

LUÍSA DE MARILAK BERNARDES FERREIRA

**PESQUISA DE DNA-HPV PELA TÉCNICA DE BIOLOGIA
MOLECULAR (CAPTURA HÍBRIDA 2) EM MULHERES COM
CITOLOGIA CÉRVICO-VAGINAL COM DIAGNÓSTICO DE
CÉLULAS ESCAMOSAS ATÍPICAS DE CARÁTER
INDETERMINADO (ASCUS)**

**Trabalho apresentado à Universidade Federal
de Santa Catarina, para a conclusão do Curso
de Graduação em Medicina.**

Florianópolis

Universidade Federal de Santa Catarina

2005

LUÍSA DE MARILAK BERNARDES FERREIRA

**PESQUISA DE DNA-HPV PELA TÉCNICA DE BIOLOGIA
MOLECULAR (CAPTURA HÍBRIDA 2) EM MULHERES COM
CITOLOGIA CÉRVICO – VAGINAL COM DIAGNÓSTICO
DE CÉLULAS ESCAMOSAS ATÍPICAS DE CARÁTER
INDETERMINADO (ASCUS)**

**Trabalho apresentado ao departamento de
Tocoginecologia da Universidade Federal de
Santa Catarina, para a conclusão do Curso de
Graduação em Medicina.**

Presidente do Colegiado: Prof. Dr. Ernani Lange de S. Thiago

Orientador: Prof. Luiz Fernando Sommacal

Co-Orientador: Dra. Maria Elizabeth Menezes

Florianópolis

Universidade Federal de Santa Catarina

2005

DEDICATÓRIA

Dedico meu trabalho, primeiramente aos meus pais, duas pessoas maravilhosas as quais serei eternamente grata por serem meu exemplo de força, determinação, coragem, humildade, paciência, acreditando na minha capacidade e depositando confiança nos meus propósitos de conquistar sempre mais...

Aos meus familiares, que mesmo distante, torceram por mim para que eu alcançasse mais essa vitória...

Aos meus amigos, que seguraram minhas mãos no momento das angústias e escreveram em minha vida cotidiana, muitos capítulos de felicidade: intermináveis conversas ao telefone, pisando as areias da praia, todas as baladas da vida, eu quero a minha máscara, os segredos do coração...

A todas as mulheres com câncer de colo do útero, por terem sido a inspiração de um propósito maior: evitar o sofrimento...

Dedico, nesse último instante, a Deus, pois, mesmo tendo várias vezes me esquecido dele, ele não se esquece de mim...

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais: Carlos Antônio Bernardes Ferreira e Vilma Fátima do Carmo Ferreira. Mais uma vez não poderia deixar de agradecer o apoio sem o qual este trabalho não existiria.

Ao meu orientador Luiz Fernando Sommacal, por ter aceitado ajudar-me a desenvolver uma idéia, organizada em um projeto, agora, consubstanciado neste trabalho.

À minha Co-orientadora Maria Elizabeth Menezes, por aceitar participar da pesquisa, gerando a maior parte dos recursos financeiros necessários.

À professora Maria Cristina Marino Calvo, pela orientação estatística dos resultados da pesquisa.

Aos funcionários do SAME: Edésio Barbosa, André Luiz Machado, José Carioni. A boa vontade em colaborar esteve presente todas a vezes que precisei acessar os prontuários.

Às funcionárias do Ambulatório de Ginecologia do HU: Nilcei Coelho, Sandra Regina Costa, Helena Faraco, Catia Mara de Oliveira. Obrigada por recepcionar as pacientes da pesquisa, mesmo não sendo suas funções, e claro, não podia deixar de falar do cafezinho...

Aos funcionários do Serviço de Anatomia Patológica do HU: Alvonir José de Souza, Eliete Porcia Meira, Eliane Pereira, Assumpção Marino Rodrigues, Daniella Serafin Couto Vieira, Vanderlei do Nascimento, Lee Ching. Permitiram minha pesquisa no Arquivo dos laudos citopatológicos. Agradecimento especial à Daniela e Eliane pelo interesse demonstrado no estudo e incentivo.

Ao funcionário da Informática do HU: Antônio Lapa Raulino.

Aos meus amigos: Marina Vasconcelos Leão Lírio, Raquel Ferreira José, Priscila Marcon Cardoso, Daniel Hartman, que diretamente contribuíram para que esse trabalho fosse iniciado e concluído.

Agradeço ainda todos os colegas de turma da med 99-2, que mesmo de forma indireta, também participaram da conclusão de mais uma etapa de minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
SUMMARY	vii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	04
3 MÉTODO.....	05
3.1 Delineamento do Estudo	05
3.2 Casuística	05
3.3 Procedimentos	06
4 RESULTADOS.....	08
5- DISCUSSÃO	11
6- CONCLUSÕES	14
NORMAS ADOTADAS	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
APÊNDICES	20

RESUMO

Introdução- O carcinoma de colo do útero representa 15% de todos os tumores malignos em mulheres. Existe uma preocupação em promover a melhoria do diagnóstico citopatológico na triagem do câncer cervical, pois o exame citopatológico de screening não tem diminuído consideravelmente a incidência dessa neoplasia nos países em desenvolvimento. Cerca de 15% dos diagnósticos de ASCUS (Células Escamosas Atípicas de Caráter indeterminado) evoluem para LIEAG (lesão intraepitelial de alto grau). A adição do teste de HPV de risco oncogênico à citologia, em comparação com a citologia isolada, melhora dramaticamente a identificação das mulheres com risco de câncer cervical, principalmente para laudos citopatológicos de ASCUS.

Objetivo.- Avaliar pacientes com citologia de ASCUS quanto à presença de DNA-HPV através de captura híbrida 2.

Sujeitos e Métodos- Foram selecionadas 35 mulheres atendidas no Ambulatório de Ginecologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina com pelo menos um diagnóstico citológico de ASCUS entre os anos de 2002 a 2004. As pacientes foram submetidas à coleta cervical para pesquisar a presença de DNA-HPV através de Captura Híbrida 2. Colposcopia e biópsia foram indicadas quando necessário.

Resultados- DNA-HPV foi encontrado em 20% das pacientes. Zonas de Transformação Atípica (ZTA) ocorreram em 23,8% das colposcopias. Das pacientes submetidas à biópsia 33% apresentaram LIEAG.

Conclusões- 20% de DNA-HPV foi encontrado em pacientes com ASCUS. 33% das pacientes com DNA-HPV de risco oncogênico apresentaram LIEAG. 14,3% das pacientes apresentaram ZTA. 14,3% das pacientes apresentaram Nics.

Palavras Chave: ASCUS, DNA- HPV, Captura Híbrida 2 , Colposcopia , Histologia.

SUMMARY

Introduction - The cervical cancer represents 15% of all malign tumors in women. There is a concern with the promotion of the improvement of cytology diagnosis in the triage of the cervical cancer as the screening cytology exam has not diminished significantly the incidence of this neoplasia in developing countries. Around 15% of ASCUS diagnoses (atypical squamous cells of undetermined significance) evolve into HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion). The addition of the HPV test of oncogenic risk to cytology, as compared to isolated cytology, improves dramatically the identification of women at risk for cervical cancer, particularly for the ASCUS cytopathological results.

Objective- To assess ASCUS cytology patients as regards the presence of DNA-HPV through hybrid 2 capture.

Subjects and Methods- The study included 35 women assisted at the gynecology ward of the "Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina", with at least one ASCUS cytology diagnosis, between 2002 and 2004. These women were submitted to cervical specimen procedures for the presence of DNA-HPV, through Hybrid capture II. Colposcopy and biopsies were indicated when necessary.

Results- DNA-HPV was found in 20% of the patients. Transformation zone atypical (TZA) occurred in 23,8% of the colposcopies. 33% of the patient submitted to biopsy were found to have HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion).

Conclusion- a percentual of 20% of DNA-HPV was found in ASCUS patients. 33% of DNA-HPV patients with at risk of carcinogenic presented LIEAG. 14,3% of the patients presented TZA. 14,3% of he patients presented NICs.

Key words: ASCUS, DNA- HPV, Hybrid capture, colposcopy, histology.

1- INTRODUÇÃO

O carcinoma de colo do útero representa 15% de todos os tumores malignos em mulheres. No Brasil, estima-se que o câncer do colo do útero seja o segundo mais comum na população feminina, sendo superado somente pelo câncer de pele não melanoma (INCA-2004). Ao contrário do que ocorre nos países mais desenvolvidos, as taxas de mortalidade por câncer do colo do útero continuam moderadamente altas no Brasil, e do ponto de vista temporal, vem aumentando¹. Segundo a Organização Mundial de Saúde, o carcinoma de colo uterino é considerado como de bom prognóstico. Se diagnosticado e tratado oportunamente, possui um dos maiores potenciais de cura, chegando a 100% quando o diagnóstico é precoce, podendo ser tratado a nível ambulatorial em 80% dos casos, contudo, dados disponíveis de registros hospitalares no Brasil mostram que, em média, a metade das pacientes com câncer de colo uterino tem um diagnóstico inicial já em estágio III ou IV¹.

Existe grande preocupação em promover a melhoria do diagnóstico citopatológico na triagem do câncer cervical, pois o exame citopatológico de screening não tem diminuído consideravelmente a incidência dessa neoplasia nos países em desenvolvimento. Uma das causas é a limitação de sensibilidade do método, variando de 50 a 98% e tendo resultados falsos negativos de 6 a 55%^{2,3}.

Em 1988 foi criada uma nova e atualizada terminologia para ser usada nos achados citopatológicos do material colhido da cérvix uterina. O objetivo era de melhorar o manejo clínico das pacientes criando uma terminologia que pudesse corresponder os achados citológicos com a progressão da lesão e estabelecer um padrão frente às diversas classificações adotadas pelos laboratórios até então. Isto diminuiria a porcentagem de falso-negativos e falso-positivos do exame citopatológico^{4,5,6}. As propostas foram denominadas de Sistema de Bethesda – TBS – *The Bethesda System*. Foi introduzido o termo lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG-LoSIL) correspondente a NIC I, da Classificação de Richard, alterações compatíveis com infecção pelo HPV e Lesão intraepitelial de alto grau (LIEAG-HiSIL) correspondendo NICII e NIC III. Em 1991 sentiu-se a necessidade de uma revisão devido à larga utilização da classificação confrontada com os resultados práticos. Foram introduzidos os termos ASCUS e AGUS (Atypical Squamous Cells of Undetermined significance / Atypical Glandular Cells of Undertemined significance). O ASCUS

corresponderia aos achados citológicos em células escamosas que não pudessem ser classificados como simples alteração reativa, mas também não preencheria critérios suficientes para caracterizá-los como neoplásicos. Dentro da própria terminologia para ASCUS foi necessária uma subdivisão caracterizando as alterações, mesmo que indeterminadas, como mais propensas a um processo inflamatório reparativo ou alterações em que lesões de alto grau não poderiam ser excluídas sendo denominadas de ASC-US e ASC-H respectivamente⁶. Aproximadamente 10% dos esfregaços cérvico-vaginais correspondem a ASCUS, a associação entre este laudo citopatológico e lesão histológica de alto grau tem sido pesquisada obtendo-se uma frequência relativamente alta⁷. Estima-se que 10% a 15% das pacientes com lesões do tipo ASCUS apresentam lesões de alto grau⁵.

A conduta relacionada às lesões do tipo ASCUS ainda é controversa, incluindo manejo clínico com repetidos esfregaços cérvico-vaginais num intervalo menor de tempo (4-6 meses) e conforme resultados desses esfregaços, seguindo uma avaliação colposcópica e histológica de áreas de forte suspeição^{1,5}.

A infecção do trato genital pelo papiloma vírus humano (HPV) é o fator etiológico mais relacionado ao câncer de colo do útero pela Organização Mundial de Saúde, tendo sido bem estabelecida esta relação^{8,9}. Estudos mostram que virtualmente 100% dos carcinomas do colo uterino estão associado ao papiloma vírus humano (HPV) e mais especificamente a determinados tipos denominados de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), desta maneira, a identificação do vírus tornou-se de interesse crescente como método de screening ou associado a colpocitologia oncótica¹⁰. Outros fatores de risco, além da presença do vírus, também estão relacionados ao desenvolvimento do câncer do colo de útero, como a multiplicidade de parceiros, história de infecções sexualmente transmissíveis da mulher e do parceiro, precocidade das relações sexuais, multiparidade e baixo nível socioeconômico, talvez por serem esses fatores facilitadores da persistência da infecção viral¹. Estudos sugerem outros fatores, ainda não conclusivos, como tabagismo, não só em quantidade de cigarros por dia bem como o tempo de uso, demonstrando que fumantes teriam 50% de chance a mais para o desenvolvimento do câncer de colo¹¹. O uso de anticoncepcionais orais, alimentação pobre em alguns macronutrientes como vitamina C, beta caroteno e folatos, estados de imunossupressão, também tem sido considerados¹.

Todos os exames de detecção do HPV disponíveis atualmente na prática clínica, Southern Blot, Dot Blot, Captura Híbrida, Hibridização in-situ, preenchem critérios para uso

em rastreamento de populações, uma vez que a infecção viral precede, um período relativamente longo, as alterações morfológicas, são testes altamente reproduzíveis e também são exames não invasivos¹¹. A captura de híbridos (*Digene Diagnostics Inc.*) para detecção do HPV é um exame de biologia molecular altamente sensível, capaz de detectar 18 dos aproximadamente 30 tipos de HPV que mais comumente infectam o trato anogenital e que são responsáveis por aproximadamente 95% dessas infecções^{7,12}. Essa técnica foi aprovada pelo FDA (Food and Drugs Administration) para uso no rastreamento de ASCUS, nos EUA e, também em 1995, pelo Ministério da Saúde para diagnóstico clínico do HPV, no Brasil. Todos os testes de captura híbrida são, ao mesmo tempo, qualitativos e quantitativos². O exame contém as sondas gênicas de 70% dos tipos de HPV de baixo risco e 99% dos tipos de HPV oncogênicos. O grupo A possui sondas para os Hpv's de baixo risco (6, 11, 42, 43, 44), e o grupo B, sondas para os HPVs de intermediário/alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). Sua sensibilidade é de 1pg/ml de DNA-HPV, equivalente a 0,1 cópia de vírus/célula¹³. Por essa sensibilidade, os estudos têm mostrado estreita relação entre os resultados e a evolução clínica^{4,9-10,14}. Os grupos designados de alto risco teriam indicação formal para colposcopia, enquanto que o grupo designado de baixo risco poderia seguramente prosseguir com acompanhamento clínico¹⁰.

A adição do teste de HPV de alto risco à citologia, em comparação com a citologia isolada, melhora dramaticamente a identificação das mulheres com risco de câncer cervical¹⁰. Mulheres com HPV de alto risco estão mais susceptíveis a anormalidades na citologia cervical que mulheres sem HPV de alto risco¹⁰. A determinação das mulheres infectadas pelo HPV de alto risco irá melhor selecionar as mulheres potencialmente de risco para câncer invasor permitindo o tratamento precoce e a diminuição da morbidade por esse tipo de tumor^{10, 15}.

2- OBJETIVOS

2-1 Objetivo geral: Avaliar a importância da citologia cérvico-vaginal com diagnóstico de Células Escamosas Atípicas de caráter indeterminado (ASCUS) quanto à presença de DNA-HPV.

2-2 Objetivos específicos:

1. Pesquisar a porcentagem de Leões intra-epiteliais de alto grau (LIEAG) diagnosticadas pela colposcopia em pacientes com HPV de risco oncogênico.
2. Avaliar a associação entre o exame citológico da cérvix uterina com diagnóstico de ASCUS e a presença de anormalidades ao exame colposcópico.
3. Avaliar a porcentagem de pacientes com ASCUS e alterações colposcópicas quanto à presença de lesão histológica.

3 - MÉTODO

3.1 Delineamento do estudo

Estudo descritivo e observacional, realizado no Ambulatório de Oncologia Genital do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, no período de setembro de 2004 a janeiro de 2005. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade acima referida, projeto 216-2004 em agosto de 2004.

3.2 Casuística

Foram incluídas no estudo as pacientes atendidas no Ambulatório de Oncologia Genital do Hospital Universitário de Santa Catarina, com pelo menos um diagnóstico de Células Escamosas Atípicas de Caráter Indeterminado (ASCUS) no exame citológico da cérvix uterina, realizados no Serviço de Anatomopatológica deste hospital no período de 01/01/2002 a 31/12/2004. Os laudos citopatológicos foram emitidos conforme a classificação de Bethesda 2001. Trinta e cinco (35) pacientes aceitaram participar da pesquisa em concordância com os termos do consentimento livre esclarecido. Todas as pacientes preenchem os critérios estabelecidos.

3.2.1 Critérios de inclusão

- ✓ Pacientes com diagnóstico de ASCUS.
- ✓ Pacientes que aceitem participar da pesquisa conforme consentimento livre e esclarecido.

3.2.2 Critérios de exclusão

- ✓ Pacientes grávidas.
- ✓ Pacientes com cervicite, ou em tratamento para afecções ginecológicas.
- ✓ Pacientes que tenham sido biopsiadas há menos de 3 meses.

3.3 Procedimentos

As pacientes foram agendadas conforme disponibilidade dos consultórios do ambulatório de Oncoginecologia do Hospital Universitário. Cada paciente foi atendida individualmente, sendo novamente esclarecida sobre a pesquisa e seus objetivos. Dados sobre tabagismo, uso de anticoncepcional oral e uso de medicações foram coletados. As pacientes menstruadas, que tiveram relações sexuais ou realizaram USG transvaginal nas últimas 48 horas foram orientadas a retornar em outra data para proceder à coleta do material da cérvix uterina. As pacientes foram colocadas em posição ginecológica, seguindo-se a introdução do espéculo vaginal sem o uso de lubrificante. O colo foi superficialmente limpo com gaze seca e estéril. Um cone-brush foi introduzido no orifício cervical externo, aproximadamente 1cm, procedendo a movimentos giratórios de 360 graus no sentido horário em número de cinco vezes, em seguida o cone foi colocado em tubete contendo líquido específico (Vira Pap) para processamento do material para captura híbrida (Digne®). O material coletado foi mantido a temperatura ambiente e encaminhado ao laboratório para pesquisa de DNA-HPV através do exame de biologia molecular, Captura Híbrida 2 (HC2) conforme protocolo e laudo da *Digene Diagnostic Inc.* O material enviado foi avaliado quanto a presença de 18 tipos de HPV divididos em dois grupos conforme o risco oncogênico. O grupo A, com sondas para os HPVs de baixo risco (6, 11, 42, 43, 44), e o grupo B, com sondas para os HPVs de risco intermediário/alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). As sondas consistem de moléculas de RNA complementares ao DNA dos tipos acima especificados. As moléculas complementares, ou híbridos, são posteriormente conjugados com anticorpos monoclonais que contém um fosfato alcalino. Esse material é lavado posteriormente, só permanecendo os anticorpos ligados ao RNA/DNA. Um substrato quimioluminescente, que se liga ao fosfato alcalino, é misturado ao material e a leitura é feita em um luminômetro, sendo a luz emitida medida em unidades relativas de luz que é comparada com o controle (RLU/PC). A sensibilidade do método é de 1pg/ml de DNA-HPV, equivalente a 0,1 cópia de vírus/célula. Foram considerados positivos os resultados iguais ou superiores a 1pg/ml, equivalente a 0,1 cópias virais/célula. Os laudos foram entregues lacrados.

As colposcopias foram realizadas em 14 pacientes no momento da coleta. Os outros dados colposcópicos foram extraídos dos prontuários das pacientes. Foi usado colposcópico

marca Olimpos. A técnica colposcópica utilizada foi a recomendada pela Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e em Colposcopia (SBPTGIC). O colo foi superficialmente limpo com gase estéril e seca. Uma gase embebida em ácido acético (3%) foi passada em todo o colo, em seguida o colo foi visualizado. O colo foi limpo novamente e uma gase embebida em solução de Lugol foi passada em todo colo seguindo a visualização. Foi utilizada a Classificação Colposcópica da Federação internacional de Patologia Cervical de Barcelona 2002. A colposcopia foi considerada negativa (ausência de lesão), onde foi possível rastrear o colo nos seus epitélios: pavimentoso, metaplásico (ZT) e glandular, cujo limite e contorno da JEC foi totalmente visualizada. A colposcopia foi considerada positiva quando houve presença de lesão delimitada e JEC visível. A colposcopia foi considerada insatisfatória quando a JEC não foi visualizada. Nas colposcopias positivas e insatisfatórias foram realizadas biópsias para análise histopatológica.

4- RESULTADOS

A média de idade das pacientes foi de 35,4 anos com desvio padrão de (12,20), sendo a idade mínima 19 anos e a máxima 64. 42,9% das pacientes tinham idade igual ou inferior a 30 anos. Dez pacientes (28,6%) usavam anticoncepcional oral, nenhuma fazia terapia de reposição hormonal. Quatro (11,4%) eram fumantes. Fig 1.

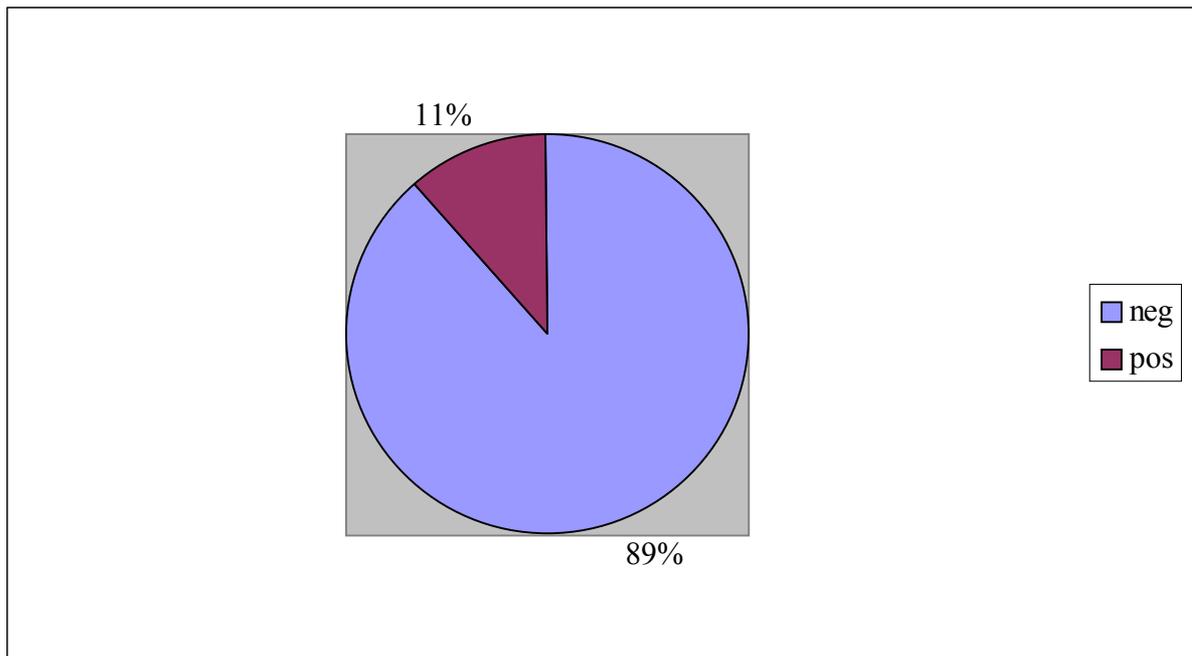


Figura - 1 Porcentagem de tabagistas em pacientes com citologia de ASCUS

Segundo dados coletados dos prontuários, após o primeiro diagnóstico de ASCUS, 16 (45,7%) das pacientes repetiram o exame preventivo antes dos seis meses sendo que seis (17,1%) dessas pacientes tiveram diagnóstico repetido para ASCUS ou lesão mais grave (LIEBG, LIEAG), nessas pacientes, três realizaram colposcopia após esse segundo laudo

citopatológico. Das 19 (54,3%) pacientes que não repetiram a citologia 11 foram submetidas a colposcopia num intervalo inferior a um ano. Tabela 1.

TABLA –1 Distribuição das pacientes com citologia de ASCUS, com repetição do esfregaço cérvico-vaginal em seis meses, quanto a Histologia.

REPETIDO < 6	ASCUS/NIC	Sem				Total %
		biópsia	normal	LIEBG	LIEAG	
NÃO		15	2	1	1	19 54,3
Total		15	2	1	1	19 54,3
SIM	NÃO	7	1	1	1	10 28,6
	SIM	4	1		1	6 17,1
Total		11	2	1	2	16 45,7
Total %		26 74,3	4 11,4	2 5,7	3 8,6	35 100

FONTE: SAME/HU, 2002-2004.

ASCUS = Células Escamosas Atípicas de Caráter Indeterminado.

LIEBG = Lesão Intraepitelial de Baixo Grau. LIEAG = Lesão Intraepitelial de Alto Grau.

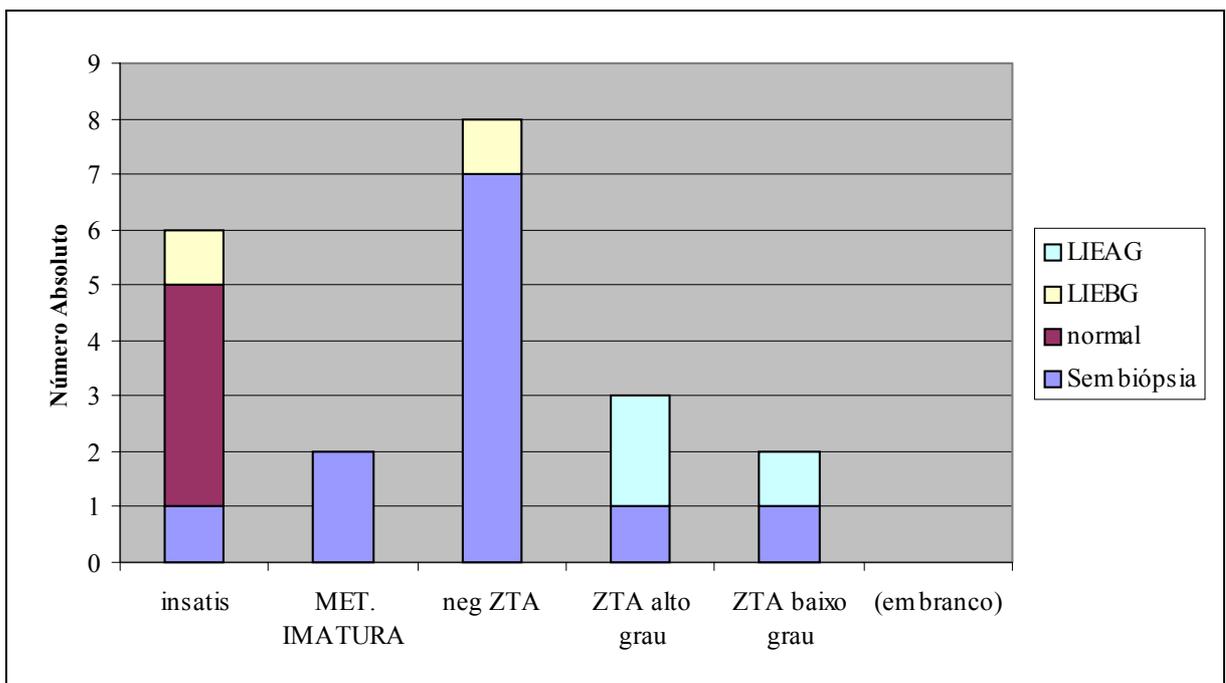


FIGURA 2- Associação entre os achados coloscópicos e histológicos em pacientes com diagnóstico de ASCUS. ZTA (Zona de Transformação Atípica). MET. (metaplasia).

No total, 21 (60%) das pacientes foram submetidas a coloscopia num intervalo inferior a um ano, 6 (28,6%) foram consideradas insatisfatórias 10 (47,6%) não apresentavam alterações sugestivas de neoplasia, 3 (14,2%) apresentavam ZTA de alto grau e 2 (9,5%) apresentavam ZTA de baixo grau, portanto 23,8% das coloscopias foram positivas.

TABELA – 2 Distribuição das pacientes com citologia de ASCUS quanto a presença de DNA-HPV dos grupos A e B.

HPV	Grupo A	%	Grupo B	%	Grupo A e B	%	Total Global	%
neg							28	80
pos	4	11,4	2	5,7	1	2,9	7	20
Total Global	4	11,4	2	5,7	1	2,9	35	100

FONTE: SAME /HU 2002-2004

Conforme Tabela 2, DNA-HPV foi encontrado em 20% das pacientes, sendo 42,6% HPV's de alto risco oncogênico. Uma paciente foi submetida a conização com CAF (Cirurgia de Alta Frequência) após os resultados. Comparando a positividade para HPV e histologia 33% dos ASCUS foram diagnosticados como LIEAG. Das LIEAGs 33% dos HPV's detectados eram de risco oncogênico. Foram biopsiadas 9 (25,7%) pacientes, 5 das colposcopias insatisfatórias e uma das 10 colposcopias não sugestivas de neoplasia, 2 com ZTA de alto grau e uma com ZTA de baixo grau. Uma paciente com ZTA de alto grau não foi biopsiada, pois estava grávida na época do exame. Uma paciente com ZTA de baixo grau foi submetida á cauterização das lesões no momento do exame. Das biópsias, 5 (55,6%) pacientes apresentaram NIC I/NIC II. Nenhuma lesão de alto grau teve colposcopia insatisfatória ou normal, as 2 ZTAs de alto grau com biópsia eram NIC II.

TABELA – 3 Associação entre os achados histológicos e a presença de DNA-HPV nas pacientes com citologia de ASCUS.

HPV	Sem Biópsia			LIEBG % (%)	LIEAG % (%)	Total %
	% (%)	Normal % (%)	% (%)			
pos	3 8,6 (11,6)	2 5,7 (50)	1 2,9 (50)	1 2,9 (33)	7 20	
neg	23 65,7 (88,4)	2 5,7 (50)	1 2,9 (50)	2 5,7 (66)	28 80	
Total	26 74,3 (100)	4 11,4 (100)	2 5,7 (100)	3 8,6 (100)	35 100	

FONTE: SAME/HU 2002-2004

5- DISCUSSÃO

Apesar de controverso, o manejo clínico do diagnóstico citopatológico de ASCUS (Atypical squamous cells of undetermined significance), tem sido conduzido durante muito tempo com a repetição seriada dos esfregaços vaginais e colposcopia, conforme resultados desses esfregaços e também dados epidemiológicos das pacientes quanto aos fatores de risco para o câncer do colo uterino¹¹⁻¹⁶⁻¹⁷⁻¹⁸. Dentro da própria terminologia de ASCUS, subcategorias têm sido necessárias para que se possa definir melhor aquelas mulheres cujas atipias celulares encontradas, mesmo que indeterminadas, possam apresentar um potencial maior para lesões de alto grau, e também câncer invasor¹⁹. Não se pode esquecer que aproximadamente 10% dos esfregaços com diagnóstico de ASCUS evoluem para LIEAG (Lesões intraepiteliais de alto grau), sendo que uma paciente a cada mil (1:1000) pode desenvolver câncer invasor⁶. Aproximadamente dois terços das LIEAGs e carcinoma in situ, foram precedidas, em algum momento, por anormalidades mínimas no exame citológico, incluído ASCUS²⁰.

Vários estudos usando testes para detecção de DNA-HPV tem demonstrado ser uma estratégia útil no seguimento de mulheres com diagnóstico de ASCUS e LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesion)^{4,7,10,13}.

No presente estudo 7 pacientes apresentaram resultado positivo (20%) para presença de DNA-HPV sendo 42,9% desses resultados para a presença de DNA-HPV de risco oncogênico (Grupo B). Cox et.al em estudo com 217 pacientes com diagnóstico de ASCUS no decorrer de um ano, sendo 81,1% primeira citologia anormal, encontrou positividade para HPV em 41,9% sendo que 89% correspondiam aos tipos oncogênicos. O ALTS Study (The ASCUS-LSIL Triage Study), um estudo randomizado com 3488 mulheres para avaliar as estratégias no manejo de pacientes com diagnóstico de ASCUS, encontrou positividade para DNA-HPV de 48,9% nas alterações de ASCUS. Hughes et al encontrou positividade em 48,8% dos citopatológicos de ASCUS, sendo 29,8% HPVs de risco oncogênico. Gontijo et al. em estudo com 733 mulheres de uma unidade básica de saúde, sendo 218 submetidas à captura híbrida aleatoriamente, encontrou uma positividade para HPV em 20,6% das pacientes. A discordância do presente estudo pode estar relacionada ao tamanho da amostra, que é pequena comparada aos outros estudos semelhantes. Também a classificação usada na citologia

cérvico-vaginal como ASCUS, não fazendo separação entre aquelas atípicas celulares com tendência inflamatória-reparativa daquelas onde não se pode descartar lesão de alto grau (ASC-U, ASC-H)⁶. O diagnóstico de ASC-H está relacionado a uma prevalência maior de displasia nos achados histológicos^{19,21}. Displasias de maior grau tendem a produzir um sinal maior, ou seja, maior quantidade de luz seria emitida pelo material analisado, pois teoricamente a carga viral é maior. Esta maior positividade também estaria relacionada com a persistência da infecção pelo HPV^{7,22}. Sabe-se também que a infecção pelo vírus na maioria das vezes é autolimitada, regredindo espontaneamente⁸. Considerando o intervalo do laudo diagnóstico de ASCUS e a coleta para captura híbrida, poderiam as pacientes não ter carga viral suficiente pela sensibilidade do método. Considerando a subjetividade quanto ao diagnóstico de ASCUS, muitos estudos mostraram que a reprodutibilidade dos diagnósticos é pequena²³⁻²⁵. Nesse estudo as lâminas não foram revisadas, talvez muitos dos diagnósticos de ASCUS poderiam numa nova reavaliação serem considerados normais.

Em nosso estudo, 23,8% das colposcopias apresentaram alterações na Zona de Transformação (ZT) caracterizadas como baixo ou alto grau, tiveram correspondência histológica para lesões intraepiteliais. Quanto a colposcopia, alguns dados foram extraídos do prontuário, não sendo muitas vezes os achados colposcópicos descritos com mais detalhes não utilizando laudo específico do protocolo para exame colposcópico. Um estudo com 111 casos de ASCUS, todos submetidos a colposcopia encontrou 72% de positivities para alterações na Zona de transformação, apresentando na histologia 2,7% de LIEAG. Neste estudo a colposcopia seria o melhor seguimento quando comparada a repetição seriada dos esfregaços vaginais. Mulheres com citopatológico de ASCUS, fumantes e com história de infecção pregressa pelo HPV, deveriam realizar seguimento através de colposcopia, uma vez que o fumo aumenta em 2,8 vezes a chance para neoplasia intraepitelial, história pregressa de infecção pelo HPV aumenta em 3 vezes essa chance.²¹ Nos serviços onde a prevalência de LIEAG é alta a colposcopia seria o manejo clínico mais adequado nos casos de ASCUS, considerando que citologias anteriores pudessem ser falso negativos.¹⁶ Cox et al, no entanto, em seu estudo, mostrou que 20,4% dos ASCUS com colposcopia normal apresentavam DNA-HPV de risco oncogênico.

Quanto aos achados histológicos, a lesão compatível com NIC II e NICIII (LIEAG) tem mostrado presença de DNA-HPV em mais de 80% dos casos.^{4,6-7,22} Em nosso estudo 33% das LIEAG tiveram positividade para HPV. O estudo ALTS encontrou 27,5%. Das pacientes

submetidas à biópsia, lesões intraepiteliais de forma geral , corresponderam a 55,5% (33% NIC II). A literatura estudada mostrou variação de 15% a 60% de ASCUS com lesões intraepiteliais incluindo NIC I, II e III. A variação pode estar relacionada ao delineamento de cada estudo ou a população onde a amostra foi selecionada. Mulheres mais jovens, abaixo dos 30 anos, mesmo com anormalidades na citologia, apresentaram histologia negativa. Conforme o tempo entre a citologia e a biópsia a possível lesão poderia ter regredido espontaneamente²⁶.

A repetição do esfregaço cérvico-vaginal, em nosso estudo, apresentou negatividade em 28,6% (10-35), dessas pacientes, duas (20%) apresentaram lesões intraepiteliais (NIC I e NIC II), Todas foram negativas quanto a presença de DNA-HPV. Cox et al encontrou valor negativo em 69,7% e neste grupo, quando comparado à presença de HPV e lesões histológicas houve significativa diferença ($p < 0,001$), ou seja, aquelas citologias negativas, porém com HPV positivo teve maior prevalência de lesões histológicas. O ALTS estudo encontrou diagnóstico negativo na repetição do esfregaço cérvico-vaginal em 31% e encontrou relação significativa entre a severidade das lesões na citologia com presença de DNA- HPV.

O tamanho da nossa amostra não foi suficiente para aplicar qualquer teste estatístico de valor correlativo (sensibilidade, especificidade) entre as alterações citopatológicas, colposcópicas ou histológicas quanto à presença do vírus HPV, porém os diversos estudos pesquisados mostraram consenso quanto ao manejo de ASCUS usando testes para detecção do DNA - HPV com valores de sensibilidade chegando a 96%^{10,12}.

6- CONCLUSÕES

- 1- 20% de DNA-HPV foi encontrado nas pacientes com citologia de ASCUS , sendo 42,9% DNA-HPV de risco oncogênico.
- 2- 33% das pacientes com DNA-HPV de risco oncogênico apresentaram lesão intraepitelial de alto grau (LIEAG).
- 3- Zona de transformação atípica (ZTA) foi encontrada em 14.3% das pacientes com citologia de ASCUS.
- 4- Lesões intraepiteliais (NICs) foram encontradas em 14.3% das pacientes com citologia de ASCUS.

NORMAS ADOTADAS

Foi utilizada a normatização para os Trabalhos de conclusão de Curso de Graduação em Medicina, segundo a resolução no. 001/2001, aprovada em Reunião do colegiado do Curso de Graduação em Medicina em 5 de julho de 2001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ¹ INCA/Ministério da Saúde. Falando sobre Câncer do Colo Uterino. Viva mulher. Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama. Janeiro de 2000.
- ² Carvalho JLL, Oyakawa, NI. Consenso Brasileiro de HPV. 1ª ed. São Paulo: BG Cultural. 2000, p. 49-57.
- ³ Gontijo CR, Derchain SFM, Ortiz RT, Guarisi R, Sarian LOZ, Bragança JF, et al. Fatores Associados às Alterações da Colpocitologia Oncológica, à Inspeção Visual com Ácido Acético e a Detecção de DNA-HPV de Alto Risco Oncológico em Mulheres de uma Unidade Básica de Saúde em Campinas. DST-J bras Doenças Sex Transm. 2002; 14(4):4-8.
- ⁴ Manos MM , Kinney WK, Hurley LB , Sherman ME , Shieh-Ngai J, Kurman RJ, et al. Identifying women with cervical neoplasia, using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. JAMA 1999 ; 281: 1605 – 10 .
- ⁵ Gonzales D, Hernandez E, Anderson L, Heller P, Atkinson BF. Clinical Significance of a Cervical Cytologic Diagnosis of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance. J Reprod Med 1996; 10: 719-23.
- ⁶ Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA 2002; 287: 2114-9
- ⁷ Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. Human papilloma virus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. Am Obstet Gynecol 1995; 172: 946-54.

- ⁸ Kjaer SK, Van Den Brule AJC, Bock IE, Poll PA, Engholm G, Sherman ME, et al. Human papillomavirus, the most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 1996; 65: 601-6.
- ⁹ Wallin KL, Wiklund F, Ångström T, Bergman, Stendahl U, Wadell G, et al. Type-Specific Persistence of Human Papillomavirus DNA before the development of Invasive Cervical Cancer. *NJEM*1999; 341: 1633-38.
- ¹⁰ Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of Three Management Strategies for Patients Whith Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance: Baseline Results From a Randomized Trial. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 293-99.
- ¹¹ Cervical Cytology Practice Guideline. American Society of Cytopathology. 2000 November 10.
- ¹² Bigio CT, Barbosa FA, Cavalcanti SMB. Detecção e Tipagem Viral para Papilomavírus Humanos: Progressos Recentes e Perspectivas Clínicas. *Rview. DST- brás Doenças Sex Transm.* 2002; 14(4): 32-5.
- ¹³ Ferris DG, Wright TC Jr, Litaker MS, Richart RM, Lorincz AT, Sun XW, et al. Comparison of two tests for detecting carcinogenic HPV in women whith Papanicolaou smears report of ASCUS and LSIL. *J Fam Pract* 1998; 46: 136-41.
- ¹⁴ Walboomers JMM, Jacobs MV, Van oostveen JW, Van den Brule AJC, Snijders PJF, Meijer CJLM. Detection of genital human papillomavirus infection and possible clinical implications. In: *Human papillomavirus infections in dermatovenerology*. Ed. G. Gross, G. von Krogh. CRC Press, Boca Raton. Chapter 19. 1997. p.341-64.
- ¹⁵ David AB. Molecular and morfologic methods for human papillomavirus testing are available. The challenge, however, is to determine which offers better specificity and positive predictive value. *Advance for Administrators of the laboratory* 2001; 5:69.

- ¹⁶ Lima DNO, Câmara S, Mattos MGG, Ramalho R. Diagnóstico Citológico de ASCUS: sua importância na conduta clínica. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2002, 38 (1): 45-49.
- ¹⁷ Yarandi F, Mood NI, Mirashrafi F, Eftekhari Z. Colposcopic and histologic findings in women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2004, 44: 514-16.
- ¹⁸ Massad LS, Collins YC, Meyer PM. Biopsy Correlates of Abnormal Cervical Cytology Classified Using the Bethesda System. *Gynecologic Oncology*. 2001; 82: 516-22 .
- ¹⁹ Hughes SA, Sun D, Gibson C, Bellerose B, Rushing L, Chen H, Harlow BL, Gnest DR, Sheets EE, Crum CP. Managing atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS): Human papillomavirus testing, ASCUS subtyping, or follow-up cytology? *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 186(3): 396-403.
- ²⁰ Kinney WK, Manos MM, Hurley LB, Ransley JE. Where's the High-Grade Cervical Neoplasia? The importance of minimally Abnormal Papanicolaou Diagnoses. *Obstetrics & Gynecology*. 1998; 91(6): 973-76.
- ²¹ Eltabbakh GH, Lipman JN, Mount SL, Morgan A. Significance of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance on ThinPrep Papanicolaou Smears. *Gynecologic Oncology*. 2000; 79: 44-9.
- ²² Hall S, Lörincz A, Shah F, Sherman ME, Abbas F, Paul G, Kurman RJ, Shah KV. Human Papillomavirus DNA Detection in Cervical Specimens by Hybrid Capture: Correlation with Cytologic and Histologic Diagnoses of Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix. *Gynecologic Oncology*. 1996 (62): 353-59.
- ²³ Souza JHK, Kalil IV, Leite JM, Geber S. Avaliação de Lâminas de Colpocitologia Oncótica Previamente Diagnosticadas como ASCUS: Comparação Interensaio e Interobservadores. *RBGO*. 2004; 26(3): 233-44.

²⁴ Confortini M, Carozzi F, Palma PD, Ghiringhello B, Parisio F, Prandi S, Ronco G, Ciatto S, Montanari G, and the GISCi Working Group for Cervical Cytology. Interlaboratory reproducibility of atypical squamous cells of undetermined significance report: a national survey. *Cytopathology*. 2003; 14: 263-68.

²⁵ Condel JL; Mahood LK; Grzybicki DM; Sturgis CD; Raab SS. Papanicolaou tests diagnosed as atypical by a cytotechnologist and downgraded to benign by a pathologist: a measure of laboratory quality. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 534-40.

²⁶ Kirby TO, Huh WK, Partridge EE. Human Papillomavirus Triage of Patients with Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance on Cervical Papanicolaou Smear. *Annals Academy of Medicine*. September 2003; 32 (5): 590-96.

APÊNDICES

Apêndice-1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A captura híbrida é um método que avalia a presença de DNA do papiloma vírus humano (HPV) em material coletado da cérvix uterina. A presença de tipos específicos desse vírus, denominados tipos oncogênicos, estaria relacionado ao desenvolvimento do câncer de colo do útero. As lesões do tipo ASCUS são células escamosas com aspecto indefinido na citologia na análise do patologista, a denominação é subjetiva e não há consenso quanto a sua conduta. Se encontrarmos a presença de DNA-HPV no colo do útero a mulher terá uma chance maior de desenvolver câncer.

O procedimento é semelhante à coleta do preventivo, uma escovinha é introduzida no colo uterino e roda-se 5 vezes. Um pequeno sangramento local pode ocorrer. Os resultados serão fornecidos em consulta posterior.

Os dados avaliados nesta pesquisa são secretos e de conhecimento dos médicos pesquisadores. A senhora tem total liberdade de aceitar ou não participar nesta pesquisa Sua negativa em participar na pesquisa não afetará o atendimento que a senhora recebe neste ambulatório, caso a senhora tenha alguma dúvida ou não queira mais participar da pesquisa, deverá entrar em contato com Luísa de Marilak Bernardes Ferreira pelo telefone (48) 226 7648.

Eu, _____, aceito ser submetida ao exame proposto pelos responsáveis pela pesquisa bem como a inclusão do mesmo no trabalho de pesquisa intitulado: Pesquisa de DNA-HPV pela técnica de biologia molecular (Captura Híbrida) em mulheres com citologia cérvico-vaginal Com diagnóstico de Células Escamosas Atípicas de Caráter Indeterminado (ASCUS).

Assinatura da paciente: _____

Assinatura dos responsáveis pela pesquisa:

Ass: _____
Luísa de Marilak Bernardes Ferreira

Ass: _____
Dr. Luiz Fernando Sommacal

Ass: _____
Dra. Maria Elizabeth Menezes

Florianópolis, / /

Apêndice-2

Cópia do parecer consubstanciado do CEPSH – projeto no. 216/04

Apêndice-3

Classificação de Bethesda 1991

I. Adequação do espécime para avaliação

1. Satisfatório
2. Insatisfatório

II. Categorização geral

1. Dentro dos limites da normalidade
2. Negativo para atipias intra-epiteliais ou malignidade
3. Células epiteliais anormais

III. Diagnóstico descritivo

1. Alterações celulares benignas

- Infecções

- Alterações reativas
- Inflamação
- Atrofia
- Radiação
- DIU
- Outros

2. Anormalidades de células epiteliais

- Células epidermóides

- Células atípicas de significado indeterminado (ASCUS)
- Lesão intra-epitelial de baixo grau, displasia leve (NIC I) ou HPV
- Lesão intra-epitelial de alto grau, displasia moderada e grave (NIC II e III/Cis)
- Carcinoma epidermóide

- Células glandulares

- Células endometriais, citologicamente benignas, pós-menopausa
- Anormalidade de células glandulares
- Adenocarcinoma endocervical
- Adenocarcinoma endometrial
- Adenocarcinoma extra-uterino
- Adenocarcinoma de origem indeterminada

3. Outras neoplasias malignas

4. Avaliação hormonal

- Padrão hormonal compatível com idade e história
- Padrão hormonal incompatível com idade e história
- Impossível a avaliação hormonal

Apêndice-4



Figura – 3 Kit coletor para Captura Híbrida (Digene®)

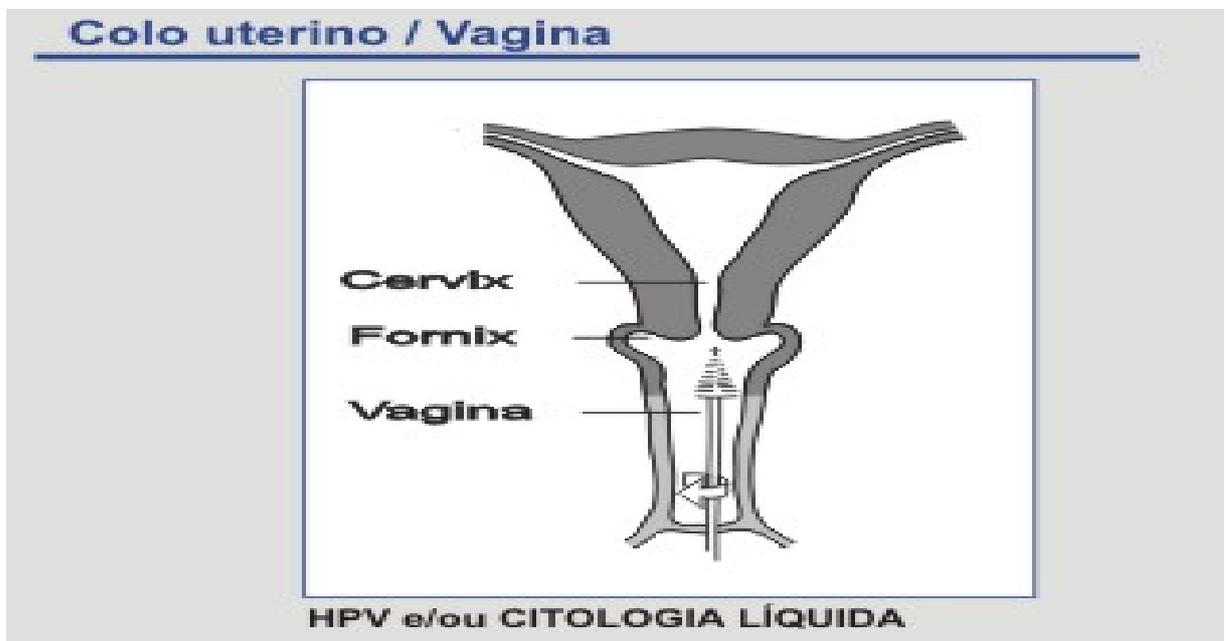


Figura – 4 Procedimento da coleta de material da cérvix uterina. O cone-brush é introduzido até 1 cm da cérvix , efetua-se giros de 360 graus.

Apêndice-5

Laudo de Captura Híbrida® para HPV

Método: Exame processado pela técnica de hibridização molecular associada a dos anticorpos monoclonais, tecnologia Digene, que permite a detecção de 1 pg/ml de DNA/HPV, equivalente a 0,1 cópia de vírus por célula. Considera-se POSITIVO quando as relações RLU/PCA para os vírus do grupo A (6, 11, 42, 43 e 44) e/ou RLU/PCB para os vírus do grupo B (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) forem iguais ou maiores que 1 (um).

Material recebido em:

Resultado:

RLU/PCA:

RLU/PCB:

Conclusão:

Notas:

1. A Captura Híbrida® contém as sondas gênicas de 70% dos tipos de HPV de baixo risco e 99% dos oncogênicos.
2. Resultado NEGATIVO indica ausência de DNA-HPV dos tipos pesquisados.
3. Em virtude da biologia viral, a comparação do resultado da Captura Híbrida® com o da citologia e da anatomia patológica, só tem valor quando o intervalo de tempo entre as coletas for inferior a 30 dias.
4. Valores das relações RLU/PCA e/ou RLU/PCB menores que 5, indicam pequeno número de cópias virais por célula, podendo significar infecção inicial ou em fase de remissão espontânea. Nesses casos, a critério clínico, sugere-se, antes de qualquer tratamento, confirmar a presença de infecção ativa com nova coleta após intervalo de três meses.
5. Para aferir a eficácia do tratamento, indica-se colher nova amostra após seis meses do término da terapêutica.

Frases para o "Resultado": 1. Positivo 2. Negativo ou Indetectável

Frases para a "Conclusão":

1. Ausência (ou Níveis indetectáveis) de DNA-HPV para os tipos pesquisados
2. Presença de DNA-HPV para os vírus do Grupo A.
3. Presença de DNA-HPV para os vírus do Grupo B.
4. Presença de DNA-HPV para os vírus do Grupo A e B.

Apêndice-6

**Classificação Colposcópica da Federação Internacional de Patologia Cervical,
Barcelona/2002)**

I. Achados Colposcópicos Normais

Epitélio Escamoso Original
Epitélio Colunar
Zona de Transformação

II. Achados Colposcópicos Anormais

Epitélio acetobranco plano
Epitélio acetobranco denso *
Mosaico fino
Mosaico grosseiro *
Pontilhado fino
Pontilhado grosseiro *
Iodo parcialmente positivo
Iodo Negativo *
Vasos atípicos *

III. Alterações Colposcópicas Sugestivas de Câncer Invasivo**IV. Colposcopia Insatisfatória**

Junção Escamocolunar não visível
Inflamação severa, atrofia severa, trauma,
Cérvix não visível

V. Miscelânea

Condiloma
Queratose
Erosão
Inflamação
Atrofia
Deciduose
Pólipo

Alterações Maiores