

Ane Francyne Costa

**ANÁLISE PROSPECTIVA DA PLOIDIA DO DNA EM ATIPIAS
E LESÕES INTRAEPITELIAIS DO COLO DO ÚTERO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fabiana Botelho de Miranda Onofre

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Costa, Ane Francyne

Análise prospectiva da ploidia do DNA em atipias
e lesões intraepiteliais do colo do útero / Ane
Francyne Costa ; orientadora, Fabiana Botelho de
Miranda Onofre, 2018.

132 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Citometria de imagem do DNA. 3.
Citologia. 4. Colo do útero. I. Onofre, Fabiana
Botelho de Miranda. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmácia. III. Título.

“Análise prospectiva da ploidia do DNA em atipias e lesões Intraepiteliais do colo do útero”

POR

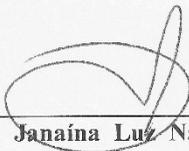
Ane Francync Costa

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

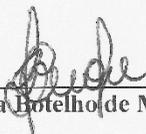
Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Thais Cristine Marques Sincero (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Janaina Luz Narciso Schiavon (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Fabiana Botelho de Miranda Onofre (UFSC – Orientador(a))



Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 19 de março de 2018.

Dedico esta dissertação à minha família, aos meus professores e aos meus colegas que contribuíram com a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família e meus amigos, por todo o amor, apoio e incentivo durante os anos necessários para realizar meus estudos, sendo minha fortaleza para a conquista dos meus objetivos.

À professora Dra.^a Fabiana Botelho de Miranda Onofre, por sua sabedoria, dedicação e competência como minha orientadora. Agradeço por ter acreditado em mim e por ter me cedido espaço para atuar em uma área do conhecimento que adoro.

Agradeço também ao professor Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, por todo o apoio e por doar seu conhecimento para a concretização deste trabalho.

À Dra. Adriane Pogere, pelo fornecimento das amostras e por todo o auxílio necessário para a coleta de dados.

Ao Departamento de Patologia do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade (HU-UFSC), pelo fornecimento dos resultados histopatológicos.

Agradeço às pacientes, por tornar possível a realização desta pesquisa.

A todos os amigos que fiz durante minha estadia no laboratório de citologia clínica, sou grata pelo companheirismo e por toda a ajuda durante os experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de estudar em um programa de qualidade, e à CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pelas contribuições para melhorar a qualidade deste trabalho.

Por fim, estendo meus agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desta dissertação.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos”.
(Marie Curie)

RESUMO

A aneuploidia, identificada pela Citometria de Imagem do DNA (DNA-ICM), é aceita internacionalmente como um marcador de transformação de células neoplásicas e tem sido associada a progressão de lesões pré-cancerosas para câncer cervical invasivo. O objetivo deste estudo foi investigar a ploidia de DNA em lesões do colo do útero de mulheres que foram atendidas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) para exame ginecológico, colposcopia e biópsia. Setenta mulheres com resultados citológicos de Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (ASC-US), Células Escamosas Atípicas não podendo excluir Lesão Intraepitelial de Alto Grau (ASC-H), Células Glandulares Atípicas (AGC), Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL) ou Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) foram incluídas neste estudo prospectivo transversal. As amostras coletadas em solução ThinPrep® PreservCyt® foram processadas e lâminas de citologia em base líquida foram preparadas e coradas pelo método de Papanicolaou para verificar a celularidade da amostra e a presença de células atípicas. Após análise citológica, as lamínulas foram removidas para posterior coloração de Feulgen. A análise do conteúdo nuclear por DNA-ICM foi realizada de acordo com o quarto consenso da Sociedade Europeia de Patologia Celular Analítica (ESACP) em citometria de imagem. No período de abril de 2017 a novembro de 2017, 70 pacientes atendidas no HU-UFSC foram incluídas no estudo. Amostra para biópsia não foi coletada em 8 pacientes, sendo estas excluídas do restante das amostras. De forma geral, euploidia foi identificada em 41,9% e aneuploidia em 58,1% dos casos. Entre os resultados citológicos, aneuploidia foi observada em 37,5% dos casos de ASC-US, 40,0% em ASC-H, 100% em AGC, 38,9% em LSIL e 83,3% em HSIL. De acordo com o diagnóstico histológico, aneuploidia foi verificada em 16,7% dos casos negativos, 27,3% em Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) grau 1, 73,9% em NIC 2, 84,6% em NIC 3 e 100% em Carcinoma de Células Escamosas (CCE), Adenocarcinoma *in situ* (AIS) e Adenocarcinoma (AC). O algoritmo de eventos excedendo 9c (9cEE) foi observado em 91,7% dos casos aneuploides, enquanto o algoritmo de *stemline* aneuploide foi observado em 80,6% e a combinação dos dois algoritmos em 69,4% de todos os casos aneuploides. Todos os casos de NIC 3 aneuploides foram positivos tanto para o algoritmo de 9cEE como para *stemline* aneuploide. O algoritmo utilizando ao menos 1 evento excedendo 5c (5cEE) obteve sensibilidade de 92,3% e especificidade de 26,1%. Os algoritmos de 2, 3 e 4 eventos

excedendo 5c, apresentaram valores de sensibilidade de 89,7%, 84,6% e 79,5%, respectivamente, e valores de especificidade de 56,5%, 65,2% e 73,9%, respectivamente. O aumento da idade (odds ratio = 1,123) e o número crescente de gestações (odds ratio = 2,981) foram associados com a aneuploidia: Dessa maneira, é possível inferir que a DNA-ICM demonstrou ser um método adequado para investigar o comportamento da ploidia de lesões precursoras do câncer cervical. A aplicação desse método tem potencial de apontar quais resultados citológicos anormais necessitam ser investigados de maneira mais rigorosa.

Palavras-chave: Citometria de imagem de DNA. Aneuploidia. Citologia cervical.

ABSTRACT

Prospective analysis of DNA ploidy in atypias and intraepithelial lesions of the cervix

Aneuploidy, identified by DNA image cytometry (DNA-ICM), is accepted internationally as a well-standardized marker of neoplastic cell transformation and has been associated with progression of precancerous lesions to invasive cancer. The aim of this study was to investigate DNA ploidy in cervical lesions of women who were treated at the University Hospital of the Federal University of Santa Catarina (HU-UFSC) for gynecological examination, colposcopy and biopsy. Seventy women with cytological results of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASC-US), Atypical Squamous Cells – Cannot Exclude HSIL (ASC-H), Atypical Glandular Cells (AGC), Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL) or High Grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL) were included in this prospective cross-sectional study. Samples collected in ThinPrep® PreservCyt® solution were processed and liquid-based cytology slides were prepared and stained by the Papanicolaou method to verify sample cellularity and the presence of atypical cells. After cytological analysis, coverslips were removed for further Feulgen staining. Nuclear content analysis by DNA-ICM was performed according to the fourth consensus of the European Society for Analytical Cell Pathology (ESACP) in image cytometry.

In the period from April 2017 to November 2017, 70 patients attended at HU-UFSC were included in the study. Biopsy sample was not collected in 8 patients, and these were excluded from the rest of the samples. In general, euploidy was identified in 41.9% and aneuploidy in 58.1% of cases. Among cytological results, aneuploidy was observed in 37.5% of ASC-US cases, 40.0% in ASC-H, 100% in AGC, 38.9% in LSIL and 83.3% in HSIL. According to the histological diagnosis, aneuploidy was found in 16.7% of negative cases, 27.3% in Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) grade 1, 73.9% in CIN 2, 84.6% in CIN 3 and 100% in Squamous Cell Carcinoma (SCC), Adenocarcinoma *in situ* (AIS) and Adenocarcinoma (AC). The 9c exceeding events (9cEE) algorithm was observed in 91.7% of aneuploid cases, while the aneuploid stemline algorithm was observed in 80.6% and both algorithms combined in 69.4% of all aneuploid cases. All CIN 3 aneuploid cases were positive for 9cEE algorithm as well as aneuploid stemline. The algorithm of at least 1 event exceeding 5c (5cEE) obtained sensitivity of 92.3% and specificity of 26.1%. The algorithms of 2, 3 and 4 events exceeding 5c, presented

sensitivity values of 89.7%, 84.6% and 79.5%, respectively, and specificity values of 56.5%, 65.2% and 73.9%, respectively. Increase in age (odds ratio = 1,123) and increasing number of pregnancies (odds ratio = 2,981) were associated with aneuploidy. Thus, it is possible to infer that DNA-ICM has been shown as an adequate method to investigate the ploidy behavior of precursor lesions to cervical cancer. The application of this method has the potential to indicate which abnormal cytological results need to be investigated in a more rigorous way.

Keywords: DNA image cytometry. Aneuploidy. Cervical Cytology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia e histologia do colo do útero	27
Figura 2 – Célula escamosa parabasal.....	29
Figura 3 – Células escamosas intermediárias.....	30
Figura 4 – Células escamosas superficiais	31
Figura 5 – Célula metaplásica	32
Figura 6 – Células endocervicais em formato de “paliçada”.....	33
Figura 7 – Células endocervicais em formato de “favo de mel”	33
Figura 8 – Progressão de uma lesão cervical benigna para câncer invasivo.	35
Figura 9 – Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau.....	36
Figura 10 – Lesão intraepitelial escamosa de alto grau.....	37
Figura 11 – Células escamosas atípicas de significado indeterminado .	38
Figura 12 – Células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial escamosa de alto grau.....	38
Figura 13 – Células glandulares atípicas.....	39
Figura 14 – História natural da infecção do HPV e câncer cervical.....	49
Figura 15 – Modelo esquemático de funcionamento dos componentes do microscópio para análise por DNA-ICM	59
Figura 16 – Captação da imagem pelo dispositivo de carga acoplada (CCD).....	60
Figura 17 – Sistema de análise de DNA-ICM.....	68
Figura 18 – Histograma com padrão diploide de DNA.....	70
Figura 19 – Histograma com padrão tetraploide de DNA.....	71
Figura 20 – Histograma com padrão aneuploide de DNA	72
Figura 21 – Aneuploidia na paciente 41 (9cEE)	78
Figura 22 – Aneuploidia na paciente 60 (9cEE)	78
Figura 23 – Aneuploidia na paciente 60 (9cEE e <i>stemline</i> aneuploide)	79
Figura 24 – Curva ROC com sensibilidade e especificidade do algoritmo de 5cEE para identificar lesões cervicais que necessitam de intervenção	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Diferenças morfológicas entre atipias, lesões e carcinomas de células escamosas.....	41
Quadro 2 – Recomendações brasileiras para conduta inicial frente aos resultados alterados dos exames citológicos	53
Quadro 3 – Alterações citológicas do colo uterino que foram incluídas no estudo	65
Quadro 4 – Definição dos termos técnicos básicos da citometria de imagem do DNA	69
Quadro 5 – Relação entre resultados citológicos, histológicos e ploidia (continua).	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre citologias de encaminhamento e resultado histológico.....	75
Tabela 2 – Relação entre resultados da citologia de encaminhamento e da ploidia de DNA	76
Tabela 3 – Relação entre resultados da histologia e da ploidia de DNA	77
Tabela 4 – Resultados histológicos e distribuição dos algoritmos utilizados em DNA-ICM.....	79
Tabela 5 – Resultados histológicos e algoritmo de 5cEE.....	80
Tabela 6 – Pontos de corte de 5cEE para identificar lesões que necessitam de intervenção	82
Tabela 7 – Dados demográficos das pacientes	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5cEE – Eventos Excedendo conteúdo de DNA de 5c
9cEE – Eventos Excedendo conteúdo de DNA de 9c
A – Núcleos em Análise
AGC – Células Glandulares Atípicas
AGC-SOE – Células Glandulares Atípicas Sem Outras Especificações
AIS – Adenocarcinoma *in situ*
ASC – Células Escamosas Atípicas
ASC-H – Células Escamosas Atípicas não podendo excluir Lesão Intraepitelial de Alto Grau
ASC-US – Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
AUC – Área sobre a curva
C – Conteúdo de DNA
CBL – Citologia em Base Líquida
CCD – Dispositivo de Carga Acoplada
CCE – Carcinoma de Células Escamosas
CIS - Carcinoma *in situ*
CV – Coeficiente de Variação
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DNA-ICM – Citometria de Imagem do DNA
DOI – Densidade Ótica Integrada
DP – Desvio Padrão
E6 – Gene de Transcrição Precoce "early" 6 / Proteína Precoce "early" 6
ESACP – Sociedade Europeia de Patologia Celular Analítica
EUA – Estados Unidos da América
FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América
EZT – Exérese da Zona de Transformação
FISH – Hibridização Fluorescente *in situ*
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA – Antígeno Leucocitário Humano
HPV – Papilomavírus humano
HSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
HU-UFSC – Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina
IDH – Índices de Desenvolvimento Humano
INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IST – Infecções Sexualmente Transmissíveis
IVA – Inspeção Visual com Ácido Acético
JEC – Junção Escamo-Colunar

L1 – Gene de Transcrição Tardia "late" 1
LSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
N – Número de casos
NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical
NILM – Negativo para Lesão Intraepitelial ou Malignidade
pRb - Proteína do Retinoblastoma
R – Núcleos de Referência
ROC – Característica de Operação do Receptor
rSEM – Erro Padrão Relativo
SR – Sem resultado
STL – Stemline
TERC – Gene do Componente de RNA da Telomerase
TERT – Gene da Transcriptase Reversa da Telomerase
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
 χ^2 – Qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1	COLO DO ÚTERO.....	27
2.2	CITOLOGIA CERVICAL.....	28
2.3	LESÕES PRÉ-CANCEROSAS.....	34
2.4	CÂNCER CERVICAL.....	40
2.4.1	Epidemiologia.....	43
2.4.2	Fatores de risco.....	46
2.5	RASTREIO DO CÂNCER CERVICAL.....	52
2.6	PLOIDIA DO DNA.....	54
2.6.1	Instabilidade cromossômica e aneuploidia.....	55
2.7	CITOMETRIA DE IMAGEM DO DNA.....	56
2.7.1	Coloração de Feulgen.....	57
2.7.2	Medida do conteúdo de DNA.....	58
3	OBJETIVOS.....	63
3.1	OBJETIVO GERAL.....	63
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	65
4.2	COLETA DAS AMOSTRAS.....	66
4.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E CITOLOGIA EM BASE LÍQUIDA.....	66
4.3.1	Coloração de Papanicolaou.....	67
4.4	CITOMETRIA DE IMAGEM DO DNA.....	67
4.4.1	Coloração de Feulgen.....	67
4.4.2	Medição do conteúdo de DNA.....	68
4.4.3	Algoritmos para determinação de aneuploidia segundo a ESACP	71
4.4.4	Avaliação de eventos de DNA excedendo 5c.....	72

4.5	AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE LESÕES PRÉ CANCEROSAS CERVICAIS E PLOIDIA DO DNA	72
4.6	AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS COM A ANEUPLOIDIA.....	73
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
4.7.1	Cálculo amostral	73
5	RESULTADOS	75
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÕES.....	97
8	PERSPECTIVAS.....	99
	REFERÊNCIAS.....	101
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.....	123
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	127
	ANEXO C – Instrumento de coleta dos dados	131

1 INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero é considerado uma das ameaças mais importantes à vida das mulheres (WHO, 2014). Em 2012, foram estimados 527.600 novos casos e 265.700 mortes por esse câncer no mundo, no qual mais de 85% das mortes ocorreram em regiões menos desenvolvidas (TORRE et al., 2015). Programas de rastreamento organizados associados ao acompanhamento das pacientes e tratamento das lesões pré-cancerosas foram capazes de reduzir em cerca de 80% a mortalidade por câncer cervical em países desenvolvidos nas últimas décadas (LÄÄRÄ; DAY; HAKAMA, 1987; DICKINSON et al., 2012; WHO, 2014). Por outro lado, em regiões onde os programas de rastreamento não cobrem a população alvo adequadamente, não se observa redução significativa na incidência da doença (ADAB et al., 2004; COMBER; GAVIN, 2004; PEIRSON et al., 2013).

A prática tradicional para o rastreamento do câncer cervical foi originalmente introduzida pelo médico grego George Papanicolaou na década de 1940, que desenvolveu uma técnica de coloração capaz de evidenciar células atípicas pela microscopia ótica (PAPANICOLAOU, 1942; BOSGRAAF et al., 2014). No Brasil, o rastreamento do câncer cervical segue o modelo oportunístico e se dá pelo exame citológico em mulheres de 25 a 64 anos. Recomenda-se que resultados citológicos de lesão intraepitelial escamosa de alto grau, células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial escamosa de alto grau, células glandulares atípicas ou adenocarcinoma *in situ* devem ser encaminhados para o exame colposcópico seguido de coleta para biópsia para confirmação da lesão. Casos de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau ou de células escamosas atípicas de significado indeterminado devem retornar para o rastreamento citológico devido à baixa prevalência de câncer nessas categorias (INCA, 2016). No entanto, sabe-se que cerca de 7% dos casos de atipias escamosas e 21% dos casos de lesões escamosas de baixo grau progridem para lesões mais graves (MELNIKOW et al., 1998).

Após o estabelecimento do papilomavírus humano (HPV) como responsável pelas alterações observadas no exame citológico e sua ligação com o câncer cervical (WALBOOMERS et al., 1999; ZUR HAUSEN, 2002; GAO; SMITH, 2016), o teste de HPV também foi introduzido nos programas de rastreamento de alguns países (CASTLE, 2015). No entanto, embora a infecção por HPV seja necessária para a transformação tecidual, ela não é suficiente para causar a progressão da doença (BURD, 2003) e somente uma pequena parcela das lesões

progridem para câncer invasivo (VINK et al., 2013; KUDELA et al., 2016). Portanto, um grande desafio permanece em detectar quais destas lesões vão regredir e quais vão progredir.

A medida da ploidia do ácido desoxirribonucleico (DNA) tem se mostrado um marcador fidedigno em avaliar a progressão de lesões intraepiteliais cervicais (BÖCKING; NGUYEN, 2004). A Citometria de Imagem do DNA (DNA-ICM) é um método que mede de forma quantitativa o conteúdo do DNA. O conteúdo nuclear das células em análise é comparado com o conteúdo nuclear de células normais (células euploides na fase G₀/G₁ do ciclo celular) e, dessa forma, é possível determinar de forma objetiva a presença de células aneuploides (GARNER, 2014).

A aneuploidia é caracterizada por aberrações numéricas e/ou estruturais no conteúdo de cromossomos e a presença dessas células tem sido utilizada como marcador de neoplasia (HAROSKE et al., 2001; BÖCKING; NGUYEN, 2004; ONOFRE et al., 2008), no qual lesões aneuploides provavelmente persistem ou progridem para malignidade, enquanto lesões euploides regredem (BOLLMANN et al., 2001; GROTE et al., 2004). A DNA-ICM é uma técnica confiável, com alta reprodutibilidade entre os observadores e com bom custo-benefício para confirmar o diagnóstico de anormalidades celulares no colo uterino (BÖCKING; NGUYEN, 2004; NGUYEN et al., 2004; NGHIEM et al., 2015).

A conferência de Consenso Internacional na Luta contra o Câncer Cervical, Força Tarefa 8, promovida pela Academia Internacional de Citologia em Chicago nos Estados Unidos da América (EUA), recomendou a DNA-ICM como um método adjuvante útil na identificação objetiva de lesões pré-cancerosas cervicais que necessitam acompanhamento clínico (HANSELAAR et al., 2001). A Sociedade Europeia de Patologia Celular Analítica (ESACP) publicou quatro consensos internacionais na padronização da DNA-ICM (BÖCKING; GIROUD; REITH, 1995; GIROUD et al., 1998; HAROSKE et al., 1998, 2001).

Diante do exposto, o comportamento da ploidia do DNA em atipias e lesões precursoras ao câncer cervical utilizando a DNA-ICM foi estudado em mulheres atendidas no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) para exame ginecológico, colposcopia e biópsia após encaminhamento devido a um resultado citológico prévio alterado, com o intenção de melhorar a identificação de pacientes que necessitam ser acompanhadas de maneira mais rigorosa.

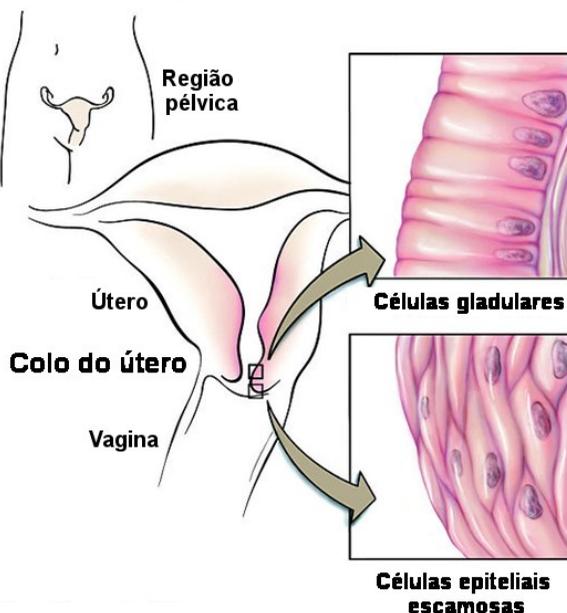
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COLO DO ÚTERO

O colo do útero ou cérvix compreende a porção inferior do útero. A cérvix possui um canal, conhecido como canal endocervical, que permite a comunicação entre a cavidade uterina na sua extremidade superior e a vagina na sua extremidade inferior (SINGH, 2014).

A porção exterior da cérvix, que se comunica com a vagina, é conhecida como ectocérvice e é coberta por epitélio escamoso estratificado. Já a porção da cérvix relacionada ao canal endocervical é conhecida como endocérvice que, por sua vez, é revestida por células colunares produtoras de muco (MILLS, 2012) (Figura 1).

Figura 1 – Anatomia e histologia do colo do útero



Fonte: Adaptado de *National Cancer Institute*, 2004 (Ilustrador: Don Bliss).

Notas: Localização do colo do útero no corpo da mulher com detalhe para os tipos celulares encontrados nessa região. Células glandulares em conformação colunar simples localizadas na endocérvice e células epiteliais escamosas em conformação estratificada localizadas na ectocérvice.

A morfologia do epitélio escamoso estratificado sofre alterações durante o ciclo menstrual devido a influência dos hormônios ovarianos. No seu estado mais maduro, a ectocérvice pode ser dividida histologicamente em três camadas: a camada basal e parabasal, a camada intermediária e a camada superficial. A membrana basal separa o epitélio escamoso do tecido conjuntivo subjacente (BIBBO; WILBUR, 2015).

A endocérvice é revestida por uma camada única de células colunares produtoras de muco que pode ter aparência pseudoestratificada. (KIERSZENBAUM; TRES, 2016).

A junção escamo-colunar (JEC) é o local onde ocorre a união entre o epitélio escamoso estratificado e a mucosa colunar simples. A localização da JEC varia de acordo com a idade, influências hormonais, estado reprodutivo e condições patológicas (HERFS et al., 2013). Durante a infância, a JEC é geralmente localizada no canal endocervical anatômico, onde permanece até a menarca. Após o início da puberdade ocorre a eversão do epitélio colunar da parte inferior do canal endocervical para a região externa da cérvice voltada para a vagina. Isso é chamado de ectopia e a partir desse momento o tecido endocervical é gradualmente substituído por epitélio escamoso ao longo dos anos reprodutivos por um processo fisiológico denominado metaplasia escamosa (BIBBO; WILBUR, 2015). A área em que a mucosa colunar está sendo substituída por epitélio escamoso é conhecida como zona de transformação (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2003; MILLS, 2012). Cerca de 95% lesões pré-cancerosas cervicais tem origem nessa região (KIERSZENBAUM; TRES, 2016).

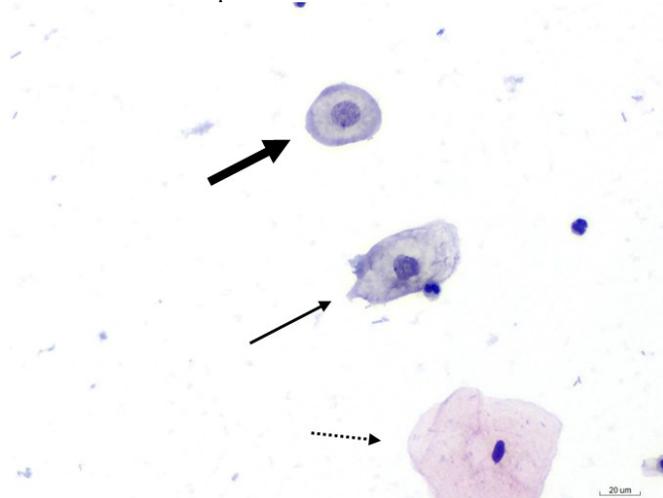
2.2 CITOLOGIA CERVICAL

Em uma amostra citológica cervical normal, é possível observar células derivadas do epitélio escamosos (células basais, parabasais, intermediárias e superficiais), células endocervicais e células metaplásicas derivadas da zona de transformação. Além disso, células endometriais podem ser normalmente encontradas em mulheres nos anos reprodutivos durante, e alguns dias após, a menstruação, enquanto as células ainda estão se desprendendo do útero (KOSS; MELAMED, 2005). Por outro lado, a presença de células endometriais em mulheres com mais de 45 anos é considerada anormal e chama a atenção para a possibilidade de neoplasia endometrial (NAYAR; WILBUR, 2015a).

Células basais e parabasais são células escamosas imaturas e estão localizadas na camada mais profunda do epitélio escamoso. As células

basais se dividem e maturam para formar as células parabasais, que por sua vez, são células arredondadas, um pouco maiores do que as basais, com uma pequena quantidade de citoplasma cianofílico moderadamente denso e núcleo arredondado com cromatina uniformemente distribuída e área de aproximadamente $50 \mu\text{m}^2$ (Figura 2) (MILLS, 2012; CIBAS; DUCATMAN, 2014; BIBBO; WILBUR, 2015; NAYAR; WILBUR, 2015a).

Figura 2 – Célula escamosa parabasal



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

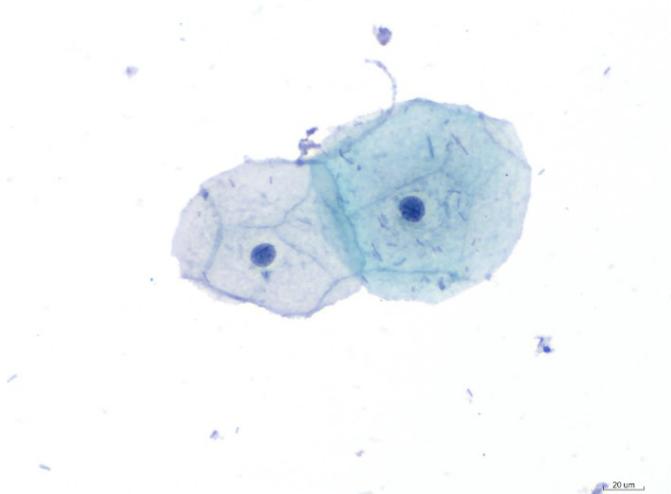
Notas: Célula parabasal (seta grossa) em uma amostra citológica corada pelo método de Papanicolaou (aumento de 40x). Célula escamosa intermediária (seta fina); Célula escamosa superficial (seta pontilhada).

As células parabasais são incomuns em amostras de mulheres em idade reprodutiva. No entanto, em mulheres durante a menopausa, células escamosas imaturas são comumente encontradas devido a atrofia epitelial em decorrência da redução das concentrações de estrogênio nessa época da vida. Demais estados de restrição de estrogênio como em crianças, mulheres em uso de anticoncepcionais contendo apenas progestina, período pós-parto e em certos estados amenorreicos podem apresentar citologia parecida com a de mulheres na menopausa, com abundância de células imaturas (MILLS, 2012; CIBAS; DUCATMAN, 2014; BIBBO; WILBUR, 2015; NAYAR; WILBUR, 2015a).

As células parabasais passam por um processo de maturação e se diferenciam em células escamosas intermediárias, que geralmente estão

presentes na camada intermediária do epitélio escamoso. As células escamosas intermediárias possuem citoplasma mais abundante do que o de células parabasais. Nessas células, o acúmulo de glicogênio dá ao citoplasma uma característica mais clara ou finamente granular levemente cianofílica. O núcleo é menor quando comparado ao núcleo de uma célula parabasal com área aproximada de $35 \mu\text{m}^2$. É geralmente alongado e regularmente apresenta uma ranhura longitudinal, possui membrana nuclear claramente definida e cromatina finamente granular uniformemente distribuída. O núcleo de células intermediárias escamosas é utilizado como referência de tamanho para outras células em amostras de citologia cervical (Figura 3) (MILLS, 2012; BIBBO; WILBUR, 2015; NAYAR; WILBUR, 2015a).

Figura 3 – Células escamosas intermediárias



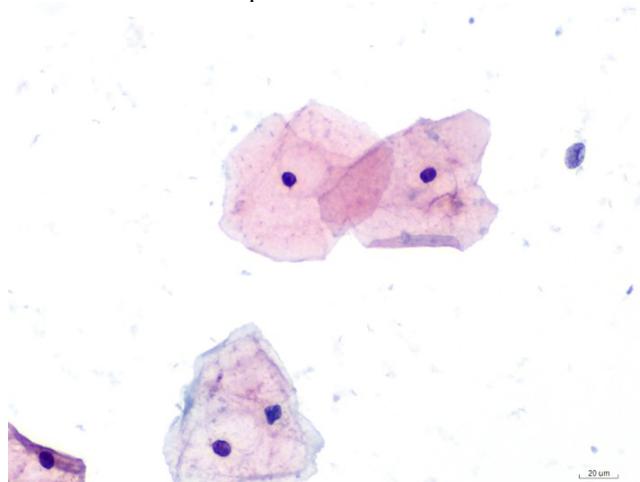
Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Notas: Células escamosas intermediárias em uma amostra citológica corada pelo método de Papanicolaou (aumento de 40x).

Na camada mais externa da ectocérvice estão presentes as células do estágio final de maturação do epitélio escamoso estratificado, as células superficiais. Essas células são geralmente vistas na fase proliferativa do ciclo menstrual. Elas possuem junções desmossômicas menos coesas, tornando-as propícias a constante esfoliação a partir da superfície da mucosa. As células superficiais escamosas são grandes (aproximadamente 40 - 60 μm de diâmetro) e poligonais, o citoplasma é

abundante, translúcido, geralmente eosinofílico e tem a membrana citoplasmática bem definida. O núcleo é pequeno e arredondado com área de 10 – 15 μm^2 e altamente condensado (picnótico) com cromatina uniformemente distribuída (Figura 4) (BIBBO; WILBUR, 2015; NAYAR; WILBUR, 2015a).

Figura 4 – Células escamosas superficiais



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Notas: Células escamosas superficiais em uma amostra citológica corada pelo método de Papanicolaou (aumento de 40x).

A presença de células metaplásicas ou células endocervicais na lâmina é considerado um indicador de que a zona de transformação foi amostrada (BIBBO; WILBUR, 2015). A presença dessas células é importante, pois estudos prévios demonstram que existe correlação entre a taxa de amostragem da zona de transformação e a taxa de detecção de anormalidades citológicas (NARINE; YOUNG, 2007; FARAKER; GREENFIELD, 2013).

As células metaplásicas podem exibir um espectro de aspectos morfológicos (NAYAR; WILBUR, 2015a). Células metaplásicas imaturas são frequentemente observadas como células isoladas, porém agregados também são vistos e as bordas das células são geralmente distintas. O formato das células é arredondado, com o número de células poligonais aumentando com a maturação. O citoplasma é denso, cianofílico, homogêneo e muitas vezes vacuolizado (Figura 5). As células metaplásicas mais maduras são muitas vezes indistinguíveis de outras

células escamosas. Elas possuem bordas distintas e são redondas ou poligonais. Quando comparado às células metaplásicas imaturas, as maduras têm menos citoplasma cianofílico homogêneo (BIBBO; WILBUR, 2015).

Figura 5 – Célula metaplásica

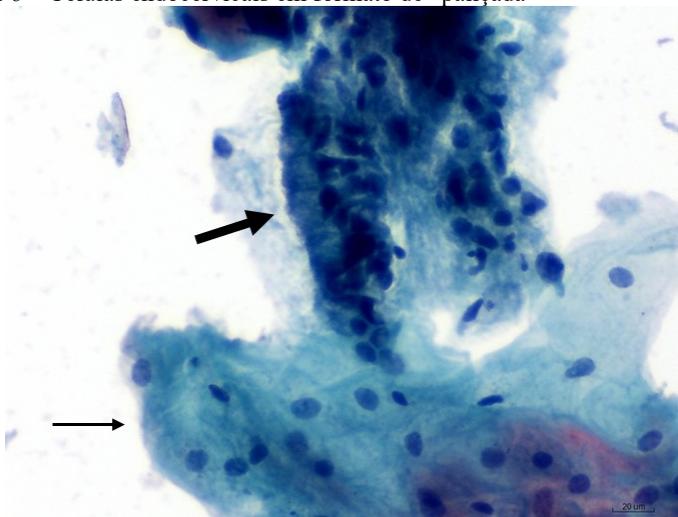


Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Notas: Célula metaplásica em uma amostra citológica corada pelo método de Papanicolaou (aumento de 40x).

O citoplasma de células endocervicais é fracamente cianofílico, transparente e difusamente vacuolado ou granular. O núcleo é arredondado ou alongado, com tamanho altamente variável (média de $50 \mu\text{m}^2$) e apresenta um padrão de cromatina finamente granular e uniforme com pequenos nucléolos. As células apresentam polaridade com o núcleo em uma extremidade do citoplasma e muco na extremidade oposta e são frequentemente observadas agrupadas na citologia, isso dá uma aparência a célula de "paliçada" (quando as células são vistas de lado) (figura 6) ou "favo de mel" (quando as células são vistas de frente) (Figura 7) (BIBBO; WILBUR, 2015; NAYAR; WILBUR, 2015a).

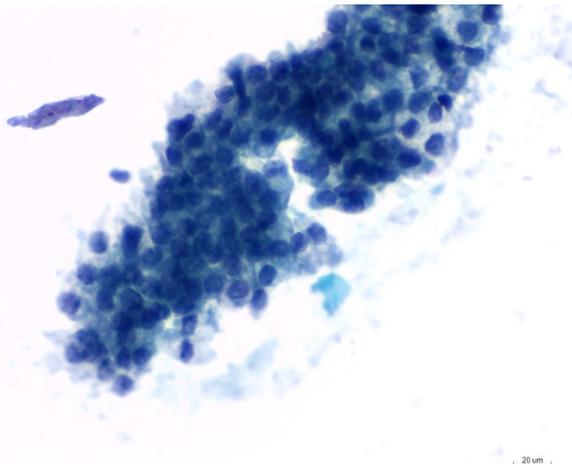
Figura 6 – Células endocervicais em formato de “paliçada”



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Notas: Célula endocervicais em formato de “paliçada” (seta grossa) em uma amostra citológica corada pelo método de Papanicolaou (aumento de 40x). Células escamosas intermediárias (seta fina).

Figura 7 – Células endocervicais em formato de “favo de mel”



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Notas: Célula endocervicais em formato de “favo de mel” em uma amostra citológica corada pelo método de Papanicolaou (aumento de 40x).

O esfregaço cervical corado pelo método de Papanicolaou é aceito mundialmente como um método não invasivo para detecção e prevenção do câncer cervical, pois o exame dessas células pode revelar anormalidades citológicas que antecedem o câncer invasivo (WHO, 2014; NAYAR; WILBUR, 2015a). A identificação de células displásicas deve levar a um acompanhamento da paciente, seguida de confirmação da lesão pré-cancerosa por avaliação histológica do tecido e subsequente tratamento das lesões que tem potencial de causar metástase (WHO, 2013).

2.3 LESÕES PRÉ-CANCEROSAS

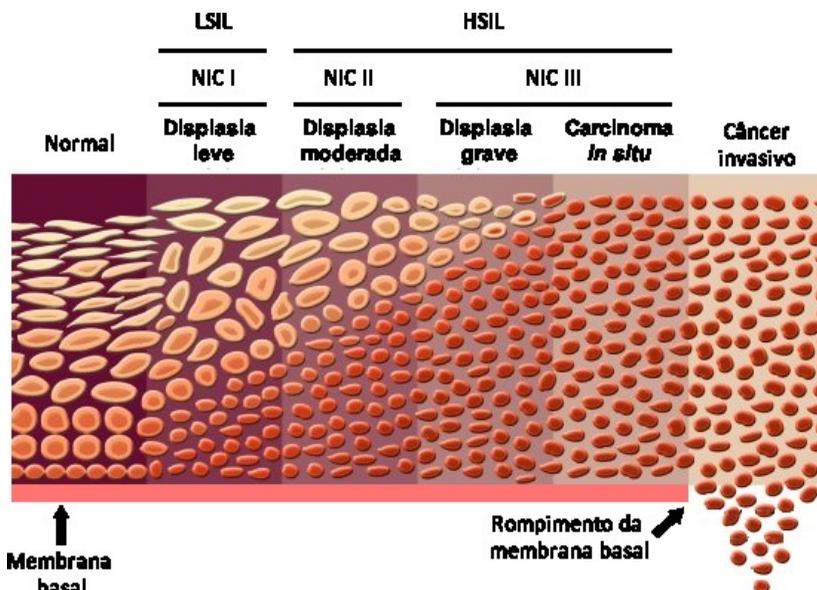
O câncer cervical é precedido por uma longa fase de doença pré-invasiva que pode durar cerca de 20 anos (VINK et al., 2013). Essas lesões pré-cancerosas podem ser detectadas no exame citológico e confirmadas na avaliação histológica do material de biópsia do colo do útero. Histopatologicamente, as alterações pré-cancerosas são classificadas de acordo com o grau de comprometimento do tecido. Displasia leve com acometimento de 1/3 do tecido cervical é chamado de NIC 1, que é caracterizado por ativação mínima da taxa de proliferação das células basais e ocasionalmente presença de coilócitos nas células da camada mais superficial. Displasia moderada com acometimento de 2/3 do tecido cervical é chamado de NIC 2. Já displasia grave ou carcinoma *in situ* (CIS) é chamado de NIC 3, nessas lesões as células em proliferação ocupam a terceira parte superior do epitélio e no caso do CIS, as células ocupam a espessura total do tecido cervical (Figura 8) (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007; BIBBO; WILBUR, 2015).

É importante ressaltar que as lesões pré-cancerosas não acarretam risco a vida da paciente, pois estas lesões não são capazes de produzir metástases. Enquanto não houver o rompimento da membrana basal e invasão para o estroma cervical, o tratamento previne o câncer cervical em 100% dos casos (KOSS; MELAMED, 2005). É consenso, portanto, que as lesões pré-invasivas devem ser tratadas para impedir sua progressão para carcinoma invasor (MCCREDIE et al., 2008).

As alterações citológicas do colo uterino podem ser observadas após a coleta por citologia esfregativa e coloração das lâminas pelo método de Papanicolaou. A classificação é realizada de acordo com o Sistema de Bethesda (NAYAR; WILBUR, 2015a). Esse sistema foi criado em 1988 com o objetivo de servir como uma nomenclatura uniforme e reprodutível entre diferentes profissionais e também ser

flexível para se adaptar a uma grande variedade de situações laboratoriais e localizações geográficas. Atualmente, o Sistema de Bethesda está em sua terceira edição (NAYAR; WILBUR, 2015b).

Figura 8 – Progressão de uma lesão cervical benigna para câncer invasivo.



Fonte: Adaptado de Lowy e Schiller (2006).

Notas: Da esquerda para a direita existe uma progressão das alterações teciduais a partir do tecido inicialmente normal até o câncer invasivo, que é caracterizado pelo rompimento da membrana basal e invasão das células neoplásicas para o estroma adjacente.

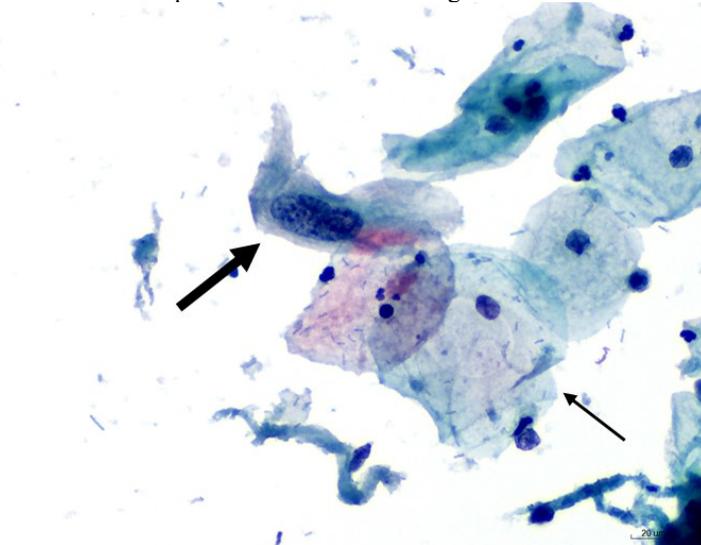
Legenda: Neoplasia intraepitelial cervical (NIC); Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL); Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL).

O Sistema de Bethesda classifica citologicamente as alterações no tecido escamoso como lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) ou lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) (NAYAR; WILBUR, 2015a). LSIL engloba lesões associadas a displasia leve (NIC 1) e as alterações relacionadas à LSIL são observadas em células bem diferenciadas. Características morfológicas que podem estar presentes em LSIL são multinucleação, coilocitose e núcleos hiper cromáticos aumentados, com bordas irregulares e cromatina grosseira (Figura 9) (KOSS; MELAMED, 2005; BIBBO; WILBUR, 2015).

HSIL engloba lesões associadas a displasia moderada (NIC 2) e grave (NIC 3/CIS) e morfologicamente é possível observar alterações em células imaturas com alta relação núcleo citoplasma e núcleos hiper cromáticos com cromatina densa, grosseira e irregular (Figura 10) (KOSS; MELAMED, 2005; BIBBO; WILBUR, 2015).

Essa classificação citológica é baseada na evidência de que a maioria das LSIL oferecem pouco risco de progressão para câncer invasivo, ao passo que boa parte das HSIL estão associadas a persistência da lesão e maior potencial para progressão (BANSAL et al., 2008; KJAER et al., 2010). Dessa forma, o acompanhamento clínico de uma HSIL deve ser mais rigoroso do que de uma LSIL, pois sugere-se que 30 – 40% das HSIL não tratadas progridem para câncer invasivo (KOSS; MELAMED, 2005).

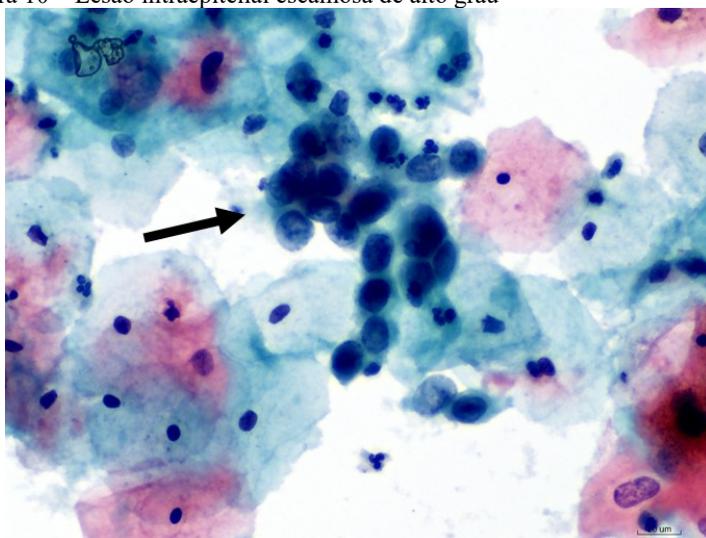
Figura 9 – Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Notas: Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) (seta grossa) em uma amostra citológica corada pelo método de Papanicolaou (aumento de 40x). Célula escamosa intermediária (seta fina).

Figura 10 – Lesão intraepitelial escamosa de alto grau

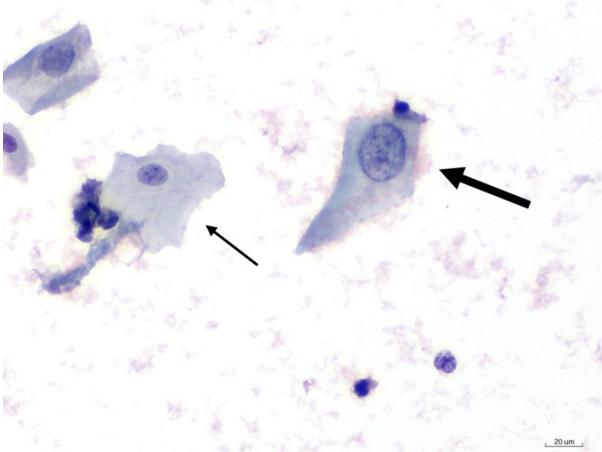


Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Notas: Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) (seta) em uma amostra citológica corada pelo método de Papanicolaou (aumento de 40x).

Além dessas duas classificações, o sistema de Bethesda ainda permite que os resultados sejam classificados em uma terceira categoria, a de células escamosas atípicas (ASC). As alterações morfológicas observadas em ASC podem não ter relação com a infecção pelo HPV ou neoplasia, porém podem conter achados que sugerem a possível presença de uma lesão intraepitelial cervical oculta ou até mesmo câncer cervical em casos raros. As células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) (Figura 11) são sugestivas de uma lesão de baixo grau, porém não possuem critérios suficientes para serem classificadas como LSIL. A morfologia atípica nos casos de ASC-US sugere que essas células não devem ser classificadas como negativas para lesão intraepitelial ou malignidade (NILM). Já as células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial escamosa de alto grau (ASC-H) (Figura 12) não possuem critérios suficientes para serem classificadas como HSIL, porém possuem características morfológicas suspeitas em células pobremente diferenciadas (NAYAR; WILBUR, 2015a).

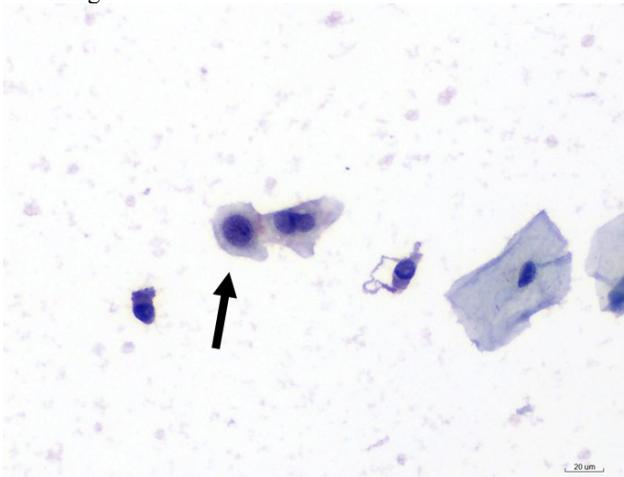
Figura 11 – Células escamosas atípicas de significado indeterminado



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Notas: Célula escamosa atípica de significado indeterminado (ASC-US) (seta grossa) em uma amostra citológica corada pelo método de Papanicolaou (aumento de 40x). Célula escamosa intermediária (seta fina).

Figura 12 – Células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial escamosa de alto grau

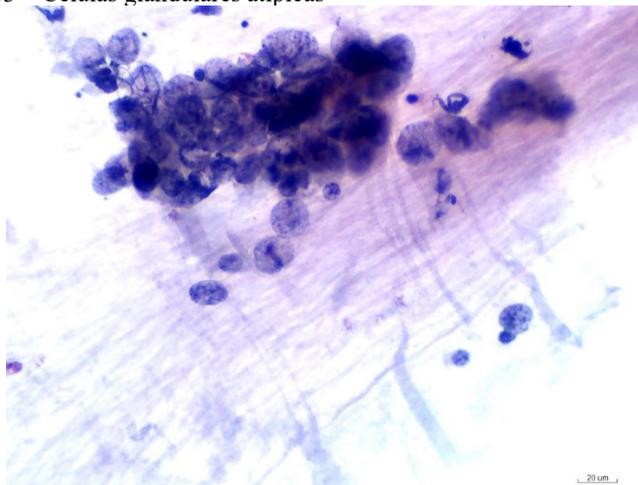


Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Notas: Células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H) (seta) em uma amostra citológica corada pelo método de Papanicolaou (aumento de 40x).

As alterações pré-invasivas em células glandulares cervicais são classificadas em células glandulares atípicas (AGC) ou adenocarcinoma *in situ* (AIS). As AGC devem ser classificadas de acordo com o tecido de origem (endocervical ou endometrial) sempre que possível. Essas células exibem atipia nuclear que excede alterações óbvias reativas ou reparadoras (Figura 13), mas não possuem características de AIS ou adenocarcinoma invasivo. As células endocervicais atípicas ainda podem ser classificadas como favorecendo neoplasia. A morfologia dessas células é mais parecida com a de um AIS, porém elas não possuem todos os critérios para serem classificadas como tal. O AIS é considerado como sendo o equivalente glandular do HSIL e o precursor de um adenocarcinoma invasivo. A interpretação citológica de AIS tem boa correlação com o resultado histológico quando os critérios de interpretação citológica são bem aplicados, como a identificação de células dispostas principalmente em agregados com núcleos aglomerados, discretamente aumentados, hiper cromáticos, com cromatina granular, ausência de bordos citoplasmáticos e polaridade alterada. Além disso, podem ser observados fragmentos teciduais com padrão de ramificação e aberturas glandulares (rosetas) e as células da periferia mostram um padrão em “plumagem” (NAYAR; WILBUR, 2015a).

Figura 13 – Células glandulares atípicas



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Notas: Células glandulares atípicas (AGC) em uma amostra citológica corada pelo método de Papanicolaou (aumento de 40x).

2.4 CÂNCER CERVICAL

Os dois tipos mais comuns de câncer cervical são o carcinoma de células escamosas (CCE) e o adenocarcinoma (AC) (LEA; LIN, 2012). O CCE é responsável por cerca de 75% dos casos de câncer cervical, enquanto o AC contabiliza aproximadamente 25% do total. Outras variantes histológicas menos comuns compreendem uma pequena porcentagem dos diagnósticos de câncer cervical (WILLIAMS et al., 2015).

O CCE varia de tumores queratinizados bem diferenciados até tumores pobremente diferenciados e não queratinizados. Citologicamente, o sistema de Bethesda não subdivide essas variantes, pois muitas vezes não é possível fazer a distinção somente com base nos achados citológicos e o prognóstico é predominantemente definido pelo estágio da doença e não difere entre os tipos. No entanto, as características morfológicas das variantes de CCE são discutidas separadamente para fins descritivos no sistema de Bethesda (NAYAR; WILBUR, 2015a).

O CCE queratinizado bem diferenciado apresenta células geralmente isoladas; intenso pleomorfismo com células caudadas e em fuso; citoplasma denso e eosinofílico ou alaranjado devido a queratinização; núcleos densos e frequentemente picnóticos e opacos; cromatina grosseiramente granular com espaços paracromáticos; além disso, macronúcleolos, assim como diátese tumoral, podem estar presentes, porém são menos comuns do que no tipo não queratinizado. O CCE não queratinizado pouco diferenciado apresenta células redondas ou ovais que ocorrem isoladamente ou em agregados sinciciais; citoplasma cianofílico; pleomorfismo, porém não tão marcante como no tipo queratinizado; núcleos aumentados, com variação de tamanho e membrana nuclear irregular; cromatina grosseiramente granular com espaços paracromáticos; por fim, macronúcleolos e diátese tumoral geralmente estão presentes (BIBBO; WILBUR, 2015; NAYAR; WILBUR, 2015a).

O quadro 1 apresenta as diferenças morfológicas entre atípias, lesões e carcinomas de células escamosas.

Quadro 1 – Diferenças morfológicas entre atipias, lesões e carcinomas de células escamosas.

Característica celular	Atipias escamosas		Lesões Intraepiteliais escamosas		Carcinoma de células escamosas	
	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	Queratinizado	Não queratinizado
Maturação celular	bem diferenciadas	imaturas	bem diferenciadas	imaturas	bem diferenciadas	imaturas
Disposição	geralmente isoladas	isoladas ou em grupos pequenos	geralmente isoladas	isoladas ou em agregados sinciciais	geralmente isoladas	isoladas ou em agregados sinciciais
Citoplasma						
•Tamanho	de células superficiais ou intermediárias (40 – 60 µm)	de células metaplásicas	de células superficiais ou intermediárias (40 – 60 µm)	de células basais ou parabasais (14 – 20 µm)	intenso pleomorfismo	de células basais ou parabasais (14 – 20 µm)
•Coloração	cianofílico ou eosinofílico	cianofílico	cianofílico ou eosinofílico	geralmente cianofílico	eosinofílico	cianofílico
Núcleo						
•Coloração	hipercromasia mínima	hipercromasia pode estar presente	geralmente hipercromático	geralmente hipercromático	geralmente hipercromático	geralmente hipercromático
•Contorno	mínima irregularidade	pode ser irregular	varia entre regular a muito irregular	bastante irregular	bastante irregular	bastante irregular
•Tamanho	aumentado (2,5 a 3x)	aumentado (1,5 a 2,5x)	aumentado (4 a 6x)	aumentado (4 a 6x)	bastante variado	aumentado, com variação no tamanho
•Cromatina	mínima irregularidade	pode ser grosseira	granular grosseira a densamente opaca	densa, grosseira e irregular	grosseiramente granular com espaços paracromatínicos	grosseiramente granular com espaços paracromatínicos
Macronúcleolos	ausente	ausente	ausente	ausente	pode estar presente	geralmente presente
Relação n/c	ligeiramente aumentada	alta	pouco aumentada	alta	geralmente alta	alta, porém menor que HSIL
Diátese tumoral	ausente	ausente	ausente	ausente	pode estar presente	geralmente presente

Fonte: Elaborado pela autora (2018). (CIBAS; DUCATMAN, 2014; BIBBO; WILBUR, 2015; NAYAR; WILBUR, 2015a).

Legenda: Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US); células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H); lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL); lesão intraepitelial de alto grau (HSIL); Relação núcleo/citoplasma (n/c); vezes (x).

O AC endocervical possui diferentes subtipos histológicos e essa variedade pode tornar o reconhecimento citológico desafiador. Em muitos casos, os critérios citológicos se sobrepõem aos descritos para um AIS, porém algumas características podem sugerir invasão. No AC, as células anormais geralmente são abundantes; o citoplasma é finamente vacuolado; os núcleos são pleomórficos e a cromatina demonstra clareamento e distribuição irregular; macronúcleolos geralmente estão presentes e diátese tumoral necrótica é comum. Células escamosas anormais podem estar presentes, o que representa uma lesão escamosa coexistente ou o componente escamoso de um AC mostrando diferenciação escamosa parcial (CIBAS; DUCATMAN, 2014; NAYAR; WILBUR, 2015a).

2.4.1 Epidemiologia

O câncer cervical é uma das malignidades que mais aflige as mulheres na atualidade. Em 2012, foram estimados 527.600 novos casos e 265.700 mortes por esse câncer no mundo, sendo que ele foi o quarto tipo de câncer mais incidente e a quarta causa de morte por câncer entre mulheres. A fatalidade do câncer cervical, no entanto, é desigual entre países desenvolvidos e países em desenvolvimento, visto que mais de 85% das mortes ocorrem nas regiões do mundo em desenvolvimento, como regiões da Ásia, da África e da América Latina e do Caribe (TORRE et al., 2015).

As menores taxas de mortalidade de câncer cervical são observadas na Austrália/Nova Zelândia (2,4/100.000), América do Norte (2,9/100.000) e Norte Africano/Oriente Médio (3,3/100.000), enquanto as maiores taxas de mortalidade estão localizadas no Sul da África subsaariana (27,0/100.000), no Centro da África subsaariana (24,7/100.000) e na Oceania (15,6/100.000) (FITZMAURICE et al., 2017).

A reduzida taxa de mortalidade do câncer cervical nas regiões mais desenvolvidas do globo quando comparado às regiões menos desenvolvidas se dá, principalmente, pela implementação bem-sucedida de programas de rastreamento organizados para detectar lesões pré-cancerosas, seguida do acompanhamento e, quando necessário, tratamento das pacientes (WHO, 2014). Em regiões onde os programas de rastreamento são oportunistas não se observa redução significativa na incidência ou mortalidade da doença (ADAB et al., 2004; SANKARANARAYANAN et al., 2009; PEIRSON et al., 2013).

A implementação de programas de rastreamento organizados que utilizaram a citologia cervical resultou em um grande declínio nas taxas de incidência e mortalidade do câncer cervical nas últimas décadas. Em um estudo em países nórdicos entre 1965 a 1974 que compararam as taxas de mortalidade antes e após a introdução do programa de rastreamento organizado (como, por exemplo, recrutamento sistemático das pacientes, lembretes para as mulheres em falta com o rastreamento, acompanhamento das pacientes e sistema de vigilância das mulheres na faixa etária de seleção) mostrou que é possível reduzir a taxa de mortalidade do câncer cervical em cerca de 80%, como foi o caso da Islândia, que possuía o programa com a maior cobertura entre os países nórdicos. Também foi observado o declínio de 50% e 34% nas taxas de mortalidade por câncer cervical na Finlândia e na Suécia, respectivamente. Na Dinamarca, onde 40% da população era coberta pelo programa organizado, a redução da mortalidade foi de 25%. Já na Noruega, onde somente 5% da população era coberta, a mortalidade foi reduzida em somente 10% (LÄÄRÄ; DAY; HAKAMA, 1987).

A mortalidade por câncer cervical também foi reduzida drasticamente em países britânicos entre 1971 e 2000 após a implementação de um programa de rastreamento com aumento da cobertura populacional na faixa etária adequada e aumento na frequência de rastreamento para 3 ou 5 anos. O mesmo não foi observado na Irlanda, onde o programa oportunístico de rastreamento teve pouco impacto na redução da taxa de mortalidade (COMBER; GAVIN, 2004). Na Colúmbia Britânica entre 1955 e 1985, as taxas de incidência e mortalidade foram reduzidas em 78% e 72%, respectivamente, onde cerca de 85% das mulheres passaram pelo rastreamento ao menos uma vez na vida (ANDERSON et al., 1988) e foi estimado que no Canadá entre 1952 e 2006, a mortalidade por câncer cervical foi reduzida em 83% após o aumento das taxas de rastreamento (DICKINSON et al., 2012).

No Brasil, o rastreamento do câncer cervical segue predominantemente o modelo oportunístico e se dá pelo exame citopatológico em mulheres de 25 a 64 anos que já iniciaram vida sexual (INCA, 2016). O câncer cervical é o terceiro tipo de câncer mais comumente diagnosticado e a quarta causa de morte por câncer segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). A estimativa para o biênio 2016-2017 apontou a ocorrência de 16.340 novos casos com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres. No entanto, existem diferenças regionais, no qual o câncer cervical foi o primeiro mais incidente na região Norte (23,97/100.000); nas regiões Centro-Oeste (20,72/100.000) e Nordeste (19,49/100.000), ocupou a segunda posição; na região Sudeste

(11,30/100.000), a terceira; e na região Sul (15,17/100.000), a quarta posição (INCA, 2015).

Durante 1980 e 2009, a tendência de mortalidade por câncer cervical como um todo mostrou estabilização no Brasil, porém houve diferenças regionais. As regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul mostraram uma redução na mortalidade, enquanto o Norte e o Nordeste do país apresentaram uma tendência ascendente (GONZAGA et al., 2013).

Dados mais recentes mostram uma tendência decrescente consistente nas taxas de mortalidade com exceção da região Norte, onde as taxas permaneceram estáveis com leve tendência a aumentar. A mortalidade por câncer cervical no Brasil é de 7,2/100.000 mulheres. A região Norte mostra os maiores índices de mortalidade (14,0/100.000), seguida da região Nordeste (8,6/100.000), Centro-Oeste (8,3/100.000), Sul (6,6/100.000) e Sudeste (5,7/100.000) (VALE et al., 2016). Projeções para 2030 demonstram que haverá redução das taxas de mortalidade, onde a média no Brasil será de 5,2/100.000 mulheres. Está previsto que a redução mais marcante será na região Sul. Também se espera redução nas taxas das regiões Sudeste e Centro-Oeste. Já as regiões Norte e Nordeste apresentam tendência global de aumento (BARBOSA et al., 2016).

Em uma análise histórica de 2006 a 2013 do programa de rastreio do câncer cervical no Brasil, foi constatado que a taxa de cobertura do programa parece ser menor do que 70%. Além disso, aproximadamente 25% dos exames são realizados em mulheres fora da faixa etária alvo e isso leva a um desperdício dos recursos investidos no programa. No entanto, mesmo com essa cobertura, houve um aumento significativo na porcentagem de exames realizados em mulheres na faixa etária alvo ao longo dos anos (ZEFERINO; DERCHAIN, 2006; COSTA et al., 2015). Isso é refletido na redução das taxas de mortalidade no Brasil nas últimas décadas (BARBOSA et al., 2016). Por outro lado, como foi descrito anteriormente, existe uma grande desigualdade entre as regiões Brasileiras. Os dados mostram que as piores situações se encontram nos estados com os menores índices de desenvolvimento humano (IDH), enquanto os estados com maior IDH apresentam tendência decrescente de mortalidade. As regiões com melhor estrutura urbana (regiões Sul e Sudeste) contam com a presença de sistemas de saúde bem equipados e bem distribuídos no território, o que facilita o rastreamento regular, diagnóstico e tratamentos oportunos. Nas demais regiões, existe uma limitação de acesso aos serviços de saúde, seja pela esparsa ocupação do território (regiões Centro-Oeste e Norte) ou pela concentração de centros de cuidado em poucos locais (região Nordeste) (GONZAGA et al., 2013; BARBOSA et al., 2016).

Para mudar essa tendência de aumento das taxas de mortalidade por câncer cervical nas regiões com menores níveis socioeconômicos do Brasil, será necessário reformular a estratégia atual de controle com novas políticas públicas, como a descentralização dos serviços de diagnóstico e dos centros de referência para o tratamento, contratação de profissionais competentes e em número suficiente para atender a população, além da necessidade de intensificar as campanhas de sensibilização, com mensagens que levem em consideração as barreiras educacionais, socioculturais e religiosas que impedem as mulheres de acessar os serviços de saúde (MASEKO; CHIRWA; MUULA, 2015). Alguns autores sugerem inclusive, que esforços para melhorar a qualidade do programa de rastreamento do câncer cervical no Brasil provavelmente não afetarão significativamente a mortalidade por este câncer enquanto não houver efetivamente a implementação de um programa organizado de rastreamento (DERCHAIN; TEIXEIRA; ZEFERINO, 2016).

2.4.2 Fatores de risco

Existem fatores de risco associados ao aumento das chances de uma mulher desenvolver câncer cervical. O principal deles é a associação entre certos tipos oncogênicos de HPV, conhecidos como HPV de alto risco, e o surgimento de alterações citológicas e histológicas relacionadas ao câncer cervical e seus estágios pré-invasivos (ZUR HAUSEN, 1996, 2002; GAO; SMITH, 2016).

No ano de 1960, Ernest Ayre deu suporte a ideia de que a atipia colicitótica ou colicitose (um halo claro ao redor do núcleo das células), termo que havia sido previamente descrito por Leopold Koss, era de origem viral (AYRE, 1960). Alguns anos mais tarde, Alexander Meisels e Roger Fortin obtiveram a confirmação científica de que as alterações citológicas e histológicas reconhecidas no epitélio cervical estavam relacionados ao condiloma acuminado (MEISELS; FORTIN, 1976). Já a conexão entre o HPV e o câncer cervical foi sugerida pelo médico alemão Harald zur Hausen (ZUR HAUSEN et al., 1974, 1975, ZUR HAUSEN, 1976, 1977) que, em 2008, foi contemplado com parte do Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina por suas contribuições (NOBEL PRIZES AND LAUREATES, 2008). Atualmente, a relação entre o HPV e o câncer cervical já está bem estabelecida (ZUR HAUSEN, 2002; GAO; SMITH, 2016) e foram confirmados em estudos multicêntricos que o DNA do HPV pode ser detectado em amostras de carcinomas invasivos em 90 –

100% dos casos (BOSCH et al., 1995, 2002; WALBOOMERS et al., 1999).

O HPV faz parte de um grande grupo de vírus de DNA não envelopados pertencentes a família *Papillomaviridae*. Mais de 200 tipos de HPV já foram isolados na natureza, destes cerca de 40 infectam o trato genital feminino e apenas uma minoria está associada ao câncer cervical. A transmissão acontece por contato físico direto, principalmente por via sexual, e a maioria das infecções permanece assintomática. Todavia, algumas infecções podem causar lesões epiteliais benignas (verrugas genitais, também conhecidas como condiloma acuminado), lesões pré-cancerosas e, mais gravemente, câncer (CIBAS; DUCATMAN, 2014; BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

Os tipos de HPV são divididos em HPV de baixo risco e HPV de alto risco dependendo da frequência com que estão associados ao câncer cervical, ou seja, se um tipo de HPV é primariamente detectado em verrugas genitais e lesões não malignas ele é dito como de baixo risco e se ele é frequentemente associado com câncer cervical é dito como de alto risco. Os HPV de alto risco mais comuns são os HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 (FERENCZY; FRANCO, 2002; ZUR HAUSEN, 2002; SCHIFFMAN et al., 2016).

Os fatores de risco associados à infecção pelo HPV estão principalmente relacionados ao comportamento sexual (CASTELLSAGUÉ, 2008). Cerca de metade das infecções pelo HPV acontecem nos três primeiros anos após o início da vida sexual da mulher (COX, 2006) e a idade precoce nos primeiros contatos sexuais está relacionado ao risco aumentado de câncer cervical (PLUMMER et al., 2012). O número de parceiros sexuais é um dos fatores de risco mais importantes para a transmissão do HPV e número elevado de parceiros sexuais durante a vida está relacionado ao risco aumentado de câncer cervical (COX, 2006; CHELIMO et al., 2013). O comportamento sexual do parceiro também influencia as chances de uma mulher entrar em contato com o HPV. Foi constatado em um estudo que, quando comparado a mulheres que possuíam parceiros sexuais monógamos, mulheres cujos parceiros sexuais tinham outros parceiros tinham risco aumentado de infecção (WINER et al., 2003). Além disso, homens que relataram ter múltiplos parceiros sexuais ou que são portadores de HPV podem ser vetores de HPV de alto risco e podem colocar suas parceiras em risco de desenvolver câncer cervical (BOSCH et al., 1996; CASTELLSAGUÉ; BOSCH; MUÑOZ, 2003).

No colo do útero, o HPV infecta as células da camada basal do epitélio escamoso que foi comprometido por micro-abrasões

(WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007). A partir disso, o vírus passa a se replicar no núcleo das células infectadas. À medida que as células infectadas se dividem e entram na camada parabasal, elas passam por etapas de expressão gênica relacionadas a diferenciação. A amplificação do genoma viral normalmente ocorre na camada intermediária e a montagem e liberação do vírus ocorre próxima a camada superficial (DOORBAR, 2005). Essa estratégia para completar o ciclo celular é utilizada tanto por HPV de baixo risco como por HPV de alto risco. No entanto, somente os HPV de alto risco possuem a capacidade de evolução para câncer por induzir a proliferação celular nas camadas de células menos diferenciadas (SCHIFFMAN et al., 2016).

Os tipos de HPV mais frequentemente detectados em carcinomas cervicais são o HPV 16, contabilizando cerca de 60% dos casos, seguido do HPV 18 com 15% e do HPV 45 com 5% dos casos (GUAN et al., 2012). Mulheres infectadas com esses tipos de HPV tem um risco aumentado de desenvolver lesões precursoras ou até mesmo carcinoma invasivo (DE SANJOSÉ et al., 2007; BIBBO; WILBUR, 2015).

O genoma do HPV possui aproximadamente 8 mil pares de bases e é composto por seis genes de transcrição precoce "*early*" (E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7) que codificam proteínas não estruturais, dois genes de transcrição tardia "*late*" (L1 e L2) que codificam proteínas estruturais do capsídeo viral e uma região controle não codificante (TOMMASINO, 2014).

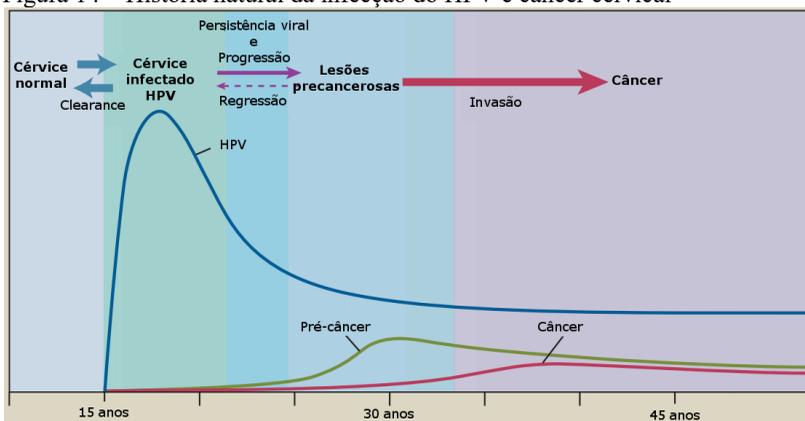
A principal diferença entre os tipos de HPV de baixo e alto risco está associada a atividade das proteínas codificadas pelos genes precoces E6 e E7. A carcinogenicidade de HPV de alto risco resulta da integração de seu material genético com o DNA da célula hospedeira, o que leva ao aumento da atividade das oncoproteínas virais E6 e E7, que se ligam aos genes supressores tumorais p53 e proteína do retinoblastoma (pRb), respectivamente. O efeito sobre os alvos celulares e vias envolvidas no desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e câncer é limitado nos HPV de baixo risco (FERENCZY; FRANCO, 2002; SCHIFFMAN et al., 2016).

Os resultados da atuação das oncoproteínas virais do HPV são a desregulação de eventos celulares cruciais como o ciclo celular, a apoptose, o reparo do DNA, a senescência e a diferenciação celular, o que facilitam o acúmulo de danos ao DNA e progressão para malignidade (TOMMASINO, 2014). Além das oncoproteínas E6 e E7, a proteína E5 também parece ter um papel importante na oncogenicidade do HPV, pois atua em estratégias de evasão do vírus ao sistema imunológico (CAMPO et al., 2010; DE FREITAS et al., 2017). Esse comprometimento da

atuação do sistema imunológico facilita a persistência da infecção, o que contribui com a transformação de células normais em células malignas (SONG et al., 2015), pois sabe-se que o surgimento de lesões precursoras e a evolução para carcinoma invasivo está fortemente associada com a infecção persistente pelo vírus (KOSHIOL et al., 2008).

A infecção persistente por HPV de alto risco, no entanto, não é garantia de que a mulher terá câncer (BURD, 2003). Isso é corroborado pelo fato de que a maioria das infecções são facilmente controladas pelo sistema imunológico tendo remissão espontânea entre 1 a 2 anos em 90% dos casos (PLUMMER et al., 2007; RACHEL SKINNER et al., 2016). Além disso, o câncer cervical é precedido por uma longa fase de doença pré-invasiva e somente uma pequena parcela das lesões progridem para câncer invasivo (MELNIKOW et al., 1998; VINK et al., 2013). (Figura 14).

Figura 14 – História natural da infecção do HPV e câncer cervical



Fonte: Adaptado de (SCHIFFMAN; CASTLE, 2005)

Notas: Grande parte das infecções por HPV ocorrem nos primeiros anos após o início da atividade sexual em mulheres entre os 15 e 20 anos de idade. No entanto, a grande maioria tem remissão espontânea (*clearance*) entre 1 a 2 anos e, de forma geral, apenas as infecções persistentes estão associadas com o surgimento de lesões pré-cancerosas, o que ocorre aproximadamente 10 anos após a infecção. A maioria dos casos de câncer invasivo ocorre cerca de 20 anos após a infecção, em mulheres entre 40 e 50 anos.

Dessa forma, a literatura aborda alguns cofatores que podem influenciar a persistência da infecção pelo HPV e/ou a progressão para câncer cervical.

Dado à evidência de que a indução de imunotolerância do sistema imunológico pela infecção persistente por HPV é um dos principais mecanismos para o surgimento de lesões pré-cancerosas, porém não suficiente para a evolução para câncer invasivo, fatores como as diferenças genéticas do hospedeiro demonstram ter um papel importante na progressão para câncer cervical (CHEN et al., 2011; SONG et al., 2015). Em uma meta-análise, foi verificado que 14 variantes de 11 genes ou loci podem aumentar o risco de câncer cervical e que esses genes estão principalmente relacionados com imunovigilância, imunorregulação, reparo do DNA e metabolismo celular (ZHANG et al., 2014). Além disso, polimorfismos no fator de necrose tumoral alfa (LIU et al., 2012), bem como em variantes de interleucina 1 beta (QIAN et al., 2010), também estão envolvidos no risco aumentado de câncer cervical.

Um ambiente no qual o sistema imune está comprometido é imprescindível para a progressão da doença. Dessa forma, além da capacidade de evasão ao sistema imunológico de tipos oncogênicos de HPV e de fatores genéticos do hospedeiro que facilitam a permanência do vírus no tecido, fatores que levam a imunossupressão também estão relacionados ao risco aumentado de câncer cervical e persistência da infecção (DUGUÉ et al., 2013). A infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) reduz a probabilidade do sistema imunológico em eliminar a infecção com o HPV (ROWHANI-RAHBAR et al., 2007). Além disso, o risco de câncer cervical é maior em mulheres infectadas com o HIV quando comparado com mulheres não infectadas, no qual o risco é crescente com o aumento da gravidade da imunossupressão (ABRAHAM et al., 2013; CLIFFORD et al., 2016). Mulheres que receberam transplante de órgãos sólidos tem risco aumentando devido a terapia imunossupressora pós-transplante (CHAPMAN; WEBSTER; WONG, 2013). A terapia de longa duração com imunossupressores utilizada em doenças autoimunes também está associada com o aumento do risco de malignidade cervical (BERNATSKY; RAMSEY-GOLDMAN; CLARKE, 2009; SINGH et al., 2009; KLUMB et al., 2010).

O uso prolongado de contraceptivos orais está associado com o risco aumentado de câncer cervical (MORENO et al., 2002). Além disso, é observado que o risco diminui após a cessação do uso e em 10 anos ou mais o risco torna-se o mesmo de uma mulher que nunca fez o uso de contraceptivos orais (INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER et al., 2007). Possíveis mecanismos para explicar essa associação incluem a interação entre estrogênios e progestágenos com receptores hormonais

presentes no tecido cervical, uma vez que a zona de transformação é altamente sensível à estimulação hormonal esteroide (REMOUE et al., 2003). Além disso, supõe-se que os hormônios esteroides sexuais aumentam a expressão dos oncogenes E6 e E7 do HPV, propiciam o estímulo à degradação de genes supressores tumorais e, dessa forma, incrementam a capacidade do DNA viral em transformar as células cervicais e induzir a carcinogênese (MOODLEY et al., 2003; ROURA et al., 2016).

A multiparidade está relacionada com o carcinoma de células escamosas do colo do útero entre mulheres com positividade para o HPV (INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER, 2006; JENSEN et al., 2013). Mulheres que relataram 7 gestações completas ou mais e que tinham menos de 17 anos na primeira gravidez apresentaram um risco quatro vezes maior de desenvolver carcinoma cervical de células escamosas do que mulheres que tiveram 1 a 2 gestações e que tinham mais de 21 anos na primeira gravidez (MUÑOZ et al., 2002). Um dos mecanismos propostos para essa associação são as concentrações elevadas de estrogênio e progesterona, que são responsáveis pelas alterações na posição da JEC durante as gestações. Isso facilitaria a exposição da zona de transformação ao HPV por muitos anos (JENSEN et al., 2013). Outro possível mecanismo é a imunossupressão ligada à gravidez, o que poderia contribuir com o papel do HPV na carcinogênese cervical (ROURA et al., 2016). Por outro lado, as taxas de prevalência e progressão para câncer cervical em mulheres grávidas são comparáveis as observadas em mulheres que não estão grávidas, dessa forma, a gravidez em si não deve ser considerada uma condição de risco (ORIGONI et al., 2014).

O tabagismo é outro fator de risco importante. Existe uma associação positiva com fumantes e ex-fumantes, bem como uma associação linear crescente com o período de tabagismo e o número de cigarros fumados por dia. Quando comparado com mulheres fumantes, mulheres que pararam de fumar por pelo menos 10 anos tem metade do risco de desenvolver câncer cervical (ROURA et al., 2014). Mecanismos propostos para o papel do tabagismo na carcinogênese no colo do útero incluem a indução de um efeito imunossupressor local devido ao comprometimento da resposta imune, o que facilitaria a persistência da infecção (POPPE et al., 1995; SZAREWSKI et al., 2001; HARRIS et al., 2004). Outro possível mecanismo é o dano ao DNA das células cervicais devido a presença de nicotina e outros metabólitos do cigarro no tecido cervical (PROKOPCZYK et al., 1997; KAPEU et al., 2008).

O risco de câncer cervical pode ser aumentado em mulheres com outras infecções sexualmente transmissíveis (ISTs). Mulheres infectadas com *Chlamydia trachomatis* estão associadas com maior risco de câncer cervical. Assume-se que a co-infecção de *Chlamydia trachomatis* e HPV aumentam as chances de tornar a infecção pelo HPV persistente. Além disso, é provável que o resultado da resposta inflamatória esteja associada com a geração de radicais livres, o que contribui, ao menos em parte, para o desenvolvimento de instabilidade genética das células cervicais (CASTELLSAGUÉ et al., 2014; ZHU et al., 2016).

Por fim, outro fator de risco para o câncer cervical é o status socioeconômico, uma vez que mulheres que não têm acesso a serviços de saúde adequados, programas de rastreio e tratamento das lesões pré-cancerosas, estão em maior risco (MCGRAW; FERRANTE, 2014). Existem barreiras ao acesso e utilização dos serviços de prevenção do câncer cervical em países de baixa e média renda, o que é refletido em mais de 85% das mortes por câncer cervical nesses locais (CHIDYAONGA-MASEKO; CHIRWA; MUULA, 2015; TORRE et al., 2015).

2.5 RASTREIO DO CÂNCER CERVICAL

O rastreio do câncer cervical visa detectar alterações pré-cancerosas que, quando não tratadas, tem potencial de progredir para câncer invasivo. Segundo a Organização Mundial da Saúde, o rastreio deve ser realizado ao menos uma vez em mulheres na faixa etária alvo de 30 a 49 anos. Entre os exames recomendados estão o exame citológico, o teste de HPV e a inspeção visual com ácido acético (IVA). Independente da abordagem utilizada, o objetivo é cobrir a maior proporção de mulheres em risco (WHO, 2014).

O rastreio do câncer cervical no Brasil segue o modelo oportunístico e se dá pelo exame citológico em mulheres de 25 a 64 anos. A recomendação para conduta inicial frente aos resultados alterados dos exames citológicos no Brasil está representada no quadro 2. Mulheres infectadas pelo HIV ou com outra forma de imunossupressão devem ser encaminhadas para colposcopia quando apresentarem alterações no resultado citológico, inclusive casos de ASC-US e LSIL. No caso de achados anormais maiores na colposcopia, deve-se realizar a biópsia para avaliação histopatológica. Na presença de NIC I, a paciente deverá voltar a fazer seguimento citológico. Nos demais casos a paciente deve seguir conduta de tratamento específica (INCA, 2016).

Quadro 2 – Recomendações brasileiras para conduta inicial frente aos resultados alterados dos exames citológicos

Diagnóstico citológico	Faixa etária	Conduta inicial
ASC-US	< 25 anos	Repetir citologia em 3 anos
	Entre 25 e 29 anos	Repetir citologia em 12 meses
	≥ 30 anos	Repetir citologia em 6 meses
LSIL	< 25 anos	Repetir citologia em 3 anos
	≥ 25 anos	Repetir citologia em 6 meses
ASC-H	Todas as idades	Encaminhar para colposcopia
AGC		
AIS		
HSIL		
Câncer invasivo		

Fonte: Adaptado das diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer de colo do útero (INCA, 2016).

Legenda: Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US); Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL); Células escamosas atípicas não podendo excluir lesão de alto grau (ASC-H); Células glandulares atípicas (AGC); Adenocarcinoma *in situ* (AIS); Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL).

Apesar de seu sucesso na redução das taxas de incidência e mortalidade do câncer cervical (DICKINSON et al., 2012), o exame citológico tem suas limitações. Os principais problemas são baixa sensibilidade, amostras insatisfatórias, problemas de reprodutibilidade e má interpretação dos diagnósticos. Alternativas como a citologia em base líquida (CBL) foram introduzidas no mercado com o objetivo melhorar a qualidade dos exames citológicos. A CBL é associada a redução de resultados insatisfatórios, possibilidade de realizar outras análises com a solução remanescente e automatização de todo o processo de análise (ROZEMEIJER et al., 2017).

Dada a associação entre tipos oncogênicos de HPV e o câncer cervical (BOSCH et al., 1995; WALBOOMERS et al., 1999), testes de HPV, bem como vacinação contra o vírus, estão sendo incorporados em programas de rastreio de países desenvolvidos como um complemento a citologia ou como uma alternativa mais sensível e com melhor custo-benefício em longo prazo (HOSTE; VOSSAERT; POPPE, 2013). O teste

de HPV, no entanto, tem menor especificidade do que a citologia, principalmente em mulheres mais jovens (< 30 anos) (PILEGGI et al., 2014). Dessa forma, possíveis consequências indesejadas do rastreio primário com testes de HPV incluem diagnóstico de lesões que regrediriam espontaneamente, com conseqüente encaminhamento desnecessário para colposcopia e excesso de tratamento (RONCO; GIORGI ROSSI, 2017).

No Brasil, o tratamento recomendado é chamado de exérese da zona de transformação (EZT), que é um procedimento ambulatorial realizado sob visão colposcópica e anestesia local para excisão do tecido lesionado. Os procedimentos excisionais são denominadas excisões dos tipos 1, 2 ou 3, de acordo com a profundidade do tecido que é determinado pelo tipo de zona de transformação observado na colposcopia (BORNSTEIN et al., 2012). Outras opções de tratamentos incluem a eletrocauterização, a crioterapia e a destruição a laser. Estas técnicas, no entanto, tem a desvantagem de não fornecer informação quanto ao tratamento da totalidade da lesão ou existência de microinvasão ou invasão, pois o tecido é destruído. Dessa forma, esses tipos de tratamentos são recomendados quando não há suspeita de lesão invasiva ou glandular, a lesão é completamente visível e não se estende ao canal endocervical (INCA, 2016).

O tratamento excessivo pode ser particularmente perigoso para mulheres com intenção de ter filhos, pois foi demonstrado que o tratamento de lesões pré-cancerosas em mulheres jovens está associado ao aumento de morbidade obstétrica e neonatal, como parto prematuro e abortos espontâneos (KYRGIU et al., 2006, 2014). Assim, uma parte dessas mulheres poderá desenvolver complicações associadas à gravidez após um tratamento possivelmente desnecessário.

Portanto, o grande desafio permanece em identificar quais lesões vão regredir ou progredir para câncer invasivo, uma vez que o comportamento biológico das lesões pré-cancerosas não pode ser predito com segurança apenas com base nos critérios citológicos, histológicos e clínicos (KUDELA et al., 2016). Dessa forma, um método objetivo e acessível que possa fazer essa predição seria excepcionalmente útil no rastreio do câncer cervical.

2.6 PLOIDIA DO DNA

Ploidia é um termo dado para o número de cromossomos que compõem o genoma de uma célula. Os gametas humanos, por exemplo,

possuem 23 cromossomos, que caracterizam uma quantidade haploide de DNA. A condição em que o número de cromossomos de uma célula é múltiplo da quantidade haploide é chamada de euploidia, que pode ter células com conteúdo diploide ou poliploide de DNA. Células diploides compreendem a maioria das células somáticas humanas e possuem o dobro da quantidade de DNA de uma célula haploide (46 cromossomos). Já em células poliploides, o número de cromossomos excede o número diploide, porém a quantidade ainda é um múltiplo exato do número haploide, como nas células em divisão celular controlada (4x, 8x, 16x, 32x). Células poliploides podem ser normalmente observadas em megacariócitos e também durante a diferenciação tecidual hepática com conteúdo de DNA até 16 vezes superior ao de uma célula haploide (BIESTERFELD et al., 1994; KIERSZENBAUM; TRES, 2016).

A aneuploidia é caracterizada por uma aberração numérica e/ou estrutural no conteúdo de cromossomos que desvia de um múltiplo do conteúdo haploide. A aneuploidia se origina durante a divisão celular quando os cromossomos não se separam adequadamente entre as duas células-filhas o que resulta na perda ou ganho de conteúdo de DNA (BÖCKING; NGUYEN, 2004; ORR; GODEK; COMPTON, 2015). A aneuploidia está presente nas células cancerígenas em geral e no caso do câncer cervical está presente nas lesões precursoras bem como, mais tardiamente, nos tumores invasivos (GARNER, 2014). As alterações severas no conteúdo de DNA dessas células cervicais ocorrem devido à instabilidade cromossômica ocasionada pela atuação de oncoproteínas virais durante a carcinogênese associada ao HPV (DUENSING; MÜNGER, 2002; GIAM; RANCATI, 2015)

2.6.1 Instabilidade cromossômica e aneuploidia

A instabilidade cromossômica é uma forma de instabilidade genômica que se refere à perda da capacidade de uma célula em manter o mesmo número de cromossomos de uma geração para a próxima, o que acarreta em altas taxas de perda e ganho de conteúdo cromossomal. Ela é consequência de mutações em genes envolvidos na replicação do DNA, segregação cromossômica e pontos de controle do ciclo celular. A aneuploidia, uma condição no qual o número total de cromossomos é aumentado ou reduzido quando comparado ao conteúdo haploide de DNA, é uma consequência da instabilidade cromossômica (THOMPSON; BAKHOUM; COMPTON, 2010; POTAPOVA; ZHU; LI, 2013; GIAM; RANCATI, 2015).

No início do século XX, o zoologista e citologista alemão Theodor Boveri inferiu que tumores surgem de células normais que se tornaram aneuploides como resultado de uma mitose aberrante (WEAVER; CLEVELAND, 2006). Atualmente, a instabilidade cromossômica e a aneuploidia são reconhecidas como características comuns de células cancerígenas que frequentemente atuam em conjunto para promover o processo carcinogênico (POTAPOVA; ZHU; LI, 2013; GIAM; RANCATI, 2015).

Na neoplasia cervical, a desregulação da expressão gênica viral e instabilidade genômica do hospedeiro desempenham um papel central na carcinogênese mediada pelo HPV (SENAPATI; SENAPATI; DWIBEDI, 2016). O surgimento de aneuploidia é resultado da ação das oncoproteínas E6 e E7 (TOMMASINO, 2014). Essas alterações induzem anormalidades centrossômicas que levam a erros na segregação cromossômica que, por sua vez, conduz a iniciação e progressão do câncer (DUENSING; MÜNGER, 2001; MITTAL; BANKS, 2017).

Um estudo verificou que a proporção de alterações do DNA é maior em pacientes com câncer do que com NIC 3 e aumenta com o nível de integração. Os autores concluíram que a instabilidade cromossômica inicial pode facilitar a integração do DNA viral, o que potencializa a atividade das oncoproteínas, o que promove crescimento celular e, eventualmente, progressão para câncer invasivo (BODELON et al., 2016).

É aceito que a aneuploidia é um resultado inevitável da instabilidade cromossômica e essa aberração no conteúdo cromossomal pode ser detectada e quantificada usando citometria de DNA (DANIELSEN; PRADHAN; NOVELLI, 2016).

2.7 CITOMETRIA DE IMAGEM DO DNA

A DNA-ICM é um método que mede de forma quantitativa o conteúdo do DNA (GARNER, 2014) e a presença dessas células tem sido utilizada como marcador para identificação de células neoplásicas (HAROSKE et al., 2001; BÖCKING; NGUYEN, 2004; ONOFRE et al., 2008).

Nas lesões pré-cancerosas cervicais, as lesões aneuploides provavelmente persistem ou progridem até a malignidade, enquanto lesões diploides ou poliploides regridem (BOLLMANN et al., 2001; GROTE et al., 2004). A medida da ploidia do DNA tem se mostrado um

marcador fidedigno em avaliar a progressão de lesões pré-cancerosas (BÖCKING; NGUYEN, 2004).

Foi demonstrada em estudos prévios a eficácia da citometria do DNA em conjunto com o teste de HPV em selecionar mulheres com alto risco de progressão para lesões de alto grau e câncer cervical (LORENZATO et al., 2001). No manejo de atipias citológicas, foi verificado que os casos aneuploides com presença de células com conteúdo de DNA acima de $9c$ devem ter uma investigação e acompanhamento mais rigoroso devido a maior probabilidade de progressão para lesões mais graves (BOLLMANN et al., 2003b; LORENZATO et al., 2008). Foi verificada a utilidade em distinguir casos de LSIL de casos de HSIL (BOLLMANN et al., 2001). A DNA-ICM é útil na diferenciação entre lesões progressivas e regressivas em pacientes com diagnóstico de ASC, LSIL e AGC (GROTE et al., 2004). Além disso, em pacientes com resultados conflitantes entre o teste de HPV e a citologia, a ploidia do DNA pode ser usada para selecionar casos com alto risco de progressão para HSIL, especialmente em casos de infecção persistente por HPV (LORENZATO et al., 2002).

2.7.1 Coloração de Feulgen

A reação de Feulgen foi introduzida por Feulgen e Rossenbeck em 1924 como uma coloração específica de DNA. Ela é o padrão ouro para a análise por DNA-ICM e é aceita como um método estequiométrico para a coloração exclusiva do conteúdo de DNA de forma padronizada e reprodutível (BIESTERFELD et al., 2011). Essa reação é um procedimento citoquímico realizado em duas etapas.

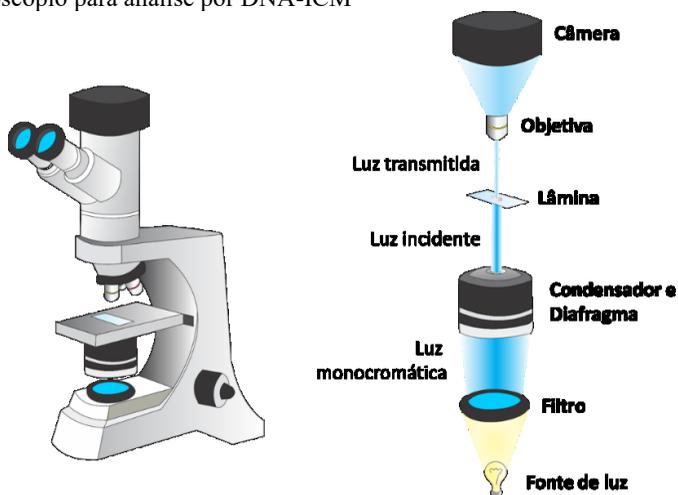
Na primeira etapa, o DNA é submetido a uma hidrólise ácida para separar as bases de purina da cadeia dupla do DNA. Dessa forma, a molécula do DNA se torna apurínica, com grupos aldeídos livres. Na segunda etapa, as células são expostas ao reagente de Schiff. Os grupos aldeídos livres na molécula de DNA apurínica se ligam estequiometricamente a pararosanilina dissolvida no reagente de Schiff, produzindo uma coloração magenta. A pararosanilina é a forma não metilada de uma série de corantes agrupados sob o nome de fucsina básica. Existem outros reagentes que podem substituir a pararosanilina no reagente de Schiff. A *European Society for Analytical Cellular Pathology* (ESACP) recomenda o uso de tionina e pararosanilina (HAROSKE et al., 1998; CHIECO; DERENZINI, 1999; HARDIE; GREGORY; HEBERT, 2002; BIESTERFELD et al., 2011).

2.7.2 Medida do conteúdo de DNA

A medição da quantidade de DNA com DNA-ICM baseia-se na lei de Lambert-Beer, pois a absorvância é proporcional tanto à concentração quanto à espessura do conteúdo nuclear corado pelo método de Feulgen. Durante a análise, o comprimento de onda ideal é selecionado com um filtro ($\sim 560\text{nm}$, próximo do máximo de absorção para o reagente de Schiff) e a luz monocromática passa através da lâmina com a amostra. As medidas são tomadas tanto dentro do núcleo (corado) quanto fora do núcleo (área limpa da lâmina). Parte da luz que passa através do DNA corado é absorvido e o restante da luz transmitida é detectado pelos pixels de uma câmera digital. Portanto, a absorvância é medida de maneira indireta pela transmitância, no qual a diferença de intensidade de luz dentro e fora do núcleo que chega até o sensor da câmera acoplada ao microscópio é utilizada para fazer o cálculo do conteúdo de DNA (HARDIE; GREGORY; HEBERT, 2002) (Figura 15).

A câmera possui um dispositivo de carga acoplada (CCD), que é um sensor normalmente colocado numa posição em que o plano de imagem primário seja formado pela objetiva do microscópio. Esse sensor é subdividido em milhares de minúsculos poços de potencial (pixels) quadrados ou retangulares ($6\text{-}15\mu\text{m}$ por lado), cada um se comporta como uma unidade fotométrica independente que transforma únicos fótons em fotoelétrons. Assim, o total de DNA presente em um núcleo é obtido da soma do DNA medido por cada pixel da imagem daquele núcleo. A ploidia do DNA é expressa em unidades de Densidade Ótica Integrada (DOI) (Figura 16) (BÖCKING; NGUYEN, 2004; CHIECO et al., 2013; GARNER, 2014).

Figura 15 – Modelo esquemático de funcionamento dos componentes do microscópio para análise por DNA-ICM



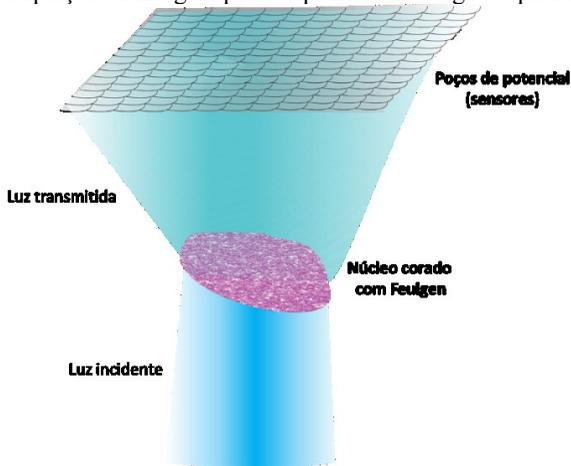
Fonte: Elaborado pela autora (2018)

Notas: Componentes do microscópio necessários para análise por DNA-ICM. A luz monocromática é selecionada após passagem pelo filtro, que em seguida é condensada e passa através das amostras coradas pelo método de Feulgen contidas na lâmina. A imagem é ampliada pela objetiva do microscópio e captada pela câmera do equipamento.

Os núcleos de células de referência são normalmente núcleos diploides do mesmo organismo. Estes podem ser encontrados como núcleos já presentes na preparação em análise (controle interno) ou núcleos diploides isolados de outros tecidos e adicionados a preparação (controle externo). A vantagem de utilizar células de referência interna é o compartilhamento de todas as etapas preparatórias com as células de importância diagnóstica (GIROUD et al., 1998; GROTE et al., 2004; CHIECO et al., 2013).

Os resultados obtidos a partir da análise com DNA-ICM são exibidos como histogramas de DNA. A interpretação dos resultados é feita por meio dos algoritmos preconizados pelo Quarto Consenso ESACP em Diagnóstico por Citometria de Imagem de DNA (HAROSKE et al., 2001; CHIECO et al., 2013).

Figura 16 – Captação da imagem pelo dispositivo de carga acoplada (CCD)



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

Notas: A luz monocromática passa pelo núcleo e é transmitida de acordo com a densidade da coloração de Feulgen, que é proporcional ao conteúdo de DNA nuclear. A luz transmitida é detectada pelos milhares de sensores da câmera, que se comportam como uma unidade fotométrica independente para transformar únicos fótons em fotoelétrons. O total de DNA presente em um núcleo é obtido da soma do DNA medido por cada pixel da imagem daquele núcleo.

Os histogramas de DNA-ICM são expressos em uma escala "c". Na análise, uma população diploide de células na fase G₀/G₁ do ciclo celular é utilizada como referência para o reescalonamento dos valores de DOI. Portanto, o valor modal de DOI dessas células representa o conteúdo 2c de DNA no histograma (BÖCKING; NGUYEN, 2004).

Após a definição da escala de referência, o conteúdo de DNA de demais células de importância diagnóstica pode ser determinado.

Células na fase G₂ do ciclo celular são aquelas que completaram a síntese do DNA e, portanto, possuem o dobro da quantidade normal de material genético de uma célula diploide. Essa poliploidização é chamada de tetraploidia e essas células possuem um conteúdo 4c de DNA. Células poliploides estão em divisão celular controlada e podem possuir conteúdo de DNA de 4c, 8c, 16c, 32c e assim por diante (BIESTERFELD et al., 1994; KIERSZENBAUM; TRES, 2016).

O objetivo do DNA-ICM, no entanto, é identificar células fora dos padrões euploides (diploide ou poliploide) (BÖCKING; NGUYEN, 2004). Sabe-se que a progressão de NIC 1 para NIC2, NIC3 e carcinoma

invasivo está relacionada com o desvio crescente dos histogramas do padrão diploide de DNA. Isso suporta o conceito de que a aneuploidia representa um marcador específico e objetivo de neoplasia cervical e que sua detecção em lesões pré-cancerosas identifica quais delas provavelmente irão progredir para malignidade (HAROSKE et al., 2001; BÖCKING; NGUYEN, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ploidia de DNA em lesões do colo uterino.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Relacionar os resultados da ploidia do DNA com os resultados da citologia de encaminhamento, da histologia e com os dados demográficos das pacientes;

Testar algoritmos utilizando DNA-ICM para identificar lesões pré-cancerosas cervicais;

Avaliar fatores de risco associados com a aneuploidia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Trata-se de um estudo prospectivo transversal, realizado em mulheres que foram atendidas no ambulatório de ginecologia e colposcopia do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) entre abril de 2017 a novembro de 2017. Estas mulheres ao apresentarem alterações citológicas na citologia oncótica de exames prévios, foram encaminhadas ao HU-UFSC para exame ginecológico, colposcopia e biópsia. Foram incluídas neste estudo, todas as pacientes que aceitaram participar do estudo e apresentaram algum tipo de alteração citológica no exame citopatológico do colo uterino (Quadro 3) de acordo com a classificação do Sistema de Bethesda (NAYAR; WILBUR, 2015a). Foram excluídas do estudo mulheres que estavam grávidas no momento do exame ou menores de 18 anos.

Quadro 3 – Alterações citológicas do colo uterino que foram incluídas no estudo

Alteração no exame citopatológico	
Células escamosas	<ul style="list-style-type: none"> • Células escamosas atípicas <ul style="list-style-type: none"> ▪ de significado indeterminado (ASC-US) ▪ não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H) • Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) • Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL)
Células glandulares	<ul style="list-style-type: none"> • Células glandulares atípicas (AGC) endocervicais • Adenocarcinoma <i>in situ</i> (AIS)

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UFSC (ANEXO A), protocolo número 57423616.3.0000.0121. Toda paciente participante foi previamente abordada e informada acerca dos objetivos do estudo. Aquelas que aceitaram participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido (TCLE) (ANEXO B) e posteriormente responderam a um questionário epidemiológico (ANEXO C).

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As mulheres selecionadas foram submetidas a exame ginecológico, colposcópico e biópsia. No momento do exame ginecológico, foram coletadas amostras citológicas com espátula de Ayre e escova endocervical para a execução de citologia em base líquida e da citometria do DNA. As amostras foram armazenadas em solução ThinPrep® PreservCyt® (Hologic Inc. Massachusetts, EUA), enviadas ao Laboratório de Citologia Clínica da UFSC e posteriormente processadas para a confecção das lâminas. Nas mulheres que possuíam lesões evidentes na colposcopia, foi realizada a biópsia e encaminhada ao setor de patologia do HU-UFSC.

4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E CITOLOGIA EM BASE LÍQUIDA

As amostras coletadas em solução ThinPrep® PreservCyt® foram armazenadas em geladeira pelo período de até seis semanas antes do processamento. No momento de serem processadas, as amostras foram retiradas da geladeira para atingirem a temperatura ambiente. Cada frasco foi agitado manualmente e 14 ml da amostra foram transferidos para um tubo de centrifugação de fundo cônico do tipo Falcon estéril. Os tubos foram centrifugados a uma velocidade e tempo de rotação de 1800 rpm por 5 minutos, respectivamente. Após a centrifugação, 2 ml do sobrenadante e 15µl do sedimento foram transferidos para um tubo de ensaio. A suspensão de células contida no tubo de ensaio foi utilizada para a preparação das lâminas citológicas. O restante da amostra foi devolvido para o frasco de ThinPrep® PreservCyt®.

As lâminas citológicas foram preparadas por meio do sistema de citocentrífuga semi-automatizado Cellspin® I (Tharmac GmbH, Waldsolms, Alemanha), que tem por função produzir uma monocamada de células em uma área definida da lâmina usando força centrífuga. O volume de amostra utilizado para a citocentrifugação foi de 2 ml e a velocidade e tempo de rotação foram de 1800 rpm por 5 minutos, respectivamente. Durante esse processo, o excesso de amostra é coletado em um filtro e as células são transferidas para a lâmina de vidro de

maneira a criar uma fina camada celular satisfatória e sem sobreposições numa área retangular de 22 x 15 mm (THARMAC, 2010).

Após a citocentrifugação, as lâminas foram secas ao ar e posteriormente submetidas à coloração pelo método clássico de Papanicolaou (KOSS; MELAMED, 2005).

4.3.1 Coloração de Papanicolaou

A coloração de Papanicolaou iniciou-se com a imersão das lâminas em etanol 99,5%. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada por 2 minutos, coradas em solução de hematoxilina de Harris 1a (Merck, Darmstadt, Nr: 1.09253.1022) por 1 minuto e 30 segundos e lavadas em água corrente por 3 minutos. Após duas baterias de etanol 99,5% (2 e 1 minuto, respectivamente), as lâminas foram coradas em solução Orange G 2a (Merck, Darmstadt, Nr: 1.06888.0500) por 10 segundos, imersas duas vezes em etanol 99,5% (2 e 1 minuto, respectivamente), coradas em solução EA 50 (Merck, Darmstadt, Nr: HT40332-1L) por 4 minutos e imersas duas vezes em etanol 99,5% (2 e 1 minuto, respectivamente). Em seguida, as lâminas foram banhadas em etanol/xilol (1:1) por 1 minuto e 30 segundos e imersas em xilol por 2 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas com Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha, Nr:1.07961.0100) e lamínula.

As lâminas coradas pelo método de Papanicolaou foram examinadas por meio de microscopia de luz para verificar a celularidade da amostra e a presença de células atípicas para aplicação da citometria de DNA. Após análise citológica, as lâminas foram imersas em xilol até a completa remoção das lamínulas para posterior coloração de Feulgen.

4.4 CITOMETRIA DE IMAGEM DO DNA

4.4.1 Coloração de Feulgen

A coloração de Feulgen foi realizada segundo Feulgen e Rossenbeck (1924) com algumas modificações (BIESTERFELD et al., 2011). Iniciou-se com a imersão das lâminas em xilol por pelo menos 15 minutos até completa remoção das lamínulas. Em seguida, as lâminas foram imersas em etanol 99,5% (5 minutos) e etanol 96% (5 minutos), e posteriormente foram imersas em formalina tamponada 10% por 50 minutos. Após duas lavagens em água destilada (10 e 5 minutos, respectivamente), as lâminas foram mantidas em HCL 5N a 27°C durante

60 minutos sendo, posteriormente lavadas em água destilada por três vezes (2 minutos cada). Em seguida, elas foram banhadas em reagente de Schiff (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha, Nr:1.09033.0500) por 60 minutos e em uma bateria de $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por três vezes (5 minutos cada), lavadas em água destilada por duas vezes (1 minuto cada), desidratadas por uma bateria de etanol (70%, 96% e 99,5%, 3 minutos cada) e finalizadas em xilol por 15 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas com Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha, Nr:1.07961.0100) e lamínula.

As lâminas montadas foram armazenadas ao abrigo da luz até o momento da medição do conteúdo de DNA.

4.4.2 Medição do conteúdo de DNA

As medições dos conteúdos de DNA foram realizadas utilizando-se o sistema de análise de imagem *MotiCyte DNA Cytology Work Station* (Motic, Xiamen, China), que consiste de um computador acoplado a um microscópio Motic BA410™, com câmera de vídeo colorida Moticam Pro 285A™ (1.4 megapixels, 1360 x 1024 pixels). O software utilizado no presente estudo foi o *MotiCyte* versão 2 (Motic, Xiamen, China) (Figura 17).

Figura 17 – Sistema de análise de DNA-ICM



Fonte: Foto retirada pela autora (2018).

Notas: Células selecionadas com o software do equipamento após captura da imagem por meio da câmera acoplada ao microscópio.

Foram selecionadas no mínimo 30 células de referência em cada lâmina. As células de referência possuem um conteúdo de DNA

conhecido e são utilizadas para o reescalonamento dos valores de DOI, que são valores arbitrários, para a escala de referência (2c, 4c, 8c). O coeficiente de variação (CV) entre as células de referência não deve ser maior do que 5% (GIROUD et al., 1998; BÖCKING; NGUYEN, 2004).

Mais de 300 células de análise para cada lâmina foram selecionadas. As células com morfologia nuclear suspeita (núcleo aumentado, coloração mais intensa), foram arbitrariamente incluídas na análise devido a sua relevância. Os valores de DOI obtidos a partir das células de análise foram representados em forma de histograma.

O Quadro 4 traz uma relação explicativa dos termos técnicos utilizados na técnica da DNA-ICM.

Quadro 4 – Definição dos termos técnicos básicos da citometria de imagem do DNA

Histograma de DNA	Representa a frequência da distribuição dos valores de densidade ótica integrada (DOI) obtidos pelas medições citométricas das células com seus DNAs corados estequiometricamente e reescalados pela DOI a partir de células de referência em unidades “c”
Pico do histograma de DNA	Alcance estatisticamente significativo num histograma de DNA
DNA <i>stemline</i>	Representa uma população proliferativa de células com um padrão cromossomal único. Uma <i>stemline</i> é a fração da fase G ₀ /G ₁ , cujo o segundo pico é o dobro do primeiro
DNA euploide	DNA euploide representa o tipo de distribuição de DNA que não pode ser diferenciada da população normal de células
DNA aneuploide	Referente ao tipo de distribuição de DNA que é estatisticamente diferente da população de células considerada normal
DNA diploide	DNA diploide refere-se ao tipo de histograma de DNA euploide que se apresenta como o equivalente de uma população de células somáticas humanas na fase G ₀ /G ₁ do ciclo celular
Poliploidização	Refere-se à progressão repetitiva de um conteúdo de DNA euploide (x2, x4, x8, etc...)

Fonte: Adaptado de Haroske e colaboradores (2001)

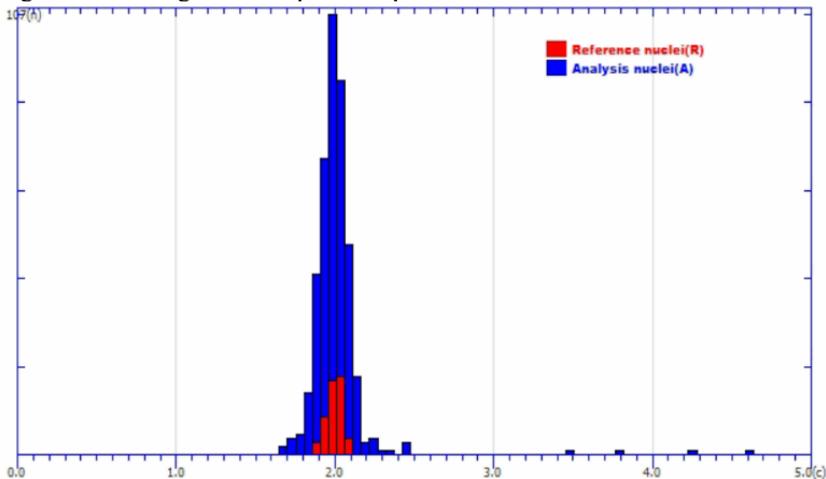
Para que os padrões de desempenho da análise por DNA-ICM sejam alcançados com uma probabilidade de erro de $p < 0,05$ (HAROSKE et al., 1997), as análises estatísticas aplicadas a DNA-ICM requerem o seguinte desempenho:

- O CV da razão entre os valores modais de DOI de células de referência e células não patológicas na fase G_0/G_1 deve ser $< 5\%$;
- O erro padrão relativo ($rSEM = CV/\sqrt{n}$) das células de referência em cada amostra deve ser $< 1,5\%$.

Uma DNA *stemline* poderá ser identificada como diploide se ela estiver dentro da fração da fase G_0/G_1 do ciclo celular ($2c$) (Figura 18). Além disso, uma DNA *stemline* poderá ser identificada como poliploide (Figura 19) dentro de uma posição de duplicação da fração da fase $G_0/G_1 \pm 0,2c$ (em $4c$) e $\pm 0,4c$ (em $8c$), respectivamente, com probabilidade de erro de $p < 0,05$ se:

- O CV das razões entre os valores modais de DOI de células não patológicas nas frações das fases G_0/G_1 e G_2/M em uma série de medidas for $< 2,5\%$.

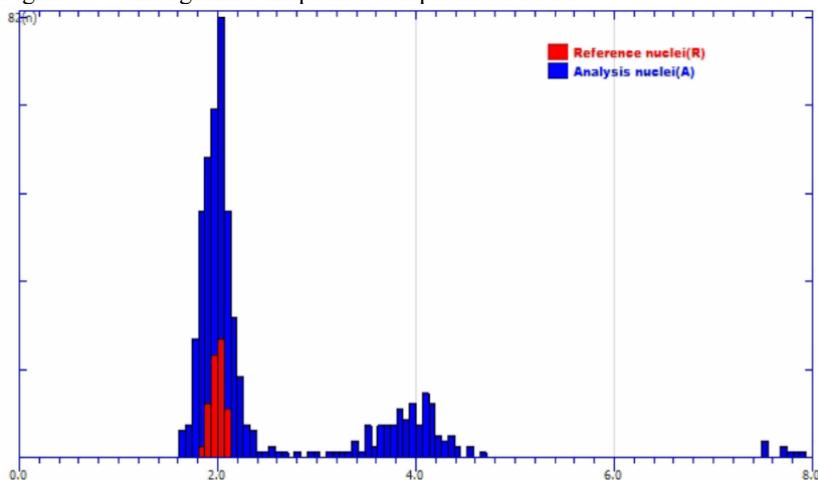
Figura 18 – Histograma com padrão diploide de DNA



Fonte: Histograma elaborado pela autora com o software *MotiCyte DNA Cytology Work Station*.

Notas: Histograma de DNA mostrando um padrão euploide de DNA (*stemline* em $2c$). Núcleos de referência (R) em vermelho e núcleos em análise (A) em azul.

Figura 19 – Histograma com padrão tetraploide de DNA



Fonte: Histograma elaborado pela autora com o software *MotiCyte DNA Cytology Work Station*.

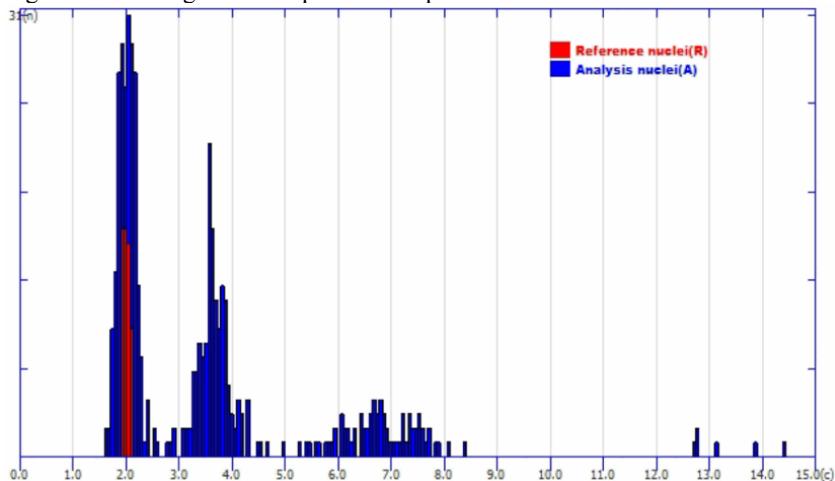
Notas: Histograma de DNA mostrando um padrão tetraploide de DNA (*stemlines* em 2c e 4c). Núcleos de referência (R) em vermelho e núcleos em análise (A) em azul.

Após o cumprimento desses padrões de desempenho, os resultados obtidos a partir dos histogramas gerados foram analisados pelo software da *MotiCyte DNA Cytology Work Station* (Motic, Xiamen, China) e a interpretação dos resultados foi realizada de acordo com os princípios e diretrizes estabelecidas pelo Quarto Consenso da ESACP em Diagnóstico por Citometria de Imagem de DNA (HAROSKE et al., 2001).

4.4.3 Algoritmos para determinação de aneuploidia segundo a ESACP

O DNA *stemline* aneuploide é caracterizado se o valor modal da *stemline* for menor que 1,80c ou maior que 2,20c e menor que 3,60c ou maior que 4,40c. Eventos raros de DNA incluíram os eventos excedendo 9cEE (Figura 20). Aneuploidia por eventos raros é determinada como ao menos uma célula por lâmina em análise com conteúdo de DNA superior a 9c (BÖCKING; NGUYEN, 2004). Eventos raros com poliploidia acima de 9c, como em 16c e 32c ($\pm 12.5\%$) foram considerados euploides para evitar diagnósticos falso-positivos (CHATELAIN et al., 1989).

Figura 20 – Histograma com padrão aneuploide de DNA



Fonte: Histograma elaborado pela autora com o software *MotiCyte DNA Cytology Work Station*.

Notas: Histograma de DNA mostrando um padrão aneuploide de DNA (*stemlines* em 2c, 6.7c e 7.4c; Eventos excedendo 9c = 6). Núcleos de referência (R) em vermelho e núcleos em análise (A) em azul.

4.4.4 Avaliação de eventos de DNA excedendo 5c

O algoritmo de eventos de DNA excedendo 5c foi investigado com o objetivo de estudar sua relação com as lesões pré-cancerosas cervicais que necessitam de intervenção de acordo com as diretrizes brasileiras de rastreamento do câncer de colo do útero (INCA, 2016). Para isso, uma curva característica de operação do receptor (ROC) foi utilizada para calcular os valores de sensibilidade e especificidade para identificar lesões histológicas de NIC 2+ (NIC 2, NIC 3, CCE, AIS ou AC) de acordo com o número de 5cEE por lâmina. Lesões que não necessitam de intervenção foram determinadas como NIC 1 ou negativo na biópsia.

4.5 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE LESÕES PRÉ CANCEROSAS CERVICAIS E PLOIDIA DO DNA

Os resultados da citologia oncológica e do padrão ouro diagnóstico (histologia) foram relacionados com os resultados da ploidia do DNA para avaliar o comportamento de lesões escamosas atípicas como ASC-

US e ASC-H, de lesões escamosas de baixo grau e de alto grau e de atipias glandulares como AGC e AIS quanto ao conteúdo de DNA.

4.6 AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS COM A ANEUPLOIDIA

Foram avaliados os fatores de risco associados com o resultado de aneuploidia utilizando um modelo de regressão logística. Esse método estatístico é utilizado para estimar a probabilidade da ocorrência de um desfecho categórico binário (variável dependente) em função de diferentes fatores (variáveis independentes) (DOMÍNGUEZ-ALMENDROS; BENÍTEZ-PAREJO; GONZALEZ-RAMIREZ, 2011).

As variáveis independentes foram os dados coletados a partir do questionário epidemiológico de cada paciente (ANEXO C): idade, hábito de fumar, ISTs prévias, método anticoncepcional e número de gestações. Neste estudo foi avaliada a influência que cada variável independente tem sobre a variável dependente binária (euploidia ou aneuploidia).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação dos fatores de risco associados com a aneuploidia foi analisada por regressão logística. Demais variáveis categóricas foram analisadas pelo teste de χ^2 de Pearson ou teste exato de Fischer quando apropriado. A curva ROC foi utilizada para determinar valores de ponto de corte. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As compilações dos dados e análises estatísticas foram realizadas por meio do software IBM® SPSS *Statistics* versão 22.0 (IMB corp., New York, EUA).

4.7.1 Cálculo amostral

Para o cálculo do tamanho da amostra esperada para o estudo foi utilizada a seguinte fórmula (1) para descrição de variáveis qualitativas em uma população (MIOT, 2011):

$$n = \frac{N.p.q.(Z\alpha/2)^2}{(N-1).(E)^2 + p.q.(Z\alpha/2)^2} \quad (1)$$

no qual, n = tamanho da amostra; $Z_{\alpha/2}$ = valor crítico para o grau de confiança desejado, usualmente 1,96 (95%); E = erro padrão, usualmente $\pm 5\%$ da proporção dos casos (precisão absoluta); N = tamanho da população (finita); p = proporção de resultados favoráveis da variável na população; q = proporção de resultados desfavoráveis na população ($q=1-p$).

Para a determinação do tamanho da população finita e da proporção dos resultados favoráveis (atípias cervicais) a base de dados DATASUS foi consultada quanto a informações sobre os exames citopatológicos cérvico-vaginais realizados no estado de Santa Catarina durante um período total de 8 meses, proporcional ao período de abril de 2017 a novembro de 2017. Foram selecionados os resultados do número total de exames realizados, resultados de ASC-US, ASC-H, AGC, AIS, LSIL e HSIL. Foi realizada uma média dos valores obtidos referentes ao período de 8 meses dos anos de 2011, 2012 e 2013 (DATASUS, 2017).

No período de 8 meses são realizados uma média de 225.668 exames em Santa Catarina. Nesse mesmo período, são diagnosticados 2.364 ASC-US (1,05%), 625 ASC-H (0,28%), 176 AGC-SOE (0,08%), 51 AGC-possivelmente neoplásico (0,02%), 1.124 LSIL (0,5%) e 439 HSIL (0,19%).

O valor crítico para o grau de confiança desejado foi considerado como sendo 1,96 (95%) e o erro padrão (E) foi considerado como sendo de 5%. Esses e os demais valores populacionais encontrados no DATASUS foram aplicados na fórmula para calcular o tamanho da amostra.

No período do estudo, são esperadas 16 amostras de ASC-US, 5 amostras de ASC-H, 8 amostras de LSIL e 3 amostras de HSIL. As categorias de atípias glandulares foram consideradas em conjunto devido à baixa prevalência, sendo esperadas 2 amostras.

5 RESULTADOS

No período de abril de 2017 a novembro de 2017, 70 pacientes atendidas no HU-UFSC foram incluídas no estudo. Estas pacientes possuíam como citologia de encaminhamento ASC-US (12 casos), ASC-H (11 casos), AGC (2 casos), LSIL (20 casos) e HSIL (25 casos) justificando o encaminhamento para o exame ginecológico e colposcópico.

Segundo o cálculo amostral, o número mínimo esperado de pacientes com resultados citológicos de ASC-H, AGC, LSIL e HSIL foram obtidos. A única exceção foi para o resultado de ASC-US, no qual o número mínimo calculado foi de 16 e somente 12 pacientes foram incluídas no estudo.

A média em dias entre a citologia de encaminhamento e a coleta da nova amostra no HU-UFSC foi de 83,4 dias. O menor intervalo entre as duas consultas foi de 11 dias e o maior intervalo foi de 365 dias.

A análise das amostras histológicas pelo setor de patologia do HU-UFSC, revelou pacientes com resultado negativo (12 casos), NIC 1 (11 casos), NIC 2 (23 casos), NIC 3 (13 casos), CCE (1 caso), AIS (1 caso) e AC (1 caso) (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação entre citologias de encaminhamento e resultado histológico.

Histologia	Citologia de encaminhamento					Total (%)
	ASC-US	ASC-H	AGC	LSIL	HSIL	
Sem lesão	3	3	-	3	3	12 (17,1)
NIC 1	-	1	-	9	1	11 (15,7)
NIC 2	3	5	-	4	11	23 (32,9)
NIC 3	1	1	1	2	8	13 (18,6)
CCE	-	-	1	-	-	1 (1,4)
AIS	-	-	-	-	1	1 (1,4)
AC	1	-	-	-	-	1 (1,4)
BNR	4	1	-	2	1	8 (11,4)
Total (%)	12 (17,1)	11 (15,7)	2 (2,9)	20 (28,6)	25 (35,7)	70 (100)

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Legenda: Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US); Células escamosas atípicas não podendo excluir lesão de alto grau (ASC-H); Células glandulares atípicas (AGC); Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL); Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL); Neoplasia intraepitelial cervical (NIC); Carcinoma de células escamosas (CCE); Adenocarcinoma *in situ* (AIS); Adenocarcinoma (AC); Biópsia não realizada (BNR).

Entre os 12 resultados histológicos sem lesão, 8 casos eram de cervicite crônica, 2 de HPV juntamente com cervicite crônica, 1 de condiloma acuminado e 1 de metaplasia escamosa. Entre os 11 resultados histológicos de NIC 1, 9 casos (81,8%) tiveram LSIL como citologia de encaminhamento. Dos 36 resultados histológicos de NIC 2 (23 casos) e NIC 3 (13 casos), 19 casos (52,8%) foram encaminhados citologicamente como HSIL. Entre os 39 resultados histológicos de NIC 2+ (NIC 2, NIC 3, CCE, AIS ou AC), 20 casos (51,3%) foram encaminhados citologicamente como HSIL, 6 casos (15,4%) como LSIL e 13 casos (33,3%) como atipia escamosa (ASC-US e ASC-H) ou atipia glandular (AGC). Entre esses resultados citológicos de atipias, AGC contribuiu com 5,1% dos encaminhamentos, ASC-US com 12,8% e ASC-H com 15,4%.

A biópsia não foi coletada em 8 pacientes devido a achados normais no colo do útero ou julgamento de amostra insatisfatória para biópsia durante o exame colposcópico. Estas pacientes possuíam como citologia de encaminhamento: ASC-US (4 casos), ASC-H (1 caso), LSIL (2 casos) e HSIL (1 caso). Esses resultados citológicos sem confirmação histológica não foram incluídos no restante das análises.

DNA-ICM foi realizada nas 62 pacientes que possuíam resultado histológico e de forma geral, a análise identificou 26 casos (41,9%) euploides e 36 casos (58,1%) aneuploides (Tabela 2).

Tabela 2 – Relação entre resultados da citologia de encaminhamento e da ploidia de DNA

Citologia de encaminhamento	N	Ploidia de DNA	
		Euploide (%)	Aneuploide (%)
ASC-US	8	5 (62,5)	3 (37,5)
ASC-H	10	6 (60,0)	4 (40,0)
AGC	2	0 (0)	2 (100)
LSIL	18	11 (61,1)	7 (38,9)
HSIL	24	4 (16,7)	20 (83,3)
Total	62	26 (41,9)	36 (58,1)

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Legenda: Número de casos (N); Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US); Células escamosas atípicas não podendo excluir lesão de alto grau (ASC-H); Células glandulares atípicas (AGC); Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL); Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL).

De acordo com os resultados citológicos representados na tabela 2, oito casos foram interpretados citologicamente como ASC-US. Destes, três obtiveram resultado aneuploide (dois casos diagnosticados

histologicamente como NIC 2 e um caso diagnosticados histologicamente como AC na biópsia). Dos 10 casos de ASC-H, quatro casos diagnosticados histologicamente como NIC 2 eram aneuploides. De 2 casos citologicamente confirmados como AGC, um caso foi confirmado na biópsia como NIC 3 e o outro como CCE, ambos aneuploides. De 18 casos interpretados citologicamente como LSIL, sete eram aneuploides (um caso sem lesão histológica, três casos diagnosticados histologicamente como NIC 1, um caso como NIC 2 e dois casos como NIC 3). Por fim, 24 casos foram interpretados na citologia oncótica como HSIL. Aneuploidia foi identificada em vinte casos, dos quais um caso foi negativo na biópsia, dez casos foram diagnosticados histologicamente como NIC 2, oito casos como NIC 3 e um caso como AIS.

Dos resultados histológicos (Tabela 3), aneuploidia foi identificada em 16,7% dos casos negativos para lesão pré-cancerosa, 27,3% dos casos de NIC 1, 73,9% dos casos de NIC 2, 84,6% dos casos de NIC 3 e em 100% dos casos de CCE, AIS e AC.

Tabela 3 – Relação entre resultados da histologia e da ploidia de DNA

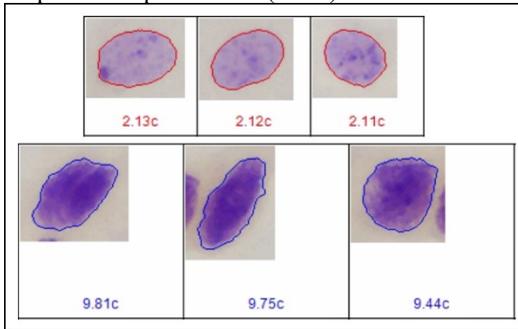
Resultado histológico	N	Ploidia	
		Euploide (%)	Aneuploide (%)
Sem lesão	12	10 (83,3)	2 (16,7)
NIC 1	11	8 (72,2)	3 (27,3)
NIC 2	23	6 (26,1)	17 (73,9)
NIC 3	13	2 (15,4)	11 (84,6)
CCE	1	0 (0)	1 (100)
AIS	1	0 (0)	1 (100)
AC	1	0 (0)	1 (100)
Total	62	26 (41,9)	36 (58,1)

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Legenda: Número de casos (N); Neoplasia intraepitelial cervical (NIC); Carcinoma de células escamosas (CCE); Adenocarcinoma *in situ* (AIS); Adenocarcinoma (AC).

Dos 12 casos negativos na histologia, 2 (16,7%) casos demonstraram resultado aneuploide. O primeiro caso (paciente 41) foi encaminhado como LSIL e foi diagnosticado histologicamente como cervicite crônica. Aneuploidia foi caracterizada devido a 3 eventos excedendo 9c (figura 21). O segundo caso (paciente 60) foi encaminhado como HSIL e a biópsia revelou cervicite crônica. Foram observados 23 eventos excedendo 9c (figura 22) e *stemline* aneuploide em 5.5c (figura 23) nesse caso.

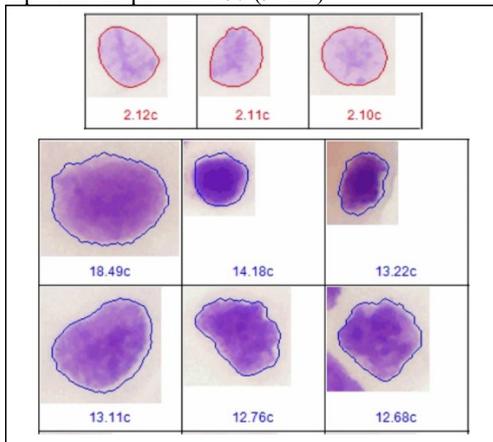
Figura 21 – Aneuploidia na paciente 41 (9cEE)



Fonte: Células selecionadas com o software *MotiCyte DNA Cytology Work Station*.

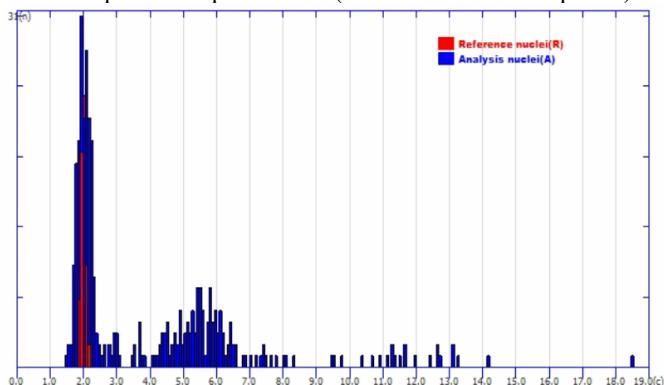
Notas: Células na parte superior da imagem circuladas de vermelho (células de referência); Células na parte inferior da imagem circuladas em azul (células de análise), 3 eventos excedendo 9c.

Figura 22 – Aneuploidia na paciente 60 (9cEE)



Fonte: Células selecionadas com o software *MotiCyte DNA Cytology Work Station*.

Notas: Células na parte superior da imagem circuladas de vermelho (células de referência); Células na parte inferior da imagem circuladas em azul (células de análise), 6 de 23 eventos excedendo 9c.

Figura 23 – Aneuploidia no paciente 60 (9cEE e *stemline* aneuploide)

Fonte: Histograma elaborado pela autora com o software *MotiCyte DNA Cytology Work Station*.

Notas: Histograma de DNA mostrando um padrão aneuploide de DNA (*stemlines* em 2c e 5.5c; eventos excedendo 9c = 23). Núcleos de referência (R) em vermelho e núcleos em análise (A) em azul.

A tabela 4 apresenta os resultados histológicos e a distribuição de algoritmos utilizados em DNA-ICM. O algoritmo de 9cEE foi observado em 33 (91,7%) dos 36 casos aneuploides, já o algoritmo de *stemline* aneuploide foi observado em 29 (80,6%) e os dois algoritmos combinados foi observado em 25 (69,4%) de todos os casos aneuploides.

Tabela 4 – Resultados histológicos e distribuição dos algoritmos utilizados em DNA-ICM

Resultado histológico	N	Aneuploidia de DNA			Total de aneuploidia (%)
		STL aneuploide (%)	9cEE (%)	STL aneuploide e 9cEE (%)	
Sem lesão	12	1 (8,3)	2 (16,7)	1 (8,3)	2 (16,7)
NIC 1	11	2 (18,2)	3 (27,3)	1 (9,1)	3 (27,3)
NIC 2	23	12 (52,2)	16 (69,6)	11 (47,8)	17 (73,9)
NIC 3	13	11 (84,6)	11 (84,6)	11 (84,6)	11 (84,6)
CCE	1	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
AIS	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
AC	1	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Total	62	29 (46,8)	33 (53,2)	25 (40,3)	36 (58,1)

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Legenda: Número de casos (N); Citometria de imagem do DNA (DNA-ICM); Neoplasia intraepitelial cervical (NIC); Carcinoma escamoso (CCE); Adenocarcinoma *in situ* (AIS); Adenocarcinoma (AC); *Stemline* (STL); Eventos excedendo 9c (9cEE).

A relação entre os valores de 5cEE e os resultados histológicos são comparados na tabela 5. Entre os resultados histológicos sem lesão, 1 ou 2 eventos excedendo 5c foram detectados em 50% ou mais dos resultados. O algoritmo de 3 ou 4 eventos excedendo 5c acarretou em uma quantidade menor de resultados falso-positivos nos casos sem lesão na histologia. Dos resultados de NIC 1, o algoritmo de 3 ou 4 eventos excedendo 5c obteve a mesma proporção de resultados positivos quando comparado a aneuploidia definida pela ESACP, já o algoritmo de 1 ou 2 eventos excedendo 5c identificou uma proporção maior de resultados positivos em NIC 1 quando comparado ao resultado aneuploide. Os algoritmos utilizando 1, 2, 3 ou 4 eventos excedendo 5c foram mais eficazes em detectar casos de NIC 2 do que os algoritmos estabelecidos pela ESACP para identificar aneuploidia. As proporções de identificação dos casos de NIC 3, CCE AIS e AC foram as mesmas para os algoritmos utilizando 5cEE ou aneuploidia determinada pela ESACP, com exceção do algoritmo de 4 eventos excedendo 5c, que não foi capaz de identificar um caso de CCE que possuía somente 3 eventos acima de 5c.

Tabela 5 – Resultados histológicos e algoritmo de 5cEE

Resultado histológico	N	Eventos excedendo 5C				Total de aneuploidia (%)
		1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	
Sem lesão	12	9 (75,0)	6 (50,0)	4 (33,3)	3 (25,0)	2 (16,7)
NIC 1	11	8 (72,2)	4 (36,4)	3 (27,3)	3 (27,3)	3 (27,3)
NIC 2	23	22 (95,7)	21 (91,3)	19 (82,6)	18 (78,3)	17 (73,9)
NIC 3	13	11 (84,6)	11 (84,6)	11 (84,6)	11 (84,6)	11 (84,6)
CCE	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	1 (100)
AIS	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
AC	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Total	62	53 (85,5)	45 (72,6)	40 (64,5)	37 (59,7)	36 (58,1)

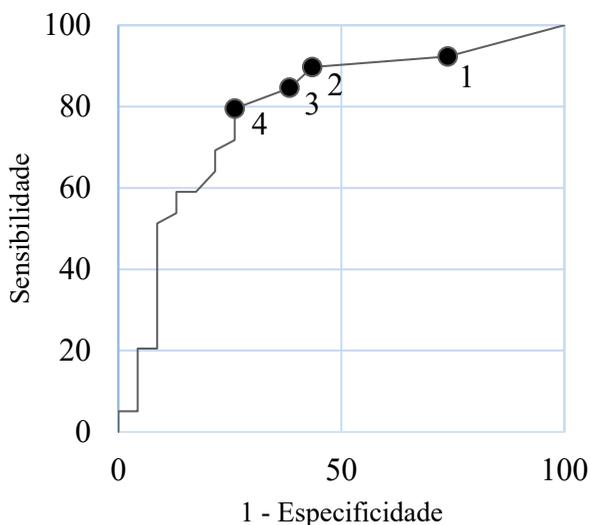
Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Legenda: Número de casos (N); Citometria de imagem do DNA (DNA-ICM); Neoplasia intraepitelial cervical (NIC); Carcinoma escamoso (CCE);

Adenocarcinoma *in situ* (AIS); Adenocarcinoma (AC); *Stemline* (STL); Eventos excedendo 5c (5cEE).

A figura 24 representa a curva ROC para determinar o valor de ponto de corte de 5cEE para identificar lesões que necessitam de intervenção (NIC 2, NIC 3, AIS, AC e CCE) de acordo com as diretrizes brasileiras atuais para rastreamento de câncer de colo do útero (INCA, 2016). Os pontos de corte de 5cEE por lâmina com seus respectivos valores de sensibilidade e especificidade foram calculados (Tabela 6).

Figura 24 – Curva ROC com sensibilidade e especificidade do algoritmo de 5cEE para identificar lesões cervicais que necessitam de intervenção



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Notas: O número de 5cEE foi contabilizado em cada uma das 62 pacientes. Os pontos destacados são para 1, 2, 3 e 4 eventos excedendo 5c. Lesões que necessitam de intervenção foram determinadas como NIC 2, NIC 3, AIS, AC e CCE. Lesões que não necessitam de intervenção foram determinadas como NIC 1 ou negativo na biópsia. AUC: 0,793; Intervalo de confiança 95%: 0,670 a 0,915; Erro padrão: 0,062; p: 0,000.

Legenda: Característica de operação do receptor (ROC); Eventos excedendo 5c (5cEE); Neoplasia intraepitelial cervical (NIC), Adenocarcinoma *in situ* (AIS); Adenocarcinoma (AC); Carcinoma de células escamosas (CCE); Área sobre a curva (AUC).

De acordo com a determinação dos pontos de corte, 1 evento excedendo 5c em uma lâmina possui sensibilidade de 92,3% para identificar lesões que necessitam de intervenção. Porém, esse algoritmo acarreta em um valor muito alto de resultados falso-positivos, com especificidade de apenas 26,1%. Os demais algoritmos de 2, 3 ou 4 eventos excedendo 5c apresentaram valores crescentes de especificidade (56,5%, 65,2% e 73,9%, respectivamente), porém, valores decrescentes de sensibilidade (89,7%, 84,7% e 79,5%, respectivamente). A área sobre a curva (AUC) foi de 0,793.

Tabela 6 – Pontos de corte de 5cEE para identificar lesões que necessitam de intervenção

5cEE	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
1	92,3	26,1
2	89,7	56,5
3	84,6	65,2
4	79,5	73,9

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

A relação dos 70 resultados de citologia oncótica, histologia e ploidia pode ser verificado no quadro 5.

Quadro 5 – Relação entre resultados citológicos, histológicos e ploidia (continua).

Paciente	Citologia	Histologia	5cEE	9cEE	STL aneuploide	Ploidia
1	LSIL	NIC 2	2	0	-	Euploide
2	HSIL	AIS	22	1	5.82c	Aneuploide
3	HSIL	NIC 1	0	0	-	Euploide
4	AGC	CCE	3	0	3.55c	Aneuploide
5	LSIL	NIC 2	3	0	-	Euploide
6	LSIL	NIC 1	20	0	-	Euploide
7	HSIL	NIC 3	101	13	3.54c; 4.74c; 5.65c; 7.00c	Aneuploide
8	LSIL	Cervicite crônica	0	0	-	Euploide
9	ASC-H	NIC 2	7	0	3.40c	Aneuploide
10	LSIL	NIC 3	52	2	3.03c; 6.17c	Aneuploide

Quadro 5 – Relação entre resultados citológicos, histológicos e ploidia (continuação).

Paciente	Citologia	Histologia	5cEE	9cEE	STL aneuploide	Ploidia
11	ASC-US	NIC 3	0	0	-	Euploide
12	LSIL	NIC 1	1	0	-	Euploide
13	ASC-H	Cervicite crônica	1	0	-	Euploide
14	HSIL	NIC 3	8	2	2.43c; 4.58c	Aneuploide
15	ASC-H	NIC 2	97	7	8.32c	Aneuploide
16	ASC-US	NIC 2	2	1	-	Aneuploide
17	ASC-US	Não realizado	-	-	-	-
18	ASC-H	NIC 2	92	7	3.07c; 6.31c; 7.65c	Aneuploide
19	LSIL	NIC 2	45	2	3.48c; 6.47c	Aneuploide
20	LSIL	NIC 1	0	0	-	Euploide
21	ASC-H	NIC 2	25	3	-	Aneuploide
22	HSIL	NIC 2	102	14	7.20c	Aneuploide
23	HSIL	NIC 2	19	2	3.31c	Aneuploide
24	HSIL	NIC 3	28	12	4.49c	Aneuploide
25	LSIL	NIC 3	19	2	3.09c; 3.33c	Aneuploide
26	ASC-US	HPV+ cervicite crônica	2	0	-	Euploide
27	LSIL	HPV+ cervicite crônica	1	0	-	Euploide
28	ASC-US	NIC 2	1	0	-	Euploide
29	HSIL	NIC 2	42	1	5.15c	Aneuploide
30	ASC-H	NIC 2	0	0	-	Euploide
31	AGC	NIC 3	103	16	4.85c; 5.60c	Aneuploide
32	HSIL	Cervicite crônica	8	0	-	Euploide
33	ASC-US	Condiloma acuminado	0	0	-	Euploide
34	LSIL	NIC 1	1	0	-	Euploide
35	HSIL	NIC 2	39	4	3.51c	Aneuploide

Quadro 5 – Relação entre resultados citológicos, histológicos e ploidia (continuação).

Paciente	Citologia	Histologia	5cEE	9cEE	STL aneuploide	Ploidia
36	HSIL	NIC 2	12	4	-	Aneuploide
37	ASC-H	Não realizado	-	-	-	-
38	HSIL	NIC 3	68	3	3.19c; 3.42c; 5.58c; 6.61c	Aneuploide
39	HSIL	Metaplasia escamosa	3	0	-	Euploide
40	HSIL	NIC 2	145	13	3.01c; 5,92c	Aneuploide
41	LSIL	Cervicite crônica	26	3	-	Aneuploide
42	ASC-H	NIC 3	0	0	-	Euploide
43	HSIL	NIC 3	85	23	7.71c	Aneuploide
44	ASC-US	Não realizado	-	-	-	-
45	HSIL	NIC 3	79	6	6.70c; 7,38C	Aneuploide
46	LSIL	NIC 2	11	0	-	Euploide
47	ASC-H	Cervicite crônica	0	0	-	Euploide
48	HSIL	NIC 3	130	26	3.77c; 6.02c	Aneuploide
49	LSIL	NIC 1	0	0	-	Euploide
50	LSIL	NIC 1	1	1	-	Aneuploide
51	LSIL	NIC 1	3	0	-	Euploide
52	LSIL	NIC 1	19	0	1.71c; 3.56c	Aneuploide
53	LSIL	NIC 1	96	29	8.08c	Aneuploide
54	LSIL	Não realizado	-	-	-	-
55	HSIL	NIC 3	115	32	8.52c	Aneuploide
56	HSIL	NIC 2	58	18	-	Aneuploide
57	ASC-US	Cervicite crônica	1	0	-	Euploide
58	HSIL	NIC 2	37	13	1.77c; 2.91c; 3.52c; 6.97c; 7.45c	Aneuploide
59	ASC-US	AC	7	0	2.83c; 3.35c	Aneuploide
60	HSIL	Cervicite crônica	116	23	5.50c	Aneuploide

Quadro 5 – Relação entre resultados citológicos, histológicos e ploidia (conclusão).

Paciente	Citologia	Histologia	5cE E	9cE E	STL aneuploide	Ploidia
61	HSIL	Não realizado	-	-	-	-
62	ASC-US	Não realizado	-	-	-	-
63	ASC-US	NIC 2	57	9	-	Aneuploide
64	ASC-US	Não realizado	-	-	-	-
65	HSIL	NIC 2	4	0	-	Euploide
66	HSIL	NIC 2	108	14	3.84c; 7.77c	Aneuploide
67	ASC-H	NIC 1	0	0	-	Euploide
68	HSIL	NIC 2	31	5	2.89c; 5.70c	Aneuploide
69	LSIL	Não realizado	-	-	-	-
70	ASC-H	Cervicite crônica	2	0	-	Euploide

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Notas: Casos sublinhados em verde são aqueles em que há concordância entre o resultado citológico de HSIL, o resultado histológico de NIC 2/NIC 3 e o resultado aneuploide na ploidia.

Legenda: Eventos excedendo 5c ou 9c (5cEE ou 9cEE); *Stemline* (STL); Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US); Células escamosas atípicas não podendo excluir lesão de alto grau (ASC-H); Células glandulares atípicas (AGC); Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL); Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL); Neoplasia intraepitelial cervical (NIC); Carcinoma de células escamosas (CCE); Adenocarcinoma *in situ* (AIS); Adenocarcinoma (AC).

Um modelo estatístico de regressão logística foi utilizado para avaliar a possível influência das variáveis apresentadas na tabela 7 sobre o resultado de aneuploidia. Hábito de fumar, uso de contraceptivos orais e presença de ISTs prévias nas pacientes não alcançaram significância estatística para explicar o resultado de aneuploidia quando o modelo foi aplicado individualmente para cada variável. Portanto, essas variáveis foram excluídas do modelo. O modelo de regressão logística que utilizou idade foi estatisticamente significativo ($\chi^2 = 15,029$, $p = 0,000$). O modelo explicou 29,0% (Nagelkerke R^2) da variância no resultado de aneuploidia e classificou corretamente 69,4% dos casos. O aumento da idade foi

associado a uma maior probabilidade de apresentar resultado aneuploide (odds ratio = 1,123, $p = 0,001$). O modelo de regressão logística que utilizou número de gestações foi estatisticamente significativo ($\chi^2 = 20,750$, $p = 0,000$), sendo capaz de explicar 38,3% (Nagelkerke R^2) da variância no resultado de aneuploidia. O modelo classificou corretamente 77,4% dos casos e o aumento no número de gestações foi associado a uma maior probabilidade de apresentar resultado aneuploide (odds ratio = 2,981, $p = 0,000$). Quando o modelo avaliou idade e número de gestações de forma conjunta, ele foi capaz de explicar 42,1% (Nagelkerke R^2) da variância no resultado de aneuploidia e classificou corretamente 79,0% dos casos de forma estatisticamente significativa ($\chi^2 = 23,284$, $p = 0,000$).

Tabela 7 – Dados demográficos das pacientes

Características das pacientes	Ploidia		
	Euploide	Aneuploide	Total
Idade em anos (média \pm DP)	30,7 \pm 8,2	40,8 \pm 11,0	36,5 \pm 11,1
Número de gestações (média \pm DP)	0,58 \pm 1,0	2,33 \pm 2,1	1,60 \pm 1,9
Hábito de fumar (%)			
Não	21 (80,8)	21 (58,3)	42
Ex-fumante	1 (3,8)	5 (13,9)	6
Sim	4 (15,4)	10 (7,8)	14
Uso de contraceptivos orais (%)			
Não	13 (50,0)	24 (66,7)	37
Sim	13 (50,0)	12 (33,3)	25
ISTs (%)			
Não	20 (76,9%)	25 (69,4%)	45
Sim	6 (23,1%)	11 (30,6%)	17
Total	26	36	62

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Legenda: Desvio padrão (DP); Infecções sexualmente transmissíveis (ISTs).

6 DISCUSSÃO

O câncer do colo do útero ainda é um grande problema de saúde pública e tem uma das maiores taxas de mortalidade por câncer entre mulheres em todo o mundo (TORRE et al., 2017). Programas de rastreio organizados utilizando como base a citologia oncótica para investigar lesões pré-cancerosas cervicais foram capazes de reduzir em cerca de 80% a mortalidade por esse câncer nas últimas décadas em alguns países desenvolvidos (LÄÄRÄ; DAY; HAKAMA, 1987; DICKINSON et al., 2012). Atualmente, estima-se que mais da metade de todos os novos casos de câncer cervical se manifestem em mulheres que raramente ou nunca foram investigadas em programas de rastreio e que mais de 85% das mortes ocorram em países em desenvolvimento (TORRE et al., 2015; BENARD et al., 2017).

Por outro lado, mesmo com o sucesso da citologia cervical como método de rastreio, reconhece-se que a técnica tem suas limitações. Os principais problemas são relacionados a baixa sensibilidade, amostras insatisfatórias, problemas de reprodutibilidade e má interpretação dos diagnósticos (BOONE; ERICKSON; HUH, 2012). Estudos relataram que 20-32% dos casos de câncer invasivo não são identificados pela citologia (LEYDEN et al., 2005; SUBRAMANIAM et al., 2011). Para tentar contornar essas limitações, novas tecnologias foram introduzidas no mercado.

O primeiro produto utilizando citologia em base líquida aprovado pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos EUA foi o ThinPrep® (Hologic Inc. Massachusetts, EUA) em 1996, seguido do SurePath™ (Becton, Dickinson and Co, New Jersey, USA) em 1999 (GIBB; MARTENS, 2011). O consenso geral é de que não há melhora significativa na sensibilidade entre citologia convencional e a citologia em base líquida para detectar NIC 2+ (RONCO et al., 2007; ARBYN et al., 2008). Por outro lado, alguns estudos recentes apontam que a sensibilidade para detectar NIC 2+ parece ser maior com a citologia em base líquida (REBOLJ et al., 2015; ROZEMEIJER et al., 2017). Além disso, fatores como a redução de resultados insatisfatórios, possibilidade de realizar outras análises com a solução remanescente e automatização de todo o processo de análise tornam a base líquida uma alternativa muito atraente (ROZEMEIJER et al., 2016).

O HPV é estabelecido como causa do câncer cervical (ZUR HAUSEN, 2009; RONCO; GIORGI ROSSI, 2017). A implementação de programas de rastreio baseados em testes de HPV e programas de

vacinação para prevenir a infecção pelo vírus são recomendados pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2014). Essas abordagens estão em discussão como uma alternativa atraente para sistemas de atenção à saúde de países que tem dificuldade de implementar programas de rastreamento eficazes baseados na citologia (BOSCH et al., 2015; CATARINO et al., 2015). No entanto, apesar do teste de HPV possuir sensibilidade superior à citologia, seu valor preditivo positivo para câncer cervical é deficiente (REBOLJ et al., 2013).

A aneuploidia, que pode ser identificada pela DNA-ICM, é aceita internacionalmente como um marcador de transformação de células neoplásicas, além de ter sido associada a progressão de lesões pré-cancerosas para câncer (GIROUD et al., 1998; HAROSKE et al., 1998, 2001; GARNER, 2014). Dessa forma, esse estudo investigou a ploidia de DNA em lesões do colo uterino de mulheres que foram atendidas no ambulatório de ginecologia e colposcopia do HU-UFSC entre abril de 2017 a novembro de 2017. Estas mulheres apresentaram alterações citológicas na citologia oncológica de exames prévios

Na análise citológica, o número mínimo esperado dos diferentes resultados citológicos segundo o cálculo amostral foi obtido, com exceção para o resultado de ASC-US. Isso acontece porque segundo as diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer de colo do útero, mulheres com resultado citológico de ASC-US devem repetir o exame citológico em 12 meses, com exceção das mulheres com mais de 30 anos que devem repetir o exame em 6 meses. A colposcopia somente é indicada nessas pacientes se o resultado da citologia subsequente for igual ou sugestivo de lesão intraepitelial ou câncer, ao passo que resultados persistentes de LSIL ou resultados únicos de ASC-H, HSIL, AGC, AIS ou sugestivo de câncer devem ser encaminhados para a colposcopia (INCA, 2016). Por essa razão, espera-se que uma quantidade menor de pacientes com resultado de ASC-US seja encaminhada para o exame colposcópico em relação ao número total de diagnósticos citológicos dessa atipia. Observou-se nesse estudo uma quantidade menor de pacientes com resultado de ASC-US, uma vez que a coleta das amostras citológicas e posterior análise por DNA-ICM foi efetuada na mesma consulta em que o exame colposcópico foi realizado.

Entre os resultados histológicos, 81,8% dos 11 resultados de NIC 1 foram encaminhados como LSIL e 52,8% dos 36 resultados de NIC 2 e NIC 3 foram encaminhados como HSIL. Nos casos de NIC 2+, 15,4% dos casos foram encaminhados como LSIL. Sub-diagnóstico de NIC 2+ seguido de um resultado citológico de LSIL foi verificado previamente em 15 – 16% dos casos (KHUAKOONRATT et al., 2008; ZHENG et al.,

2017). Problemas na correlação entre o resultado citológico e o diagnóstico histológico podem ser atribuídos a erros na amostragem, preparação inadequada da lâmina citológica e variações na reprodutibilidade dos resultados citológicos devido ao caráter subjetivo das interpretações (STOLER; SCHIFFMAN, 2001; GUPTA; SODHANI, 2004; HEARP et al., 2007; KURTYCZ et al., 2017). Além disso, também existe a possibilidade da lesão ter regredido ou progredido no período entre o exame citológico e o encaminhamento para a confirmação da lesão (RAAB; GRZYBICKI, 2011). A literatura traz que apenas 10% das lesões de baixo grau progridem para lesões de alto grau em um período de 1 ano, ao passo que as taxas de regressão para lesões de alto grau são menores (MELNIKOW et al., 1998; BANSAL et al., 2008; DISCACCIATI et al., 2011; KUDELA et al., 2016). Nesse estudo, o tempo médio entre a citologia de encaminhamento e a consulta ginecológica e colposcópica no HU-UFSC foi de 83,4 dias, variando de 11 a 365 dias. Infelizmente, não é possível determinar a quanto tempo as pacientes estavam portando a lesão antes do exame citológico de encaminhamento. Dessa forma, é difícil indicar qual dessas variáveis pode ter contribuído em maior peso para a discrepância na correlação entre os resultados citológicos e histológicos.

A existência de categorias citológicas de atipias cervicais no sistema de Bethesda acarreta um impasse adicional na correlação entre citologia e histologia, pois resultados de ASC-US, ASC-H e AGC não possuem um correspondente na classificação histológica (NAYAR; WILBUR, 2015a). Nesse estudo, 33,3% dos diagnósticos histológicos de NIC 2+ foram encontrados após citologia de encaminhamento com resultado de atipia glandular ou escamosa, no qual AGC contribuiu com 5,1% dos encaminhamentos, ASC-US com 12,8% e ASC-H com 15,4%. Demais estudos averiguaram prevalência de NIC 2+ em mulheres com ASC-US de 11,8 – 23,7% (COSTA; BARROS, 2011; PANYANUPAP et al., 2011) e com ASC-H de 19,3 – 38,0% (CYTRYN et al., 2009; DIFURIO et al., 2009; HOWELL; GURUSINGHE; TABNAK, 2009).

De forma geral, euploidia foi identificada em 41,9% e aneuploidia em 58,1% dos 62 casos investigados.

Entre os resultados citológicos de atipia cervicais, aneuploidia foi identificada em 37,5% dos casos de ASC-US, 40,0% dos casos de ASC-H e 100% dos casos de AGC. Taxa elevada de aneuploidia em pacientes com AGC foi verificada previamente (GROTE et al., 2004). Atipias escamosas podem conter achados que sugerem a possível presença de uma lesão intraepitelial cervical oculta ou até mesmo câncer cervical em casos raros (NAYAR; WILBUR, 2015a). Bollmann et al. (2003) e

Lorenzato et al. (2008) afirmaram que um conteúdo de DNA aneuploide em casos de atipias escamosas representam lesões progressivas com comportamento semelhante ao HSIL. As diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer de colo do útero não recomendam o encaminhamento para biópsia nos casos de ASC-US devido à baixa prevalência de câncer invasivo nessa categoria, dando preferência para o acompanhamento com exame citológico (INCA, 2016). No entanto, alguns casos são encaminhados para um posterior exame ginecológico e colposcópico para confirmação da lesão, devido principalmente à persistência do resultado de atipia (PERKSANUSAK et al., 2015). A aplicação da DNA-ICM para apontar quais resultados citológicos de atipia escamosa necessitam ser investigados de maneira mais rigorosa tem potencial de melhorar o manejo dessas pacientes e evitar o encaminhamento desnecessário para biópsia.

Entre os resultados citológicos de LSIL, aneuploidia foi observada em 38,9% dos casos. Outros estudos encontraram prevalência de aneuploidia entre 4 – 63,6% em casos de LSIL (MONSONEGO et al., 1997; BOLLMANN et al., 2001, 2003a). LSIL é considerada uma lesão transitória com baixa taxa de progressão para câncer cervical (LAU; FRANCO, 2005). De forma semelhante aos casos de atipias escamosas, um resultado de aneuploidia na análise por DNA-ICM poderia melhorar o manejo dessas pacientes e auxiliar na seleção de pacientes que tem maior risco de possuir uma lesão com caráter progressivo. Entre os resultados de HSIL, aneuploidia foi identificada em 83,3% dos casos. Monsonego et al. (1997) e Bollmann et al. (2003a) verificaram aneuploidia em casos de HSIL em 78,0% e 91,8% dos casos, respectivamente.

De acordo com a relação entre resultados da histologia e ploidia de DNA, aneuploidia foi verificada em 16,7% dos casos negativos, 27,3% em NIC 1, 73,9% em NIC 2, 84,6% em NIC 3 e 100% em CCE, AIS e AC. Dos 12 casos negativos na histologia, 2 (16,7%) casos demonstraram resultado aneuploide. No primeiro caso, encaminhado citologicamente como LSIL e diagnosticado histologicamente como cervicite crônica, aneuploidia foi caracterizada devido a 3 eventos excedendo 9c. O segundo caso, encaminhado como HSIL e também diagnosticado histologicamente como cervicite crônica, aneuploidia foi caracterizada devido a eventos excedendo 9c e *stemline* aneuploide em 5,5c. Resultados aneuploides em casos histologicamente negativos podem ser em consequência de um erro na determinação do local exato da lesão durante o procedimento ginecológico ou histológico ou até mesmo devido a erros de interpretação. Erros de diagnóstico histológico podem acontecer em

até 11,8% dos casos (RAAB et al., 2005) e juntamente com erros na amostragem celular podem explicar discrepâncias entre os achados da citologia/DNA-ICM e achados histológicos, uma vez que casos de cervicite crônica foram reportados previamente como sendo euploides (SHIRATA et al., 2003; GROTE et al., 2004). Uma hipótese adicional proposta seria de que as células com lesão poderiam estar na camada mais externa do colo do útero e estas foram em sua maioria amostradas durante a coleta citológica. Dessa forma, não sobrariam células suficientes para caracterizar NIC histológico, porém explicaria a presença de células com conteúdo acima de 9c na lâmina citológica. Essa possibilidade parece ser mais plausível para a paciente encaminhada como LSIL, no qual as células alteradas são aquelas da camada mais superficial (NAYAR; WILBUR, 2015a).

Aneuploidia foi observada em 3 (27,3%) dos 11 casos de NIC 1. Estudos corroboram com esses achados, pois encontraram aneuploidia em NIC 1 de 14 – 54% dos casos (MONSONEGO et al., 1997; GROTE et al., 2004). A progressão de NIC 1 para NIC 2, NIC 3 e câncer invasivo está relacionada ao desvio crescente dos histogramas do padrão diploide de DNA. Presença de aneuploidia já em casos de NIC 1 representa um marcador precoce e objetivo de lesões que provavelmente irão evoluir para malignidade (BÖCKING; NGUYEN, 2004).

Foi demonstrado que a prevalência de aneuploidia é maior em casos de NIC 2+ do que em NIC 1 ou resultados negativos (MONSONEGO et al., 1997; GROTE et al., 2004). Além disso, a aneuploidia tem sido utilizada para prever a progressão de NIC, em um estudo demonstrou um valor preditivo positivo de 81,8% para NIC 2+ (BOLLMANN et al., 2005). Neste estudo, aneuploidia foi verificada em 73,9% e 84,6% dos casos de NIC 2 e NIC 3, respectivamente. Dois de 13 casos de NIC 3 obtiveram resultado euploide, 1 caso encaminhado como LSIL (paciente 11) e outro como ASC-H (paciente 42). Estes achados corroboram com resultados de outros estudos, nos quais alguns casos de NIC 3 euploides foram reportados (SKYLDBERG et al., 2001; GROTE et al., 2004). Euploidia em NIC 3 poderia explicar alguns casos de regressão espontânea nessa categoria (MONSONEGO et al., 1997). Sabe-se que a idade das pacientes desempenha um papel importante na ploidia, uma vez que cerca de 80% das lesões de NIC 3 em mulheres com mais de 50 anos apresentam padrão aneuploide e essa porcentagem diminui para 40% em mulheres com menos de 35 anos (HANSELAAR et al., 1988). As pacientes com NIC 3 euploide no estudo tinham 31 e 36 anos e as pacientes com NIC 3 aneuploide tinham 41,2 anos \pm 6,0 (idade média \pm desvio padrão).

O único caso de AIS diagnosticado na histologia demonstrou aneuploidia apresentando 9cEE e *stemline* aneuploide. Aneuploidia em lesões glandulares cervicais também foi observada em outros estudos e sua presença é associada a transformação maligna de lesões endocervicais, com potencial para ser usado como método diagnóstico complementar. (BIESTERFELD et al., 2001; GROTE et al., 2004).

Ambos os casos de câncer invasivo foram aneuploides devido a presença de *stemlines* aneuploides. Aberrações cromossômicas ocorrem durante a progressão tumoral e comumente isso resulta no surgimento de *stemlines* fora da região euploide. Essas *stemlines* constituem a expansão clonal de células com aneuploidia cromossomal (BÖCKING; NGUYEN, 2004; GROTE et al., 2004). *Stemlines* aneuploides são comuns no câncer cervical e foi sugerido que a presença delas está correlacionado com um prognóstico desfavorável nessa neoplasia (GROTE et al., 2001), inclusive em casos recorrentes (DAVEY et al., 1998).

O algoritmo de 9cEE foi observado em 91,7% dos casos aneuploides, enquanto o algoritmo de *stemline* aneuploide foi observado em 80,6% e a combinação dos dois algoritmos estava presente em 69,4% de todos os casos aneuploides. Esses resultados estão em concordância com os observados por Grote et al. (2004), que descreveram aneuploidia por eventos raros em 85,5% de todas as pacientes que apresentaram distribuições anormais de DNA. Nesse mesmo estudo, *stemline* aneuploide e ambos os algoritmos combinados mostraram prevalência de 30,7% e 16,1% entre os casos aneuploides, respectivamente (GROTE et al., 2004). Em nosso estudo, todos os casos de NIC 3 aneuploides foram positivos tanto para o algoritmo de 9cEE como para *stemline* aneuploide. A presença desses algoritmos em conjunto foi associada em um estudo com um valor preditivo positivo de 100% para NIC 2+ (SKYLDBERG et al., 2001). É reconhecido que casos de NIC 3 apresentam taxas de progressão para câncer invasivo maiores do que qualquer outra categoria de NIC (MOTAMEDI et al., 2015; KUDELA et al., 2016). Portanto, sugere-se que a presença de *stemline* aneuploide associada a 9cEE em um histograma de DNA indique a expansão de células tumorais (BÖCKING; NGUYEN, 2004; GROTE et al., 2004) e que o tratamento dessas pacientes deva ser imediato devido ao risco emitente de progressão para invasão.

Em casos de NIC 1 e NIC 2, a presença de poliploidia até 8c é comum. Por esse motivo, Chatelain et al. (1989) sugeriu que o limite de detecção de eventos raros para caracterizar aneuploidia deveria ser acima de 9c, excluindo valores em torno de 16c e 32c para evitar diagnósticos falso-positivos em casos de poliploidia. Por outro lado, alguns autores

consideram 9cEE restritivo para o rastreio de lesões pré-cancerosas, pois esses eventos raros são escassos para dar ao teste sensibilidade razoável (GUILLAUD et al., 2006). Portanto, alguns autores sugerem o uso de 5cEE ou até mesmo 6cEE para estabelecer um resultado suspeito (SUN et al., 2005; GUILLAUD et al., 2006; TONG et al., 2009; DEMIREL; AKYÜREK; RAMZY, 2013).

No presente estudo, algoritmos que utilizaram mais de 1 evento excedendo 5c foram investigados para avaliar sua utilidade em identificar casos de NIC 2+. Os algoritmos de 1 ou 2 eventos excedendo 5c por amostra obtiveram valores de sensibilidade próximos de 90% (92,3% e 89,7%, respectivamente). Por outro lado, o valor de especificidade para o algoritmo de 1 evento excedendo 5c foi baixo (26,1%) e o de 2 eventos excedendo 5c foi de 56,5%. Esses valores reduzidos de especificidade ocorreram devido à presença abundante desses eventos em casos histologicamente negativos para lesão ou em casos de NIC 1. A especificidade para os algoritmos de 3 ou 4 eventos excedendo 5c foi ligeiramente melhor (65,2% e 73,9%, respectivamente), porém, isso culminou na redução da sensibilidade, com valores de 84,6% para 3 eventos 5c e 79,5% para 4 eventos excedendo 5c. Com esses dados, pode-se inferir que o algoritmo de ao menos 1 evento excedendo 5c pode contribuir com o diagnóstico de resultados falso-positivos, o que poderia levar a diagnósticos excessivos e tratamentos desnecessários.

O algoritmo de 2 eventos excedendo 5c foi capaz de identificar 91,3% dos casos de NIC 2, ao passo que os algoritmos que caracterizam aneuploidia de acordo com a ESACP (9cEE e *stemline* aneuploide) identificaram 73,9% desses casos. A utilização do algoritmo de 2 eventos excedendo 5c para o rastreio de lesões pré-cancerosas parece ser uma abordagem interessante e apesar dele também contribuir com o diagnóstico de resultados falso-positivos, ele faz isso de forma mais moderada do que o algoritmo de 1 eventos excedendo 5c. De forma parecida, o algoritmo de 3 eventos excedendo 5c foi capaz de identificar 82,6% dos casos de NIC 2. Alguns estudos de rastreio utilizaram esses algoritmos de 2 ou 3 eventos excedendo 5c como tentativa para melhorar a especificidade da citometria para detectar NIC 2+ sem perder sensibilidade (SUN et al., 2005; TONG et al., 2009). Tong et al. (2009) utilizaram o algoritmo de 2 eventos excedendo 5c, obtendo sensibilidade de 91,7% e especificidade de 54,1%. Já Sun et al. (2005) utilizaram o algoritmo de 3 eventos excedendo 5c, no qual a sensibilidade foi de 54,3% e a especificidade foi de 96,9%. A detecção desses 5cEE foi utilizada nesses estudos para caracterizar amostras suspeitas que necessitam de maiores investigações.

Uma deficiência do algoritmo de 4 eventos excedendo 5c em nosso estudo foi a não identificação de um caso de CCE, o que caracteriza um erro grave. Os demais eventos acima de 5c por amostra apresentaram valores de sensibilidade decrescentes, o que reduz a utilidade desses algoritmos quando o objetivo é a identificação do maior número possível de casos suspeitos que necessitam ser encaminhados para maiores investigações. Portanto, os algoritmos de 2 ou 3 eventos excedendo 5c parecem ser mais adequados se a intenção do teste é o rastreamento primário de lesões pré-cancerosas, de forma que a maioria das verdadeiras lesões sejam diagnosticadas e o mínimo possível de resultados falso-positivos sejam encaminhados de forma desnecessária para a biópsia.

Um modelo estatístico de regressão logística foi utilizado nesse estudo para avaliar a influência de variáveis como hábito de fumar, uso de contraceptivos orais, presença de ISTs prévias, número de gestações e idade sobre o resultado da ploidia. Todos esses fatores foram associados em outros estudos com o risco aumentado de câncer cervical (MORENO et al., 2002; VESCO et al., 2011; JENSEN et al., 2013; ROURA et al., 2014). Nesse estudo, apenas o valor crescente do número de gestações e da idade das pacientes demonstrou ter relação com o resultado de aneuploidia. No entanto, um número maior de pacientes é necessário para averiguar a influência desses fatores sobre o resultado de aneuploidia de maneira mais estatisticamente relevante.

Por fim, é importante expor algumas limitações do estudo. Esse foi um estudo prospectivo transversal, no qual as amostras foram coletadas uma vez em cada paciente e o resultado da ploidia foi verificado naquele único momento. Para verificar se as amostras com DNA aneuploide vão de fato progredir para lesões mais graves, seria necessário a execução de um estudo prospectivo longitudinal sem qualquer intervenção de tratamento nessas pacientes. No entanto, esse tipo de análise seria antiético. Até o momento, estudos retrospectivos dão suporte a suposição de que lesões aneuploides provavelmente progridem para lesões mais graves (BIBBO et al., 1989; KASHYAP; DAS; LUTHRA, 1990; BOLLMANN et al., 2001; GROTE et al., 2004) e as extrapolações das consequências de um resultado aneuploide em nosso estudo são baseadas nesta suposição. Em relação a análise por DNA-ICM, as células de importância diagnóstica foram selecionadas de forma manual. A análise de uma lâmina completa levou em torno de 40 a 60 minutos, o que poderia ser um problema em laboratórios com grande demanda de análises. Equipamentos automatizados de DNA-ICM já são utilizados em alguns países como a China e o Canadá para tornar a análise mais dinâmica (SUN et al., 2005; GUILLAUD et al., 2006; TONG et al., 2009). Foi relatado

que a DNA-ICM é um método eficaz e com bom custo-benefício para o rastreio do câncer cervical (NGHIEM et al., 2015). Dessa forma, a DNA-ICM demonstra ser uma metodologia interessante para auxiliar no rastreio primário de lesões pré-cancerosas cervicais, bem como para identificar quais lesões possuem maior probabilidade de progressão para câncer invasivo.

O fluxograma proposto neste estudo para ser aplicado na clínica seria aplicar a DNA-ICM em todos os casos de atipias ou lesões de baixo grau evidenciadas no resultado citológico. Os casos de ASC-US e LSIL euploides retornariam para o rastreio no período determinado pelas diretrizes brasileiras de rastreamento do câncer de colo do útero, porém os casos aneuploides devem ser encaminhados para colposcopia e biópsia. Estudos com um número maior de pacientes precisam ser realizados para determinar se pacientes com resultados de ASC-H ou AGC euploides podem retornar para o rastreio citológico com segurança ao invés de serem diretamente encaminhadas para a biópsia como é o procedimento recomendado. Já resultados de HSIL ou mais grave devem continuar sendo encaminhados para a biópsia até que demais estudos sejam realizados.

7 CONCLUSÕES

A DNA-ICM demonstrou ser um método adequado para investigar o comportamento da ploidia de lesões precursoras do câncer cervical;

O algoritmo de eventos raros acima de 9c foi observado em 91,7% dos casos aneuploides, demonstrando ser predominante para caracterizar aneuploidia. Já 80,6% dos casos aneuploides foram positivas para o algoritmo de *stemline* aneuploide e 69,4% dos casos aneuploides demonstraram ser positivos para ambos os algoritmos;

Quando o algoritmo de eventos raros acima de 9c foi utilizado, 91,7%

O algoritmo de eventos raros acima de 9c demonstrou ser predominante para caracterizar aneuploidia, sendo observado em 91,7% dos casos aneuploides. Já

Já o algoritmo de *stemline* aneuploide e a sua combinação com 9cEE foram observados em menores proporções;

A presença de aneuploidia foi observada de maneira crescente em relação a progressão da gravidade das lesões pré-cancerosas cervicais, sendo verificada em 27,3% de NIC 1, 73,9% de NIC 2, 84,6% de NIC 3 e em 100% dos casos de câncer invasivo;

Todos os casos de NIC 3 aneuploides apresentaram tanto 9cEE como *stemlines* aneuploides, o que indica a expansão de células tumorais e provavelmente está relacionado as maiores taxas de progressão para câncer invasivo nesses casos;

O algoritmo de ao menos 1 evento excedendo 5c foi observado de forma abundante em casos negativos para lesão na histologia e sua aplicação no rastreamento pode induzir a resultados falso-positivos;

Os algoritmos de 2 ou 3 eventos excedendo 5c apresentaram valores de sensibilidade próximos de 90% para identificar NIC 2+, qualificando a utilização desse algoritmo eficaz no rastreamento primário de lesões pré-cancerosas cervicais;

O número crescente de gestações e aumento da idade foram associados a uma maior probabilidade de apresentar um resultado aneuploide na análise por DNA-ICM;

A aplicação da DNA-ICM utilizando os algoritmos de 9cEE e *stemline* aneuploide para apontar quais resultados citológicos atípicos necessitam ser investigados de maneira mais rigorosa tem potencial de melhorar o manejo dessas pacientes.

8 PERSPECTIVAS

Utilizar a DNA-ICM em um número maior de pacientes para avaliar de forma mais significativa o uso dos algoritmos para caracterizar aneuploidia segundo a ESACP em casos de atípias e lesões de baixo grau;

Avaliar o algoritmo de eventos excedendo 5c em um número maior e mais diversificado de pacientes, como em casos negativos para lesão e com outras ISTs;

Fazer a associação entre os resultados da DNA-ICM e os tipos de HPV presentes em cada amostra;

Relacionar os resultados de aneuploidia com outras variáveis epidemiológicas que não foram abordadas nesse estudo, porém que também tem relação com a maior probabilidade de progressão para câncer cervical;

Acompanhar os casos de lesões aneuploides, a fim de verificar a probabilidade de recidiva da doença em comparação com lesões euploides.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A. G. et al. Invasive cervical cancer risk among HIV-infected women: a North American multicohort collaboration prospective study. **Journal Of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 62, n. 4, p. 405–413, 2013.
- ADAB, P. et al. Effectiveness and efficiency of opportunistic cervical cancer screening: comparison with organized screening. **Medical Care**, v. 42, n. 6, p. 600–609, 2004.
- ANDERSON, G. H. et al. Organisation and results of the cervical cytology screening programme in British Columbia, 1955-85. **British Medical Journal (Clinical Research Ed.)**, v. 296, n. 6627, p. 975–978, 1988.
- ARBYN, M. et al. Liquid Compared With Conventional Cervical Cytology: a systematic review and meta-analysis. **Obstetrics & Gynecology**, v. 111, n. 1, p. 167–177, 2008.
- AYRE, J. E. Role of the halo cell in cervical cancerigenesis. A virus manifestation in premalignancy? **Obstetrics And Gynecology**, v. 15, p. 481–91, 1960.
- BANSAL, N. et al. Natural history of established low grade cervical intraepithelial (CIN 1) lesions. **Anticancer Research**, v. 28, n. 3B, p. 1763–1766, 2008.
- BARBOSA, I. R. et al. Desigualdades regionais na mortalidade por câncer de colo de útero no Brasil: tendências e projeções até o ano 2030. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 1, p. 253–262, 2016.
- BENARD, V. B. et al. Cervical cancer survival in the United States by race and stage (2001-2009): Findings from the CONCORD-2 study. **Cancer**, v. 123, p. 5119–5137, 2017.
- BERNATSKY, S.; RAMSEY-GOLDMAN, R.; CLARKE, A. E. Malignancy in systemic lupus erythematosus: what have we learned? **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 23, n. 4, p. 539–547, 2009.

BIBBO, M. et al. DNA ploidy profiles as prognostic indicators in CIN lesions. **American Journal Of Clinical Pathology**, v. 92, n. 3, p. 261–265, 1989.

BIBBO, M.; WILBUR, D. C. **Comprehensive Cytopathology**. 4. ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2015.

BIESTERFELD, S. et al. Polyploidy in non-neoplastic tissues. **Journal Of Clinical Pathology**, v. 47, n. 1, p. 38–42, 1994.

BIESTERFELD, S. et al. DNA image cytometry in the differential diagnosis of endocervical adenocarcinoma. **Cancer**, v. 93, n. 2, p. 160–164, abr. 2001.

BIESTERFELD, S. et al. Feulgen staining remains the gold standard for precise DNA image cytometry. **Anticancer Research**, v. 31, n. 1, p. 53–58, 2011.

BÖCKING, A.; GIROUD, F.; REITH, A. Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. European Society for Analytical Cellular Pathology. **Analytical Cellular Pathology: The Journal Of The European Society For Analytical Cellular Pathology**, v. 8, n. 1, p. 67–74, 1995.

BÖCKING, A.; NGUYEN, V. Q. H. Diagnostic and prognostic use of DNA image cytometry in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma. **Cancer**, v. 102, n. 1, p. 41–54, 2004.

BODELON, C. et al. Chromosomal copy number alterations and HPV integration in cervical precancer and invasive cancer. **Carcinogenesis**, v. 37, n. 2, p. 188–196, 2016.

BOLLMANN, R. et al. DNA cytometry confirms the utility of the Bethesda system for the classification of Papanicolaou smears. **Cancer**, v. 93, n. 3, p. 222–228, 2001.

BOLLMANN, R. et al. Human papillomavirus typing and DNA ploidy determination of squamous intraepithelial lesions in liquid-based cytologic samples. **Cancer**, v. 99, n. 1, p. 57–62, 2003a.

BOLLMANN, R. et al. Determination of features indicating

progression in atypical squamous cells with undetermined significance: human papillomavirus typing and DNA ploidy analysis from liquid-based cytologic samples. **Cancer**, v. 99, n. 2, p. 113–117, 2003b.

BOLLMANN, R. et al. Aberrant, highly hyperdiploid cells in human papillomavirus-positive, abnormal cytologic samples are associated with progressive lesions of the uterine cervix. **Cancer**, v. 105, n. 2, p. 96–100, 2005.

BOONE, J. D.; ERICKSON, B. K.; HUH, W. K. New insights into cervical cancer screening. **Journal Of Gynecologic Oncology**, v. 23, n. 4, p. 282–287, 2012.

BORNSTEIN, J. et al. 2011 Colposcopic Terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. **Obstetrics & Gynecology**, v. 120, n. 1, p. 166–172, 2012.

BOSCH, F. X. et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 11, p. 796–802, 1995.

BOSCH, F. X. et al. Male sexual behavior and human papillomavirus DNA: key risk factors for cervical cancer in Spain. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 15, p. 1060–1067, 1996.

BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal Of Clinical Pathology**, v. 55, n. 4, p. 244–265, 2002.

BOSCH, F. X. et al. HPV-FASTER: broadening the scope for prevention of HPV-related cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, n. 2, p. 119–132, 2015.

BOSGRAAF, R. P. et al. The current position and the future perspectives of cervical cancer screening. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 14, n. 1, p. 75–92, 2014.

BRAVO, I. G.; FÉLEZ-SÁNCHEZ, M. Papillomaviruses. **Evolution, Medicine, and Public Health**, v. 2015, n. 1, p. 32–51, 2015.

BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2003.

CAMPO, M. S. et al. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. **Virology**, v. 407, n. 1, p. 137–142, 2010.

CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 110, n. 3, p. S4–S7, 2008.

CASTELLSAGUÉ, X. et al. Prospective seroepidemiologic study on the role of Human Papillomavirus and other infections in cervical carcinogenesis: Evidence from the EPIC cohort. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 2, p. 440–452, 2014.

CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. The male role in cervical cancer. **Salud Publica De Mexico**, v. 45 Suppl 3, p. S345–353, 2003.

CASTLE, P. E. Gynaecological cancer: New standard of care—HPV testing for cervical cancer screening. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 12, n. 4, p. 194–196, 2015.

CATARINO, R. et al. Cervical cancer screening in developing countries at a crossroad: Emerging technologies and policy choices. **World Journal Of Clinical Oncology**, v. 6, n. 6, p. 281–290, 2015.

CHAPMAN, J. R.; WEBSTER, A. C.; WONG, G. Cancer in the transplant recipient. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 7, p. 1–15, 2013.

CHATELAIN, R. et al. Diagnosis of prospective malignancy in koilocytic dysplasias of the cervix with DNA cytometry. **The Journal Of Reproductive Medicine**, v. 34, n. 8, p. 505–510, 1989.

CHELIMO, C. et al. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. **Journal of Infection**, v. 66, n. 3, p. 207–217, 2013.

CHEN, X. et al. Genetic susceptibility of cervical cancer. **Journal**

Of Biomedical Research, v. 25, n. 3, p. 155–164, 2011.

CHIDYAONGA-MASEKO, F.; CHIRWA, M. L.; MUULA, A. S. Underutilization of cervical cancer prevention services in low and middle income countries: a review of contributing factors. **The Pan African Medical Journal**, v. 21, p. 231, 2015.

CHIECO, P. et al. Image Cytometry: Protocols for 2D and 3D Quantification in Microscopic Images. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 47, n. 4, p. 211–333, 2013.

CHIECO, P.; DERENZINI, M. The Feulgen reaction 75 years on. **Histochemistry And Cell Biology**, v. 111, n. 5, p. 345–358, 1999.

CIBAS, E. S.; DUCATMAN, B. S. **Cytology: diagnostic principles and clinical correlates**. 4. ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2014.

CLIFFORD, G. M. et al. Immunodeficiency and the risk of cervical intraepithelial neoplasia 2/3 and cervical cancer: A nested case-control study in the Swiss HIV cohort study. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 7, p. 1732–1740, 2016.

COMBER, H.; GAVIN, A. Recent trends in cervical cancer mortality in Britain and Ireland: the case for population-based cervical cancer screening. **British Journal Of Cancer**, v. 91, n. 11, p. 1902–1904, 2004.

COSTA, R. F. A. et al. Historical Analysis of the Brazilian Cervical Cancer Screening Program from 2006 to 2013: A Time for Reflection. **PloS One**, v. 10, n. 9, p. e0138945, 2015.

COSTA, R. F.; BARROS, S. M. O. DE. Prevalência de lesões intraepiteliais em atipias de significado indeterminado em um serviço público de referência para neoplasias cervicais. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 24, n. 3, p. 400–406, 2011.

COX, J. T. The development of cervical cancer and its precursors: what is the role of human papillomavirus infection? **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 18, n. Suppl 1, p. s5–s13, 2006.

CYTRYN, A. et al. Prevalence of cervical intraepithelial neoplasia grades II/III and cervical cancer in patients with cytological diagnosis of atypical squamous cells when high-grade intraepithelial lesions (ASC-H) cannot be ruled out. **Sao Paulo Medical Journal = Revista Paulista De Medicina**, v. 127, n. 5, p. 283–287, 2009.

DANIELSEN, H. E.; PRADHAN, M.; NOVELLI, M. Revisiting tumour aneuploidy - the place of ploidy assessment in the molecular era. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 13, n. 5, p. 291–304, 2016.

DATASUS. **TabNet Win32 3.0: Exame Citopatológico Cérvico-Vaginal e Microflora**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?siscolo/ver4/DEF/uf/SCCC OLO4.def>>. Acesso em: 7 maio. 2017.

DAVEY, D. D. et al. Prognostic significance of DNA cytometry of postirradiation cervicovaginal smears. **Cancer**, v. 84, n. 1, p. 11–16, 1998.

DE FREITAS, A. C. et al. hrHPV E5 oncoprotein: immune evasion and related immunotherapies. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 36, n. 1, p. 71, 2017.

DE SANJOSÉ, S. et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 7, p. 453–459, 2007.

DEMIREL, D.; AKYÜREK, N.; RAMZY, I. Diagnostic and prognostic significance of image cytometric DNA ploidy measurement in cytological samples of cervical squamous intraepithelial lesions. **Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology**, v. 24, n. 2, p. 105–112, 2013.

DERCHAIN, S.; TEIXEIRA, J.; ZEFERINO, L. Organized, Population-based Cervical Cancer Screening Program: It Would Be a Good Time for Brazil Now. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics**, v. 38, n. 4, p. 161–163, 2016.

DICKINSON, J. A. et al. Reduced cervical cancer incidence and

mortality in Canada: national data from 1932 to 2006. **BMC Public Health**, v. 12, p. 992, 2012.

DIFURIO, M. J. et al. Comparison of the clinical significance of the Papanicolaou test interpretations LSIL cannot rule out HSIL and ASC-H. **Diagnostic Cytopathology**, v. 38, n. 5, p. 313–317, 2009.

DISCACCIATI, M. G. et al. Outcome of expectant management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 155, n. 2, p. 204–208, 2011.

DOMÍNGUEZ-ALMENDROS, S.; BENÍTEZ-PAREJO, N.; GONZALEZ-RAMIREZ, A. R. Logistic regression models. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 39, n. 5, p. 295–305, 2011.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 7–15, 2005.

DUENSING, S.; MÜNGER, K. Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1471, n. 2, p. M81-88, 2001.

DUENSING, S.; MÜNGER, K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. **Cancer Research**, v. 62, n. 23, p. 7075–7082, 2002.

DUGUÉ, P.-A. et al. Immunosuppression and risk of cervical cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 13, n. 1, p. 29–42, 2013.

FARAKER, C. A.; GREENFIELD, J. Transformation zone sampling rate used as a performance indicator for cervical liquid-based cytology sample-takers. **Cytopathology**, v. 24, n. 4, p. 222–227, 2013.

FERENCZY, A.; FRANCO, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **Lancet Oncology**, v. 3, n. 1, p. 11–16, 2002.

FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer

Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die- darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 135, n. 5–6, p. 203–248, 1924.

FITZMAURICE, C. et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 4, p. 524, 2017.

GAO, G.; SMITH, D. I. Human Papillomavirus and the Development of Different Cancers. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 150, n. 3–4, p. 185–193, 2016.

GARNER, D. Clinical application of DNA ploidy to cervical cancer screening: A review. **World Journal Of Clinical Oncology**, v. 5, n. 5, p. 931–965, 2014.

GIAM, M.; RANCATI, G. Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. **Cell Division**, v. 10, p. 3, 2015.

GIBB, R. K.; MARTENS, M. G. The impact of liquid-based cytology in decreasing the incidence of cervical cancer. **Reviews In Obstetrics & Gynecology**, v. 4, n. Suppl 1, p. S2–S11, 2011.

GIROUD, F. et al. 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for quality assurance. European Society for Analytical Cellular Pathology. **Analytical Cellular Pathology: The Journal Of The European Society For Analytical Cellular Pathology**, v. 17, n. 4, p. 201–208, 1998.

GONZAGA, C. M. R. et al. Cervical cancer mortality trends in Brazil: 1980-2009. **Cadernos De Saude Publica**, v. 29, n. 3, p. 599–608, 2013.

GROTE, H. J. et al. Prognostic significance of DNA cytometry in carcinoma of the uterine cervix FIGO stage IB and II. **Analytical Cellular Pathology: The Journal Of The European Society For Analytical Cellular Pathology**, v. 23, n. 3–4, p. 97–105, 2001.

GROTE, H. J. et al. Identification of progressive cervical epithelial cell abnormalities using DNA image cytometry. **Cancer**, v. 102, n. 6, p. 373–379, 2004.

GUAN, P. et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 10, p. 2349–2359, 2012.

GUILLAUD, M. et al. DNA ploidy compared with human papilloma virus testing (Hybrid Capture II) and conventional cervical cytology as a primary screening test for cervical high-grade lesions and cancer in 1555 patients with biopsy confirmation. **Cancer**, v. 107, n. 2, p. 309–318, 2006.

GUPTA, S.; SODHANI, P. Why is high grade squamous intraepithelial neoplasia under-diagnosed on cytology in a quarter of cases? Analysis of smear characteristics in discrepant cases. **Indian Journal Of Cancer**, v. 41, n. 3, p. 104–108, 2004.

HANSELAAR, A. G. J. M. et al. DNA ploidy patterns in cervical intraepithelial neoplasia grade III, with and without synchronous invasive squamous cell carcinoma: Measurements in nuclei isolated from paraffin-embedded tissue. **Cancer**, v. 62, n. 12, p. 2537–2545, 1988.

HANSELAAR, A. G. J. M. et al. Summary statement on quantitative cytochemistry (DNA and molecular biology): Task force 8. **Acta Cytologica**, v. 45, n. 4, p. 499–501, 2001.

HARDIE, D. C.; GREGORY, T. R.; HEBERT, P. D. N. From Pixels to Picograms. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, n. 6, p. 735–749, 2002.

HAROSKE, G. et al. DNA histogram interpretation based on statistical approaches. **Analytical Cellular Pathology : The Journal Of The European Society For Analytical Cellular Pathology**, v. 15, n. 3, p. 157–173, 1997.

HAROSKE, G. et al. Part I: Basic Considerations and Recommendations for Preparation, Measurement and Interpretation. **Analytical Cellular Pathology**, v. 17, n. 4, p. 189–200, 1998.

HAROSKE, G. et al. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. **Analytical Cellular Pathology : The Journal Of The European Society For Analytical Cellular Pathology**, v. 23, n. 2, p. 89–95, 2001.

HARRIS, T. G. et al. Cigarette smoking, oncogenic human papillomavirus, Ki-67 antigen, and cervical intraepithelial neoplasia. **American Journal Of Epidemiology**, v. 159, n. 9, p. 834–842, 2004.

HEARP, M. L. et al. Validity of sampling error as a cause of noncorrelation. **Cancer**, v. 111, n. 5, p. 275–279, 2007.

HERFS, M. et al. A novel blueprint for “top down” differentiation defines the cervical squamocolumnar junction during development, reproductive life, and neoplasia. **The Journal of Pathology**, v. 229, n. 3, p. 460–468, 2013.

HOSTE, G.; VOSSAERT, K.; POPPE, W. A. J. The Clinical Role of HPV Testing in Primary and Secondary Cervical Cancer Screening. **Obstetrics And Gynecology International**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

HOWELL, L. P.; GURUSINGHE, S.; TABNAK, F. Impact of ASC-H terminology on the detection of HSILs in medically underserved California women. **Diagnostic Cytopathology**, v. 37, n. 2, p. 103–110, 2009.

INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Ministério da Saúde, 2015.

INCA. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero**. 2. ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede, 2016.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Cervical carcinoma and reproductive factors: Collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies.

International Journal of Cancer, v. 119, n. 5, p. 1108–1124, 2006.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16 573 women with cervical cancer and 35 509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. **The Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1609–1621, 2007.

JENSEN, K. E. et al. Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up. **British Journal Of Cancer**, v. 108, n. 1, p. 234–239, 2013.

KAPEU, A. S. et al. Is Smoking an Independent Risk Factor for Invasive Cervical Cancer? A Nested Case-Control Study Within Nordic Biobanks. **American Journal of Epidemiology**, v. 169, n. 4, p. 480–488, 2008.

KASHYAP, V.; DAS, D. K.; LUTHRA, U. K. Microphotometric DNA analysis in moderate dysplasia of the uterine cervix correlation to the progression and regression of the lesion. **Acta Oncologica**, v. 29, n. 6, p. 755–759, 1990.

KHUAKOONRATT, N. et al. Prevalence of high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and invasive cervical cancer in patients with low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) at cervical pap smear. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention : APJCP**, v. 9, n. 2, p. 253–257, 2008.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histology and cell biology: an introduction to pathology**. 4. ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2016.

KJAER, S. K. et al. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 19, p. 1478–1488, 2010.

KLUMB, E. M. et al. Is Higher Prevalence of Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women With Lupus Due to

Immunosuppression? **JCR: Journal of Clinical Rheumatology**, v. 16, n. 4, p. 153–157, 2010.

KOSHIOL, J. et al. Persistent Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **American Journal of Epidemiology**, v. 168, n. 2, p. 123–137, 2008.

KOSS, L. G.; MELAMED, M. R. **Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases**. 5. ed. Philadelphia: LWW, 2005.

KUDELA, E. et al. Determination of malignant potential of cervical intraepithelial neoplasia. **Tumor Biology**, v. 37, n. 2, p. 1521–1525, 2016.

KURTYCZ, D. F. I. et al. Bethesda Interobserver Reproducibility Study-2 (BIRST-2): Bethesda System 2014. **Journal of the American Society of Cytopathology**, v. 6, n. 4, p. 131–144, 2017.

KYRGIU, M. et al. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 367, n. 9509, p. 489–498, 2006.

KYRGIU, M. et al. Fertility and early pregnancy outcomes after treatment for cervical intraepithelial neoplasia: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 349, n. oct28 1, p. g6192–g6192, 2014.

LÄÄRÄ, E.; DAY, N. E.; HAKAMA, M. Trends in mortality from cervical cancer in the Nordic countries: association with organised screening programmes. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 8544, p. 1247–1249, 1987.

LAU, S.; FRANCO, E. L. Management of low-grade cervical lesions in young women. **CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal De L'association Medicale Canadienne**, v. 173, n. 7, p. 771–774, 27 2005.

LEA, J. S.; LIN, K. Y. Cervical Cancer. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 39, n. 2, p. 233–253, 2012.

LEYDEN, W. A. et al. Cervical Cancer in Women With Comprehensive Health Care Access: Attributable Factors in the

Screening Process. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 9, p. 675–683, 2005.

LIU, L. et al. Association between TNF- α polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 3, p. 2683–2688, 2012.

LORENZATO, M. et al. DNA image cytometry and human papillomavirus (HPV) detection help to select smears at high risk of high-grade cervical lesions. **The Journal Of Pathology**, v. 194, n. 2, p. 171–176, 2001.

LORENZATO, M. et al. Usefulness of DNA ploidy measurement on liquid-based smears showing conflicting results between cytology and high-risk human papillomavirus typing. **American Journal Of Clinical Pathology**, v. 118, n. 5, p. 708–713, 2002.

LORENZATO, M. et al. Contribution of DNA ploidy image cytometry to the management of ASC cervical lesions. **Cancer**, v. 114, n. 4, p. 263–269, 2008.

LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Prophylactic human papillomavirus vaccines. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p. 1167–1173, 2006.

MASEKO, F. C.; CHIRWA, M. L.; MUULA, A. S. Health systems challenges in cervical cancer prevention program in Malawi. **Global Health Action**, v. 8, p. 26282, 2015.

MCCREDIE, M. R. et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. **The Lancet Oncology**, v. 9, n. 5, p. 425–434, 2008.

MCGRAW, S. L.; FERRANTE, J. M. Update on prevention and screening of cervical cancer. **World Journal Of Clinical Oncology**, v. 5, n. 4, p. 744–752, 2014.

MEISELS, A.; FORTIN, R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. **Acta Cytologica**, v. 20, n. 6, p. 505–509, 1976.

MELNIKOW, J. et al. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. **Obstetrics And Gynecology**, v. 92, n. 4 Pt 2, p. 727–735, 1998.

MILLS, S. E. **Histology for pathologists**. 4. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, n. 4, p. 275–278, 2011.

MITTAL, S.; BANKS, L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 772, p. 23–35, 2017.

MONSONEGO, J. et al. Simultaneous effects of aneuploidy and oncogenic human papillomavirus on histological grade of cervical intraepithelial neoplasia. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 104, n. 6, p. 723–727, 1997.

MOODLEY, M. et al. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: A review. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 13, n. 2, p. 103–110, 2003.

MORENO, V. et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. **The Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1085–1092, 2002.

MOTAMEDI, M. et al. CIN III lesions and regression: retrospective analysis of 635 cases. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, p. 541, 2015.

MUÑOZ, N. et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. **The Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1093–1101, 2002.

NARINE, N.; YOUNG, W. Transformation zone sampling rate is a useful performance indicator for practitioners collecting cervical samples using SurePath™ liquid-based cytology system. **Cytopathology**, v. 18, n. 4, p. 220–224, 2007.

NAYAR, R.; WILBUR, D. **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes**. 3. ed. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2015a.

NAYAR, R.; WILBUR, D. C. The Pap Test and Bethesda 2014. **Acta Cytologica**, v. 59, n. 2, p. 121–132, 2015b.

NGHIEM, V. T. et al. Economic evaluation of DNA ploidy analysis vs liquid-based cytology for cervical screening. **British journal of cancer**, v. 112, n. 12, p. 1951–1957, 2015.

NGUYEN, V. Q. H. et al. Interobserver reproducibility of DNA-image-cytometry in ASCUS or higher cervical cytology. **Cellular Oncology: The Official Journal Of The International Society For Cellular Oncology**, v. 26, n. 3, p. 143–150, 2004.

NOBEL PRIZES AND LAUREATES. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2008**. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/>. Acesso em: 31 jan. 2018.

ONOFRE, F. B. DE M. et al. 9p21 Deletion in the diagnosis of malignant mesothelioma in serous effusions additional to immunocytochemistry, DNA-ICM, and AgNOR analysis. **Cancer**, v. 114, n. 3, p. 204–215, 2008.

ORIGONI, M. et al. Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) in pregnancy: the state of the art. **European Review For Medical And Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 6, p. 851–860, 2014.

ORR, B.; GODEK, K. M.; COMPTON, D. Aneuploidy. **Current Biology : CB**, v. 25, n. 13, p. R538-542, 2015.

PANYANUPAP, A. et al. Prevalence of high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in the patients with atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) pap smears: hospital based, dynamic population area. **Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet**, v. 94, n. 2, p. 159–163, 2011.

PAPANICOLAOU, G. N. A NEW PROCEDURE FOR STAINING VAGINAL SMEARS. **Science**, v. 95, n. 2469, p. 438–439,

1942.

PEIRSON, L. et al. Screening for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. **Systematic Reviews**, v. 2, n. 1, p. 35, 2013.

PERKSANUSAK, T. et al. Colposcopy Requirement of Papanicolaou Smear after Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASC-US) by Follow-up Protocol in an Urban Gynaecology Clinic, a Retrospective Study in Thailand. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention : APJCP**, v. 16, n. 12, p. 4977–4980, 2015.

PILEGGI, C. et al. Is HPV DNA testing specificity comparable to that of cytological testing in primary cervical cancer screening? Results of a meta-analysis of randomized controlled trials. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 1, p. 166–177, 2014.

PLUMMER, M. et al. 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. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 11, p. 1582–1589, 2007.

PLUMMER, M. et al. Time since first sexual intercourse and the risk of cervical cancer. **International Journal of Cancer**, v. 130, n. 11, p. 2638–2644, 2012.

POPPE, W. A. et al. Tobacco smoking impairs the local immunosurveillance in the uterine cervix. An immunohistochemical study. **Gynecologic And Obstetric Investigation**, v. 39, n. 1, p. 34–38, 1995.

POTAPOVA, T. A.; ZHU, J.; LI, R. Aneuploidy and chromosomal instability: a vicious cycle driving cellular evolution and cancer genome chaos. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 32, n. 3–4, p. 377–389, 2013.

PROKOPCZYK, B. et al. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 12, p. 868–873, 1997.

QIAN, N. et al. Circulating IL-1 β levels, polymorphisms of IL-1B, and risk of cervical cancer in Chinese women. **Journal of Cancer**

Research and Clinical Oncology, v. 136, n. 5, p. 709–716, 2010.

RAAB, S. S. et al. Clinical impact and frequency of anatomic pathology errors in cancer diagnoses. **Cancer**, v. 104, n. 10, p. 2205–2213, 2005.

RAAB, S. S.; GRZYBICKI, D. M. Cytologic-histologic correlation. **Cancer Cytopathology**, v. 119, n. 5, p. 293–309, 2011.

RACHEL SKINNER, S. et al. Progression of HPV infection to detectable cervical lesions or clearance in adult women: Analysis of the control arm of the VIVIANE study. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 10, p. 2428–2438, 2016.

REBOLJ, M. et al. The problem of false-positive human papillomavirus DNA tests in cervical screening. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 8, p. 1439–1449, 2013.

REBOLJ, M. et al. Cervical histology after routine ThinPrep or SurePath liquid-based cytology and computer-assisted reading in Denmark. **British Journal Of Cancer**, v. 113, n. 9, p. 1259–1274, 2015.

REMOUE, F. et al. High intraepithelial expression of estrogen and progesterone receptors in the transformation zone of the uterine cervix. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, v. 189, n. 6, p. 1660–1665, 2003.

RONCO, G. et al. Accuracy of liquid based versus conventional cytology: overall results of new technologies for cervical cancer screening: randomised controlled trial. **BMJ**, v. 335, n. 7609, p. 28–28, 2007.

RONCO, G.; GIORGI ROSSI, P. Role of HPV DNA testing in modern gynaecological practice. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 107–118, 2017.

ROURA, E. et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 2, p. 453–466, 2014.

ROURA, E. et al. The Influence of Hormonal Factors on the Risk

of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0147029, 2016.

ROWHANI-RAHBAR, A. et al. The Impact of HIV Status and Type on the Clearance of Human Papillomavirus Infection among Senegalese Women. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 6, p. 887–894, 2007.

ROZEMEIJER, K. et al. Comparing SurePath, ThinPrep, and conventional cytology as primary test method: SurePath is associated with increased CIN II+ detection rates. **Cancer Causes & Control: CCC**, v. 27, n. 1, p. 15–25, 2016.

ROZEMEIJER, K. et al. Cervical cancer incidence after normal cytological sample in routine screening using SurePath, ThinPrep, and conventional cytology: population based study. **BMJ (Clinical Research Ed.)**, v. 356, p. j504, 2017.

SANKARANARAYANAN, R. et al. HPV Screening for Cervical Cancer in Rural India. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 14, p. 1385–1394, 2009.

SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, 2016.

SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P. E. The Promise of Global Cervical-Cancer Prevention. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 20, p. 2101–2104, 2005.

SELLORS, J. W.; SANKARANARAYANAN, R. **Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginner's manual**. 1. ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2003.

SENAPATI, R.; SENAPATI, N. N.; DWIBEDI, B. Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. **Infectious Agents and Cancer**, v. 11, n. 1, 2016.

SHIRATA, N. K. et al. DNA ploidy in cervical lesions assessed by computed image analysis: relation to histopathology. **Pathologica**, v. 95, n. 2, p. 88–91, 2003.

SINGH, H. et al. Risk of Cervical Abnormalities in Women With Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Nested Case-Control Study. **Gastroenterology**, v. 136, n. 2, p. 451–458, 2009.

SINGH, I. **Inderbir Singh's textbook of human histology**. 7. ed. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers Private Limited, 2014.

SKYLDBERG, B. et al. Human papillomavirus infection, centrosome aberration, and genetic stability in cervical lesions. **Modern Pathology : An Official Journal Of The United States And Canadian Academy Of Pathology, Inc**, v. 14, n. 4, p. 279–284, 2001.

SONG, D. et al. Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer. **Oncology Letters**, v. 10, n. 2, p. 600–606, 2015.

STOLER, M. H.; SCHIFFMAN, M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: Realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. **Journal of the American Medical Association**, v. 285, n. 11, p. 1500–1505, 2001.

SUBRAMANIAM, A. et al. Invasive cervical cancer and screening: what are the rates of unscreened and underscreened women in the modern era? **Journal Of Lower Genital Tract Disease**, v. 15, n. 2, p. 110–103, 2011.

SUN, X. R. et al. Detection of cervical cancer and high grade neoplastic lesions by a combination of liquid-based sampling preparation and DNA measurements using automated image cytometry. **Cellular Oncology : The Official Journal Of The International Society For Cellular Oncology**, v. 27, n. 1, p. 33–41, 2005.

SZAREWSKI, A. et al. The effect of stopping smoking on cervical Langerhans' cells and lymphocytes. **BJOG : An International Journal Of Obstetrics And Gynaecology**, v. 108, n. 3, p. 295–303, 2001.

THARMAC. **Cellspin I: Manual de Instruções**. 1. ed. Drosselweg: Tharmac, 2010.

THOMPSON, S. L.; BAKHOUM, S. F.; COMPTON, D. A. Mechanisms of chromosomal instability. **Current Biology : CB**, v. 20, n.

6, p. R285-295, 2010.

TOMMASINO, M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 26, p. 13–21, 2014.

TONG, H. et al. DNA ploidy cytometry testing for cervical cancer screening in China (DNACIC Trial): a prospective randomized, controlled trial. **Clinical Cancer Research : An Official Journal Of The American Association For Cancer Research**, v. 15, n. 20, p. 6438–6445, 2009.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

TORRE, L. A. et al. Global cancer in women: Burden and trends. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 26, n. 4, p. 444–457, 2017.

VALE, D. B. et al. Disparities in time trends of cervical cancer mortality rates in Brazil. **Cancer Causes & Control**, v. 27, n. 7, p. 889–896, 2016.

VESCO, K. K. et al. Risk Factors and Other Epidemiologic Considerations for Cervical Cancer Screening: A Narrative Review for the U.S. Preventive Services Task Force. **Annals of Internal Medicine**, v. 155, n. 10, p. 698, 2011.

VINK, M. A. et al. Clinical Progression of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia: Estimating the Time to Preclinical Cervical Cancer From Doubly Censored National Registry Data. **American Journal of Epidemiology**, v. 178, n. 7, p. 1161–1169, 2013.

WALBOOMERS, J. M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12–19, 1999.

WEAVER, B. A.; CLEVELAND, D. W. Does aneuploidy cause cancer? **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, n. 6, p. 658–667, 2006.

WHO. **WHO Guidelines for Screening and Treatment of Precancerous Lesions for Cervical Cancer Prevention**. Geneva: World

Health Organization, 2013.

WHO. **WHO | Comprehensive cervical cancer control: A guide to essential practice**. 2. ed. [s.l.] World Health Organization (WHO), 2014.

WILLIAMS, N. L. et al. Adenocarcinoma of the Cervix: Should We Treat It Differently? **Current Oncology Reports**, v. 17, n. 4, p. 17, 2015.

WINER, R. L. et al. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. **American Journal Of Epidemiology**, v. 157, n. 3, p. 218–226, 2003.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, 2007.

ZEFERINO, L. C.; DERCHAIN, S. F. Cervical cancer in the developing world. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 20, n. 3, p. 339–354, 2006.

ZHANG, X. et al. Genetic variants and risk of cervical cancer: epidemiological evidence, meta-analysis and research review. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 121, n. 6, p. 664–673, 2014.

ZHENG, B. et al. HPV test results and histological follow-up results of patients with LSIL Cervical Cytology from the Largest CAP-certified laboratory in China. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 13, p. 2436–2441, 2017.

ZHU, H. et al. Chlamydia Trachomatis Infection-Associated Risk of Cervical Cancer. **Medicine**, v. 95, n. 13, p. e3077, 2016.

ZUR HAUSEN, H. et al. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. **International Journal Of Cancer**, v. 13, n. 5, p. 650–656, 1974.

ZUR HAUSEN, H. et al. Human papilloma viruses and cancer.

Bibliotheca Haematologica, n. 43, p. 569–571, 1975.

ZUR HAUSEN, H. Condylomata acuminata and human genital cancer. **Cancer Research**, v. 36, n. 2 pt 2, p. 794, 1976.

ZUR HAUSEN, H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, v. 78, p. 1–30, 1977.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections - A major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1288, n. 2, p. F55–F78, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260–265, 2009.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise Multimodal das Atípias do Colo Uterino

Pesquisador: Alexandre Sherley Casimiro Onofre

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57423616.3.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.691.864

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa que envolve o Programa de pós-graduação em Ciências Médicas e Programa de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina; estudo prospectivo transversal, envolvendo mulheres que serão atendidas no ambulatório de ginecologia e colposcopia do Hospital Universitário da UFSC, que apresentarem alterações citológicas na colpocitologia oncótica. O estudo será realizado de maio de 2016 a abril de 2019.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Realizar uma análise multimodal das atípias do colo uterino utilizando métodos tais como a citometria do DNA (DNA-ICM), imunocitoquímica, teste de HPV, AgNOR e hibridização in situ por fluorescência (FISH).
Objetivo Secundário:

. Avaliar a ploidia do DNA nas células atípicas; . Analisar a positividade dos anticorpos anti-Ki67, anti-p53 e anti p16ink4a; . Analisar a associação entre os graus de atípias identificados nas células cervicais e a presença do HPV detectada por PCR e captura híbrida e sua genotipagem; Identificar os subtipos de HPV de alto risco mais prevalentes no nosso meio;. Analisar a hiperexpressão das regiões nucleolares por prata (AgNOR)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vítor Lima, nº 222, sala 401

Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400

UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.691.864

nas células atípicas;. Identificar alterações cromossomais em células atípicas por hibridização in situ por fluorescência. Fazer uma análise comparativa multimodal em prever o risco de gravidade das lesões;. Identificar os sinais/achados colposcópicos mais importantes numa análise conjunta com a ploidia do DNA em prever o risco de gravidade das lesões.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores informam sobre o benefícios: As pacientes que apresentarem resultados positivos nos métodos adjuvantes serão convidadas a visita médica para acompanhamento adequado. Como riscos e desconfortos: sentir um pequeno desconforto durante a coleta do preventivo, durante a introdução do espéculo ou coleta de células do colo do útero. Como haverá acesso aos seus dados, há um risco de perda de sigilo dessas informações, mas os pesquisadores garantem que tomarão todos os cuidados para evitar que isso ocorra.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa encontra-se adequadamente instrumentalizada do ponto de vista teórico, tem mérito científico e importância no que se refere a prevenção dos agravos decorrentes de uma citologia positiva para células neoplásicas. Os documentos encontra-se adequados para a tramitação. O Cronograma no formulário de tramitação ainda precisaria ser mais especificado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE encontra-se adequadamente instrumentalizado com informações ao alcance das participantes e evidenciando o acompanhamento, caso se faça necessários, após a análise do material coletado durante o estudo. O TCLE contempla as recomendações da Resolução 466/2012.

Recomendações:

Recomenda-se, em futuras submissões detalhar mais o cronograma de execução.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

conclusão: aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P RÓJETO_709158.pdf	28/06/2016 15:01:05		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	ProjetoGuardaChuva2016.pdf	28/06/2016 15:00:45	Alexandre Sherley Casimiro Onfre	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.691.864

Investigador	ProjetoGuardaChuva2016.pdf	28/06/2016 15:00:45	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoDiretor.pdf	28/06/2016 15:00:27	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/06/2016 14:58:51	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	28/06/2016 14:54:13	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 22 de Agosto de 2016

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências da Saúde
Hospital Universitário
Curso de Pós-Graduação em Farmácia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Sra. está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa “Análise Multimodal das Atipias do Colo Uterino” a ser desenvolvida na Universidade Federal de Santa Catarina sob a responsabilidade do Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre. Nesse estudo pretende-se avaliar o grau de severidade da lesão evidenciada no seu último exame preventivo utilizando algumas metodologias tais como a citometria do DNA (DNA-ICM), imunocitoquímica, teste de Papiloma vírus humano (HPV), coloração pela prata das regiões organizadoras de nucléolos (AgNOR) e hibridização in situ por fluorescência (FISH).

O motivo que nos levou a este estudo é poder proporcionar um diagnóstico precoce das lesões que poderão progredir ao câncer do colo do útero, tendo como benefício um tratamento e/ou controle mais adequado para seu caso, visando sempre a cura completa da lesão. Devido a lesão diagnosticada no seu último exame, você será submetida ao exame colposcópico (exame necessário para identificar o local da lesão) e biópsia caso haja necessidade. É importante ressaltar que todos esses procedimentos realizados durante a consulta, são rotineiramente realizados em todas as pacientes com preventivo alterado, mesmo naquelas que não façam parte da pesquisa.

Assinando este termo, a Sra concorda em participar deste estudo permitindo uma nova coleta de preventivo para confirmar o resultado anterior, o acesso ao material pertencente a senhora (preventivo e biópsia) e também as informações que estão nas fichas dos exames de preventivo, colposcopia e biópsia e responderá a um questionário epidemiológico. Essa nova coleta de preventivo além de confirmar o resultado anterior, poderá ser utilizada para a realização dos outros testes tais como DNA-ICM, imunocitoquímica, HPV, AgNOR e FISH. Como desconfortos e riscos, você poderá sentir um pequeno desconforto durante a coleta do preventivo, durante a introdução do espécúlo ou coleta de células do colo do útero. Como haverá acesso aos seus dados, há um risco de perda de

sigilo dessas informações, mas os pesquisadores garantem que tomarão todos os cuidados para evitar que isso ocorra.

A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que será atendida pela médica pesquisadora responsável pela conduta deste estudo, Dra Adriane Pogere.

A Sra tem a garantia que receberá respostas ou esclarecimentos a todas as suas perguntas sobre os assuntos relacionados à pesquisa, por meio do contato com os pesquisadores. A Sra não terá nenhuma despesa decorrente desta pesquisa, nem receberá qualquer vantagem financeira e tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, sem qualquer represália/prejuízo a seu atendimento. Os pesquisadores declaram que cumprirão as exigências contidas na Resolução CNS 466/2012 (especialmente nos itens IV.3 e IV.4), que o sigilo/privacidade dos participantes será garantido durante todas as etapas da pesquisa, inclusive na divulgação dos resultados, que os participantes terão direito ao ressarcimento de eventuais despesas e indenização diante de eventuais danos produzidos pela pesquisa. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada.

A Sra. terá assegurado o seu tratamento e acompanhamento clínico da mesma forma como é feito com as mulheres que fazem controle por neoplasia intraepitelial cervical, ou seja, será submetida a exame ginecológico e colposcópico semestral durante o período mínimo de 2 anos. Após este período de tempo e com os resultados desses exames negativos, a Sra. será encaminhada à sua unidade básica de saúde para controle anual de rotina.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em 2 (duas) vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você.

Dúvidas sobre a pesquisa envolvendo princípios éticos poderão ser questionadas diretamente a Dra Adriane Pogere ou ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC localizado no prédio Reitoria II, 4º andar, sala 401, localizado na Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, Trindade, Florianópolis. Telefone para contato: 3721-6094.

Eu, _____,
portadora do RG/CPF _____, concordo em participar desta pesquisa, bem como com a utilização dos dados coletados, desde que seja mantido o sigilo de minha identificação,

conforme normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. A minha participação é voluntária podendo ser suspensa a qualquer momento. Pelo presente consentimento, declaro que fui esclarecida sobre a pesquisa a ser realizada, de forma detalhada, livre de qualquer constrangimento e obrigação, e que recebi uma cópia deste termo, assinada pelos pesquisadores.

Florianópolis, _____ de _____ de _____.

Nome e assinatura da paciente

**Dr. Alexandre Sherley
Casimiro Onofre**
Responsável pela Pesquisa
(48) 37213474
e-mail: asonofre@hotmail.com

Dra. Adriane Pogere
Pesquisadora Participante
(48) 30394417
e-mail:
adripogere@hotmail.com

ANEXO C – Instrumento de coleta dos dados

PROTOCOLO DE PESQUISA

DADOS PESSOAIS:

Nome: _____
 Prontuário: _____ Idade _____ anos
 Estado civil: () casada () união estável () solteira () outros
 Escolaridade (anos completos): _____ anos.
 Procedência (bairro): _____
 Naturalidade: _____
 Fumante: () sim () não no cigarros/dia: _____
 Doenças crônicas: () sim () não
 Qual(is): _____
 Medicações utilizadas: _____

ANTECEDENTES GINECOLÓGICOS:

Idade da primeira relação sexual: _____ anos
 Último preventivo realizado (em meses ou anos): _____
 IST prévias: () sim () não
 () sífilis () gonorréia () clamídia () trichomonas () condilomas ()
 HIV () herpes genital Outros: _____
 Método anticoncepcional : () ACO () DIU () injetável mensal
 Outros: _____
 Condon: () sim () não () às vezes

ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS:

G: ___ P: ___ C: ___ A: ___ () espontâneo () provocado () ectópica
 Idade no primeiro parto: _____ anos.

CITOLOGIA DO ENCAMINHAMENTO:

() ASCUS () ASC-H () LSIL () HSIL () atípias glandulares SOE
 () atípias glandulares, possivelmente neoplásicas.

IMPRESSÃO COLPOSCÓPICA:

() achados normais. ZTT tipo _____.

- alteração regenerativa.
- alteração de grau menor.
- alteração de grau maior.
- sugestivo de câncer invasor.

CITOLOGIA (BASE LÍQUIDA):

- Negativo ASCUS ASC-H LSIL HSIL Ca invasor atipias glandulares SOE atipias glandulares, possivelmente neoplásicas adenocarcinoma “in situ” adenocarcinoma invasor

ANÁTOMO – PATOLÓGICO:

- Negativo NIC 1 NIC 2 NIC 3 Ca micro invasor Ca invasor escamoso adenocarcinoma “in situ” adenocarcinoma invasor

CITOMETRIA:

- Diploide Poliploide Aneuploide

TESTE HPV:

- negativo
- positivo: 16 18 31 33 35 39 45 51 52 56 58 59 66 68

IMUNOHISTOQUÍMICA:

anti-Ki67: _____
anti-p53: _____
anti p16ink4a: _____