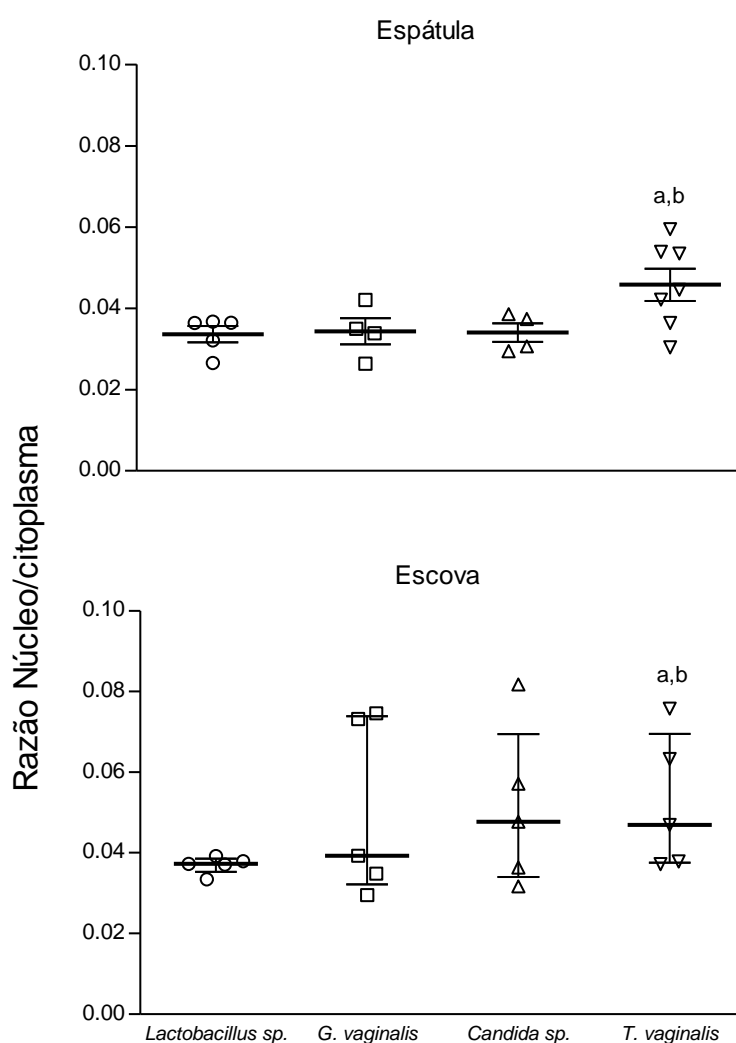
ASC-H: células escamosas atípicas em que não se pode excluir lesão de alto grau

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado

LSIL: lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau

## 5.2 - Avaliação Morfométrica

Os parâmetros área nuclear (AN), área citoplasmática (AC) e razão núcleo/citoplasma (AN/AC) foram avaliados em um total de 1200 células escamosas em cada grupo. O Gráfico 4 mostra os resultados da razão AN/AC entre as diferentes categorias de microorganismos selecionados para constituírem o grupo controle (*Lactobacillus sp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida sp.* e *Trichomonas vaginalis*). Esses dados não apresentaram distribuição normal e os testes aplicados mostraram que houve diferença significativa tanto na região coletada com auxílio de espátula quanto de escova, entre os grupos *Trichomonas vaginalis* e *Lactobacillus sp.* e *Trichomonas vaginalis* e *Gardnerella vaginalis*.



**Gráfico 4:** Análise morfométrica da razão núcleo/citoplasma observados em células escamosas das regiões coletadas com auxílio de espátula e de escova no grupo HPV-ATIPIA-, considerando-se os diferentes microorganismos que podem ser encontrados na flora cervical.

As letras “a”, “b”, “c” e “d” representam diferenças significativas entre os grupos *Lactobacillus sp.*, *G. vaginalis*, *Candida sp.* e *T. vaginalis*.

Os valores da média e do desvio padrão das variáveis AN, AC e razão AN/AC obtidos nas células escamosas das regiões coletadas com espátula e escova são exibidos nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Nas células avaliadas na região coletada com espátula, os testes estatísticos apontaram uma distribuição normal e variâncias homogêneas entre os grupos, com maior AN no grupo HPV-ATIIA+ em relação aos grupos HPV-ATIIA- e HPV+ATIIA-. O grupo HPV+ATIIA+ também apresentou maior AN em relação aos grupos HPV-ATIIA- e HPV+ATIIA-. Quanto à variável AC, os grupos HPV-ATIIA- e HPV+ATIIA+ apresentaram AC maior do que o grupo HPV+ATIIA-. Por outro lado, na análise da razão AN/AC os grupos HPV-ATIIA+ e HPV+ATIIA+ apresentaram razão AN/AC significativamente maiores em relação ao grupo HPV-ATIIA-.

**Tabela 3:** Área Nuclear, Área Citoplasmática e Razão Núcleo/Citoplasma observadas em células escamosas da região coletada com auxílio de espátula nos grupos HPV-ATIIA-, HPV-ATIIA+, HPV+ATIIA- e HPV+ATIIA+.

	HPV-ATIIA-	HPV-ATIIA+	HPV+ATIIA-	HPV+ATIIA+
Área Nuclear (AN)	81,73 ± 10,59	97,64 <sup>a,c</sup> ± 19,95	78,20 ± 19,21	88,39 <sup>a,c</sup> ± 14,26
Área Citoplasmática (AC)	235,86 <sup>c</sup> ± 44,30	217,58 ± 41,47	202,64 ± 37,49	230,73 <sup>c</sup> ± 49,36
AN/AC	0,04 ± 0,01	0,05 <sup>a</sup> ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,05 <sup>a</sup> ± 0,01

As letras “a”, “b”, “c” e “d” representam diferenças significativas entre os grupos HPV-ATIIA-, HPV-ATIIA+, HPV+ATIIA- e HPV+ATIIA+, respectivamente.

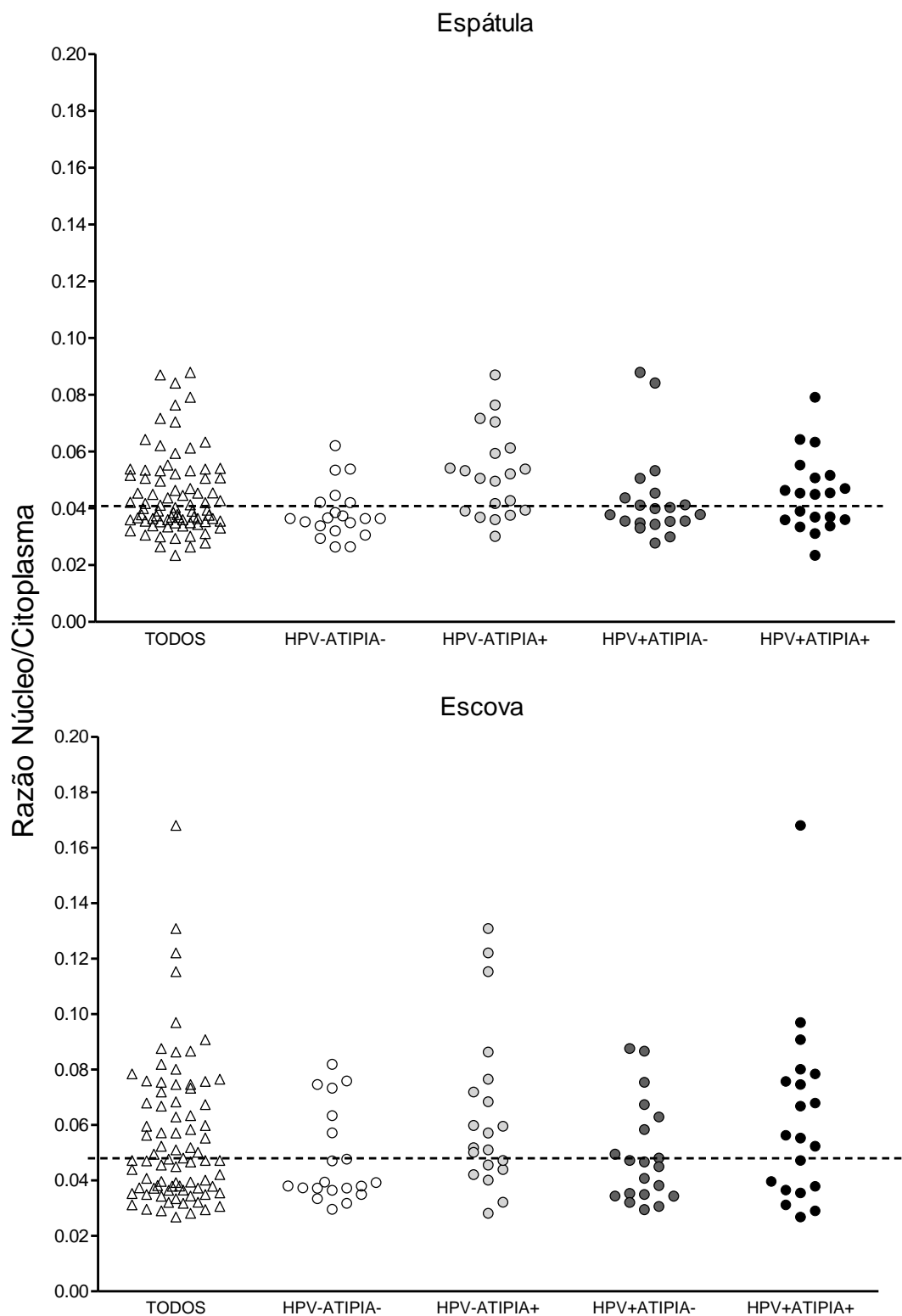
Nas células avaliadas na região coletada com escova os resultados também apresentaram uma distribuição normal e variâncias homogêneas entre os grupos. A variável AN foi maior no grupo HPV-ATIIA+ em relação aos grupos HPV-ATIIA- e HPV+ATIIA- e no grupo HPV+ATIIA+ quando comparado aos grupos HPV-ATIIA- e HPV+ATIIA-. Quanto à variável AC nenhum resultado foi significativo. A razão AN/AC foi maior nos grupos HPV-ATIIA+ e HPV+ATIIA+ em relação ao grupo HPV-ATIIA-.

**Tabela 4:** Área Nuclear, Área Citoplasmática e Razão Núcleo/Citoplasma observadas em células escamosas da região coletada com auxílio de escova nos grupos HPV-ATIPIA-, HPV-ATIPIA+, HPV+ATIPIA- e HPV+ATIPIA+.

	HPV-ATIPIA-	HPV-ATIPIA+	HPV+ATIPIA-	HPV+ATIPIA+
Área Nuclear (AN)	82,83 ± 14,94	106,96 <sup>a,c</sup> ± 29,55	83,42 ± 19,10	109,37 <sup>a,c</sup> ± 41,84
Área Citoplasmática (AC)	204,23 ± 41,20	207,64 ± 51,98	200,91 ± 36,09	216,07 ± 60,84
AN/AC	0,04 ± 0,02	0,06 <sup>a</sup> ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,06 <sup>a</sup> ± 0,03

As letras “a”, “b”, “c” e “d” representam diferenças significativas entre os grupos HPV-ATIPIA-, HPV-ATIPIA+, HPV+ATIPIA- e HPV+ATIPIA+, respectivamente.

No Gráfico 5 está representada a mediana (linha tracejada) para cada região de coleta, obtida a partir do somatório dos valores da razão AN/AC provenientes de todos os grupos. Na região da espátula, o grupo HPV-ATIPIA- apresentou seis lâminas com valores acima da mediana, enquanto os grupos HPV-ATIPIA+, HPV+ATIPIA- e HPV+ATIPIA+ apresentaram 14, 8 e 11 lâminas, respectivamente. Na região da escova, o grupo HPV-ATIPIA- apresentou seis lâminas com valores acima da mediana, ao passo que os grupos HPV-ATIPIA+, HPV+ATIPIA- e HPV+ATIPIA+ apresentaram 13, 8 e 12 lâminas, respectivamente.



**Gráfico 5:** Análise morfométrica da razão núcleo/citoplasma, observados em células escamosas das regiões coletadas com auxílio de espátula e de escova. Cada círculo representa uma lâmina em cada grupo. A linha tracejada representa a mediana obtida a partir do somatório dos valores provenientes de todos os grupos em cada região.

### **5.3 - Avaliação dos Critérios Não Clássicos para o Diagnóstico Citológico da Infecção pelo HPV**

Nas Tabelas 5 e 6 estão mostrados os critérios não clássicos que podem ser utilizados para sugerir o diagnóstico citológico da infecção pelo HPV. Em cada grupo está apresentado o número de lâminas em que cada critério foi observado, independente da intensidade, isto é, quantas vezes os critérios apareceram em cada lâmina.

Os critérios Bi ou Multinucleação, Halo Perinuclear e Grânulos Querato-hialinos foram observados na maioria das lâminas em todos os grupos, o que não permite a utilização de tais critérios enquanto fator isolado para definir a presença de HPV.

Os critérios Disceratose Leve, Núcleo em Borrão, Condensação em Filamentos, Células em Fibra e Células Parabasais Coilocitóticas não foram observados em nenhum dos grupos avaliados.

O critério Queratinização só esteve presente no grupo que apresentou HPV+ATIPIA+, ao passo que o critério Núcleo em Fibra esteve presente apenas nos grupos que apresentaram diagnóstico citológico positivo, independente do resultado da pesquisa viral.

Os critérios Núcleo Hiper Cromático, Coilocitose Leve e Cariorréxe não foram identificados no grupo HPV-ATIPIA-.

Células gigantes só foram observadas em uma lâmina do grupo HPV+ATIPIA+.

Os critérios Escamas Anucleadas e Células Fantasmas encontram-se distribuídos de forma heterogênea entre os grupos.



**Tabela 5:** Critérios não clássicos observados por lâmina nos grupos HPV-ATIIPIA-, HPV-ATIIPIA+, HPV+ATIIPIA- e HPV+ATIIPIA+, independente da intensidade.

<b>Critérios não clássicos</b>	<b>HPV-ATIIPIA-</b>	<b>HPV-ATIIPIA+</b>	<b>HPV+ATIIPIA-</b>	<b>HPV+ATIIPIA+</b>
Bi ou Multinucleação	17	18	18	19
Halo perinuclear	19	20	20	17
Grânulos querato-hialinos	12	19	15	15
<b>TOTAL</b>	<b>48</b>	<b>57</b>	<b>53</b>	<b>51</b>

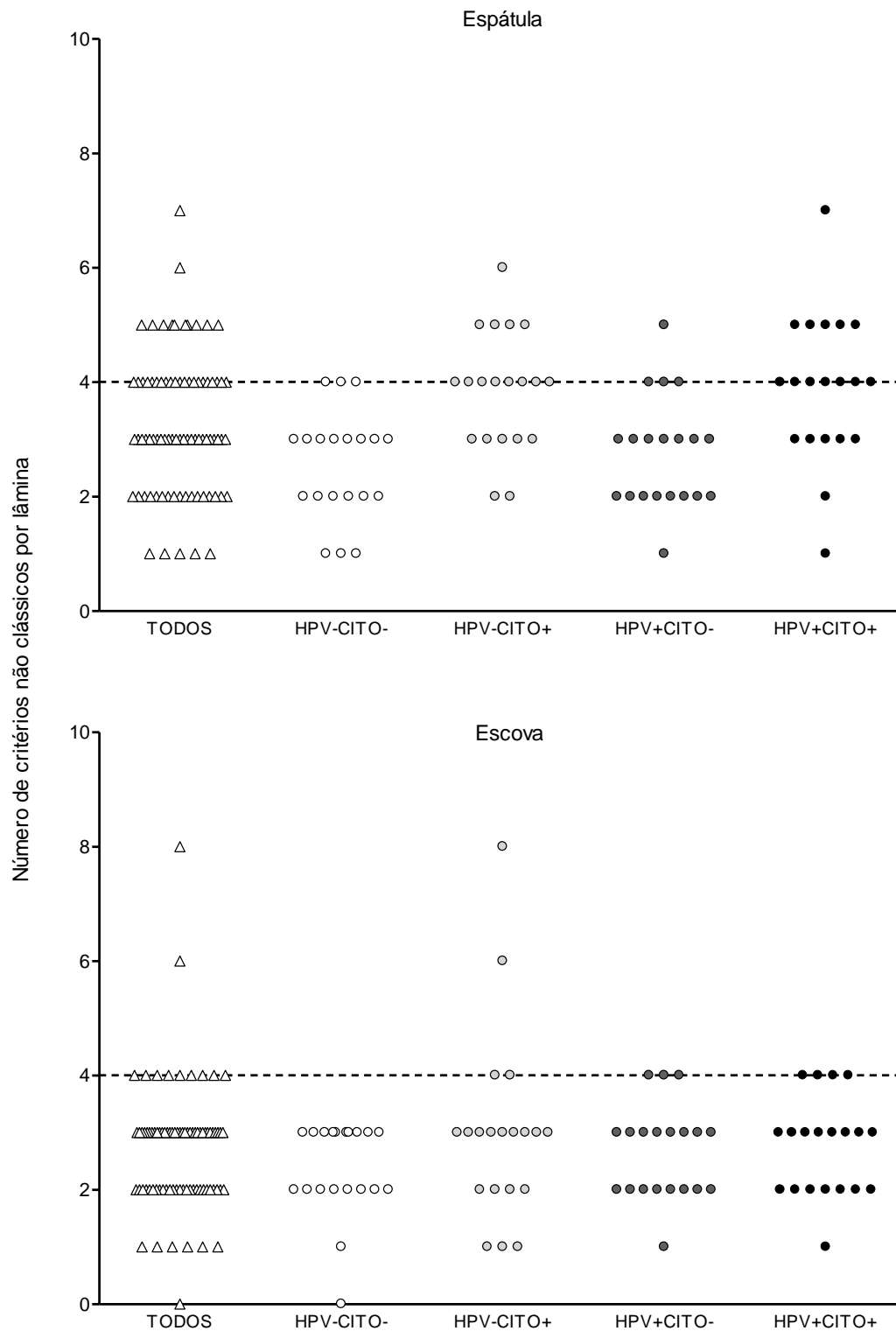
Na Tabela 6 estão mostrados os critérios não clássicos utilizados para o diagnóstico citológico da infecção pelo HPV, excluindo-se os critérios que não foram observados em nenhum dos grupos avaliados (Disceratose Leve, Núcleo em Borrão, Condensação em Filamentos, Células em Fibra e Células Parabasais Coilocitóticas) e os critérios que foram observados em todos os grupos (Bi ou Multinucleação, Halo Perinuclear e Grânulos Querato-hialinos).

**Tabela 6:** Critérios não clássicos observados por lâmina nos grupos HPV-ATIIA-, HPV-ATIIA+, HPV+ATIIA- e HPV+ATIIA+, independente da intensidade, excluindo-se os critérios que não foram observados em nenhum dos grupos avaliados e os critérios que foram observados em todos os grupos.

<b>Critérios não clássicos</b>	<b>HPV-ATIIA-</b>	<b>HPV-ATIIA+</b>	<b>HPV+ATIIA-</b>	<b>HPV+ATIIA+</b>
Queratinização	0	0	0	2
Núcleo hiper Cromático	0	2	3	9
Núcleo em fibra	0	1	0	1
Coilocitose leve	0	6	1	8
Cariorréxe	0	1	1	4
Escamas anucleadas	5	7	8	4
Células fantasmas	3	10	3	6
Células gigantes	0	0	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>8</b>	<b>27</b>	<b>16</b>	<b>35</b>

No Gráfico 6 está representada a mediana (linha tracejada) para cada região de coleta, obtida a partir do somatório do número de critérios não clássicos observados em todos os grupos avaliados, independente da intensidade de cada critério.

A literatura aponta que a presença de quatro ou mais critérios não clássicos em uma determinada lâmina é suficiente para considerá-la positiva para o HPV pela citologia. Na região da espátula, os grupos HPV-ATÍPIA- e HPV+ATÍPIA-, apenas três e quatro lâminas apresentaram quatro ou mais critérios não clássicos, respectivamente, ao passo que os grupos HPV-ATÍPIA+ e HPV+ATÍPIA+ 13 lâminas apresentaram quatro ou mais critérios não clássicos. Na região da escova, nenhuma lâmina do grupo HPV-ATÍPIA- apresentou quatro ou mais critérios não clássicos, e nos grupos HPV-ATÍPIA+, HPV+ATÍPIA- e HPV+ATÍPIA+, quatro, três e quatro lâminas apresentaram quatro ou mais critérios não clássicos, respectivamente.



**Gráfico 6:** Número de critérios não clássicos observados na região coletada com auxílio de espátula e de escova, por grupo, independente da intensidade de cada critério. Cada círculo representa uma lâmina em cada grupo. A linha tracejada representa a mediana obtida a partir do somatório do número de critérios em todos os grupos avaliados.



A infecção pelo HPV é extremamente comum. Estima-se que a maioria das mulheres no mundo será infectada pelo HPV em algum momento de sua vida, com o risco de adquirir a infecção de 50 a 80% (Koutsky, 1997). Além disso, é possível apontar que 10,2% das mulheres com citologia dentro dos limites da normalidade possuem o DNA do HPV em sua cérvix, apesar das diferenças geográficas de prevalência (De Sanjosé *et al.*, 2007). Além de determinar a prevalência da infecção pelo HPV, investigar os tipos virais predominantes é extremamente relevante uma vez que genótipos diferentes exercem patogênese distinta na carcinogênese cervical.

Analisando-se a caracterização dos grupos que constituíram este trabalho, foi possível verificar predomínio de infecções por tipos virais de alto risco oncogênico no grupo HPV+ATIPIA- (50%) e no grupo HPV+ATIPIA+ (50%), sendo coerente, portanto, com os dados obtidos por Miranda (2010) os quais também evidenciaram o predomínio de infecção por tipos virais de alto risco oncogênico (60%).

No Brasil, resultados semelhantes foram encontrados em estudos desenvolvidos em diversas localidades geográficas (Rousseau *et al.*, 2001; Paesi *et al.*, 2009, Fernandes *et al.*, 2010).

Em estudo de prevalência na Argentina, verificou-se que cerca de 68% das infecções foram causadas por tipos virais de alto risco (Matos *et al.*, 2003). Semelhantemente, em mulheres holandesas em que foi possível detectar o DNA do HPV, 72% dos casos apresentaram infecção por tipos de alto risco (Jacobs *et al.*, 2000).

Quanto aos diagnósticos citológicos positivos observados nos grupos HPV-ATIPIA+ e HPV+ATIPIA+, observou-se que no grupo com ausência de infecção pelo HPV, o diagnóstico citológico predominante foi de ASC-US. Tal fato pode ser explicado visto que o diagnóstico de ASC-US é indicativo de alterações celulares qualitativamente e quantitativamente insuficientes para concluir lesão intra-epitelial, ou seja, é um diagnóstico que representa o limiar entre as alterações celulares associadas a processos inflamatórios pronunciados, principalmente na vigência de *Candida sp.* e *Trichomonas vaginalis* e as alterações consistentes com as lesões intra-epiteliais que podem ser desencadeadas pelo HPV (Lima *et al.*, 2002). Assim sendo, o seguimento de casos de ASC-US pode demonstrar tanto lesões precursoras de câncer quanto alterações celulares benignas associadas a processos inflamatórios ou reparativos (Lousuebsakul *et al.*, 2000).

Já no grupo em que houve infecção pelo HPV, o diagnóstico citológico predominante foi de LSIL, o que corrobora com o modelo proposto para a história natural do câncer cervical, uma vez que a infecção pelo HPV pode regredir espontaneamente ou levar ao aparecimento da lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau, que por sua vez pode progredir subsequentemente para a lesão intra-epitelial escamosa de alto grau e, eventualmente para o câncer invasor (Bosch *et al.*, 2002; Schiffman & Castle, 2003). Os critérios aumento nuclear e hiper cromasia, utilizados para definir o diagnóstico de LSIL, resultam da ativação da síntese de DNA mediada pelos genes E6 e E7 do HPV,

nas células hospedeiras que perderam a capacidade de divisão e iniciaram a maturação escamosa (Stoler, 2003).

Analisando-se em conjunto os resultados moleculares e citológicos do grupo HPV+ATIPIA-, é notória a associação entre a presença de flora de padrão anaeróbio e a detecção de HPV de alto risco e risco provavelmente alto, o que concorda com estudos que apontam significativa associação entre a detecção do DNA do HPV e a substituição da flora normal pela flora de padrão anaeróbio (McNicol *et al.*, 1994). Além disso, alguns trabalhos sugerem que a vaginose bacteriana (síndrome clínica caracterizada pela proliferação excessiva de bactérias anaeróbias ou facultativas, como a *G. vaginalis*, *Mobiluncus sp.* e *Mycoplasma hominis* em detrimento da flora lactobacilar normal) parece ter um papel importante no desenvolvimento da NIC, uma vez que tais bactérias estimulam a produção de nitrosaminas oncogênicas e citocinas, como a interleucina 1 beta 1 (Behbakht *et al.*, 2002).

O diagnóstico das displasias e neoplasias que acometem o colo do útero baseia-se em alterações morfológicas identificadas predominantemente no núcleo, tais como variação do tamanho, forma e distribuição da cromatina nuclear. Soma-se a estes critérios, a necessidade de avaliar também a quantidade de citoplasma em relação ao tamanho do núcleo, isto é, a razão núcleo/citoplasma, uma vez que esta relação é marcadamente maior nas células displásicas e neoplásicas do que em suas correspondentes normais (Wied *et al.*, 1989).

Tem sido descrito na literatura que a análise quantitativa de parâmetros tais como área, perímetro, coeficiente de arredondamento, alongamento, comprimento do eixo principal, ângulo do eixo principal, comprimento do eixo secundário e ângulo do eixo secundário, é capaz de fornecer fatores prognósticos confiáveis e aprimorar parâmetros diagnósticos (Collan *et al.*, 1987; Millot & Dufer, 2000). Dessa forma, um dos objetivos deste estudo foi definir área nuclear, área citoplasmática e razão núcleo/citoplasma, em células escamosas das regiões da cérvix uterina coletadas com auxílio de espátula e de escova, em esfregaços provenientes de pacientes portadoras ou não do HPV e de atipias celulares, com intuito de identificar alterações morfométricas significativas que tenham sido imperceptíveis na análise citológica convencional.

É importante destacar que a literatura carece de uma padronização no que se refere à metodologia utilizada em estudos de análise quantitativa, particularmente no campo da citopatologia (Fleege *et al.*, 1990). Neste trabalho, medidas da área nuclear e citoplasmática foram obtidas em uma célula por campo, em todos os campos capturados de forma consecutiva ao longo do esfregaço, totalizando 30 campos na região da espátula e 30 campos na região da escova. Este tipo de análise assemelha-se a metodologia da seleção consecutiva, descrita por Altenstrasser *et al.* (1998) que reforçam a utilidade e reprodutibilidade deste método, especialmente na análise de preparados citológicos, tendo em vista que a confecção do esfregaço promove uma distribuição

aleatória do material sobre a lâmina. Esses autores avaliaram onze amostras citológicas obtidas por punção aspirativa por agulha fina, sendo três casos de câncer de próstata, cinco de carcinoma de mama, dois de hiperplasia prostática e um de sarcoma, com a finalidade de comparar o número de medidas necessárias para obter reprodutibilidade na análise do parâmetro área nuclear, partindo-se de dois métodos distintos de amostragem. Definiu-se como método de seleção consecutiva, a análise de todos os núcleos não sobrepostos identificados no campo, até atingir 250 análises, e, método de seleção aleatória, a análise de núcleos não sobrepostos direcionada por um *point grid* até atingir 120 análises. No que diz respeito aos resultados obtidos para o parâmetro área nuclear, verificou-se que ao utilizar a metodologia consecutiva, foi possível determinar o *plateau* em todos os casos avaliados e os valores variaram entre 30 e 240 medições, ao passo que, utilizando-se a metodologia aleatória, não foi possível definir o *plateau* em um caso avaliado e os valores variaram entre 30 e 110 medições.

Comparando-se os dados morfométricos das diferentes categorias de microorganismos selecionadas para constituírem o grupo controle (HPV-ATIPIA-), foi possível verificar uma concordância deste estudo com o que já está estabelecido na literatura em relação ao efeito citopático induzido pelo *Trichomonas vaginalis*, visto que este microorganismo provoca um processo inflamatório pronunciado, em que muitas vezes não é possível distinguir de uma lesão pré-neoplásica. No esfregaço podem ser visualizadas alterações nucleares como anisocariose, cariomegalia, reforço da membrana nuclear devido à degeneração celular com depósito de grumos cromáticos, hipercromasia e binucleação ou multinucleação muito acentuadas (Gram *et al.*, 1992; Petrin *et al.*, 1998). Em decorrência disso, já era de se esperar que as amostras contendo *T. vaginalis* em sua flora demonstrassem razão AN/AC significativamente maior em relação às demais amostras.

Em relação à média dos valores das variáveis AN, AC e razão AN/AC observados em todos os grupos na região da espátula e da escova, os resultados evidenciaram a existência de alterações morfométricas significativas na AN das amostras que apresentaram citologia positiva, independente da presença do HPV, em relação às amostras que apresentaram citologia negativa, independente da presença do HPV. Além disso, os grupos com resultado citológico positivo apresentaram também razão AN/AC significativamente maiores em relação ao grupo HPV-ATIPIA-.

Tais resultados são semelhantes aos obtidos no estudo de Athanassiadou *et al.* (2001), os quais avaliaram o parâmetro razão núcleo/citoplasma, utilizando-se da análise computadorizada de imagens, em 110 esfregaços cervicais de mulheres com idade variando entre 18 e 55 anos de idade, com diagnóstico citológico de NIC I, NIC II ou NIC III, associados ou não ao efeito citopático compatível com a infecção pelo HPV, com o objetivo de minimizar discrepâncias entre os resultados citológicos e histológicos. Todas as amostras foram submetidas à avaliação histopatológica, e em grande parte das amostras foi realizado também a pesquisa do DNA do HPV



por meio da PCR. Para o estudo morfométrico, foi mensurado em todas as células atípicas os parâmetros área nuclear e área citoplasmática com conseqüente determinação da razão núcleo/citoplasma, em uma ampliação de 400X. A análise estatística evidenciou que o aumento da gravidade da lesão é acompanhado pelo aumento da razão núcleo/citoplasma, independente da presença do HPV, isto é, não houve diferença morfométrica entre as amostras pertencentes aos grupos NIC I e NIC I com HPV, NIC II e NIC II com HPV, NIC III e NIC III com HPV; NIC III e NIC III com HPV e carcinoma.

Deve-se salientar que no trabalho de Athanassiadou *et al.* (2001), foram analisadas apenas amostras com diagnóstico citológico positivo (NIC I, NIC II, NIC III e carcinoma), o que exclui a possibilidade de comparar a existência de alterações morfométricas significativas entre amostras com diagnóstico citológico positivo e negativo. Soma-se a isso o fato de a presença do HPV ter sido realizada também por intermédio de um método morfológico (citologia), o que dificulta a percepção de falhas inerentes a esta metodologia.

Os resultados deste trabalho são reforçados pelo estudo de Cavaliere *et al.* (1990), que se propuseram a estudar a razão núcleo/citoplasma em 44 esfregaços com alterações coilocitóticas, classificados segundo a nomenclatura da Organização Mundial de Saúde (OMS, 1984) e posteriormente avaliados quanto a presença do antígeno (Ag) para HPV por meio da reação de peroxidase-antiperoxidase (PAP). O grupo controle constou de 12 esfregaços citologicamente normais em que também não foi detectado o Ag do HPV. No grupo de estudo, 29 casos foram classificados como inflamatório, sendo 16 casos HPV positivo e 13 casos HPV negativo. Os demais 15 casos foram classificados como NIC, dos quais nove casos foram HPV positivo e seis casos foram HPV negativo. A análise citométrica foi realizada em 162 células do grupo controle e em todas as células coilocitóticas identificadas nos esfregaços que não apresentaram sobreposição nos grupos de estudo, totalizando 352 células. Foram mensurados em uma ampliação de 400X, o maior e o menor diâmetro do núcleo e do citoplasma, e seguiu-se o cálculo do diâmetro médio nuclear e citoplasmático para a obtenção da razão núcleo/citoplasma. A análise estatística revelou que os valores da razão núcleo/citoplasma do grupo controle foram significativamente menores do que os dos grupos inflamatórios e NIC, independente da presença do HPV. Além disso, os valores nos grupos inflamatórios foram significativamente menores do que os dos grupos NIC, tanto Ag HPV positivo quanto negativo. Soma-se ainda a evidência de que não houve diferença entre os grupos com resultado citológico inflamatório e entre os grupos com resultado citológico de NIC.

Levando-se em consideração a evolução dos sistemas de classificação da citologia cérvico-vaginal ocorrida nos últimos anos, os resultados desses autores são os que mais se aproximam aos obtidos neste trabalho, pois é possível fazer uma correspondência entre o diagnóstico citológico inflamatório na década de 90 e o atual diagnóstico citológico negativo. Todavia, esses autores

relataram a existência de razão AN/AC significativamente maior nos grupos com diagnóstico citológico positivo em relação ao grupo controle e aos grupos com diagnóstico citológico negativo, independente da presença do HPV, em contrapartida, neste trabalho foi possível observar alterações morfológicas significativas deste mesmo parâmetro entre os grupos com diagnóstico citológico positivo em relação ao grupo HPV-ATIPIA- (controle), mas não em relação ao grupo HPV+ATIPIA-.

Quando se estabeleceu a mediana obtida a partir do somatório dos valores da razão AN/AC de todos os grupos, na região coletada com espátula, nos grupos que apresentaram citologia negativa, independente do resultado da pesquisa viral, 40 lâminas foram previamente definidas como negativas de acordo com a análise citológica convencional e, após a análise morfológica apenas 26 lâminas apresentaram resultados menores do que a mediana, ou seja, 14 lâminas tornar-se-iam positivas, representando uma elevação da frequência de diagnósticos positivos de 35% após a análise quantitativa.

Similarmente, na região coletada com escova, nos grupos que apresentaram citologia negativa, independente do resultado da pesquisa viral, 40 lâminas foram previamente definidas como negativas de acordo com a análise citológica convencional e, após a análise morfológica apenas 26 lâminas apresentaram resultados menores do que a mediana, ou seja, 14 lâminas tornar-se-iam positivas, representando uma elevação da frequência de diagnósticos positivos de 35% após a análise quantitativa.

Por outro lado, na região coletada com espátula, nos grupos que apresentaram citologia positiva, independente do resultado da pesquisa viral, 40 amostras foram previamente definidas como positivas de acordo com a análise citológica convencional e, após a análise quantitativa 25 lâminas permaneceram com diagnóstico positivo, ou seja, 15 lâminas tornar-se-iam negativas, refletindo uma redução de 37,5% na frequência de diagnósticos positivos.

Analogamente, na região coletada com a escova, nos grupos que apresentaram citologia positiva, independente do resultado da pesquisa viral, 40 amostras foram previamente definidas como positivas de acordo com a análise citológica convencional e, após a análise quantitativa 25 permaneceram com diagnóstico positivo, isto é, 15 lâminas tornar-se-iam negativas, refletindo uma redução de 37,5% na frequência de diagnósticos positivos.

Da mesma forma, na região da espátula, das 40 amostras que apresentaram pesquisa viral negativa, após a análise morfológica, das 20 lâminas com citologia convencional negativa, 6 tornar-se-iam positivas e das 20 lâminas com citologia convencional positiva, 6 tornar-se-iam negativas.

Semelhantemente, na região da escova, após a análise morfométrica, das 20 lâminas com citologia convencional negativa, 6 tornar-se-iam positivas, enquanto das 20 lâminas com citologia convencional positiva, 7 tornar-se-iam negativas.

Por outro lado, na região da espátula, das 40 amostras que apresentaram pesquisa viral positiva, após a análise morfométrica, das 20 lâminas com citologia convencional negativa, 8 tornar-se-iam positivas e das 20 lâminas com citologia convencional positiva, 9 tornar-se-iam negativas.

Analogamente, na região da escova, após a análise morfométrica, das 20 lâminas com citologia convencional negativa, 8 tornar-se-iam positivas e das 20 lâminas com citologia convencional positiva, 8 tornar-se-iam negativas.

É possível inferir, portanto, que nos esfregaços avaliados neste estudo, tanto na região da espátula quanto na região da escova, a presença do HPV não foi determinante na indução de alterações morfométricas significativas, utilizando-se os parâmetros AN, AC e razão AN/AC. Tal fato pode ser explicado pelo predomínio de diagnósticos de ASC-US e LSIL, dentre as amostras apresentando diagnóstico citológico positivo, mas também pode ser atribuído a utilização de apenas um parâmetro para a análise morfométrica nuclear, fazendo-se necessária, então, a adição de outros parâmetros tais como avaliação da forma e padrão cromatínico.

O outro objetivo específico deste trabalho foi avaliar as amostras levando-se em consideração os critérios citológicos não clássicos para o diagnóstico do HPV em células escamosas das regiões da cérvix uterina coletadas com auxílio de espátula e escova, e posteriormente, avaliar esses resultados conjuntamente com os resultados da análise morfométrica, comparando-os com a análise citológica convencional.

Em infecções genitais pelo HPV, a literatura é unânime em apresentar a coilocitose e a disqueratose como alterações citológicas clássicas atribuídas ao efeito citopático pelo HPV, sendo assim, são consideradas critérios patognomônicos para definir infecção pelo HPV (zur Hausen, 1977; Meisels & Morin, 1982; Schneider *et al.*, 1985). No entanto, muitos autores destacam que os critérios clássicos não são os mais frequentemente observados nos preparados citológicos e apesar de serem alterações específicas, são moderadamente sensíveis para o diagnóstico do HPV. Considera-se que cerca de um terço dos casos de infecção pelo HPV não seriam notificados, utilizando-se apenas a coilocitose como critério diagnóstico (Schneider *et al.*, 1987).

Para melhorar a sensibilidade da detecção citológica da infecção pelo HPV, a validade de vários critérios citológicos não clássicos tem sido relatada na literatura, os quais podem ser agrupados em (1) alterações nucleares leve (hipercromasia leve, anisocitose leve e bi ou multinucleação); (2) desordens de queratinização (disqueratose leve e paraceratose); (3) grânulos

querato-hialinos e halo perinuclear e (4) alterações degenerativas (células gigantes e condensação de filamentos) (Bollmann *et al.*, 2005).

Neste trabalho foram avaliados os critérios bi ou multinucleação, disceratose leve, queratinização, núcleo hipercromático, núcleo em borrão, núcleo em fibra, coilocitose leve, halo perinuclear, cariorréxe, grânulos querato-hialinos, condensação em filamentos, escamas anucleadas, células fantasmas, células em fibra, células gigantes e células parabasais coilocitóticas.

Os critérios bi ou multinucleação, halo perinuclear, grânulos querato-hialinos, escamas anucleadas e células fantasmas foram encontrados em todos os quatro grupos de estudo, observando-se maior frequência do critério escamas anucleadas nos grupos HPV+ATIIPIA- e HPV-ATIIPIA+ e do critério células fantasmas no grupo HPV+ATIIPIA-.

A presença de escamas anucleadas no esfregaço, enquanto fator isolado, não constitui diagnóstico de hiperkeratose, que por sua vez consiste em uma resposta proliferativa e protetora do epitélio escamoso resultante de um processo anormal de maturação que confere ao epitélio uma camada de queratina. Esta reação está frequentemente associada a processos inflamatórios inespecíficos ou específicos, como os provocados por *G. vaginalis* e fungos, exposição ao estrogênio bem como a histopatologia do condiloma e a lesões mais graves (Hudock *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 1997). Apesar disso, nos grupos HPV-ATIIPIA+ e HPV+ATIIPIA-, a marcante representatividade de escamas anucleadas nos esfregaços pode ser atribuída a processos inflamatórios específicos e inespecíficos e eventualmente, ao pico do efeito estrogênico sobre a maturação do epitélio escamoso.

Os critérios núcleo hipercromático e coilocitose leve revelaram maior associação a presença do HPV, uma vez que foram observados predominantemente nos grupos com diagnóstico molecular positivo, independente do resultado do diagnóstico citológico. Tais resultados são similares ao estudo de Schneider *et al.* (1987) em que os critérios não clássicos bi ou multinucleação, núcleo hipercromático, coilocitose leve, disceratose leve e clareamento citoplasmático (células fantasmas) demonstraram significativa correlação com a presença do HPV.

Esses achados são reforçados pelo trabalho de Bollmann *et al.* (2005) que descreveram que os critérios bi ou multinucleação, hiperkeratose nuclear leve, coilocitose leve, disceratose leve e grânulos querato-hialinos em células escamosas, demonstraram associação significativa à infecção pelo HPV.

A presença do critério núcleo hipercromático no grupo HPV-ATIIPIA+ pode ser parcialmente atribuída ao fato de que a detecção do HPV por meio da metodologia da PCR ocorre apenas acima de uma determinada carga viral, contudo, existem infecções pelo HPV que estão sob o limiar de detecção da PCR, mas que já são capazes de produzir alterações citopatológicas visíveis ao microscópio óptico (Snijders *et al.*, 2003).

Dessa forma, a literatura aponta que os critérios não clássicos estão significativamente, mas não independentemente associados à infecção pelo HPV (Cavaliere *et al.*, 1990).

Partindo dessa prerrogativa, nos grupos que apresentaram resultado citológico negativo, independente do resultado da pesquisa viral, 40 lâminas foram previamente definidas como negativas de acordo com a análise citológica convencional e, após a introdução dos critérios não clássicos, sete lâminas tornar-se-iam positivas na região da espátula ao passo que apenas três lâminas tornar-se-iam positivas na região da escova, representando uma elevação da frequência diagnóstica do HPV de 17,5% e 7,5% após a inclusão dos critérios não clássicos, respectivamente.

Por outro lado, nos grupos que apresentaram resultado citológico positivo, independente do resultado da pesquisa viral, 40 lâminas foram previamente definidas como positivas de acordo com a análise citológica convencional e, após a introdução dos critérios não clássicos 26 lâminas permaneceram com diagnóstico citológico positivo na região da espátula e oito na região da escova, ou seja, 14 lâminas na região da espátula e 32 lâminas na região da escova tornar-se-iam negativas, o que reflete em um decréscimo de 35% e 80% na frequência diagnóstica de HPV após a inclusão dos critérios não clássicos, respectivamente.

Esses resultados diferem dos obtidos por Schneider e colaboradores (1987), que selecionaram 200 esfregaços com diagnóstico citológico negativo, provenientes de pacientes assintomáticas para HPV e sem história prévia de citologia anormal, das quais 100 apresentaram diagnóstico molecular positivo definido pela metodologia de hibridização *in situ* e as outras 100 apresentaram diagnóstico molecular negativo. Os resultados demonstraram que após a inclusão de critérios não clássicos, 84 amostras com diagnóstico molecular positivo tornar-se-iam positivas para o diagnóstico citológico do HPV, e oito amostras com diagnóstico molecular negativo, tornar-se-iam positivas para o diagnóstico citológico do HPV, isto é, das 200 amostras inicialmente categorizadas como negativas pela citologia, 92 tornar-se-iam positivas, demonstrando uma elevação da frequência diagnóstica de HPV de 46%.

Cavaliere *et al.* (1990), em estudo retrospectivo, utilizaram os mesmos parâmetros morfológicos não clássicos descritos por Schneider *et al.* (1987) para analisar 40 esfregaços cérvicos-vaginais com diagnóstico citológico positivo prévio (NIC, carcinoma *in situ* e carcinoma invasor), mas que não evidenciaram efeito citopático pelo HPV. Após a revisão, foi possível detectar citologicamente a presença do HPV em 17 casos, isto é, houve uma elevação da frequência diagnóstica do HPV de 42,5%.

Deve-se salientar que tanto no trabalho de Schneider *et al.* (1987) quanto no trabalho de Cavaliere *et al.* (1990) a análise dos critérios citológicos não clássicos foi parcialmente limitada, no primeiro trabalho por ter sido realizada apenas em amostras com diagnóstico citológico negativo, e no segundo trabalho por ter sido realizado apenas em amostras com diagnóstico citológico positivo

(além de não haver a definição de infecção pelo HPV segundo metodologias moleculares), ou seja, em ambos os casos a avaliação foi unilateral, não permitindo verificar se por um lado houve elevação da frequência diagnóstica mas se por outro houve decréscimo da frequência diagnóstica. Soma-se a isso o fato desses autores terem avaliado a lâmina como um todo, não a subdividindo em suas respectivas regiões de coleta, o que muito provavelmente potencializou o achado de quatro ou mais critérios não clássicos.

Da mesma forma, na região da espátula, das 40 amostras que apresentaram pesquisa viral negativa, após a introdução de critérios não clássicos, das 20 lâminas com citologia convencional negativa, 3 tornar-se-iam positivas e das 20 lâminas com citologia convencional positiva, 7 tornar-se-iam negativas.

Semelhantemente, na região da escova, após a introdução de critérios não clássicos, das 20 lâminas com citologia convencional negativa, nenhuma se tornaria positiva, enquanto das 20 lâminas com citologia convencional positiva, 16 tornar-se-iam negativas.

Por outro lado, na região da espátula, das 40 amostras que apresentaram pesquisa viral positiva, após a introdução de critérios não clássicos, das 20 lâminas com citologia convencional negativa, 4 tornar-se-iam positivas e das 20 lâminas com citologia convencional positiva, 7 tornar-se-iam negativas.

Analogamente, na região da escova, após a introdução de critérios não clássicos, das 20 lâminas com citologia convencional negativa, 3 tornar-se-iam positivas e das 20 lâminas com citologia convencional positiva, 16 tornar-se-iam negativas.

É possível inferir, portanto, que nos esfregaços avaliados neste estudo, a inclusão de critérios citológicos não clássicos não obteve validade para definir a presença do HPV morfológicamente, e conseqüentemente, atuar como diagnóstico diferencial entre condições benignas e lesões pré-malignas, tanto na região da espátula quanto na região da escova, ressaltando-se ainda a baixa representatividade de tais critérios na última região. Tais achados podem ter ocorrido porque a avaliação dos critérios não clássicos foi realizada utilizando-se as mesmas imagens adquiridas para a análise morfométrica (60 campos), ou seja, não houve uma releitura completa dos esfregaços, o que limita a quantidade de células avaliadas.

Finalmente, comparando-se as metodologias utilizadas neste estudo com a análise citológica convencional, percebe-se que a análise quantitativa de imagens foi útil para discernir a presença do *Trichomonas vaginalis* e a presença de atipias celulares associadas ou não ao HPV. Dessa forma, a continuidade deste estudo é de extrema relevância para avaliar se a evolução das lesões promovidas pelo HPV será acompanhada de alterações morfométricas significativas.

Quanto a utilização de critérios não clássicos para o diagnóstico do HPV, demonstrou-se que a elevação da frequência de diagnósticos de HPV em amostras definidas como negativas pela

análise citológica convencional foi superada pelo decréscimo da frequência de diagnósticos de HPV em amostras definidas como positivas pela análise citológica convencional, sendo assim, este trabalho apresenta a perspectiva de verificar se a releitura completa das lâminas produzirá resultados diferentes.





A presença do HPV não foi determinante na indução de alterações morfométricas significativas utilizando-se os parâmetros AN, AC e razão AN/AC, tanto na região da espátula quanto na região da escova nos esfregaços avaliados.

A inclusão de critérios citológicos não clássicos não obteve validade para definir a presença do HPV morfológicamente, e consequentemente, atuar como diagnóstico diferencial entre condições benignas e lesões pré-malignas, tanto na região da espátula quanto na região da escova



- 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. (2001). Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. *Sao Paulo Med J*, 119(6), 200-205.
- Altenstrasser, F., Weger, A.R., Lindholm, J., Gschwendter, A., Mairinger, T. (1998). Reproducibility and efficiency testing of two sampling methods for image analysis in cytology. *Anal Quant Cytol Histol*, 20(2), 92-96.
- Apel, R., Delling, G., Krumme, H., Winkler, K., Salzer-Kuntschik, M. (1985). Nuclear polymorphism in osteosarcomas as a prognostic factor for the effect of chemotherapy: a quantitative study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 405(2), 215-223.
- Appleby, P., Beral, V., Berrington de González, A., Colin, D., Franceschi, S., Goodill, A., Green, J., Peto, J., Plummer, M., Sweetland, S. (2006). Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer*, 118(6), 1481-1495.
- Arbyn, M., Buntinx, F., Van Ranst, M., Paraskevaidis, E., Martin-Hirsch, P., Dillner, J. (2004). Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 96(4), 280-293.
- Arbyn, M., Bergeron, C., Klinkhamer, P., Martin-Hirsch, P., Siebers, A.G., Bulten, J. (2008). Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*, 111(1), 167-177.
- Athanassiadou, P., Kavantzias, N., Gonidi, M., Athanassiades, P., Liossi, A., Nakopoulou, L., Petrakakou, E., Davaris, P. (2001). Correlations between nuclear/cytoplasmic area ratio and classification of cervical smears. *J Exp Clin Cancer Res*, 20(4), 481-486.
- Azocar, J., Abad, S.M., Acosta, H., Hernandez, R., Gallegos, M., Pijano, E., Blanch, R., Kramar, A. (1990). Prevalence of cervical dysplasia and HPV infection according to sexual behavior. *Int J Cancer*, 45(4), 622-625.
- Baak, J.P. (1987). The principles and advances of quantitative pathology. *Anal Quant Cytol Histol*, 9(2), 89-95.
- Bernard, H. U. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*, 32S, S1-S6.
- Bibbo, M. (1991). *Morphometry: Cell image analysis*. In: Comprehensive Cytopathology, W.B. Saunders, 946-983.
- Bollmann, M., Bankfalvi, A., Trosic, A., Speich, N., Schmitt, C., Bollmann, R. (2005). Can we detect cervical human papillomavirus (HPV) infection by cytomorphology alone? Diagnostic value of non-classic cytological signs of HPV effect in minimally abnormal Pap tests. *Cytopathology*, 16(1), 13-21.
- Boon, M.E., De Graaff Guilloud, J.C., Rietveld, W.J. (1989). Analysis of five sampling methods for the preparation of cervical smears. *Acta Cytologica*, 33(6), 843-848.

- Boone, C.W., Stoner, G.D., Bacus, J.V., Kagan, V., Morse, M.A., Kelloff, G.J., Bacus, J.W. (2000). Quantitative grading of rat esophageal carcinogenesis using computer-assisted image tile analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9(5), 495-500.
- Bosch, F.X., Lorincz, A., Muñoz, N., Meijer, C.J., Shah, K.V. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 55(4), 244-265.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009. 98p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. (2000). Normas e recomendações: Recomendações básicas para o controle do câncer do colo do útero no Brasil. *Rev Bras Cancerol*, 46(1), 23-33.
- Bravo, I.G., Alonso, A. (2007). Phylogeny and evolution of papillomaviruses based on the E1 and E2 proteins. *Virus Genes*, 34, 249-262.
- Bray, F., Loos, A.H., McCarron, P., Weiderpass, E., Arbyn, M., Moller, H., Hakama, M., Parkin, D.M. (2005). Trends in cervical squamous cell carcinoma incidence in 13 european countries: Changing risk and the effects of screening. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14(3), 677-686.
- Buhmeida, A. (2006). Quantitative pathology: historical background, clinical research and application of nuclear morphometry and DNA image cytometry. *Libyan J Med*, 1(2), 126-139.
- Burghardt, E., Östör, A.G. (1983). Site and origin of squamous cervical cancer: a histomorphologic study. *Obstet Gynecol*, 62(1), 117-127.
- Carr, I., Pettigrew, N. (1991). How malignant is malignant? A brief review of the microscopic assessment of human neoplasms, and the prediction of whether they will metastasize and kill. *Clin Exp Metastasis*, 9(2), 127-137.
- Carvalho, J.J.L. & Oyakawa (2000). *I Consenso Brasileiro de HPV*, BG Cultural, 56-57.
- Castellsagué, X., Díaz, M., De Sanjosé, S., Muñoz, N., Herrero, R., Franceschi, S., Peeling, R.W., Ashley, R., Smith, J.S., Snijders, P.J.F., Meijer, C.J.L.M., Bosch, F.X. (2006). Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst*, 98(5), 303-315.
- Castle, P. E., Giuliano, A. R. (2003). Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 31, 29-34.
- Castle, P. E., Gravitt, P. E., Solomon, D., Wheeler, C. M., & Schiffman, M. (2008). Comparison of linear array and line blot assay for detection of human papillomavirus and diagnosis of cervical precancer and cancer in the atypical squamous cell of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion triage study. *J Clin Microbiol*, 46(1), 109-117.
- Castle, P. E., Schiffman, M., Gravitt, P. E., Kendall, H., Fishman, S., Dong, H., Hildesheim, A., Herrero, R., Bratti, M.C., Sherman, M.E., Lorincz, A., Schussler, J.E., Burk, R.D. (2002). Comparisons of HPV DNA detection by MY09/11 PCR methods. *J Med Virol*, 68(3), 417-423.

- Castle, P. E., Solomon, D., Schiffman, M., Wheeler, C. M. (2005). Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst*, 97(14), 1066-1071.
- Cavaliere, M.C., Filho, A.L., Pereira, G.M.C., Maeda, M.Y.S., Di Loreto, C. (1990). Papilomavirus em saúde pública: Importância da aplicação de novos critérios morfológicos para sua detecção em trato genital feminino. *Bol Infor Union*, 15(59-60), 24-39.
- Cavaliere, M.J., Pereira, G.M.C., De Lima, M.A.N., Pereira, S.M.M., Maeda, M.Y.S., Santos, R.T.M. (1990). Alterações colicitóticas em esfregaços cérvico-vaginais: inter-relações entre os aspectos citológico, imunocitoquímico para papilomavírus e morfométrico. *Jornal Brasileiro de Ginecologia*, 100(9), 275-279.
- Cecchini, S., Confortini, M., Bonardi, L., Cipparrone, G., Galante, L., Iossa, A., Ciatto, S. (1990). "Nonclassic" cytologic signs of cervical condyloma. A case-control study. *Acta Cytol*, 34(6), 781-784.
- Chen, Z., Schiffman, M., Herrero, R., DeSalle, R., Burk, R. D. (2007). Human papillomavirus (HPV) types 101 and 103 isolated from cervicovaginal cells lack an E6 open reading frame (ORF) and are related to gamma-papillomaviruses. *Virology*, 360(2), 447-453.
- Cho, N.H., Kim, Y.T., Kim, J.W. (2002). Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Yonsei Medical Journal*, 43(6), 722-728.
- Clifford, G., Franceschi, S., Díaz, M., Muñoz, N., Villa, L. L. (2006). Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*, 24 S3, 26-34.
- Collaço, L.M., Pinto, A.P. (1994). Aspectos citológicos na coloração de Papanicolaou da associação de HPV com displasia e carcinoma do colo uterino. *J. Bras. Ginec.*, 104(11/12), 419-421.
- Collan, Y., Torkkeli, T., Pesonen, E., Jantunen, E., Kosma, V.M. (1987). Application of morphometry in tumor pathology. *Anal Quant Cytol Histol*, 9(2), 79-88.
- Dardick, I., Payne, C.M. (1992). Rationale and potencial for image analysis in histopathology: an overview. *Ultrastructural Pathology*, 16(1-2), 97-98.
- De Andrea, C.E., Bleggi-Torres, L.F., Alves, M.T.S. (2008). Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos *softwares* de edição de imagem. *J Bras Patol Med Lab*, 44(1), 51-57.
- De Borges, R.J., Garcia-Tamayo, J., Zaitzman, M. (1989). Cytologic and ultrastructural findings of a peculiar alteration in cervical cells from patients with human Papillomavirus infections. *Acta Cytol*, 33(3), 314-318.
- De Sanjosé, S., Diaz, M., Castellsagué, X., Clifford, G., Bruni, L., Muñoz, N., Bosch, F.X. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis update. *Lancet Infect Dis*, 7(7), 453-459.

- De Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H-U, zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17-27.
- Derchain, S. F., Rabelo-Santos, S. H., Sarian, L. O., Zeferino, L. C., De Oliveira Zambeli, E. R., Do Amaral Westin, M. C., De Angelo Andrade, L.A., Syrjänen, K.J. (2004). Human papillomavirus DNA detection and histological findings in women referred for atypical glandular cells or adenocarcinoma in situ in their Pap smears. *Gynecol Oncol*, 95(3), 618-623.
- Diamond, D.A., Berry, S.J., Jewett, H.J., Eggleston, J.C., Coffey, D.S. (1982). A new method to assess metastatic potential of human prostate cancer: relative nuclear roundness. *J Urol*, 128(4), 729-734.
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, 110(5), 525-541.
- Dunn, T.S., Burke, M., Shwayder, J. (2003). A “see and treat” management for high-grade squamous intraepithelial lesion pap smears. *J Low Genit Tract Dis*, 7(2), 104-106.
- Dupin, N. (2004). Genital warts. *Clin Dermatol*, 22(6), 481-486.
- Eldar, S., Sabo, E., Cohen, A., Misselevich, I., Abrahamson, J., Cohen, O., Kelner, J., Boss, J.H. (1999). The value of histomorphometric nuclear parameters in the diagnosis of well differentiated follicular carcinomas and follicular adenomas of the thyroid gland. *Histopathology*, 34(5), 453-461.
- Fernandes, J.V., Meissner, R.V., Carvalho, M.G.F., Fernandes, T.A.A.M., Azevedo, P.R.M., Sobrinho, J.S., Prado, J.C.M., Villa, L.L. (2010). Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil. *BMC Res Notes*, 3(96), 1-6.
- Fleege, J.C., van Diest, P.J., Baak, J.P. (1990). Computer assisted efficiency testing of different sampling methods for selective nuclear graphic tablet morphometry. *Lab Invest*, 63(2), 270-275.
- Forslund, O., Antonsson, A., Nordin, P., Stenquist, B., & Hansson, B. G. (1999). A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol*, 80 ( Pt 9), 2437-2443.
- Forslund, O., Iftner, T., Andersson, K., Lindelöf, B., Hradil, E., Nordin, P., Stenquist, B., Kirnbauer, R., Dillner, J., de Villiers, E.M. (2007). Cutaneous human papillomaviruses found in sun-exposed skin: Beta-papillomavirus species 2 predominates in squamous cell carcinoma. *J Infect Dis*, 196(6), 876-883.
- Giuliano, A. R., Lu, B., Nielson, C. M., Flores, R., Papenfuss, M. R., Lee, J. H., Abrahamsen, M., Harris, R.B. (2008). Age-specific prevalence, incidence, and duration of human papillomavirus infections in a cohort of 290 US men. *J Infect Dis*, 198(6), 827-835.
- Gram, I.T., Macaluso, M., Churchill, J., Stalsberg, H. (1992). *Trichomonas vaginalis* (TV) and human papillomavirus (HPV) infection and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade III. *Cancer Causes Control*, 3(3), 231-236.

- Gupta, D.K., Komaromy-Hiller, G., Raab, S.S., Nath, M.E. (2001). Interobserver and intraobserver variability in the cytologic of normal and abnormal metaplastic squamous cells in pap smears. *Acta Cytol*, 45(5), 697-703.
- Heiberg, K.A., Kemp, T. (1929). Über die Zahl der chromosomen in Karzinomzellen beim Menschen. *Virchows Arch*, 273(3), 693-700.
- Hildesheim, A., Wang, S. S. (2002). Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res*, 89(2), 229-240.
- Högberg, T., Wang, G., Risberg, B., Guerrieri, C., Hittson, J., Boeryd, B., Gedal, B.K., Simonsen, E. (1992). Nuclear morphometry: a strong prognostic factor for survival after secondary surgery in advanced ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2(4), 198-206.
- Hudock, J., Hanau, C.A., Hawthorne, C., Jordan, A.G. (1995). Predictors of human papilloma virus in patients with keratinization. *Diagnostic Cytopathology*, 12(1), 28-31.
- Jacobj, W. (1925). Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihres Volumens. *Arch Entwickl Mech Org*, 106(1-4), 124-192.
- Jacobs, M.V., Walboomers, J.M., Snijders, P.J., Voorhorst, F.J., Verheijen, R.H., Franssen-Daalmeijer, N., Meijer, C.J. (2000). Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer*, 87(2), 221-227.
- Janicek, M.F., Averette, H.E. (2001). Cervical cancer: Prevention, diagnosis, and therapeutics. *CA Cancer J Clin*, 51, 92-114.
- Jayshree, R.S., Sreenivas, A., Tessy, M., Krishna, S. (2009). Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *Indian J Med Res*, 130(3), 286-295.
- Kashima, H. K., Shah, K. (1987). Recurrent respiratory papillomatosis. Clinical overview and management principles. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 14(2), 581-588.
- Kaneshima, E. N. *et al.* (2005). Importância da aplicação de critérios morfológicos não clássicos para o diagnóstico citopatológico de Papillomavirus humano (HPV) previamente detectado por PCR. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 39(1), 61-8.
- Kern, S.B. (1991). Significance of anucleated squames in Papanicolaou-stained cervicovaginal smears. *Acta Cytol*, 35(1), 89-93.
- Korobowicz, E. *et al.* (1997). The diagnostic value of cytomorphological traits in low and high risk type HPV infections. *J. Pathol.*, 48(2), 107-12.
- Koss, L.G., Durfee, G.R. (1956). Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann. NY Acad. Sci*, 63, 1245-1261.
- Koutsky, L. (1997). Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*, 102, 3-8.
- Kulasingam, S. L., Kim, J. J., Lawrence, W. F., Mandelblatt, J. S., Myers, E. R., Schiffman, M., Solomon, D., Goldie, S.J. (2006). Cost-effectiveness analysis based on the atypical squamous

- cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesion Triage Study (ALTS). *J Natl Cancer Inst*, 98(2), 92-100.
- Lima, D.N.O., Camara, S., Mattos, M.G.G., Ramalho, R. (2002). Diagnóstico citológico de ASCUS: sua importância na conduta clínica. *J Bras Patol Med Lab*, 38(1), 45-49.
- Lörincz, A. T., Richart, R. M. (2003). Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Pathol Lab Med*, 127(8), 959-968.
- Lousuebsakul, V., Knutsen, S.M., Gram, I.T., Akin, M.R. (2000). Clinical impact of atypical squamous cells of undetermined significance: A cytohistologic comparison. *Acta Cytologica*, 44 (1), 23-30.
- Luzzatto, R., Recktenvald, M., Portugal, J.P.L. (1990). Multinucleation and abortive cellular division in human papillomavirus infection. *Acta Cytol*, 34(2), 286-287.
- Manos, M. M., Kinney, W. K., Hurley, L. B., Sherman, M. E., Shieh-Ngai, J., Kurman, R. J., Ransley, J.E., Fetterman, B.J., Hartinger, J.S., McIntosh, K.M., Pawlick, G.F., Hiatt, R.A. (1999). Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. *JAMA*, 281(17), 1605-1610.
- Massad, L.S., Collins, Y.C., Meyer, P.M. (2001). Biopsy correlates of abnormal cervical cytology classified using the Bethesda system. *Gynecol Oncol*, 82(3), 516-522.
- Matos, E., Loria, D., Amestoy, G.M., Herrera, L., Prince, M.A., Moreno, J., Krunfly, C., van den Brule, A.J., Meijer, C.J., Muñoz, N., Herrero, R. (2003). Prevalence of human papillomavirus infection among women in Concordia, Argentina: a population-based study. *Sex Transm Dis*, 30(8), 593-599.
- Maw, R.D., Reitano, M., Roy, M. (1998). An international survey of patients with genital warts: Perceptions regarding treatment and impact on lifestyle. *Int J STD AIDS*, 9(10), 571-578.
- McIntyre-Seltman, K., Castle, P. E., Guido, R., Schiffman, M., Wheeler, C. M. (2005). Smoking is a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(5), 1165-1170.
- Meijer, G.A., Beliën, J.A., van Diest, P.J., Baak, J.P. (1997). Origins of image analysis in clinical pathology. *J Clin Pathol*, 50(5), 365-370.
- Meisels, A., Fortin, R. (1976). Condylomatous of the cervix and vagina: Cytologic patterns. *Acta Cytol*, 20(6), 505-509.
- Meisels, A., Morin, C., Casas-Cordero, M. (1982). Human papillomavirus infection of the uterine cervix. *International Journal of Gynecological Pathology*, 1(1), 75-94.
- Millot, C., Dufer, J. (2000). Clinical applications of image cytometry to human tumour analysis. *Histol Histopathol*, 15(4), 1185-1200.



- Miranda, P.M. (2010). Detecção e tipagem do papilomavirus humano em mulheres do município de Ouro Preto, Minas Gerais. *Dissertação de Mestrado*. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. 131 p.
- Molano, M., Van den Brule, A., Plummer, M., Weiderpass, E., Posso, H., Arslan, A., Meijer, C.J., Muñoz, N., Franceschi, S. (2003). Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol*, 158(5), 486-494.
- Morse, A.R., Wickenden, C., Byrne, M., Taylor-Robinson, D., Smith, J., Anderson, M.C., Smith, C., Malcolm, A.D.B., Coleman, D.V. (1988). DNA hybridization of cervical scrapes: comparison with cytological findings in Papanicolaou smears. *J. Clin Patol*, 41(3), 296-299.
- Muñoz, N., Bosch, F. X., Castellsagué, X., Díaz, M., De Sanjosé, S., Hammouda, D., *et al.* (2004). Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer*, 111(2), 278-285.
- Muñoz, N., Bosch, F. X., De Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., Snijders, P.J.F., Meijer, C.J.L.M. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348(6), 518-527.
- Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B., Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24 S3, 1-10.
- Naib, Z.M., Masukawa, N. (1961). Identification of condyloma acuminata cells in routine vaginal smears. *Obstet. & Gynecol*, 18(6), 735-738.
- Navarro, M., Furlani, B., Songco, L., Alfieri, M.L., Nuovo, G.J. (1997). Cytologic correlates of benign versus dysplastic abnormal keratinization. *Diagn Cytopathol*, 17(6), 447-451.
- Nuovo, G.J. (1990). Human papillomavirus DNA. In: genital tract lesions histologically negative for condylomata. *Am J Surg Pathol*, 14, 643-51.
- Paesi, S., Serafini, E.P., Barea, F., Madi, S.R., Echeverrigaray, S. (2009). High prevalence of human papillomavirus type 58 in patients with cervical pre-malignant lesions in southern Brazil. *J Med Virol*, 81(7), 1270-1275.
- Papanicolaou, G.N., Traut, H.F. (1997). The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. 1941. *Arch Pathol Lab Med*, 121(3), 211-224.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., Garber, G. (1998). Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev*, 11(2), 300-317.
- Plummer, M., Schiffman, M., Castle, P. E., Maucort-Boulch, D., Wheeler, C. M. (2007). A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis*, 195(11), 1582-1589.
- Purola, E., Savia, E. (1977). Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. *Acta Cytol*, 21(1), 26-31.

- Reagan, J.W., Hamonic, M.J. (1956). The cellular pathology in carcinoma in situ: A cytohistopathological correlation. *Cancer*, 9(2), 385-402.
- Richart, R.M. (1967). Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol*, 10(4), 748-784.
- Robertson, J.H., Woodend, B. (1993). Negative cytology preceding cervical cancer: causes and prevention. *J Clin Pathol*, 46(8), 700-702.
- Rousseau, M.C., Pereira, J.S., Prado, J.C., Villa, L.L., Rohan, T.E., Franco, E.L. (2001). Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. *J Infect Dis*, 184(12), 1508-1517.
- Schiffman, M., Castle, P.E. (2003). Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med*, 127(8), 930-934.
- Schiffman, M., Herrero, R., DeSalle, R., Hildesheim, A., Wacholder, S., Rodriguez, A. C., Bratti, M.C., Sherman, M.E., Morales, J., Guillen, D., Alfaro, M., Hutchinson, M., Wright, T.C., Solomon, D., Chen, Z., Schussler, J., Castle, P.E., Burk, R.D. (2005). The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*, 337(1), 76-84.
- Schlecht, N. F., Platt, R. W., Duarte-Franco, E., Costa, M. C., Sobrinho, J. P., Prado, J. C., et al. (2003). Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 95(17), 1336-1343.
- Schneider, A., Kraus, H., Schuhmann, R., Gissman, L. (1985). Papillomavirus infection of the lower genital tract: detection of viral DNA in gynecological swabs. *Int J Cancer*, 35( ), 443-448.
- Schneider, A., Meinhardt, G., De Villiers, E.M., Gissmann, L. (1987). Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies. *Diagn Cytopathol*, 3(3), 250-255.
- Schmidt, J.L, Henriksen, J.C., McKeon, D.M., Savik, K., Gulbahce, H.E., Pambuccian, S.E. (2008). Visual estimates of nucleus-to-nucleus ratios: can we trust our eyes to use the Bethesda ASCUS and LSIL size criteria? *Cancer*, 114(5), 287-293.
- Sherman, M. E., Solomon, D., Schiffman, M. (2001). Qualification of ASCUS. A comparison of equivocal LSIL and equivocal HSIL cervical cytology in the ASCUS LSIL Triage Study. *Am J Clin Pathol*, 116(3), 386-394.
- Sherman, M.E., Wang, S.S., Carreon, J., Devesa, S.S. (2005). Mortality trends for cervical squamous and adenocarcinoma in the United States. *Cancer*, 103(6), 1258-1264.
- Smith, J. S., Green, J., Berrington de Gonzaléz, A., Appleby, P., Peto, J., Plummer, M., Franceschi, S., Beral, V. (2003). Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet*, 361(9364), 1159-1167.
- Smith, J. S., Lindsay, L., Hoots, B., Keys, J., Franceschi, S., Winer, R., Clifford, G.M. (2007). Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*, 121(3), 621-632.

- Snijders, P.J.F., van den Brule, A.J.C., Meijer, C.J.L.M. (2003). The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol*, 201(1), 1-6.
- Solomon, D. (1991). The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytology diagnosis: An overview. *Int J Gynecol Pathol*, 10(4), 323-325.
- Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., Raab, S., Sherman, M., Wilbur, D., Wright, T.J., Young, N. (2002). The 2001 Bethesda system: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama*, 287(16), 2114-2119.
- Stoler, M.H. (2003). Human papillomavirus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. *Arch Pathol Lab Med*, 127(8), 935-939.
- Strefezzi, R.F., Xavier, J.G., Catão-Dias, J.L. (2003). Morphometry of canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary Pathology*, 40(3), 268-275.
- Szostek, S., Klimek, M., Zawilinska, B., Rys, J., Kope, J., Daszkiewicz, E. (2006). Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. *Acta Biochim Pol*, 53(3), 603-607.
- Takahashi, M., Naito, M. (1997). Application of the CytoRich monolayer preparations system for cervical cytology: A prelude to automated primary screening. *Acta Cytologica*, 41(6), 1785-1789.
- Tommasino, M., Accardi, R., Caldeira, S., Dong, W., Malanchi, I., Smet, A., Zehbe, I. (2003) The role of TP53 in cervical carcinogenesis. *Human Mutation*, 21(3), 307-312.
- Vaucher, R.A., Santos, F.R., Vargas, V.R.A. (2006). Índice de concordância entre dois diferentes observadores na revisão de esfregaços citológicos cérvico-vaginais anteriormente diagnosticados como ASC-US: utilização da técnica convencional de Papanicolaou. *RBAC*, 38(1), 29-33.
- Velasco, J. (2001). Citologia líquida. *VPH Hoje*, 1, 8-9.
- Vince, A., Ivanisevic, M., Harni, V., Skalko, D., Jeren, T. (2001). Molecular detection of human papillomavirus in women with minor-grade cervical cytology abnormalities. *Journal of Clinical Virology*, 20(1-2), 91-94.
- Wheeler, C. M. (2008). Natural history of human papillomavirus infections, cytologic and histologic abnormalities, and cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 35(4), 519-536, vii.
- Wied, G.L., Bartels P.H., Bibbo, M., Dytch, H.E. (1989). Image analysis in quantitative cytopathology and histopathology. *Human Pathology* 20(6), 549-571.
- Winer, R. L., Lee, S. K., Hughes, J. P., Adam, D. E., Kiviat, N. B., Koutsky, L. A. (2003). Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*, 157(3), 218-226.
- Woodman, C. B., Collins, S., Winter, H., Bailey, A., Ellis, J., Prior, P., *et al.* (2001). Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet*, 357(9271), 1831-1836.

- World Health Organization. Programmes and projects. Cancer. Screening and early detection of cancer. Disponível em:<<http://www.who.int/cancer/detection/cytologyscreen/en/index.html>> (acessado em 01/08/2011)
- Yamamoto, L.S.U., Alves, V.A.F., Maeda, M.Y.S., Longatto-Filho, A., Utagawa, M.L., Eluf-Neto, J. (2004). A morphological protocol and guide-list on uterine cervix cytology associated to papillomavirus infection. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 46(4), 189-193.
- Yoshinouchi, M., Hongo, A., Nakamura, K., Kodama, J., Itoh, S., Sakai, H., Kudo, T. (1999). Analysis by multiplex PCR of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. *J Clin Microbiol*, 37(11), 3514-3517.
- zur Hausen, H. (1977). Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol*, 78, 1-30.



**ANEXO I – Coloração de Papanicolaou Modificada**

- Água destilada..... 3’
- Hematoxilina de Harris..... 1’ 20”
- Água corrente..... 1’
- Álcool 95%..... 10 imersões
- Álcool 95%..... 10 imersões
- Orange G ..... 2’
- Álcool 95% ..... 10 imersões
- Álcool 95%..... 10 imersões
- EA 36..... 50”
- Álcool 95% ..... 10 imersões
- Álcool 95% ..... 10 imersões
- Deixar secar à temperatura ambiente
- Xilol ..... 3’
- Montar a lâmina com Entellan e cobrir com lamínula

**ANEXO II - Emissão de Laudo de acordo com o Sistema de Bethesda 2001****1. TIPOS DA AMOSTRA**

Citologia:

- Convencional
- Em meio líquido

**2. AVALIAÇÃO PRÉ-ANALÍTICA**

Amostra rejeitada por:

- Ausência ou erro de identificação da lâmina e/ou do frasco;
- Identificação da lâmina e/ou do frasco não coincidente com a do formulário;
- Lâmina danificada ou ausente;
- Causas alheias ao laboratório (especificar);
- Outras causas (especificar).

**3. ADEQUABILIDADE DA AMOSTRA**

Satisfatória

Insatisfatória para avaliação oncótica devido ao:

- Material acelular ou hipocelular (< 10% do esfregaço)
- Leitura prejudicada (> 75% do esfregaço) por presença de:
  - sangue;
  - piócitos;
  - artefatos de dessecação;
  - contaminantes externos;
  - intensa superposição celular;
  - outros (especificar).

Epitélios representados na Amostra:

- Escamoso;
- Glandular;
- Metaplásico.

#### 4. DIAGNÓSTICO DESCRITIVO

Dentro dos limites da normalidade, no material examinado;

Alterações celulares benignas

Inflamação;

Reparação;

Metaplasia escamosa imatura;

Atrofia com inflamação;

Radiação;

Outras (especificar), por exemplo: Presença de células endometriais (na pós-menopausa ou acima de 40 anos, fora do período menstrual).

Atipias celulares

Células atípicas de significado indeterminado:

Escamosas:

Possivelmente não neoplásicas (ASC-US);

Não se pode afastar lesão intra-epitelial de alto grau (ASC-H).

Glandulares:

Possivelmente não neoplásicas;

Não se pode afastar lesão intra-epitelial de alto grau.

De origem indefinida:

Possivelmente não neoplásicas;

Não se pode afastar lesão intra-epitelial de alto grau.

Em células escamosas:

Lesão intra-epitelial de baixo grau (compreendendo efeito citopático pelo HPV e neoplasia intra-epitelial cervical grau I);

Lesão intra-epitelial de alto grau (compreendendo neoplasias intra-epiteliais cervicais graus II e III);

Lesão intra-epitelial de alto grau, não podendo excluir micro-invasão;

Carcinoma epidermóide invasor.

Em células glandulares:

Adenocarcinoma *in situ*

Adenocarcinoma invasor:

Cervical

Endometrial

Sem outras especificações

Outras neoplasias malignas (especificar)



**5. MICROBIOLOGIA**

Lactobacillus sp;

Bacilos supracitoplasmáticos (sugestivos de *Gardnerella/Mobiluncus*);

Outros bacilos;

Cocos;

*Candida* sp;

*Trichomonas vaginalis*;

Sugestivo de *Chlamydia* sp;

*Actinomyces* sp;

Efeito citopático compatível com vírus do grupo Herpes;

Outros (especificar).





