



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Adriane Pogere

**ANÁLISE MULTIMODAL DA CITOLOGIA, COLPOSCOPIA, TESTE DO HPV E
DNA-ICM NO PROGNÓSTICO DA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL**

Florianópolis

2020

Adriane Pogere

**ANÁLISE MULTIMODAL DA CITOLOGIA, COLPOSCOPIA, TESTE DO HPV E
DNA-ICM NO PROGNÓSTICO DA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de doutora em ciências médicas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre

Florianópolis

2020

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

Pogere, Adriane

Análise multimodal da citologia, colposcopia, teste do HPV e DNA-ICM no prognóstico da neoplasia intraepitelial cervical / Adriane Pogere ; orientador, Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, 2020.

123 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas-Novo, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Ciências Médicas-Novo. 2. neoplasia intraepitelial cervical. 3. citometria de imagem do DNA. 4. colposcopia. 5. teste do HPV. I. Onofre, Alexandre Sherlley Casimiro. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas-Novo. III. Título.

Adriane Pogere

**ANÁLISE MULTIMODAL DA CITOLOGIA, COLPOSCOPIA, TESTE DO HPV E
DNA-ICM NO PROGNÓSTICO DA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Maria Salete Medeiros Vieira, Dr.(a)
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia - UFSC

Prof. Leonardo de Lucca Schiavon, Dr.
Departamento de Clínica Médica - UFSC

Prof. Alberto Trapani Júnior, Dr.
UNISUL

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Ciências Médicas obtido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Prof.(a) Katia Lin, Dr.(a)
Coordenador(a) do Programa

Prof. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre
Orientador

Florianópolis, 29 de outubro de 2020.

Dedico esta tese aos meus queridos pais, ao meu filho Gabriel e ao meu marido Luiz.

AGRADECIMENTOS

Um dia eu li que “a vida se faz de pedaços de outras gentes que vão se tornando parte da gente também. E a melhor parte é que nunca estaremos prontos, finalizados... Haverá sempre um retalho novo para adicionar à alma” (Cora Coralina). E, por todos esses pedaços adquiridos eu tenho muito a agradecer.

A todas as pacientes que participaram da pesquisa e confiaram no nosso trabalho, minha gratidão.

Agradeço aos meus pais pelo seu exemplo de determinação, sabedoria e amor incondicional, determinantes em cada uma de minhas escolhas.

Ao Luiz, meu marido, pela sua paciência e compreensão em meus períodos de ausência. Teu incentivo e amor tornaram meu caminho mais leve. Ao meu filho Gabriel, minha alegria, obrigada por existir e fazer minha vida mais feliz. Nada teria sentido sem vocês.

Aos meus irmãos, Angela e Ricardo, minha cunhada Lilian e aos meus filhos do coração Maryan e Matheus obrigada pelo apoio e incentivo.

Ao meu orientador, professor Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, obrigada por me acompanhar nesses quatro anos, pela sua paciência e seus ensinamentos. Agradeço também pela nossa amizade e agradáveis conversas. A professora Dra Fabiana Botelho de Miranda Onofre, sua esposa, pelo apoio, incentivo e sábios conselhos.

À minha companheira de equipe, Ane Francyne Costa, pela sua competência na realização das análises das amostras coletadas e nossa parceria nessa caminhada.

Ao professor Dr. Marcos José Machado, agradeço pelos seus ensinamentos e auxílio fundamental na análise estatística. Saber ensinar é um dom, obrigada por me ensinar a gostar dos números e por tua preciosa amizade.

A minha querida amiga, Dra Stella Abdala, obrigada pelo auxílio na correção de toda a tese, por ter me ajudado a enxergar outras possibilidades e insistir em algumas mudanças. Você é um exemplo de dedicação e comprometimento, serei eternamente grata.

À Dra. Ana Paula Beltrame Farina Pasinato, agradeço pela realização de todas histopatologias, por sua dedicação, competência e pelos conhecimentos adquiridos na discussão dos casos mais difíceis.

Ao meu colega e amigo Dr. Luiz Fernando Sommacal, pelo auxílio na coleta de dados e discussão de assuntos relevantes da pesquisa.

À Dra. Maria Luisa Bazzo, meu muito obrigada por disponibilizar seu laboratório para podermos terminar as análises do HPV do restante das amostras.

Às minhas amigas, Ana Rita Peixoto Panazzolo, Adriana Toledo Gieburowski, Tatiana de Bem Freta e Leisa Beatriz Grando, minhas fiéis confidentes, obrigada pela paciência em me ouvir e por seus conselhos sinceros.

Agradeço aos funcionários da cirurgia ambulatorial, principalmente a técnica de enfermagem Josiane A. Nunes Vitor e a enfermeira Maria Patrícia Locks Mesquita, pelo cuidado dispensado às pacientes e por tornarem nosso ambiente de trabalho um local agradável de convivência. E, a Rosicleia Pacheco Inácio, recepcionista do ambulatório pela sua dedicação e eficiência. Guardo um carinho especial por vocês.

Aos professores da pós graduação o meu muito obrigado por dividirem seu conhecimento e por me auxiliarem nessa caminhada, em especial à professora Dra. Rosemeri Maurici da Silva, pela sua disponibilidade e doação ao ensino.

Às minhas colegas de turma, gostaria de dizer que sentirei saudades e que sou muito grata por tê-las conhecido.

Enfim, depois de 4 anos, adicionei muitos retalhos à minha vida, que cuidadosamente guardarei, por toda minha existência.

“Escrever é fácil. Você começa com uma letra maiúscula e termina com um ponto final. No meio, você coloca as idéias”.
(Pablo Neruda)

RESUMO

Introdução: o tratamento da lesão precursora diminui a incidência de câncer do colo uterino, mas, em contrapartida, aumenta riscos obstétricos, ansiedade e custos. O arsenal diagnóstico existente não oportuniza o prognóstico da neoplasia intraepitelial cervical (NIC). **Objetivo:** avaliar o papel da aneuploidia como biomarcador de lesão de pior evolução em conjunto com o perfil epidemiológico e comparar a sensibilidade e a especificidade dos achados de citometria do DNA com os de outros métodos diagnósticos e os destes entre si. **Método:** estudo observacional prospectivo de coorte contendo 254 mulheres com colpocitologia alterada. Coleta citológica em solução ThinPrep® PreservCyt® dessas pacientes foram realizadas para execução de citometria de DNA e pesquisa de HPV, além de colposcopia com biópsia quando indicada. Após a aplicação da conduta adequada, observacional ou cirúrgica, as participantes foram avaliadas a cada seis meses e a coorte dividida em dois grupos, conforme o comportamento da doença. No grupo “casos” foram incluídas pacientes com: progressão da NIC; recidiva de NIC 2+ após EZT; persistência de NIC 1, durante 2 anos; e as com menos de 25 anos com NIC 2 que se manteve ou evoluiu. No grupo “não casos”, aquelas com: exames normais; alteração de baixo grau na citologia sem correspondência na colposcopia; e NIC 1 não persistente. A regressão logística e o modelo multivariado de COX foram utilizados para identificação dos fatores de risco independentes para diagnóstico e prognóstico de NIC de alto grau e curva ROC para avaliar sensibilidade e especificidade dos métodos. **Resultados:** a coorte foi composta por 153 mulheres, pois 82 participantes não compareceram ao retorno e 19 tiveram diagnóstico de câncer no atendimento inicial. A análise dos resultados demonstrou: que as variáveis “idade maior ou igual a 30 anos” (OR=3,6), “tamanho da lesão maior que 20%” (OR=6,49), “aneuploidia” (OR=12,04) e “HPV 16” (OR=7,47) tiveram associação com o diagnóstico de NIC 2+ ($p<0,05$) e “aneuploidia” (HR=4,34) e “portar HIV” (HR=6,47) ($p<0,05$) com lesões de pior prognóstico; e que a força de concordância ($p<0,001$) da colposcopia, pelo teste de Kappa, foi boa, com sensibilidade de 79,3% (IC 95%,71,0-85,6) e especificidade de 94,4% (IC 95%, 88,3-97,4); da citometria do DNA e da citologia oncótica, moderada ($p<0,001$), respectivamente com sensibilidade de 74,6% (IC 95%, 66,2-81,4) e 72,3% (IC 95%, 63,9-79,4) e especificidade de 85,3% (IC95%, 77,4-90,7) e 76,1% (IC 95%, 67,3-83,1); e dos testes de HPV de alto risco e HPV 16, fraca, com sensibilidade de 75,0% (IC 95%, 63,1-84,0) e 43,75% (IC 95%, 32,2-55,9) e especificidade de 50,0% (IC 95%, 35,8-64,1) e 88,64% (IC 95%, 76,0-95,0). **Conclusão:** os resultados da pesquisa indicam que a detecção de aneuploidia por DNA-ICM, método indolor e não invasivo, é promissora para predição de lesão cervical mais grave, bem como o fato de ser portadora de HIV.

Palavras-chave: Neoplasia Intraepitelial Cervical, prognóstico, DNA-ICM, colposcopia e teste HPV.

ABSTRACT

Introduction: treatment of precursor lesion decreases the incidence of cervical cancer, but, on the other hand, increases obstetric risks, anxiety and costs. The existing diagnostic arsenal does not provide an opportunity for prognosis of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). **Objective:** to assess the role of aneuploidy as a biomarker of the worst-evolving lesion in conjunction with epidemiological profile and to compare sensitivity and specificity of DNA cytometry results with those of other diagnostic methods and those of each other. **Method:** prospective observational cohort study with 254 women with altered colpocytology. Colpocytological collection in ThinPrep® PreservCyt® solution from these patients was performed to perform DNA cytometry and HPV research, in addition to colposcopy with biopsy when indicated. After applying the appropriate conduct, observational or surgical, participants were evaluated every six months and the cohort divided into two groups, according to the disease's behavior. The “cases” group included patients with: progression of CIN; recurrence of CIN 2+ after EZT; persistence of CIN 1 for 2 years; and those under 25 years old with CIN 2 that remained or evolved. In the “non-cases” group, those with: normal exams; low-grade change in cytology with no match in colposcopy; and non-persistent CIN 1. Logistic regression and multivariate COX model were used to identify the independent risk factors for diagnosis and prognosis of high-grade CIN, and ROC curve to assess sensitivity and specificity of the methods. **Results:** the cohort consisted of 153 women, as 82 participants did not attend the return visit and 19 were diagnosed with cancer at the initial visit. The analysis of the results showed: that the variables “age greater than or equal to 30 years” (OR = 3.6), “lesion size greater than 20%” (OR = 6.49), “aneuploidy” (OR = 12,04) and “HPV 16” (OR = 7.47) were associated with the diagnosis of CIN 2+ ($p < 0.05$) and “aneuploidy” (HR = 4.34) and “having HIV” (HR = 6.47) ($p < 0.05$) with lesions with a worse prognosis; and that the strength of agreement ($p < 0.001$) for colposcopy, using Kappa test, was good, with a sensitivity of 79.3% (95% CI, 71.0-85.6) and specificity of 94.4% (95% CI, 88.3-97.4); DNA cytometry and oncotoc cytology, moderate ($p < 0.001$), respectively with sensitivity of 74.6% (95% CI, 66.2-81.4) and 72.3% (95% CI, 63.9-79.4) and specificity of 85.3% (95% CI, 77.4-90.7) and 76.1% (95% CI, 67.3-83.1); and high-risk HPV and HPV 16 tests, weak, with sensitivity of 75.0% (95% CI, 63.1-84.0) and 43.75% (95% CI, 32.2-55,9) and specificity of 50.0% (95% CI, 35.8-64.1) and 88.64% (95% CI, 76.0-95.0). **Conclusion:** research results indicate that detection of aneuploidy by DNA-ICM, a painless and non-invasive method, is promising for prediction of more severe cervical lesions, as well as the fact of having HIV.

Keywords: Cervical Intraepithelial Neoplasia, prognosis, DNA-ICM, colposcopy and HPV test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia e histologia do colo do útero	19
Figura 2 - Demonstração das diferentes localizações da junção escamo colunar.	20
Figura 3 - Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau.....	22
Figura 4 - Lesão intraepitelial escamosa de alto grau.	23
Figura 5 - Células glandulares atípicas.....	24
Figura 6 - Colposcópico ótico e seus componentes.	25
Figura 7 - Junção escamo colunar (JEC), zona de transformação (ZT) normal e imagem na colposcopia após aplicação de ácido acético a 3%.	27
Figura 8 - Tipos de zona de transformação típica e respectivas imagens na colposcopia.	28
Figura 9 - Zona de transformação atípica em imagens na colposcopia.....	28
Figura 10 - Progressão de lesão cervical benigna para câncer invasivo.....	31
Figura 11 - Fluxograma: atendimento inicial da população estudada.	49
Figura 12 - Sistema de análise de DNA-ICM.	52
Figura 13 - - Histograma com padrão diploide de DNA (Stemline em 2c).....	54
Figura 14 - Histograma com padrão tetraploide de DNA (stemline em 2c e 4c).	54
Figura 15 - Histograma com padrão aneuploide de DNA (stemline em 2c, 6.7c e 7.4c; eventos excedendo 9c = 6).	55
Figura 16 - Fluxograma: seguimento da população estudada.	57
Figura 17 - Curva ROC mostrando a sensibilidade e especificidade do tamanho da lesão conforme a gravidade na histopatologia. HU-UFSC.....	69
Figura 18 - Curvas de Kaplan Meyer demonstrando a proporcionalidade dos riscos das variáveis associadas ao grupo “casos”. HU-UFSC, abril de 2017 a outubro de 2019	92
Figura 19 - curva de kaplan meyer demonstrando a proporcionalidade dos riscos da variável ploidia do dna excluindo as pacientes hiv+. hu-ufsc, abril de 2017 a outubro de 2019	96
Figura 20 - Curva geral do modelo de sobrevida de COX analisado. hu-ufsc, abril de 2017 a outubro de 2019	97

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Distribuição da população da pesquisa, conforme a faixa etária. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018 (n=254).....	60
Gráfico 2 - Distribuição do tipo de zona de transformação, conforme a faixa etária. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018.....	70
Gráfico 3 - Comparação da sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos utilizados para detecção de lesão de alto grau. HU-UFSC.....	80
Gráfico 4 - Composição do grupo da pesquisa. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018.....	84
Gráfico 5- Distribuição da coorte estudada. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018.....	86
Gráfico 6 - Distribuição dos grupos da coorte, conforme a idade. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018.....	87
Gráfico 7 - Distribuição do grupo “casos”, conforme o diagnóstico. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018.....	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Conduta recomendada, no Brasil, diante de exame citológico alterado.....	38
Quadro 2 - Alterações colpocitológicas, conforme classificação do Sistema de Bethesda.	45
Quadro 3 - Terminologia colposcópica - IFCPC 2011.....	47
Quadro 4 - Termos técnicos da DNA-ICM.	53
Quadro 5 - Divisão da coorte.....	56
Quadro 6 - Correspondência da citologia, colposcopia e histopatologia, conforme a gravidade.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medidas de tendência central e dispersão das variáveis contínuas. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018 (n=254).....	61
Tabela 2 - Distribuição da população da pesquisa, conforme os dados epidemiológicos compilados. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018 (n=254)	62
Tabela 3 - Frequência de IST relatadas pelas pacientes, conforme a faixa etária. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018 (n=75).....	63
Tabela 4 - Distribuição do período decorrido desde a última citologia, conforme idade superior ou inferior a 25 anos. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018 (n=254).....	64
Tabela 5 - Distribuição da população da pesquisa, conforme o diagnóstico da citologia do encaminhamento. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018 (n=254)	65
Tabela 6 - Distribuição da população da pesquisa, conforme o diagnóstico da colposcopia. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018 (n=254).....	67
Tabela 7 - Sensibilidade e especificidade do tamanho da lesão na colposcopia conforme a gravidade na histopatologia. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018.....	68
Tabela 8 - Distribuição da população da pesquisa, conforme o diagnóstico da histopatologia. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018	71
Tabela 9 - Distribuição da população da pesquisa, conforme o diagnóstico da DNA-ICM. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018 (N=252)	72
Tabela 10 - Distribuição da população da pesquisa, conforme o diagnóstico do teste de HPV. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018 (N=121).....	72
Tabela 11 - Distribuição da citologia, conforme a colposcopia. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018 (N=254)	74
Tabela 12 - Distribuição dos resultados da histopatologia com a citologia do encaminhamento. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018 (N=232).....	75
Tabela 13 - Distribuição dos resultados da histopatologia com os da colposcopia. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018 (N=232).....	76
Tabela 14 - Distribuição dos resultados da histopatologia com os da DNA-ICM. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018 (N=230) ^a	77

Tabela 15 - Distribuição dos resultados da histopatologia com os do teste de HPV de alto risco. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018 (N=108) ^a	78
Tabela 16 - Distribuição dos resultados da histopatologia com os do teste de HPV 16. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018 (N=108) ^a	78
Tabela 17 - Valores de sensibilidade, especificidade e teste de kappa dos métodos diagnósticos utilizados para detecção de lesão de alto grau. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018	79
Tabela 18- Distribuição de NIC 2+ na histopatologia, conforme características epidemiológicas, tamanho da lesão na colposcopia e resultado da DNA-ICM e teste de HPV. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018.....	82
Tabela 19 - Análise multivariada das características epidemiológicas, tamanho da lesão na colposcopia, aneuploidia e HPV, conforme o risco de NIC 2+. HU-UFSC, abril de 2017 a setembro de 2018.....	83
Tabela 20 - Distribuição das pacientes, separadas em função do comparecimento, conforme características epidemiológicas e análises de DNA-ICM e teste de HPV. HU-UFSC, abril de 2017 a outubro de 2019	85
Tabela 21 - Distribuição da coorte, conforme características epidemiológicas e análises de DNA-ICM e teste de HPV. HU-UFSC, abril de 2017 a outubro de 2019.....	90
Tabela 22 - Análise multivariada das características epidemiológicas e aneuploidia, conforme o risco de lesão de pior prognóstico. HU-UFSC, abril de 2017 a outubro de 2019.	95

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenocarcinoma
AGC	Atipia das células glandulares
AGC-NEO	Atipias glandulares favorecendo neoplasia
AGC-SOE	Atipias glandulares sem outras especificações, possivelmente não neoplásicas
AIS	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
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
CBL	Citologia em base líquida
CEC	Carcinoma de células escamosas
CEPON	Centro de Pesquisas Oncológicas
CH2	Captura Híbrida 2
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CU-IUD	Dispositivo intra-uterino com cobre
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-ICM	Citometria de Imagem do DNA
DOI	Densidade ótica integrada
ESACP	Sociedade Europeia de Patologia Celular Analítica
EZT	Exérese da zona de transformação
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus Humano
HSIL	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
HSV-2	Herpes vírus 2
HU-UFSC	Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina

IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
IFCPC	Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia
IST	Infecções sexualmente transmissíveis
IVA	Inspeção visual com ácido acético
JEC	Junção escamo-colunar
LAST	Lower Anogenital Squamous Terminology
LEEP	<i>Loop electrosurgical excision procedure</i>
LLETZ	<i>Large loop excision of the transformation zone</i>
LNG-IUS	Sistema intra-uterino de levonorgestrel
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NILM	Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
PSA	Antígeno prostático específico
PTGI	Patologia do Trato Genital Inferior
ROC	Característica de Operação do Receptor
RT-PCR	<i>Real-time</i> PCR
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
ZT	Zona de transformação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.1.1	Objetivos específicos:	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	COLO DO ÚTERO	18
3.2	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL E CARCINOMA	20
3.2.1	Epidemiologia.....	20
3.2.2	Métodos Diagnósticos	21
3.2.3	Fatores de Risco	35
3.2.4	Rastreamento	37
3.3	PLOIDIA DO DNA	39
3.3.1	Marcadores biológicos.....	39
3.3.2	Ploidia, euploidia e aneuploidia	40
3.3.3	Aneuploidia na carcinogênese	40
3.3.4	Citometria de Imagem do DNA (DNA-ICM)	41
3.3.5	Medição do conteúdo de DNA	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	DESENHO DO ESTUDO E CASUÍSTICA	44
4.2	CÁLCULO AMOSTRAL.....	44
4.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	44
4.4	ASPECTOS ÉTICOS	45
4.5	QUESTIONÁRIO.....	45
4.6	ATENDIMENTO INICIAL	46
4.7	EXAME HISTOPATOLÓGICO	50
4.8	EXAME CITOLÓGICO	50
4.9	CITOMETRIA DE IMAGEM DO DNA	51
4.10	TESTE DE HPV	55
4.11	SEGUIMENTO E COMPOSIÇÃO DA COORTE	56

4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
5	RESULTADOS.....	60
5.1	PERFIL EPIDEMIOLÓGICO	60
5.2	ANÁLISE DESCRITIVA DOS RESULTADOS DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	65
5.2.1	Citologia	65
5.2.2	Colposcopia	66
5.2.3	Histopatologia.....	71
5.2.4	DNA-ICM e teste de HPV	72
5.3	CORRESPONDÊNCIA DO GRAU DE GRAVIDADE ENTRE OS RESULTADOS DA CITOLOGIA, COLPOSCOPIA E HISTOPATOLOGIA.....	73
5.4	ANÁLISE CRUZADA DOS RESULTADOS DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS 74	
5.4.1	Citologia do encaminhamento e colposcopia	74
5.4.2	Histopatologia e demais exames	75
5.5	ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	79
5.6	ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS COM O DIAGNÓSTICO DE NIC2+81	
5.7	COMPOSIÇÃO E DIVISÃO DA COORTE.....	84
5.8	ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS COM O AGRAVAMENTO DA LESÃO CERVICAL.....	89
6	DISCUSSÃO.....	98
7	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS	106
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos	115
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	118
	ANEXO C – Questionário epidemiológico	121

1 INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino é grave problema de saúde pública (BURKI, 2020) e corresponde à principal causa de morte da população feminina, nos países com baixo ou médio índice de desenvolvimento humano (BRAY et al., 2018). No Brasil como um todo é o terceiro câncer mais frequente, com incidência variável entre as regiões, sendo que na Norte, local de maior pobreza, não se considerando os tumores de pele não melanoma, ocupa o primeiro lugar (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019). É precedido de longa fase de lesão pré-invasiva, denominada neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (BALASUBRAMANIAM et al., 2019), que se diagnosticada e corretamente tratada, diminui a incidência de malignização e, conseqüentemente, a mortalidade (BADRICK et al., 2019).

Apesar de existirem vários métodos e protocolos para o diagnóstico precoce, para o prognóstico estão ainda em estudo. O grande desafio, portanto, reside em identificar as lesões com maior propensão de transformação em carcinoma, para se evitar procedimentos desnecessários e, assim, se diminuir riscos obstétricos, ansiedade e custos (CASTLE et al., 2009; KYRGIU et al., 2016; MUNMANY et al., 2017).

A descoberta de que infecção persistente por Papilomavírus humano (HPV) de alto risco é a principal causa de câncer cervical marcou uma nova era de conhecimento - apesar de a detecção do vírus não necessariamente significar evolução para malignidade (BALASUBRAMANIAM et al., 2019) - e permitiu, também, melhor compreensão da carcinogênese, descortinando possibilidades prognósticas. Em função disso, desde então, em alguns países o teste de HPV vem sendo incluído ao arsenal diagnóstico tradicional - citologia, colposcopia e histopatologia.

A identificação de biomarcadores - indicadores biológicos mensuráveis experimentalmente (TERMINI; VILLA, 2008) - embora de elevado custo e ainda com resultados inconsistentes que nem sempre podem ser generalizados (DUVLIS et al., 2020), tem demonstrado grande potencial para prever a evolução e a gravidade das NIC (KUDELA et al., 2016) e estão sendo investigadas técnicas com essa finalidade, porém, em recente revisão, Clarke et al. (2020) não conseguiram reunir estudos suficientes para comparação com outros métodos, o que corrobora a necessidade de mais pesquisas.

É sabido que a persistência de doença viral por si só não é suficiente para que uma lesão evolua para câncer (ZUR HAUSEN, 2002) e que isso depende de condições individuais, socioeconômicas e também da interação desses cofatores com o hospedeiro (LEA; LIN, 2012; MCGRAW; FERRANTE, 2014). É essa interação que se almeja que marcadores biológicos permitam avaliar.

A quantidade de cromossomas do DNA celular, que em condições normais é rigorosamente controlada, com a integração do HPV oncogênico, sofre instabilidade, originando a alteração denominada aneuploidia, que se afigura como promissor biomarcador de prognóstico (DANIELSEN; PRADHAN; NOVELLI, 2016), pois pode ser encontrada em lesões cervicais com maior probabilidade de transformação maligna, assim como em outros tumores de origem epitelial (GIAM; RANCATI, 2015; POTAPOVA; ZHU; LI, 2013). A medida do DNA da célula, ou simplesmente ploidia do DNA, é realizada por citometria do DNA (DNA-ICM), método objetivo e de custo menor do que de outros biomarcadores (DANIELSEN; PRADHAN; NOVELLI, 2016; GARNER, 2014).

Diante da dificuldade de identificar precocemente fatores relacionados à evolução de atipias cervicais, surgiu a motivação desta pesquisa de coorte prospectiva, que tem como objetivo principal a validação da hipótese de que aneuploidia em esfregaço citológico, independentemente da existência de dados epidemiológicos sabidamente envolvidos na etiologia do câncer de colo uterino, pode ajudar na predição de lesões de pior prognóstico, vez que não foram encontrados estudos de seguimento nesse sentido. Bem como, com a utilização de metodologia transversal, comparar a sensibilidade e a especificidade dos achados da citometria de DNA com os de outros métodos diagnósticos e os destes entre si.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar os achados de citologia oncótica, colposcopia, DNA-ICM, teste de HPV e perfil epidemiológico, em mulheres com exame de Papanicolaou alterado, e sua relação com o diagnóstico e o prognóstico da neoplasia intraepitelial cervical e câncer.

2.1.1 Objetivos específicos:

- Comparar a sensibilidade e a especificidade da citologia oncótica, colposcopia, DNA-ICM e teste de HPV para o diagnóstico de lesão de alto grau e câncer de colo uterino;
- Determinar qual ponto de corte identifica maior gravidade, a partir do tamanho da lesão cervical na colposcopia, e propor classificação.
- Avaliar fatores epidemiológicos e clínicos associados ao diagnóstico da lesão intraepitelial de alto grau e câncer de colo uterino;
- Avaliar se alteração da ploidia do DNA associada a características epidemiológicas sabidamente envolvidas na patologia cervical está relacionada à lesão de pior prognóstico;

3 REVISÃO DA LITERATURA

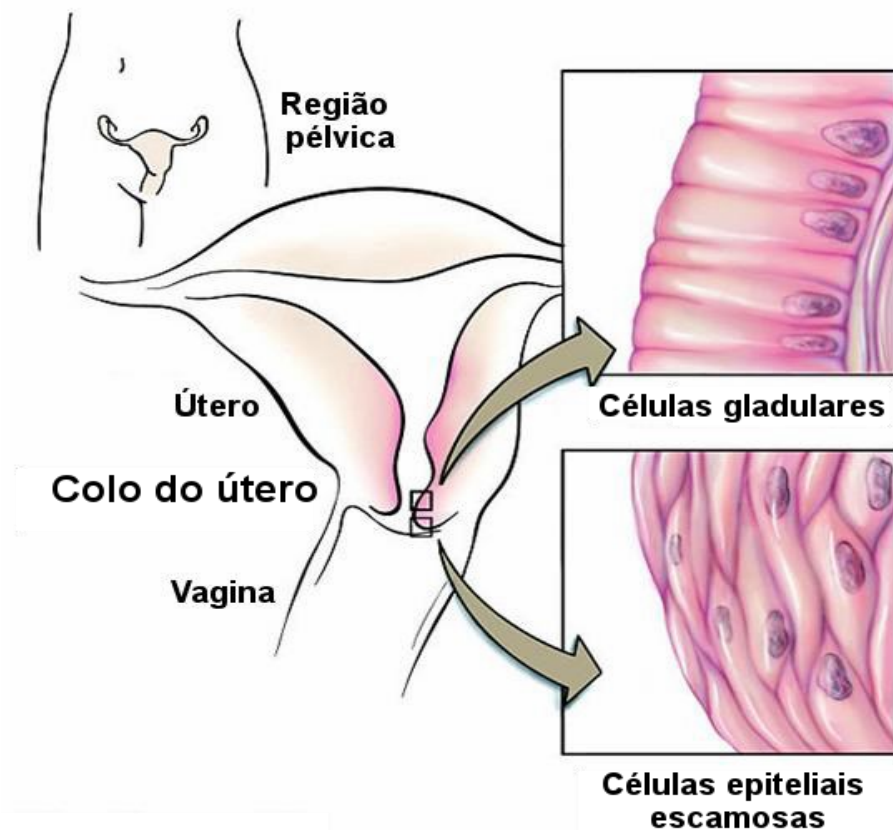
A revisão da literatura foi realizada através da busca de artigos nas bases de dados eletrônicos MEDLINE – PubMed, SCOPUS, WEB OF SCIENCE, LILACS e SCIELO. Foram utilizadas combinações de descritores, tais como: neoplasias do colo do útero, neoplasia intraepitelial cervical, citologia, colposcopia, teste do HPV, citometria de imagem, aneuploidia, biomarcadores e prognóstico.

3.1 COLO DO ÚTERO

O colo uterino ou cérvix compreende a porção inferior do útero e possui um canal denominado endocervical, que interliga a cavidade do órgão superiormente com a vagina inferiormente (MARTINS; RIBALTA, 2005; MAYEAUX; COX, 2012).

A parte que se comunica com a vagina, chamada de ectocérvix, é coberta por epitélio escamoso estratificado. Já a porção relacionada ao canal endocervical, conhecida como endocérvix, é revestida por células glandulares colunares e produtoras de muco (BHATLA et al., 2018; CARTIER; CARTIER; CALDAS, 1994; MAYEAUX; COX, 2012) (Figura 1).

FIGURA 1 – ANATOMIA E HISTOLOGIA DO COLO DO ÚTERO



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

Localização do colo do útero na região pélvica feminina, com detalhe para os tipos celulares: no endocérvice, células glandulares em conformação colunar simples e na ectocérvice, epiteliais escamosas em arranjo estratificado.

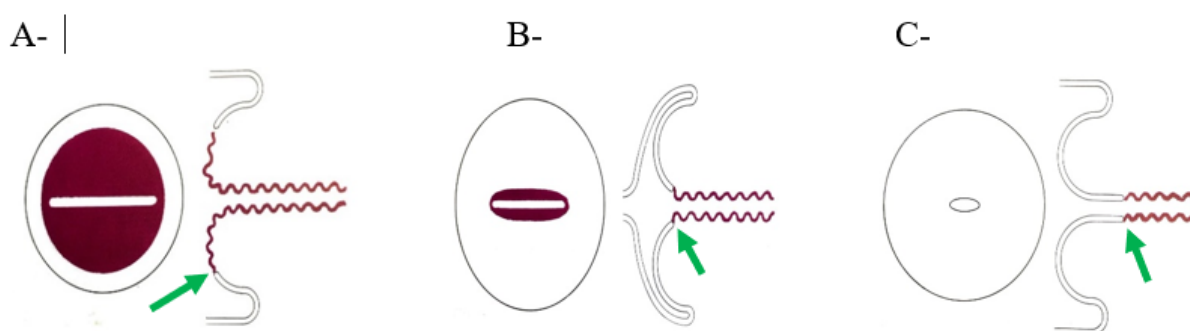
Durante o ciclo menstrual, o epitélio escamoso estratificado da ectocérvice sofre alterações na morfologia por influência dos hormônios ovarianos, e quando maduro pode ser dividido histologicamente em camadas: basal e parabasal, que o separam do tecido conjuntivo subjacente, intermediária e superficial (MAYEAUX; COX, 2012).

A endocérvice é revestida por camada única de células colunares produtoras de muco, que pode ter aparência pseudoestratificada (KIERSZENBAUM; TRES, 2019).

A união entre o epitélio escamoso estratificado e a mucosa colunar simples é designada junção escamo-colunar (JEC) e sua localização varia conforme a idade, alterações hormonais, estado reprodutivo e condições patológicas (Figura 2). Durante a infância até a menarca,

geralmente está situada no canal endocervical. Após o início da puberdade, ocorre eversão do epitélio colunar da parte inferior do canal endocervical, para a região externa voltada para a vagina, o que é chamado de ectopia. A partir de então, ao longo dos anos reprodutivos, por um processo fisiológico de metaplasia, a área glandular é gradualmente substituída por epitélio escamoso, sendo conhecida como zona de transformação (LUYTEN et al., 2015), onde se originam cerca de 95% das lesões pré-cancerosas (SMALL et al., 2017).

FIGURA 2 - DEMONSTRAÇÃO DAS DIFERENTES LOCALIZAÇÕES DA JUNÇÃO ESCAMO COLUNAR.



Adaptado do livro Colposcopia Prática, Cartier, 1994.

Epitélio glandular representado em vermelho e junção escamo colunar (JEC) indicada pela seta verde.

A: JEC ectocervical; B: JEC justa-orifical; C: JEC endocervical.

3.2 NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL E CARCINOMA

3.2.1 Epidemiologia

A incidência de neoplasias em geral, no mundo, está mais alta, em ambos os gêneros, em razão do crescimento populacional, aumento da expectativa de vida e exposição a fatores de risco relacionados ao desenvolvimento socioeconômico. Nos países em desenvolvimento, tem-se observado mudança dos tipos de câncer, outrora vinculados à pobreza e infecções e atualmente associados ao estilo de vida típico de países industrializados, tais como sedentarismo, alimentação inadequada, entre outros (BRAY et al., 2018).

Especificamente ao câncer de colo uterino tanto a incidência quanto a mortalidade

variam muito entre os países e dentro deles, pois dependem do grau de desenvolvimento econômico, fatores sociais e estilo de vida. Constitui a principal causa de morte em 42 países, da África e do sudeste asiático, ficando atrás apenas do câncer de mama nos países com baixo ou médio índice de desenvolvimento humano (BRAY et al., 2018). Em vista disso é apontado, por organizações internacionais, como grave problema de saúde pública (BURKI, 2020).

No Brasil, para o triênio 2020-2022, a estimativa aponta, como mais frequentes entre as mulheres, as neoplasias de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), cérvix uterina (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%). Entretanto, existe grande variação entre as diversas regiões (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

O número esperado de novos casos de câncer do colo do útero, para cada ano do triênio em questão, é 16.590, com risco previsto de 15,43 a cada 100 mil mulheres. A maior incidência é na região Norte (21,20/100 mil), única do país onde a taxa equipara-se a do câncer de mama, ocupando a segunda posição na Nordeste (17,62/100 mil) e Centro-Oeste (15,92/100 mil). Na região Sul (17,48/100mil) está na quarta colocação e na Sudeste (12,01/100 mil), na quinta (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

Os índices dessa enfermidade na América do Norte, Oceania (Austrália e Nova Zelândia) e Ásia Ocidental (Arábia Saudita e Iraque) sofreram declínio, nas últimas décadas, pela implementação de programas de rastreio que permitiram detectar e tratar lesões precursoras (MCGRAW; FERRANTE, 2014), sendo atualmente 7 a 10 vezes mais baixos do que os de outras regiões (BRAY et al., 2018).

3.2.2 Métodos Diagnósticos

3.2.2.1 Citologia oncótica

O diagnóstico de câncer do trato genital feminino realizado por esfregaço cérvico-vaginal foi idealizado por George N. Papanicolaou em 1941 e mundialmente adotado como método não invasivo para detecção e prevenção do câncer cervical (MAYEAUX; COX, 2012).

Desde 1988, as alterações citológicas são classificadas de acordo com o Sistema de Bethesda, cuja última atualização foi em 2014. Foi criado com o objetivo de uniformizar e ser reprodutível por diferentes profissionais, pois sua flexibilidade permite adaptação a diversas

particularidades laboratoriais e de localizações geográficas (NAYAR; WILBUR, 2015).

Quanto ao tipo de célula, as anormalidades são divididas em: das células escamosas e das glandulares.

As das células escamosas podem ser de baixo grau (LSIL) ou de alto grau (HSIL). Clinicamente essa divisão é importante uma vez que as HSIL precisam de confirmação histológica e de tratamento, enquanto as LSIL podem ser acompanhadas por citologia e colposcopia (PERKINS et al., 2020).

As características morfológicas que podem estar presentes nas LSIL são multinucleação, coilocitose, núcleos hiper cromáticos aumentados com bordas irregulares e cromatina grosseira e são observadas nas células bem diferenciadas (Figura 3). Nas HSIL, as alterações ocorrem em células imaturas, com alta relação núcleo citoplasma, núcleos hiper cromáticos com cromatina densa, grosseira e irregular (Figura 4) (NAYAR; WILBUR, 2015).

FIGURA 3 - LESÃO INTRAEPITELIAL ESCAMOSA DE BAIXO GRAU.

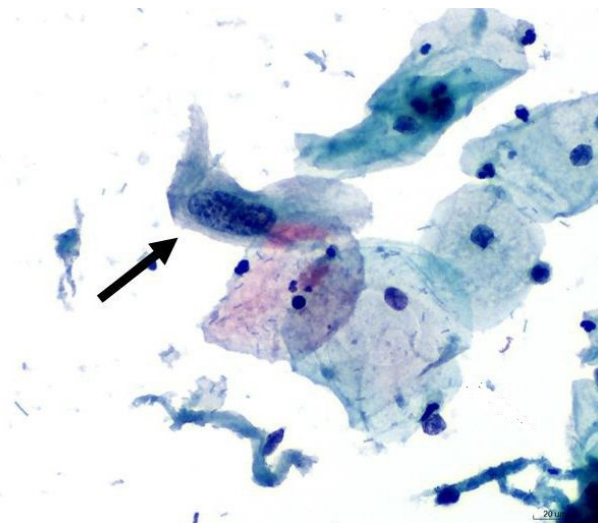


Foto fornecida pelo Laboratório de Citologia Clínica da UFSC.
Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) em amostra citológica corada pelo método de Papanicolaou (aumento de 40x), indicada pela seta preta.

FIGURA 4 - LESÃO INTRAEPITELIAL ESCAMOSA DE ALTO GRAU.

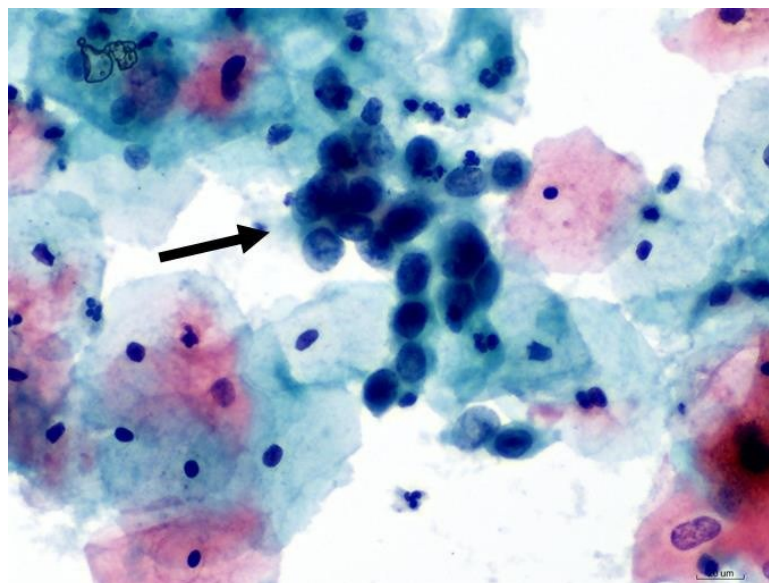


Foto fornecida pelo Laboratório de Citologia Clínica da UFSC.
Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) em amostra citológica corada pelo método de Papanicolaou (aumento de 40x), indicada pela seta preta.

O sistema de Bethesda, além dessas duas classificações, inclui uma terceira categoria, a de células escamosas atípicas (ASC), que pode ser subdividida em: de “significado indeterminado” (ASC-US), se sugestiva de lesão de baixo grau sem critérios suficientes para ser LSIL, ou seja, com morfologia atípica que indique que não deva ser considerada negativa para lesão intraepitelial ou malignidade (NILM); e “que não se pode excluir lesão de alto grau” (ASC-H), quando se suspeita de células pobremente diferenciadas, mas não pode ser classificada como HSIL (NAYAR; WILBUR, 2015).

As alterações das células glandulares são catalogadas em: atípicas sem outras especificações (AGC-SOE), quando a atipia nuclear excede alterações óbvias reativas ou reparadoras (Figura 5), sem características de adenocarcinoma *in situ* (AIS) ou invasivo; atípicas favorecendo neoplasia (AGC-NEO), quando com morfologia parecida com AIS, mas sem critérios para ser classificada como tal; AIS, que é considerado o equivalente glandular do HSIL; e adenocarcinoma invasivo, que pode ser endocervical, endometrial, extra-uterino ou sem especificação (NAYAR; WILBUR, 2015) .

FIGURA 5 - CÉLULAS GLANDULARES ATÍPICAS.

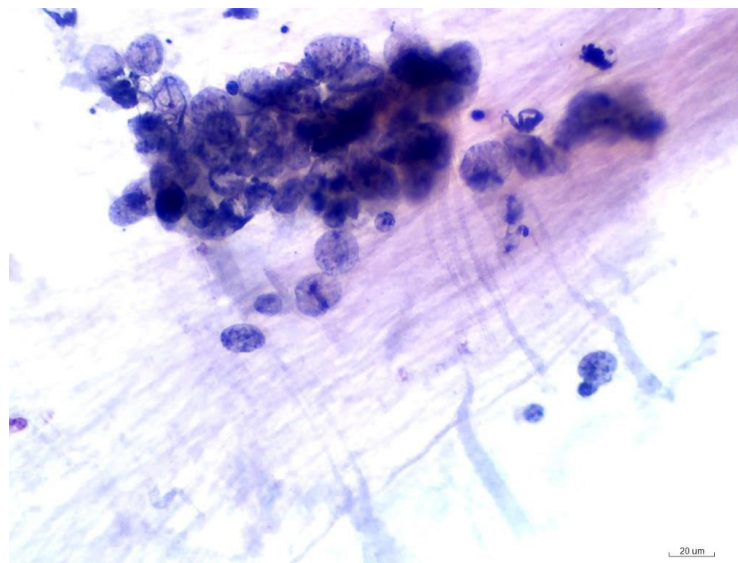


Foto fornecida pelo Laboratório de Citologia Clínica da UFSC.
Células glandulares atípicas (AGC), em amostra citológica corada pelo método de Papanicolaou (aumento de 40x).

3.2.2.2 *Teste de Schiller e Ácido Acético*

Historicamente, inspeção a olho nu, sem qualquer magnificação, foi o primeiro método de rastreamento utilizado na avaliação do colo uterino (FUSCO et al., 2008).

Em 1928, em Viena, o histologista Walter Schiller descobriu que células da camada intermediária do epitélio pavimentoso normal, por serem ricas em glicogênio, possuem a capacidade de captar a solução de lugol, assumindo coloração marrom avermelhada escura (MAYEAUX; COX, 2012), criando o Teste de Schiller, que foi incorporado ao exame ginecológico e acrescentado, com sucesso, à colposcopia (FUSCO et al., 2008).

Em 1938, o médico alemão Hans Hinselman introduziu ao arsenal diagnóstico o uso do ácido acético, que permite reconhecer o epitélio glandular colunar, a zona de transformação e a maioria das suas atipias (FUSCO et al., 2008; NAUD et al., 2006). Essa solução não age habitualmente no epitélio escamoso bem diferenciado normal, mas nos metaplásicos e anormais promove a coagulação das proteínas intracelulares, reduzindo a transparência do tecido, com efeito característico de aceto-branqueamento, em diferentes graus, conforme a densidade

nuclear (KHAN et al., 2017; MARTINS; RIBALTA, 2005).

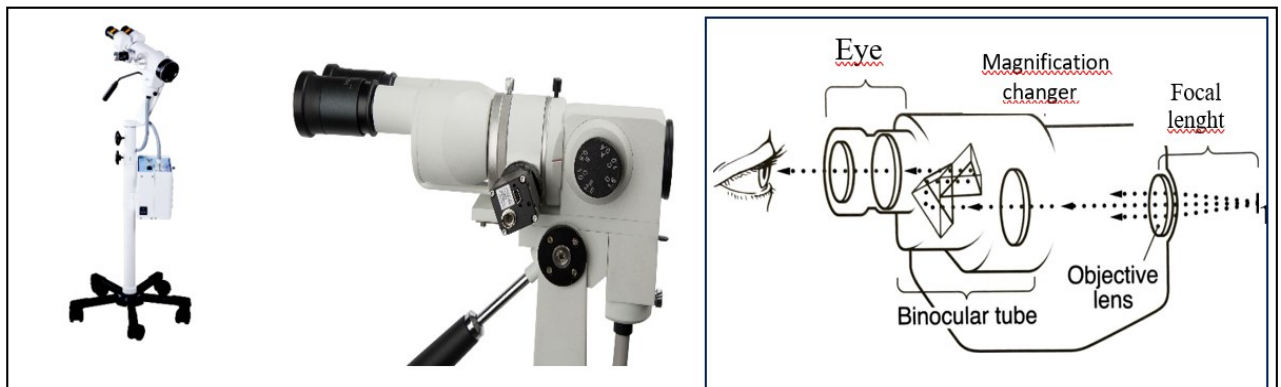
Até hoje, esses testes integram o exame ginecológico inicial e, apesar de terem baixa sensibilidade, são os utilizados como rastreamento, em países com baixo nível sócio econômico (ADSUL et al., 2017).

3.2.2.3 Colposcopia

Colposcopia é o exame indicado para mulheres com alteração no resultado da citologia oncótica, realizada sob iluminação e magnificação com colposcópio (Figura 6), instrumento óptico que possibilita avaliação da superfície epitelial e dos vasos sanguíneos subepiteliais do tecido conjuntivo da cérvix e da vagina.

Esse aparelho possui: 2 oculares com ajuste de dioptria; 1 filtro, usualmente verde, que bloqueia a transmissão da luz vermelha para facilitar a observação da rede vascular; e sistema de magnificação que permite aumento ou diminuição da imagem sem alterar a distância focal do objetivo principal. A ampliação é variável e a ideal para o trato genital inferior é de 2 a 15 vezes e, especificamente para o colo, de 7,5 a 15 (MAYEAUX; COX, 2012).

FIGURA 6 - COLPOSCÓPIO ÓTICO E SEUS COMPONENTES.



Adaptado do livro *Modern Colposcopy*, Mayeaux e Cox, 2012

A colposcopia é considerada fundamental no manejo de pacientes com alterações nos testes de rastreamento (NAM, 2018), pois permite localizar o transtorno epitelial mais importante

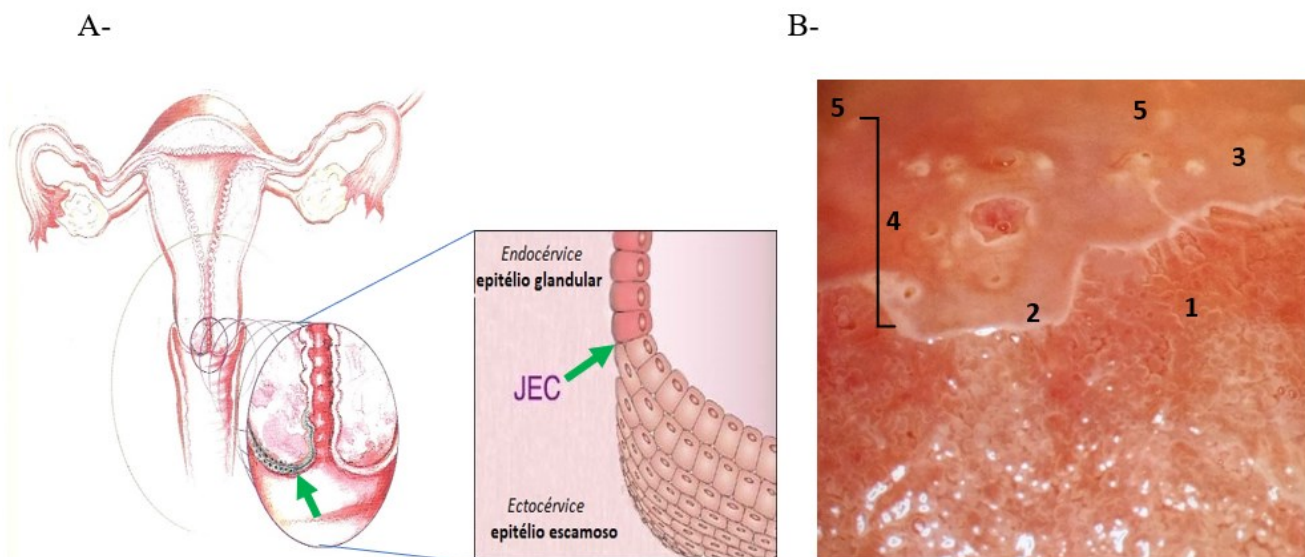
para a realização da biópsia (BROWN; TIDY, 2019; FUSCO et al., 2008), cujo resultado irá definir o tratamento (MASSAD et al., 2009; STUEBS et al., 2019). Sua utilização para confirmar lesões de alto grau reduz o número de procedimentos desnecessários e as morbidades associadas (ARBYN et al., 2008; KYRGIU et al., 2016).

O método foi concebido na Alemanha, em 1925, por Hans Hinselman (BOKIL; LIM, 2019; FUSCO et al., 2008) e, durante as décadas de 1930 e 1940, difundiu-se por toda Europa, concomitantemente com o desenvolvimento da citologia oncológica por Papanicolaou nos Estados Unidos da América, ambas visando combater o câncer do colo uterino. A partir da década de 1950, durante mais de 20 anos, a eficácia das duas foi comparada e as técnicas chegaram inclusive a se contrapor, até que no final da década de 1970, a primeira foi então reconhecida como necessária e complementar na avaliação de mulheres com colpocitologia anormal (BOKIL; LIM, 2019; FUSCO et al., 2008).

Como a prática colposcópica tornou-se universal, a Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia (IFCPC), em 1975, aprovou terminologia para uniformizar o diagnóstico e os resultados. A nomenclatura usada atualmente foi revisada em 2011 visando melhor comparação dos achados para garantir maior padronização nas evidências científicas (BORNSTEIN et al., 2012; KHAN et al., 2017).

No exame colposcópico é essencial a identificação da zona de transformação (ZT), que compreende a área entre o epitélio escamoso original e o colunar, incluindo os orifícios glandulares e os cistos de Naboth. Na colposcopia, o limite dessa zona é determinado pelo último orifício glandular ou último cisto de Naboth distais ao orifício externo do colo e demarca o ponto até onde o epitélio glandular alcançou antes do processo metaplásico (LUYTEN et al., 2015; MARTINS; RIBALTA, 2005) (Figura 7).

FIGURA 7 - JUNÇÃO ESCAMO COLUNAR (JEC), ZONA DE TRANSFORMAÇÃO (ZT) NORMAL E IMAGEM NA COLPOSCOPIA APÓS APLICAÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO A 3%.



Adaptado do livro Colposcopia Prática, Cartier, 1994.

A: JEC indicada pela seta verde, na união do epitélio escamoso da ectocérvice com o glandular da endocérvice;
 B: imagem na colposcopia: 1- epitélio glandular; 2- JEC; 3- epitélio escamoso; 4- zona de transformação limitada pelo último orifício glandular, na porção distal, e a JEC, na proximal; 5- último orifício glandular visualizado.

Pode ser constituída por epitélio metaplásico normal (ZT típica) ou anormal (ZT atípica) e, conforme a posição no colo uterino, dividida (Figura 8 e 9) em:

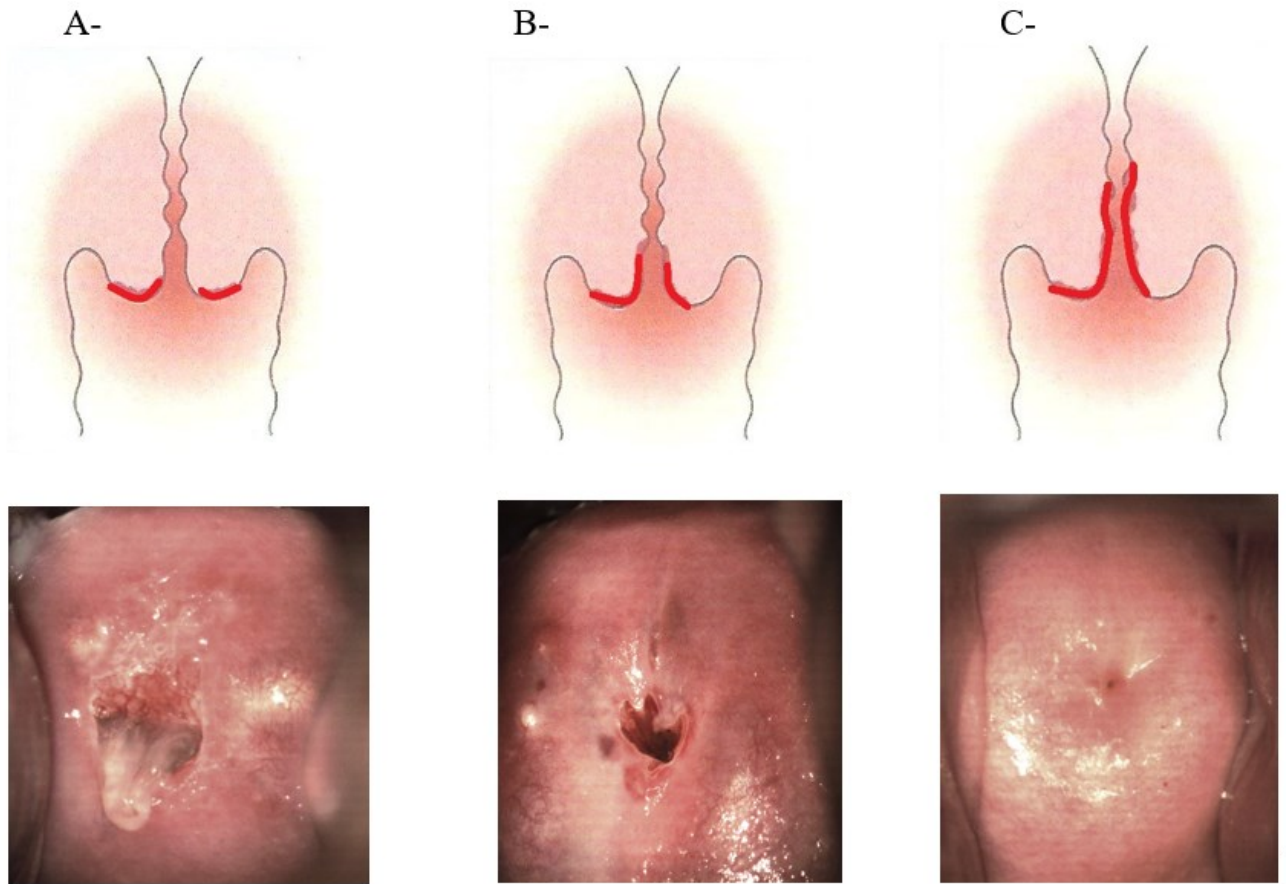
Tipo 1: ectocervical e completamente visível;

Tipo 2: com componente endocervical e completamente visível; e

Tipo 3: com componente endocervical e não completamente visível.

Com efeito, a JEC pode estar localizada dentro do canal endocervical e, muitas vezes, ser parcialmente ou até não visualizada, em mulheres após a menopausa, nas que usaram contraceptivos de progesterona por muito tempo e nas submetidas a tratamentos excisionais ou ablativos (LUYTEN et al., 2015; MARTINS; RIBALTA, 2005).

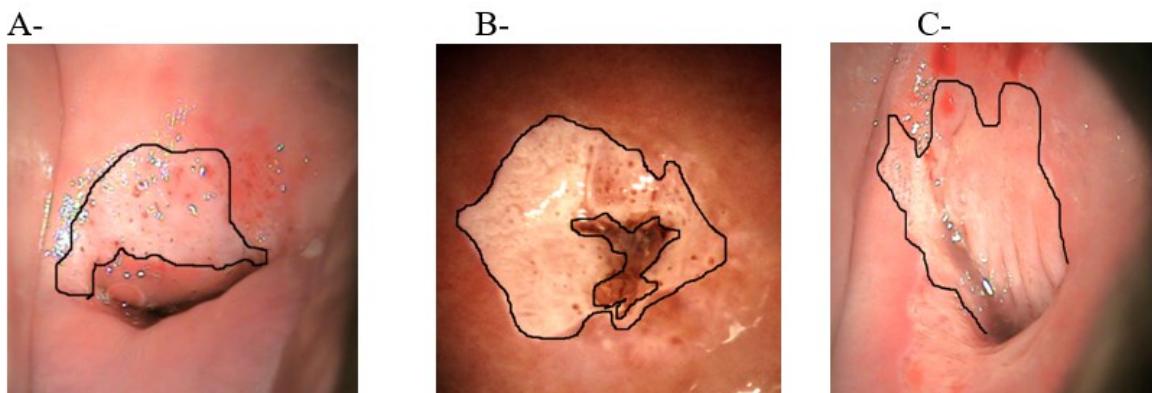
FIGURA 8 - TIPOS DE ZONA DE TRANSFORMAÇÃO TÍPICA E RESPECTIVAS IMAGENS NA COLPOSCOPIA.



Figuras adaptadas das Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero, 2016 e fotos do acervo da autora.

Zona de transformação típica: A- tipo 1; B- tipo 2; C- tipo 3.

FIGURA 9 - ZONA DE TRANSFORMAÇÃO ATÍPICA EM IMAGENS NA COLPOSCOPIA.



Fotos do acervo da autora

Zona de transformação atípica: A- tipo 1; B- tipo 2; C- tipo 3.

O primeiro passo do exame colposcópico de qualidade deve ser a identificação da JEC e a localização e tipificação da ZT que influencia diretamente o diagnóstico final e a escolha do tratamento (STUEBS et al., 2019; TATTI; BORNSTEIN; PRENDIVILLE, 2013). É na ZT que se desenvolvem praticamente todas as lesões cervicais e a localização exata dessa região é fundamental na prevenção do câncer, pois determina a confiabilidade da biópsia, a necessidade de avaliação endocervical e a quantidade de tecido a ser removido no procedimento cirúrgico (BHATLA et al., 2018; PETRY; LUYTEN; SCHERBRING, 2013).

Após a observação das características que diferenciam uma zona de transformação normal (típica) de uma anormal (atípica), o próximo passo é classificá-la, pela nomenclatura da IFCPC, conforme a gravidade, com grau menor, maior ou suspeita de câncer invasor, com base nos seguintes parâmetros diagnósticos: variação da tonalidade das áreas acetobranças; calibre e padrão - mosaico, pontilhado ou atípicos - dos vasos; demarcação - melhor ou pior - das margens; e contorno - regular ou irregular - da superfície. Presença de vasos frágeis, lesão exofítica, com superfície irregular, necrose e ulceração são sinais de alerta de câncer invasor (KHAN et al., 2017; WENTZENSEN et al., 2018).

A gravidade tem relação também com o tamanho da lesão: as menores são mais susceptíveis à regressão e devem ser tratadas de modo conservador, principalmente nas mulheres jovens em idade reprodutiva (MUNMANY et al., 2017) e nas extensas, em contrapartida, há risco 3,6 vezes maior de neoplasias intraepiteliais de alto grau (KIERKEGAARD et al., 1995). A IFCPC recomenda que o tamanho da lesão seja determinado em porcentagem de comprometimento da cérvix e na quantidade de quadrantes envolvidos (BORNSTEIN et al., 2012; FAN et al., 2018).

Destarte, a avaliação colposcópica com biópsia dirigida é fundamental e determinante na decisão entre tratamento, vigilância ou acompanhamento (LOOPIK et al., 2019; SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2015), e a realização de duas ou mais biópsias nos locais com maior alteração, aumenta a probabilidade de ser detectada neoplasia intraepitelial grau 2 ou pior, conhecida como NIC2+ (GAGE et al., 2006; WENTZENSEN et al., 2018).

A recomendação é acompanhamento das lesões de baixo grau e cirurgia nas de alto grau. Quanto às pré-invasivas (NIC2+) é consenso que sejam tratadas, para impedir a progressão para carcinoma invasor (BHATLA et al., 2018), e o método de escolha é a retirada cirúrgica, que também permite o diagnóstico de invasão porventura não detectada na citologia

ou colposcopia. No Brasil, a excisão realizada em ambulatório é chamada de exérese da zona de transformação (EZT) e, em inglês, de LLETZ (*large loop excision of the transformation zone*) ou LEEP (*loop electrosurgical excision procedure*) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

Com o objetivo de assegurar a retirada completa da lesão, na nova nomenclatura da IFCCPC, a excisão passou a ser diferenciada em tipo 1, 2 ou 3, dependendo da profundidade de tecido a ser extirpado, determinada pelo tipo de ZT achado na colposcopia (BORNSTEIN et al., 2012; STUEBS et al., 2019).

Contudo, como o tratamento excisional aumenta a morbidade obstétrica e neonatal - com parto prematuro, rotura prematura de membranas e feto de baixo peso (KYRGIU et al., 2016) - deve-se evitar intervenções no colo do útero de mulheres jovens, porque normalmente não têm prole definida e, como tem sido demonstrado, nessa faixa etária o comportamento da NIC 2 tende a ser semelhante ao da lesão de baixo grau, com significativa taxa de regressão espontânea (LOOPIK et al., 2019). Portanto, em pacientes com idade até 24 anos, a avaliação deve ser feita com muita cautela e, de preferência, adotada conduta expectante, com controle citológico e colposcópico semestral (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

3.2.2.4 Histopatologia

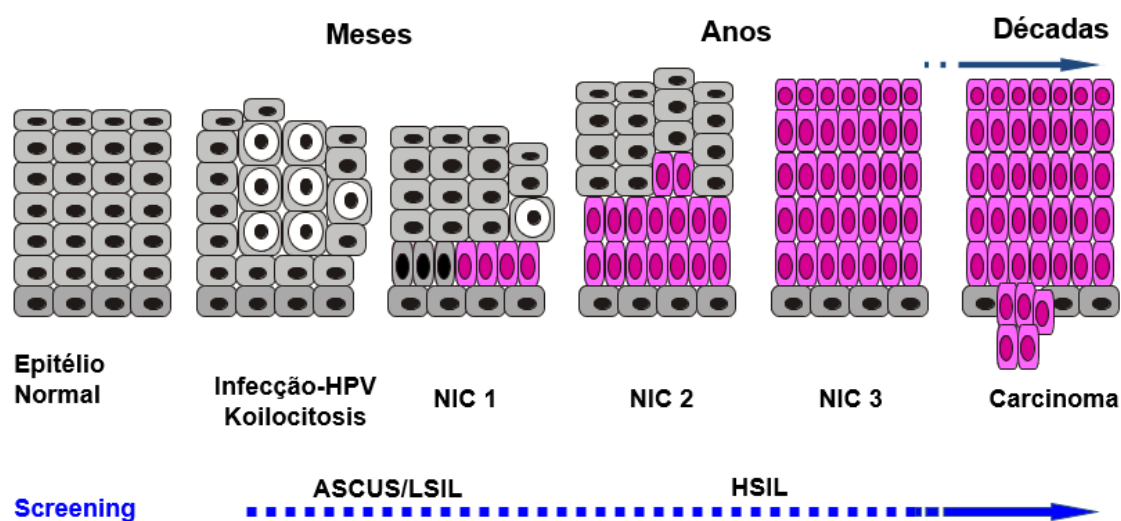
O exame histopatológico de tecido obtido por biópsia ou EZT, padrão ouro do diagnóstico de lesões do colo uterino, fornece informações sobre o tipo histológico, o grau da neoplasia intraepitelial cervical (NIC), presença ou ausência de invasão vascular e linfática e das margens cirúrgicas, livres ou comprometidas (BHATLA et al., 2018).

O câncer de colo uterino é precedido por longa fase de doença pré-invasiva, a neoplasia intraepitelial cervical (NIC), que conforme o grau de comprometimento do tecido pode ser categorizada em 1, 2 e 3 (BALASUBRAMANIAM et al., 2019; WAXMAN et al., 2012).

NIC 1 são os casos com atipias apenas no terço inferior do epitélio, mínima ativação da taxa de proliferação das células basais e ocasionalmente apresentam, na camada mais superficial, coilócitos, células caracterizadas por halo claro perinuclear e associadas à

replicação ativa do HPV; NIC 2, se acometimento de dois terços do tecido cervical; e NIC 3, quando há alterações mais severas e células atípicas no terço superior do epitélio, sendo denominadas carcinoma “*in situ*” (CIS), se atipia em toda a espessura do tecido cervical (NAYAR; WILBUR, 2015) (Figura 10).

FIGURA 10 - PROGRESSÃO DE LESÃO CERVICAL BENIGNA PARA CÂNCER INVASIVO.



Adaptado do livro *Modern Colposcopy*, Mayeaux e Cox, 2012.

Da esquerda para a direita: progressão das alterações do epitélio normal até câncer invasivo, que é caracterizado pelo rompimento da membrana basal e invasão do estroma adjacente.

NIC: neoplasia intraepitelial cervical; HPV: papilomavírus humano; ASCUS: atipia de significado indeterminado; LSIL: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; HSIL: lesão intraepitelial escamosa de alto grau.

As NIC 1 são consideradas lesões de baixo grau, dificilmente progridem para 2 ou 3 em um período de 2 anos, segundo dados do *ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS)*, (WALKER et al., 2006) e, mesmo na ausência de qualquer tratamento, apresentam grande chance de regressão espontânea, representando cerca de 90%, no seguimento de 2 anos (PERKINS et al., 2020; WRIGHT et al., 2007).

NIC 2 e 3 são consideradas as precursoras da doença invasiva, sendo que quanto mais severa a atipia, maior a possibilidade de invasão (BALASUBRAMANIAM et al., 2019; ÖSTÖR, 1993). Se não tratadas, aumenta a probabilidade de progressão para câncer (BHATLA et al., 2018; MCCREDIE et al., 2008; PERKINS et al., 2020) e, em contrapartida, é prevenível

em 100% dos casos, se o tratamento for instituído antes de haver rompimento da membrana basal com acometimento do estroma cervical (SMALL et al., 2017).

Todavia, embora a intermediária NIC 2 seja apontada como de alto grau, seu diagnóstico não é unânime entre os patologistas (WAXMAN et al., 2012) e há controvérsias se realmente caracteriza categoria isolada ou se seria NIC 1 ou 3 não diagnosticadas (CASTLE et al., 2007). Existem evidências de que tenha mais chance de sofrer regressão espontânea do que a NIC 3, principalmente em mulheres jovens (MONTEIRO et al., 2010; PERKINS et al., 2020; SKORSTENGAARD et al., 2020; WILKINSON et al., 2015), exatamente as que devem receber tratamento mais conservador, para minimizar riscos obstétricos (CASTLE et al., 2009; LOOPIK et al., 2019).

Quanto às NIC 3, estima-se que cerca de 50% delas sem a adequada terapêutica evolui para doença invasora num período de 30 anos (KUDELA et al., 2016; MCCREDIE et al., 2008) e que mesmo as tratadas possuem risco aumentado de recorrência nos primeiros dois anos e de desenvolvimento de câncer até 10 a 20 anos (ARBYN et al., 2014).

Os tipos mais comuns de câncer cervical são o carcinoma de células escamosas (CEC) e o adenocarcinoma (AC) (LEA; LIN, 2012), sendo o primeiro responsável por cerca de 75% dos casos e, normalmente, com início na junção escamo colunar. AC contabiliza próximo de 25% do total, origina-se nas células glandulares da endocérvice e, por essa razão, nos estágios iniciais pode manter-se oculto e, somente nos mais avançados, ser clinicamente evidente. Variantes histológicas menos comuns, como tumores neuroendócrinos, sarcomas e linfomas, compreendem pequena porcentagem dos diagnósticos (LEA; LIN, 2012; SMALL et al., 2017).

O reconhecimento do carcinoma microinvasor do colo, que constitui estágio I do câncer cervical, é importante, pois se tem demonstrado êxito com terapêuticas conservadoras (BHATLA et al., 2018). O diagnóstico é histopatológico, ou seja, avaliação microscópica de espécimes obtidos por exérese da zona de transformação (EZT), conização a frio ou histerectomia, com o intuito principal de permitir o estadiamento pela aferição da profundidade da invasão estromal que, pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), deve ter no máximo 3 mm (estádio IA1) e menos que 5 mm (estádio IA2), sendo que envolvimento de espaços vasculares - arterial, venoso ou linfático - não altera o estadiamento, mas modifica o prognóstico (BHATLA et al., 2018).

Quando inexistente abrangência linfovascular, EZT ou conização a frio, com margens

livres, representa tratamento definitivo. Para mulheres mais velhas ou com prole constituída, histerectomia pode ser recomendada. O tratamento primário de doença invasiva a partir do estágio 1B, profundidade ≥ 5 mm, varia de acordo com o estadiamento, com indicação de histerectomia radical com linfadenectomia pélvica, radioterapia e quimioterapia (BHATLA et al., 2018).

3.2.2.5 *Papilomavírus Humano*

A conexão entre papilomavírus humano (HPV) e câncer cervical foi descoberta pelo médico alemão Harald Zur Hausen (ZUR HAUSEN, 1976, 1977) que, em 2008, foi contemplado com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina (LAUREATES, 2009). Atualmente, esta ligação já é bem estabelecida (GAO; SMITH, 2017; ZUR HAUSEN, 2002) e estudos multicêntricos confirmaram que o DNA do HPV pode ser detectado em quase 100% dos carcinomas invasivos (SMALL et al., 2017; WALBOOMERS et al., 1999).

O HPV pertence à família *Papillomaviridae*, integra o grande grupo de vírus que possuem DNA não envelopado e já foram isolados na natureza mais de 200 tipos, sendo que cerca de 40 infectam o trato genital feminino, mas apenas a minoria associa-se ao câncer cervical (HARDEN; MUNGER, 2017). A transmissão acontece por contato físico direto, principalmente por via sexual, e na maioria das vezes a infecção é assintomática, porém, em algumas, causa lesões epiteliais benignas, verrugas genitais também conhecidas como condiloma acuminado, noutras, doença pré-maligna e, mais gravemente, câncer (GAO; SMITH, 2017).

Os tipos de HPV são divididos em: de baixo e alto risco oncogênico. Os primeiros são responsáveis pela maior parte das lesões não malignas e são representados pelos HPV 6 e 11 (FERENCZY; FRANCO, 2002; ZUR HAUSEN, 2002); no grupo dos segundos, inclui-se os HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68, que são os agentes causais do câncer e lesões precursoras.

Infecção persistente pelos tipos 16 e 18 é responsável por 70% dos casos da doença. O mecanismo de ação viral ocorre pela sua integração ao genoma das células hospedeiras, que causa interrupção do processo imunológico celular natural, e prejuízo da função de reparação do DNA. A partir disso, a célula apresenta supressão de cromossomas, sofre ativação proto-

oncogênica e alteração do seu material genético, a chamada aneuploidia que é considerada determinante na patogênese da neoplasia cervical e potencial biomarcador da progressão do tumor (FERENCZY; FRANCO, 2002; HARDEN; MUNGER, 2017).

Infecção por HPV é mais prevalente em mulheres jovens e sexualmente ativas, depende principalmente do contato físico e por isso pode ser prevenida pelo uso de preservativo, que inclusive pode alcançar 80% de efetividade na diminuição do risco de lesões precursoras e câncer cervical (BERMAN; SCHILLER, 2017; MCGRAW; FERRANTE, 2014). A persistência da doença pelo vírus de alto risco ocorre em pequeno grupo de mulheres, denominadas carreadoras crônicas, que possui probabilidade maior de progressão e desenvolvimento de neoplasias do trato anogenital (CASTELLSAGUÉ, 2008; ZUR HAUSEN, 2002).

A descoberta da relação do HPV com a etiologia do câncer cervical e a identificação dos subtipos virais permitiram o desenvolvimento de novas tecnologias de rastreamento, de diagnóstico precoce e foram primordiais para a criação de vacinas, que previnem de 70% (na bivalente e quadrivalente) a 90% (na nonavalente) das lesões precursoras e do câncer, com eficácia similar nas diferentes regiões do mundo (HUH et al., 2017; SUH et al., 2018; ZHANG; BATUR, 2019).

A detecção do vírus é realizada por métodos de biologia molecular, sendo a Captura Híbrida 2 (CH2) o mais conhecido e aprovado pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) (Qiagen, Gaithersburg, MD). Essa técnica, com a utilização de diversas sondas, pode detectar 13 tipos de HPV de alto risco e 5 de baixo risco (CLAVEL et al., 1998), mas não os distingue, sendo considerada de baixa sensibilidade (TUERXUN et al., 2016).

O exame de hibridização Cervista HPV HR (Hologic, Inc., Bedford, MA), também certificado pelo FDA, detecta 14 tipos de HPV de alto risco e identifica polimorfismos de um nucleotídeo específico, reduzindo, de forma eficaz, possível reação cruzada com vírus de baixo risco e resultados falsos positivos (TUERXUN et al., 2016).

Outro método é o de reação em cadeia da polimerase (PCR), que além de maior sensibilidade, possui a vantagem de poder ser utilizado em diversos tipos de material biológico, como células esfoliadas, material parafinado, lavado cérvico-vaginal, entre outros, diferentemente do CH2 e Cervista que foram desenvolvidos para detecção do HPV especificamente em amostras de raspado cervical (CLAVEL et al., 1998). *Real-time* PCR (RT-

PCR), é uma variante do teste convencional com reprodutibilidade e rapidez superiores, que reconhece individualmente o DNA dos HPV 16 e 18, além de outros doze tipos de HPV de alto risco (WRIGHT et al., 2012; ZHANG; BATUR, 2019).

A tecnologia de arrays utiliza sondas específicas para cada tipo de HPV, permitindo identificar o genótipo individual. Alguns exames, como PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Alemanha) e CLART (GENOMICA, Espanha), empregam a moderna metodologia baseada em microarray, que permite automação e maior assertividade tornando-os excelentes para genotipagem, sendo o último capaz de reconhecer trinta e cinco tipos de HPV anogenitais (PISTA; VERDASCA; OLIVEIRA, 2011).

3.2.3 Fatores de Risco

Diversos fatores de risco – clínicos, hormonais, imunológicos, epidemiológicos – notoriamente estão envolvidos no desenvolvimento do câncer do colo uterino.

A infecção por HPV de alto risco, como já citado, é fator essencial, mas não o bastante para a oncogênese. Em 90% dos casos, graças ao sistema imunológico, sofre remissão em dois anos e apenas a minoria progride para lesão de alto grau ou câncer invasor (PLUMMER et al., 2007; RACHEL SKINNER et al., 2016).

Estudos têm demonstrado a influência de cofatores, por diferentes vias, seja facilitando a aquisição da infecção ou aumentando o risco da persistência e da evolução (MAYEAUX; COX, 2012), como acontece em pacientes com resposta imunológica deficitária, particularmente as infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), as em tratamento prolongado por doenças auto imunes, por câncer, em uso crônico de corticosteroides e imunossupressores após transplante de órgãos (MOSCICKI et al., 2019).

Pacientes portadoras de HIV possuem infecção mais persistente por HPV (ROWHANI-RAHBAR et al., 2007), além de risco de câncer invasor aumentado (SILVERBERG; LEYDEN; CHI, 2018) e inversamente proporcional à imunidade, chegando até 7,7 vezes quando o resultado do CD4 é inferior a 200 células/mm³ (ABRAHAM et al., 2014). Apresentam, outrossim, índice elevado de permanência de lesão após tratamento padrão

(EINSTEIN; PHAËTON, 2010).

Outras infecções sexualmente transmissíveis (IST), como *Chlamydia trachomatis* e herpes vírus 2 (HSV-2) igualmente mostram associação com NIC 3 e câncer, provavelmente pelo intenso processo inflamatório provocado, cuja reparação gera radicais livres, danos genéticos e alterações cromossômicas (CASTELLSAGUÉ et al., 2014).

O tabagismo também está associado à maior incidência de câncer cervical escamoso invasivo e NIC 3 e seu efeito relaciona-se com a quantidade e duração do consumo. Mulheres que param de fumar por pelo menos dez anos têm o risco diminuído pela metade (ROURA et al., 2014). Dentre os mecanismos de carcinogênese propostos estão: efeito imunossupressor local, pela diminuição das células de Langerhans e linfócitos T do muco cervical, facilitando a persistência da infecção (POPPE, 1995); e dano ao DNA das células cervicais, pela presença de nicotina e outros metabólitos do cigarro, no tecido cervical (KAPEU et al., 2009).

Número de gestações e idade na ocasião da primeira gravidez têm relação com o desenvolvimento de câncer invasivo. Revisão conduzida pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC), envolvendo 16.563 mulheres com câncer e 33.542 de grupo controle, mostrou risco superior nas com sete filhos ou mais e nas que tiveram o primeiro parto antes dos 17 anos (RAJKUMAR et al., 2006). Uma explicação aventada para a associação é que, como durante a gestação ocorre alteração na posição da JEC por elevada concentração de estrogênio e progesterona, com a multiparidade, a zona de transformação ficaria exposta ao HPV, por muito tempo (JENSEN et al., 2013).

Ainda no que tange a ação hormonal, existe incremento de câncer cervical em mulheres com HPV que usam contraceptivo oral por longo período (MORENO et al., 2002), sendo que após 10 ou mais anos da cessação, a chance diminui, sendo semelhante à da mulher que nunca o utilizou (CANCER, 2007). Por outro lado, em pacientes que fazem reposição pós-menopausa e nas que usam dispositivo intra-uterino com cobre (CU-IUD), observa-se menor risco dessa neoplasia. Quanto às últimas, sugere-se que a presença do CU-IUD no canal endocervical, promoveria processo inflamatório crônico, com remissão da infecção pelo HPV (ROURA et al., 2016). O contrário ocorre em relação ao sistema intra-uterino de levonorgestrel (LNG-IUS), que causa queda na produção de prostaglandinas, com comprometimento da imunidade local, tornando o útero mais suscetível à infecção viral, ou seja, pacientes com CU-IUD têm menos probabilidade de apresentar lesões de alto grau do que as com LNG-IUS

(LEKOVICH et al., 2015; SPOTNITZ et al., 2020).

Da mesma forma, a idade influencia na evolução da NIC. Pacientes jovens apresentam maior índice de regressão e até remissão espontânea (WRIGHT et al., 2007). Contudo, a taxa de involução diminui 21% a cada cinco anos acrescidos na idade (BEKOS et al., 2018) e infecção persistente por HPV é mais observada em mulheres acima de 30 anos (PILEGGI et al., 2014; ZUR HAUSEN, 2002).

Por fim, vale destacar que é nos países de baixa e média renda, cuja população detém menor nível socioeconômico e não tem acesso a adequados programas de prevenção e tratamento de lesões pré-malignas e câncer (MCGRAW; FERRANTE, 2014), que ocorre no mínimo 85% dos óbitos por essa doença (BRAY et al., 2018; BURKI, 2020).

3.2.4 Rastreamento

O rastreamento do câncer cervical visa detectar alterações precursoras que, se não tratadas, têm potencial de progredir para doença invasiva. Segundo a Organização Mundial da Saúde, mulheres na faixa etária alvo - 30 a 49 anos - devem ser investigadas, ao menos uma vez, com inspeção visual com ácido acético (IVA), exame de Papanicolaou e teste de HPV, com o objetivo de cobrir a maior proporção possível do grupo de risco (MCGRAW; FERRANTE, 2014).

No Brasil, é recomendado que o rastreio seja feito por exame colpocitológico de todas as mulheres com idade entre 25 e 64 anos, que são, ou foram, ativas sexualmente, mas na realidade o tipo que predomina é o oportunístico, ou seja, elas o realizam quando procuram os serviços de saúde por outras razões. Se o resultado do primeiro exame for normal, deve ser repetido após um ano e se o do segundo for igual, os próximos devem ser a cada 3 anos. Se um dos dois for positivo, o seguimento deve obedecer às Diretrizes de Rastreamento que determina periodicidade e conduta em função do diagnóstico citológico e da idade da paciente (Quadro 1). As infectadas por HIV, ou com imunossupressão por outras causas, que apresentarem alterações citológicas – inclusive ASC-US e LSIL - devem ser submetidas à colposcopia (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

QUADRO 1 - CONDUITA RECOMENDADA, NO BRASIL, DIANTE DE EXAME CITOLÓGICO ALTERADO.

Diagnóstico	Idade (anos)	Periodicidade da citologia (meses)
ASC-US	< 25	36
	25 a 29	12
	≥ 30	6
LSIL	< 25	36
	≥ 25	6
ASC-H	Todas	Colposcopia
AGC		
AIS		
HSIL		
Câncer invasivo		

Adaptado das Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer de Colo do Útero (INCA, 2016).

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; ASC-H: células escamosas atípicas não podendo excluir lesão de alto grau; AGC: células glandulares atípicas; AIS: adenocarcinoma *in situ*; HSIL: lesão intraepitelial escamosa de alto grau.

O seguimento com base na citologia e idade tem demonstrado redução de cerca de 80% na incidência e mortalidade do câncer (KOLIOPOULOS et al., 2018), indicando que, apesar da significativa taxa de sucesso, esse exame tem limitações, sendo as principais causas: baixa sensibilidade, amostras insatisfatórias, problemas de reprodutibilidade e de interpretação diagnóstica (STOLER; SCHIFFMAN, 2001). Objetivando-se a melhora da qualidade do exame, alternativas foram introduzidas no mercado, como a citologia em base líquida (CBL), que além de possibilitar novas análises da solução remanescente, por ser um processo totalmente automatizado, reduz sensivelmente os resultados insatisfatórios (ROZEMEIJER et al., 2016).

Devido à associação entre HPV e câncer cervical, estão sendo incorporados aos programas de rastreio, como complemento à citologia ou como alternativa mais sensível e de melhor custo-benefício a longo prazo, o teste de HPV e a vacinação contra o vírus (ALTOBELLI et al., 2019; CUZICK et al., 2006; HOSTE; VOSSAERT; POPPE, 2013). Apesar desse teste ter sensibilidade superior, a especificidade é menor, principalmente em mulheres com menos de 30

anos (PILEGGI et al., 2014). Assim, rastreio primário com essa estratégia pode ter consequências indesejadas, uma vez que permite o diagnóstico de lesões que espontaneamente regrediriam e que, sem necessidade, são encaminhadas para colposcopia, suscitando excesso de tratamento (KOLIOPOULOS et al., 2018), além do dano psicológico e social causado pela notícia de ser portadora de infecção sexualmente transmissível (CUZICK et al., 2006).

Pesquisas têm comparado a sensibilidade e a especificidade dos dois métodos, com achados distintos. Em ambos, é demonstrada a existência de problemas na padronização dos resultados. Na citologia se deve à baixa reprodutibilidade, visto que a interpretação varia conforme o examinador (STOLER; SCHIFFMAN, 2001) e no teste do HPV, ao uso de diferentes *primers* e diversificação da técnica (KOLIOPOULOS et al., 2018), além da constatação de falsos negativos em considerável número de lesões de alto grau e câncer (GE et al., 2019; ZHAO et al., 2015).

O método ideal para identificar fatores prognósticos que indiquem que uma lesão tende a malignizar, ainda não foi encontrado. Aventa-se que seja resultado da combinação de efeitos, como insultos ambientais, imunidade do hospedeiro e variação genômica das células (BALASUBRAMANIAM et al., 2019; LEA; LIN, 2012). As alterações moleculares envolvidas na oncogênese, recentemente conhecidas, podem ter essa capacidade, mas são complexas e ainda não completamente compreendidas.

3.3 PLOIDIA DO DNA

3.3.1 Marcadores biológicos

Biomarcadores ou marcadores moleculares são indicadores biológico que podem ser medidos experimentalmente - no sangue, em outros fluidos e tecidos corporais - para diagnosticar, identificar risco de ocorrência, gravidade e prognóstico de uma doença, dentre elas o câncer, e também auxiliar no monitoramento do tratamento e recidiva (TERMINI; VILLA, 2008). Antígeno prostático específico (PSA) e mutação do DNA dos genes BRCA 1 e 2 são exemplos de biomarcadores usados no rastreamento de câncer de próstata e predisposição de câncer de mama e ovário, respectivamente.

A compreensão do mecanismo de interação das oncoproteínas do HPV com o tecido alvo permitiu a observação de biomarcadores que identificam populações celulares com maior risco de câncer de colo uterino (DANIELSEN; PRADHAN; NOVELLI, 2016; DUVLIS et al., 2020; JIANG et al., 2020; KUDELA et al., 2016). Um deles, é a alteração na ploidia do DNA celular que ocorre pela instabilidade genômica provocada pelo vírus (DANIELSEN; PRADHAN; NOVELLI, 2016).

3.3.2 Ploidia, euploidia e aneuploidia

O termo ploidia refere-se ao número de conjuntos de cromossomos do genoma de uma célula, que pode ser: apenas um (haploide), dois (diploide) ou mais (poliploide). Os gametas humanos, por exemplo, são haploides, com 23 cromossomos, enquanto a maioria das células somáticas são diploides, com 46 cromossomos, 23 maternos e 23 paternos. Poliploides são as células em processo de divisão controlada, que possuem número de cromossomos maior do que o da diploide, mas sempre múltiplo exato (4, 8, 16, 32 vezes), condição conhecida por euploidia. Megacariócitos e células hepáticas - cujo conteúdo de DNA chega a ser 16 vezes maior durante a diferenciação tecidual - são exemplos delas (BIESTERFELD; GERRES; BOCKING, 1994).

Quando a repartição entre duas células-filhas não é adequada e o número de cromossomos não é múltiplo do da diploide, fica caracterizada a aneuploidia, aberração numérica e/ou estrutural, com perda ou ganho de conteúdo do DNA (BÖCKING; HUY NGUYEN, 2004; ORR, B.; GODEK, K. M.; COMPTON, 2015). É o que acontece, em geral, nas células cancerígenas e também nas lesões precursoras, no caso do câncer cervical (GARNER, 2014).

3.3.3 Aneuploidia na carcinogênese

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 defeituosa (GARNER, 2014) e, atualmente, aneuploidia e instabilidade cromossômica são reconhecidas como características de células cancerígenas que, frequentemente, atuam em conjunto no processo tumorigênico (DANIELSEN; PRADHAN; NOVELLI, 2016; GIAM; RANCATI, 2015). A primeira decorre da segunda, e acontece após mutações nos genes envolvidos na replicação do DNA, segregação cromossômica e pontos de controle do ciclo

celular e se expressa pela perda da capacidade celular de manter o número de cromossomos, de uma geração para a outra, com elevadas taxas de perda e ganho de conteúdo cromossomal (DANIELSEN; PRADHAN; NOVELLI, 2016; GIAM; RANCATI, 2015; POTAPOVA; ZHU; LI, 2013).

Na neoplasia cervical, essa desregulação da expressão gênica viral, que gera instabilidade no DNA do hospedeiro, desempenha papel central na formação de câncer mediada pelo HPV (SENAPATI; SENAPATI; DWIBEDI, 2016) e a aneuploidia é resultante da ação das oncoproteínas E6 e E7, que promovem anormalidades centrossômicas e erros na segregação cromossômica que, por sua vez, conduzem o início e a progressão do câncer (DUENSING; MÜNGER, 2002).

Foi verificado que a quantidade de alterações do DNA em pacientes com câncer é maior do que nas com NIC 3 e aumenta com o status de integração, que concluiu, então, que a instabilidade cromossômica inicial facilita a integração do DNA viral e potencializa a atividade das oncoproteínas, promovendo o crescimento celular e, eventualmente, progressão para câncer invasivo (BODELON et al., 2015).

3.3.4 Citometria de Imagem do DNA (DNA-ICM)

A aneuploidia pode ser detectada e quantificada por citometria de imagem do DNA (DANIELSEN; PRADHAN; NOVELLI, 2016), método que vem sendo objeto de pesquisa experimental desde 1960 (WONG et al., 2018) e, na maioria dos países, ainda não é utilizada como diagnóstico, apesar de recentes estudos reconhecerem que possui grande potencial de tornar-se fundamental na avaliação clínica de tumores sólidos, como câncer cervical e seus precursores (GIAM; RANCATI, 2015).

A identificação de células com alteração na ploidia do DNA também tem sido utilizada como marcador de neoplasias (BÖCKING; HUY NGUYEN, 2004; HAROSKE et al., 2001; ONOFRE et al., 2008) e se mostrado confiável para avaliar a evolução de lesões pré-cancerosas cervicais, pois a presença de aneuploidia indica provável persistência ou progressão para malignidade, enquanto que de diploidia ou poliploidia, aponta regressão (BOLLMANN et al., 2001; GROTE et al., 2004). Desse modo, permite selecionar as lesões de maior risco de avanço para alto grau e câncer cervical (LORENZATO et al., 2002), distinguir LSIL e HSIL (BOLLMANN et al., 2001), assim como, identificar a evolução em pacientes com diagnóstico

de ASC, LSIL e AGC (GROTE et al., 2004). O objetivo do DNA-ICM, portanto, é identificar células fora do padrão euplóide (BÖCKING; HUY NGUYEN, 2004).

3.3.5 Medição do conteúdo de DNA

A quantificação do conteúdo de DNA, com DNA-ICM, é baseada na lei de Lambert-Beer, que fundamenta a espectrofotometria e estabelece que a absorvância da luz é proporcional à concentração e espessura da solução, que neste caso é o núcleo corado pelo método de Feulgen, técnica citoquímica específica. Na análise, com um filtro de aproximadamente 560nm (tamanho próximo do máximo de absorção para o reagente utilizado, o de Schiff), é selecionado o comprimento de onda ideal da luz monocromática que atravessa a lâmina contendo a amostra, tomando-se as medidas de dentro do núcleo corado e de fora dele, na área da lâmina sem corante. Parte da luz que perpassa o DNA corado é absorvida e o restante é detectado por pixels de uma câmera digital, sendo a absorvância mensurada indiretamente por transmitância e a medida do conteúdo de DNA é estabelecida pelo cálculo da diferença entre a intensidade da luz que alcança o sensor da câmera acoplada ao microscópio, dentro e fora do núcleo (HARDIE; GREGORY; HEBERT, 2002).

Essa câmera possui dispositivo de carga acoplada (CCD), que é um sensor normalmente posicionado onde é formada a imagem primária pela objetiva do microscópio, que se subdivide em milhares de minúsculos pixels, quadrados ou retangulares, com lados medindo entre 6 e 15µm, cada um se comportando como unidade fotométrica independente, que transforma fótons únicos em fotoelétrons e assim o total de DNA nuclear é expresso em unidades de densidade ótica integrada (DOI) e resultante da soma do DNA medido por cada pixel da imagem do núcleo (BÖCKING; HUY NGUYEN, 2004; CHIECO et al., 2013; GARNER, 2014).

Nessa técnica são utilizados, como referência, núcleos - normalmente diploides - de células do mesmo organismo, que podem ser as presentes no preparo em análise (controle interno) ou isoladas de outros tecidos e acrescidas ao material (controle externo), sendo o primeiro mais vantajoso, pois possibilita que todas as etapas de preparação das células importantes no diagnóstico sejam compartilhadas (CHIECO et al., 2013; GROTE et al., 2004).

A interpretação dos resultados, que são exibidos como histogramas de DNA, é feita por algoritmos preconizados no Quarto Consenso ESACP em Diagnóstico por Citometria de Imagem de DNA (CHIECO et al., 2013; HAROSKE et al., 2001). Os histogramas são expressos

em escala "c", que é definida utilizando-se a população diploide de células na fase G0/G1 do ciclo divisório, cujo valor modal de densidade ótica integrada (DOI) - que representa 2c de DNA - permite a graduação dos valores de referência (BÖCKING; HUY NGUYEN, 2004) e a determinação do conteúdo de DNA das demais células de importância diagnóstica.

Verificou-se que lesões com aneuploidia acima de 9c, devem ser investigadas e acompanhadas com bastante rigor, pela maior probabilidade de agravamento (BOLLMANN et al., 2003; LORENZATO et al., 2008) e que, em pacientes com resultados do teste de HPV e citologia conflitantes, especialmente, nos com infecção persistente por HPV, a ploidia do DNA pode ser usada para eleger os de maior risco de evoluir para HSIL (LORENZATO et al., 2002).

Sabe-se que a progressão da NIC 1 para 2, 3 e carcinoma invasivo está relacionada a histogramas com crescente desvio do padrão diplóide de DNA, corroborando o conceito de que aneuploidia é um marcador específico e objetivo de neoplasia cervical e que sua detecção identifica quais lesões pré-cancerosas certamente irão progredir para malignidade (BÖCKING; HUY NGUYEN, 2004; HAROSKE et al., 2001).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO E CASUÍSTICA

O presente estudo observacional prospectivo foi iniciado em abril de 2017, com amostra por conveniência, de 254 pacientes com alteração na colpocitologia oncótica encaminhadas ao ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior, do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina (PTGI do HU-UFSC), recrutadas até setembro de 2018 e acompanhadas até outubro de 2019, para composição de uma coorte.

4.2 CÁLCULO AMOSTRAL

O fator considerado para o cálculo amostral da população finita foi a prevalência de pacientes com lesão de alto grau diagnosticada no exame histopatológico, no universo de consultas novas - ou seja, não se contabilizando retornos - em um ano, no local da pesquisa (MEDRONHO, 2016).

Estudo piloto realizado previamente demonstrou que, em média, 960 pacientes são atendidas anualmente no ambulatório de PTGI do HU- UFSC, e que 192 apresentavam neoplasia intraepitelial cervical de alto grau, ficando estabelecida taxa de prevalência de 20%.

Determinado esse fator, foi utilizado o software OpenEpi versão 3.01 (Atlanta, EUA), resultando amostra necessária de 211 pacientes com confiança de 95%.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios de inclusão considerados para compor a população do estudo foram: ter idade igual ou superior a 18 anos; apresentar colpocitopatológico com alteração (NAYAR; WILBUR, 2015) (Quadro 2); e anuir em participar da pesquisa, com a assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE). E os de exclusão: estar grávida na ocasião do primeiro exame e ter realizado biópsia prévia.

QUADRO 2 - ALTERAÇÕES COLPOCITOLÓGICAS, CONFORME CLASSIFICAÇÃO DO SISTEMA DE BETHESDA.

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) • HSIL não excluindo possibilidade de invasão • Carcinoma escamoso (CEC)
Células glandulares	<ul style="list-style-type: none"> • Atipias glandulares sem outras especificações (AGC-SOE), possivelmente não neoplásicas • Atipias glandulares, favorecendo neoplasia (AGC-NEO) • Adenocarcinoma “in situ” • Adenocarcinoma invasor

Adaptado de Nayar e colaboradores (2015) .

4.4 ASPECTOS ÉTICOS

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC (CAAE: 57423616.3.0000.0121) (Anexo A), as pacientes foram abordadas, informadas dos objetivos da pesquisa e as que aceitaram participar assinaram TCLE em obediência à Resolução CNS n. 466/12 (Anexo B), autorizando a inclusão dos seus resultados laboratoriais e clínicos de rotina.

4.5 QUESTIONÁRIO

A cada participante foi aplicado um questionário tipo entrevista por um membro da equipe médica do Serviço de PTGI do HU-UFSC (Anexo C), com perguntas fechadas e pré-codificadas – duas delas com base na Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), sobre dados

demográficos, socioeconômicos, clínicos e obstétricos, além da periodicidade do exame de citologia oncótica.

4.6 ATENDIMENTO INICIAL

No atendimento inicial das participantes, após exame ginecológico padrão, foi coletada amostra citológica, com espátula de Ayre e escova endocervical, armazenada em base líquida, exclusivamente para pesquisa da ploidia do DNA, no Laboratório de Citologia Clínica da UFSC, e testagem de HPV, no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF).

A seguir, foi realizada colposcopia, em todas as pacientes, com videocolposcópico MEDPEJ® (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), modelo PE 7000, com lentes objetivas de alta resolução, distância focal de 300 ou 400 mm e sistema de magnificação opcional de 7, 14 e 25 vezes (Figura 11). O exame obedeceu a seguinte sistemática: limpeza do muco; observação do colo e mucosa vaginal após aplicação de spray de solução de ácido acético a 3%; realização de teste de Schiller, que foi classificado como iodo positivo (Schiller negativo), se houve captação e o epitélio assumiu coloração marrom escuro, iodo negativo (Schiller positivo), se não houve ou parcialmente positivo, se incompleta.

Os achados da colposcopia foram descritos conforme a preconização da IFCCP (International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy) – Rio de Janeiro 2011 (BORNSTEIN et al., 2012; TATTI; BORNSTEIN; PRENDIVILLE, 2013) (Quadro 3). Na avaliação geral, foi adicionado o termo “insatisfatória” quando a JEC não era totalmente visualizada (ZT3), impossibilitando descartar-se doença endocervical.

QUADRO 3 - TERMINOLOGIA COLPOSCÓPICA - IFCPC 2011.

Avaliação geral	<ul style="list-style-type: none"> • Exame: adequado ou inadequado (especificar causa, por exemplo, atrofia intensa, processo inflamatório) • JEC: visível, parcialmente visível ou não visível • Zona de transformação: tipo 1, 2 ou 3 	
Achados normais	<ul style="list-style-type: none"> • Epitélio escamoso original: maduro ou atrófico • Epitélio colunar: presença ou não de ectopia • Epitélio escamoso metaplásico: presença de cistos de Naboth e/ou orifício glandular aberto • Decidua da gravidez 	
Achados anormais	Princípios gerais	<ul style="list-style-type: none"> • Local da lesão: dentro ou fora da ZT, de acordo com a posição do relógio • Tamanho da lesão: quantidade de quadrantes e porcentagem do colo envolvido
	Grau menor	<ul style="list-style-type: none"> • Epitélio acetobranco tênue com borda irregular ou geográfica • Mosaico fino • Pontilhado fino
	Grau maior	<ul style="list-style-type: none"> • Epitélio acetobranco denso com margens bem demarcadas • Orifícios glandulares espessados • Mosaico grosseiro • Pontilhado grosseiro • Sinal da margem interna • Sinal da crista (sobrelevado)
	Inespecífico	<ul style="list-style-type: none"> • Leucoplasia: queratose, hiperqueratose • Erosão • Captação da solução de lugol: positiva (corado) ou negativa (não corado)
Suspeita de invasão	<ul style="list-style-type: none"> • Vasos atípicos • Outros sinais: vasos frágeis, superfície irregular, lesão exofítica, necrose, ulceração, neoplasia grosseira 	
Miscelânea	<ul style="list-style-type: none"> • ZT congênita, condiloma, pólipo ecto ou endocervical, inflamação, estenose, seqüela pós-tratamento, endometriose 	

Adaptado de Bornstein e colaboradores (2012).

IFCPC: International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy;

A conduta foi guiada pelas diretrizes brasileiras para rastreamento do câncer de colo do útero, do Ministério da Saúde e INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

Nos casos em que havia atrofia ou intenso processo inflamatório – colposcopia inadequada - foi prescrito tratamento e agendado retorno para novo exame.

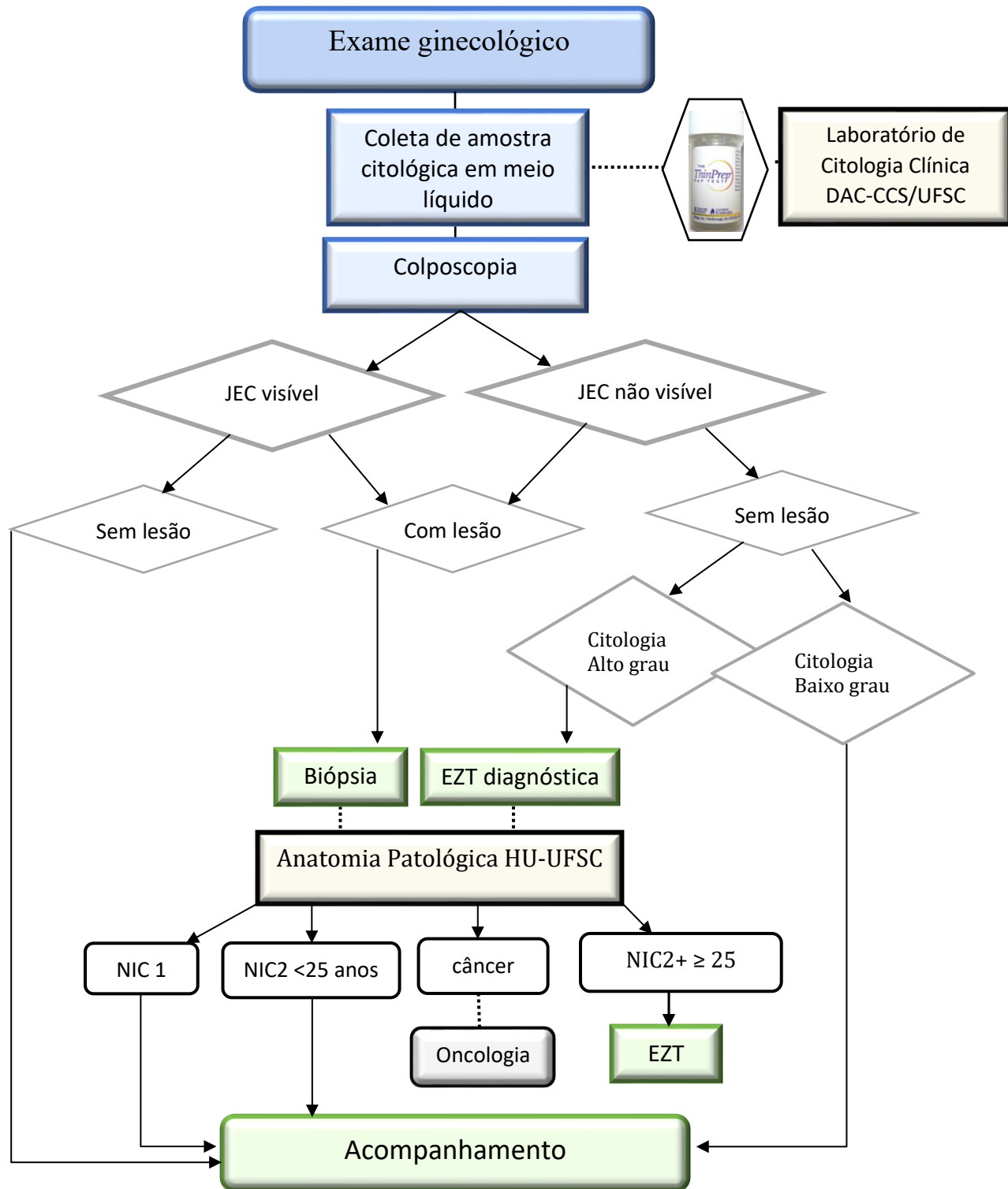
Naqueles que os achados colposcópicos e da citologia do encaminhamento eram suficientes, a conduta foi determinada e realizada no primeiro atendimento:

- Acompanhamento após 6 meses: se colposcopia adequada e sem lesão; ou insatisfatória, sem lesão com citologia de baixo grau;
- Biópsia dirigida: se colposcopia adequada e com lesão; ou insatisfatória, sem lesão com citologia de alto grau, que nesse caso foi denominada de EZT diagnóstica;

E nos casos que dependiam do resultado da histopatologia, o tratamento foi instituído no retorno, cerca de 30 dias depois, definido de acordo com a idade da paciente:

- Acompanhamento após 6 meses: se idade menor que 25 anos e NIC 2; ou NIC 1 com qualquer idade;
- EZT: se idade superior ou igual a 25 anos e NIC 2; NIC 3 com qualquer idade;
- Encaminhamento para o Serviço de Oncoginecologia do HU-UFSC ou para o Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON), em Florianópolis-SC: se diagnóstico de câncer invasor ou microinvasor com margens comprometidas, na biópsia ou na EZT.

FIGURA 11 - FLUXOGRAMA: ATENDIMENTO INICIAL DA POPULAÇÃO ESTUDADA.



Elaborado pela autora.

DAC- departamento de análises clínicas; CCS- centro de ciências da saúde; HU- hospital universitário; UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina.

4.7 EXAME HISTOPATOLÓGICO

O material obtido pelas biópsias foi fixado em formol tamponado a 10% e enviado ao Serviço de Anatomia Patológica do HU-UFSC, que realizou o processamento das lâminas, da seguinte maneira: cortes histológicos, de até 3 μm de espessura, feitos com navalhas descartáveis, em micrótomo rotativo manual; imersão em parafina; desparafinamento em estufa a 60°C; e coloração com hematoxilina-eosina (H.E).

A avaliação histológica foi realizada por dois experientes médicos patologistas, eventuais discrepâncias resolvidas em consenso e empregada a terminologia elaborada pelo projeto LAST (Lower Anogenital Squamous Terminology) para diagnóstico de lesões escamosas do trato genital inferior (WAXMAN et al., 2012).

4.8 EXAME CITOLÓGICO

Os frascos com as amostras coletadas e conservadas em solução ThinPrep® PreservCyt® foram mantidos em geladeira, por no máximo seis semanas. Para o processamento: foram retirados da armazenagem e, após atingirem a temperatura ambiente, agitados manualmente; transferiu-se 14 ml do conteúdo para um tubo estéril de fundo cônico, tipo Falcon, que foi colocado durante 5 minutos, à velocidade de 1800 rpm, em citocentrífuga semiautomatizada Cellspin® I (TharmacGmbH, Waldsolms, Alemanha) que, segundo o fabricante, filtra o excesso da amostra e produz fina monocamada de células, sem sobreposições, em uma área de 22 x 15 mm na lâmina de vidro; 2 ml do sobrenadante e 15 μl do sedimento obtidos foram colocados em um tubo de ensaio; e as lâminas preparadas com a suspensão de células contida no tubo, sendo o restante devolvido para o frasco original em base líquida.

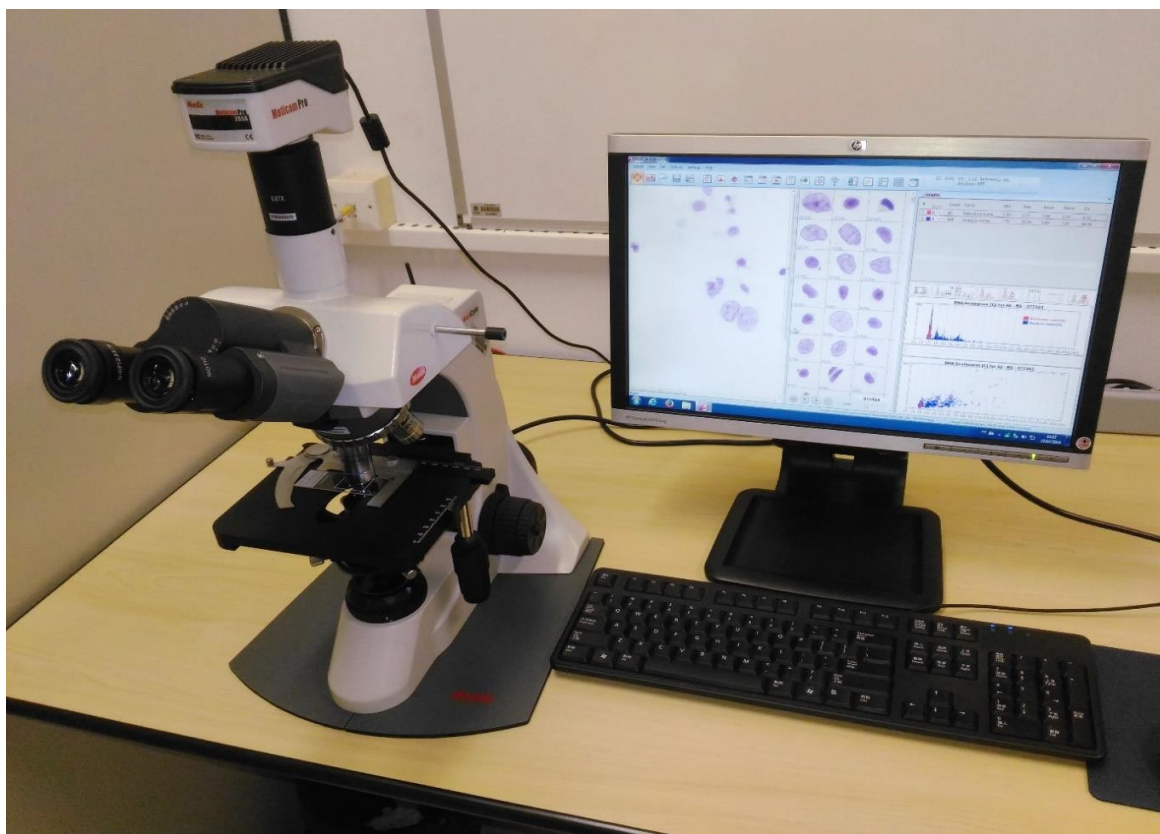
Após secagem natural, as lâminas foram submetidas à coloração pelo clássico método de Papanicolau e analisadas com microscopia de luz, com o único objetivo de identificar células com atipias, etapa necessária para a avaliação por citometria de DNA.

4.9 CITOMETRIA DE IMAGEM DO DNA

As lâminas contendo células atípicas detectadas na citologia, foram imersas em xilol, permitindo a completa remoção das lamínulas, para as amostras serem então coradas pelo método de Feulgen (Merck, Darmstadt, Germany) (BIESTERFELD et al., 2011), específico para DNA. Após remoção das lamínulas, a coloração iniciou-se com imersão sequencial da lâmina em solução de etanol a 99,5% e depois a 96%, por 5 minutos em cada uma; e em formalina tamponada a 10%, por 50 minutos. Em seguida, a lâmina foi lavada com água destilada, duas vezes, por 10 e 5 minutos; mantida em ácido clorídrico 5N a 27° C, durante 60 minutos; novamente lavada com água destilada, agora três vezes, durante 2 minutos cada; colocada por 60 minutos em reagente de Schiff; posta em bateria de SO₂.H₂O, por 5 minutos, três vezes; lavada com água destilada, durante 1 minuto, duas vezes; desidratada em bateria de etanol 70, 96 e 99,5%, 3 minutos em cada concentração e deixada em xilol, por 15 minutos.

Ao final do processo, as lâminas foram montadas com Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), armazenadas ao abrigo da luz até o momento da medição do conteúdo de DNA, que foi realizada com sistema de análise *MotiCyte DNA Cytology Work Station* (Motic, Xiamen, China), que consiste em um computador acoplado a um microscópio Motic BA410™, com câmera de vídeo colorida Moticom Pro 285A™ (1.4 megapixels, 1360 x 1024 pixels) e software *MotiCyte* versão 2 (Motic, Xiamen, China) (Figura 12).

FIGURA 12 - SISTEMA DE ANÁLISE DE DNA-ICM.



Sistema *MotiCyte DNA Cytology Work Station* (Motic, Xiamen, China) com câmera acoplada ao microscópio: células selecionadas para a análise (no monitor).

O exame iniciou-se com a escolha de no mínimo 30 núcleos de células normais, para a calibração dos valores de densidade ótica integrada (DOI), que foram medidos e convertidos em valores de referência de $2c$, que equivale ao valor médio de conteúdo de DNA do núcleo de células diploides na fase G₀/G₁ do ciclo celular. Foi adotado um coeficiente de variação das células de referência inferior a 5% (BÖCKING; HUY NGUYEN, 2004).

Após a calibração: foram selecionadas no mínimo 300 células, de cada lâmina; incluídas na análise, por sua relevância, as com características suspeitas (núcleo aumentado e com coloração mais intensa); quantificado o conteúdo de DNA; e os valores de DOI, representados em forma de histograma, conforme descrição definida nos termos técnicos inerentes ao método (Quadro 4).

QUADRO 4 - TERMOS TÉCNICOS DA DNA-ICM.

Histograma de DNA (em unidade “c”)	Frequência da distribuição dos valores de DOI: obtidos pela medição do DNA celular e reescalados a partir das células de referência.
Pico do histograma de DNA	Alcance estatisticamente significativo em um histograma de DNA.
DNA <i>stemline</i>	População proliferativa de células com um único padrão cromossomal.
DNA euploide	Distribuição que não pode ser diferenciada da população celular normal.
DNA aneuploide	Distribuição estatisticamente diferente da população celular normal.
DNA diploide	Histograma euploide equivalente ao da população de células somáticas humanas.
Poliploidização	Progressão repetitiva de conteúdo de DNA euploide (x2, x4, x8, etc).

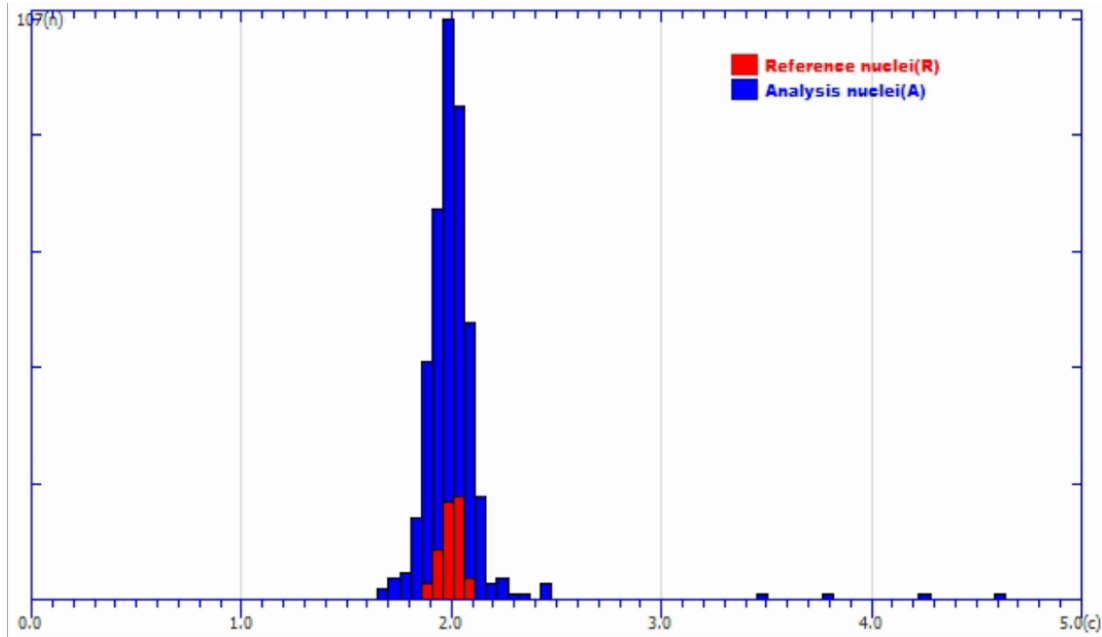
Adaptado de Haroske e colaboradores (2001).

DNA-ICM: citometria de imagem do DNA.

Os histogramas foram analisados pelo software da *MotiCyte DNA Cytology Work Station* (Motic, Xiamen, China) e o laudo registrado de acordo com os princípios e diretrizes do Quarto Consenso da ESACP em Diagnóstico por Citometria de Imagem de DNA (HAROSKE et al., 2001), que classifica as amostras em dois grupos, euploide ou aneuploide.

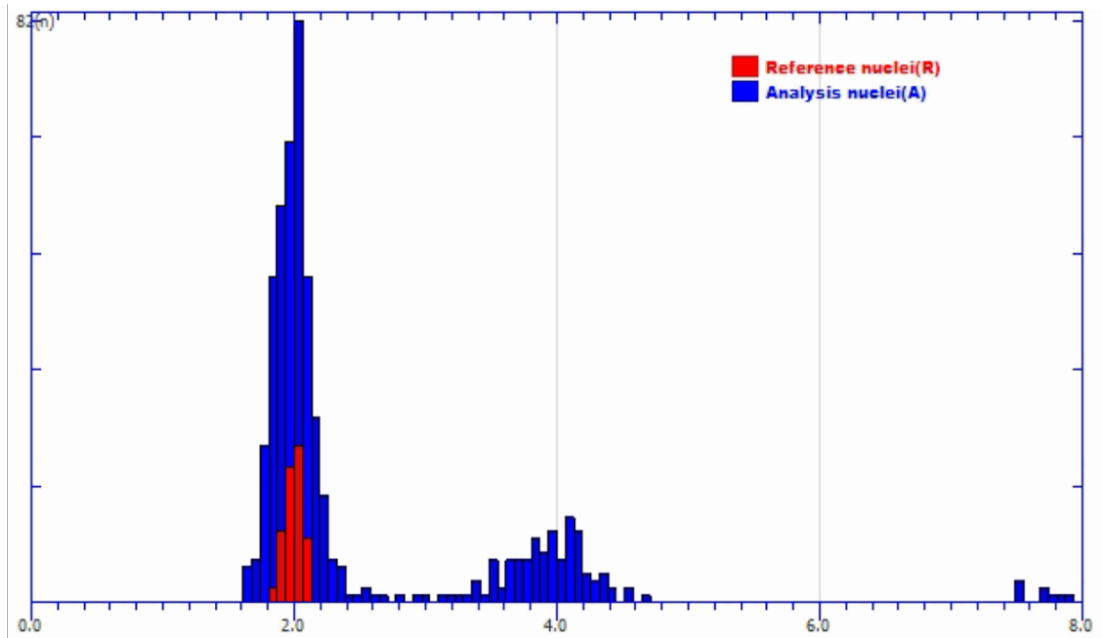
A amostra foi considerada: euploide, se a distribuição do DNA foi equivalente ao da célula somática humana (Figura 13); poliploide, se com conteúdo de DNA euploide repetitivo: x2, x4 (Figura 14), x8 e assim por diante; aneuploide se apresentou ao menos uma *stemline* cujo conteúdo de DNA diferiu pelo menos 10% do valor médio da população de referência. Isto é, se o valor modal da *stemline* foi 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 15). Aneuploidia por eventos raros é determinada com pelo menos uma célula por lâmina em análise com conteúdo de DNA superior a 9c (BÖCKING; HUY NGUYEN, 2004).

FIGURA 13 - - HISTOGRAMA COM PADRÃO DIPLOIDE DE DNA (STEMLINE EM 2C).



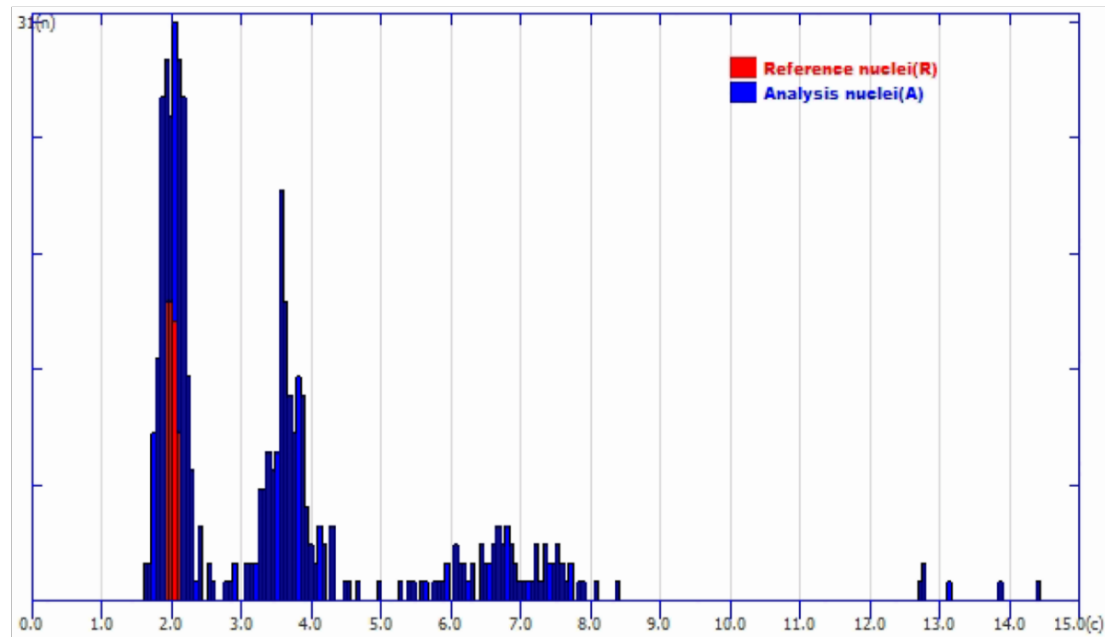
Núcleos de referência (R), em vermelho e analisados (A), em azul.

FIGURA 14 - HISTOGRAMA COM PADRÃO TETRAPLOIDE DE DNA (STEMLINE EM 2C E 4C).



Núcleos de referência (R), em vermelho e analisados, (A) em azul.

FIGURA 15 - HISTOGRAMA COM PADRÃO ANEUPLOIDE DE DNA (STEMLINE EM 2C, 6.7C E 7.4C; EVENTOS EXCEDENDO 9C = 6).



Núcleos de referência (R), em vermelho e analisados (A), em azul.

4.10 TESTE DE HPV

O diagnóstico de infecção por HPV é feito atualmente por exames de biologia molecular que investigam a presença do DNA do vírus no material analisado.

As amostras citológicas coletadas no primeiro atendimento das participantes da pesquisa foram analisadas no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF), com o teste CLART® HPV2 (Genomica, Madri, Espanha), que é um ensaio de microarranjos de baixa densidade, integrante de linha de produtos de diagnóstico in vitro para uso clínico.

O processamento do material para esse exame consiste em aumentar a concentração de DNA, pela amplificação por PCR, de determinados fragmentos do genoma de cada tipo de vírus, produzindo amplicons. A avaliação do grau de semelhança entre os amplicons e sondas específicas permite a detecção, em uma única amostra, de infecções de até 35 genótipos de HPV, de alto e baixo risco, com alta especificidade e sensibilidade.

A interpretação é feita de forma totalmente automatizada, por *software* de processamento de imagem, que localiza e analisa todos os alvos – microarranjos - presentes na imagem, evitando assim qualquer subjetividade que pudesse advir da variação entre observadores. Os achados são fornecidos em relatórios claros e concisos, para então serem interpretados.

As amostras que obtiveram “resultado inválido”, foram novamente testadas e o segundo laudo é que foi considerado.

4.11 SEGUIMENTO E COMPOSIÇÃO DA COORTE

Após averiguação do resultado dos exames realizados no primeiro atendimento, foi desenhado o *follow-up* (Figura 16), excluindo-se as 19 pacientes que tiveram diagnóstico de câncer. Independentemente da conduta adotada, cirúrgica ou observacional, para as demais, foi agendada avaliação a cada 6 meses, em média, para seguimento: com colpocitologia; colposcopia; e, se indicado, biópsia ou EZT e respectiva análise da histopatologia. O exame de Papanicolau foi feito pelo método de citologia convencional e não foram repetidos os exames de DNA-ICM e teste de HPV.

Durante o acompanhamento, a coorte foi sendo composta e, de acordo com o comportamento da doença dividida em dois grupos: “casos” e “não casos” (Quadro 5).

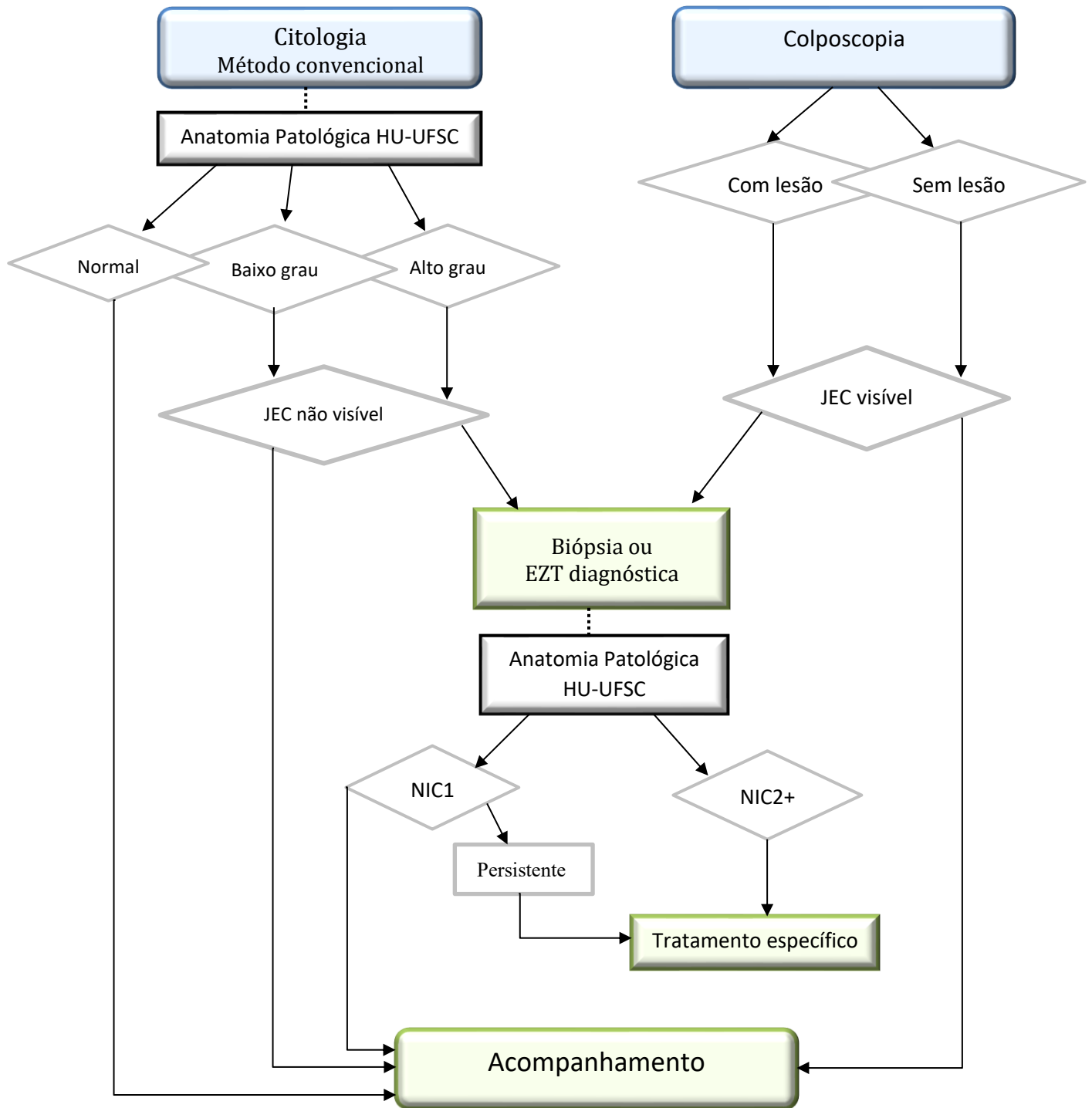
No grupo “casos” foram incluídas as pacientes com: progressão do grau da lesão, na histopatologia; recidiva de NIC 2+ após EZT; persistência de NIC 1 durante 2 anos; e as com menos de 25 anos com NIC 2 que se manteve ou evoluiu.

E no grupo “não casos”, as que tiveram resultados de exames normais; alteração de baixo grau na citologia sem correspondência na colposcopia; e NIC 1 não persistente.

QUADRO 5 - DIVISÃO DA COORTE.

GRUPO	CASOS	NÃO CASOS
≥ 25 anos	NIC 2 recidivada NIC 1 persistente NIC 1 progressão	Exames normais NIC 1 não persistente e/ou com colposcopia normal
< 25 anos	NIC 2 persistente NIC 2 progressão	

FIGURA 16 - FLUXOGRAMA: SEGUIMENTO DA POPULAÇÃO ESTUDADA.



Elaborado pela autora.

HU: Hospital Universitário; UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina; JEC: junção escamo colunar; EZT: exérese da zona de transformação.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da pesquisa foram averiguados por análise estatística descritiva de todas as variáveis por: distribuição de frequência, para as categóricas; e medidas de tendência central e sua dispersão, para as contínuas, que foram também estudadas quanto à adesão de suas distribuições de frequência ao modelo gaussiano (normal), por meio do teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Foram aplicados os testes estatísticos qui-quadrado, exato de Fischer, teste U de Mann Whitney e o cálculo do Odds Ratio brutas, sendo considerado o valor de p de 5% ($p < 0,05$).

A dicotomização dos fatores para análise binária foi feita com base em dados da literatura e analisadas as variáveis epidemiológicas: idade, estado civil, escolaridade, tabagismo, paridade, uso de anticoncepcional hormonal e de preservativo, história de IST e HIV. O ponto de corte escolhido, em relação à idade, foi 30 anos porque é a partir daí que a infecção por HPV persistente é mais frequente e, por consequência, maior a probabilidade de desenvolvimento de lesão (PILEGGI et al., 2014; ZUR HAUSEN, 2002).

Os dados de todos os métodos diagnósticos realizados foram cruzados com os da histopatologia, porque é o padrão ouro na investigação de lesões precursoras do câncer cervical, e os da citologia com os da colposcopia, por serem os exames de rotina para o rastreamento dessa neoplasia.

A curva ROC foi empregada para verificar o melhor ponto de corte entre o tamanho da lesão do colo uterino e a gravidade na biópsia, sendo que valores da área sob a curva (AUC) de 0,7- 0,8 representaram razoável discriminação e os acima de 0,8, boa.

O teste de Kappa serviu para avaliar o grau de concordância da sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos que, de acordo como os valores obtidos, foi classificado em: muito bom, de 0,81-1,00; bom, de 0,61-0,80; moderado, de 0,41-0,60; fraco, de 0,21-0,40; e pobre, se $< 0,20$.

A regressão logística foi realizada para identificar fatores de risco independentes para o diagnóstico de lesões intraepiteliais cervicais de alto grau e, na análise bivariada, o critério para inclusão no modelo múltiplo foi valor do $p \leq 0,25$ e para permanência no modelo final, $p \leq 0,05$.

Após o seguimento, antes da caracterização e composição da coorte, com o intuito de evitar potenciais vieses e avaliar a homogeneidade da amostra, os achados das participantes que continuaram no estudo foram comparados com os das que não retornaram.

Na análise da coorte, o tempo livre de lesão de pior prognóstico e a probabilidade de sobrevida livre de doença em dois anos, das variáveis que obtiveram significância no teste qui quadrado, foi calculado através do estimador de Kaplan-Meier e construídas curvas para verificação da proporcionalidade dos riscos entre elas. O grupo da coorte que evoluiu com agravo, denominado “casos”, foi considerado como falha. Após o risco de proporcionalidade ser aceito, empregou-se o modelo multivariado de COX para avaliação do efeito independente das covariáveis, considerando o valor de $p \leq 0,05$.

Considerando-se que mulheres HIV soropositivas possuem risco aumentado de lesões precursoras e câncer invasor (SILVERBERG; LEYDEN; CHI, 2018), para verificação da proporcionalidade dos riscos e da significância, a variável “ploidia do DNA” foi estudada também excluindo-se a variável "HIV".

Para as análises estatísticas foram empregados os programas de computador *MedCalc Statistical Software version 19.1.5 (MedCalc Software by Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020)* e *Open Epi 2.2.1*.

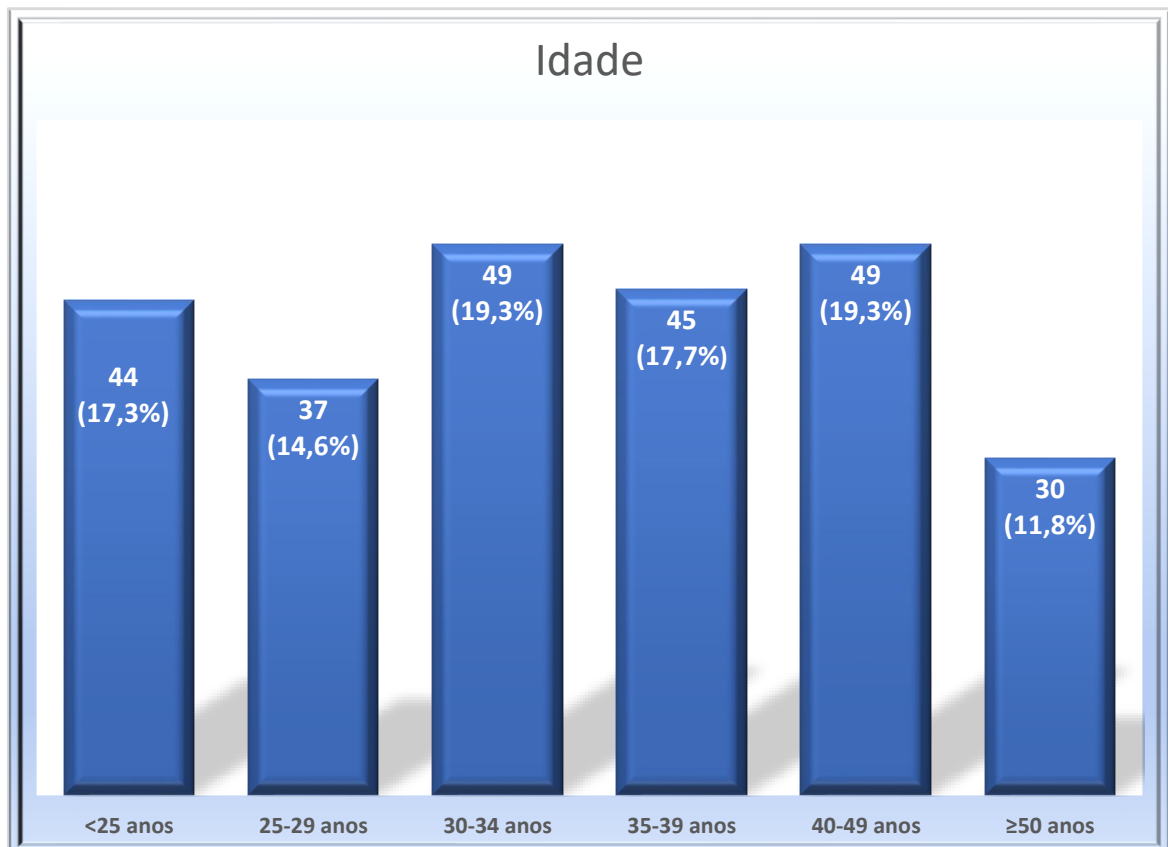
5 RESULTADOS

5.1 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO

O perfil epidemiológico da população da pesquisa foi delineado a partir das respostas ao questionário aplicado na ocasião do recrutamento, de abril de 2017 a setembro de 2018.

A idade das pacientes variou de 17 a 77 anos e a distribuição por faixa etária está expressa no Gráfico 1.

GRÁFICO 1- DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO DA PESQUISA, CONFORME A FAIXA ETÁRIA. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018 (N=254)



Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

A idade média quando foi realizado o recrutamento era 35,88 anos, no início da atividade sexual, 17 e no primeiro parto, 20,5. A média da paridade era 1,42 filhos e do tempo de estudo, 12 anos (Tabela 1).

TABELA 1 - MEDIDAS DE TENDÊNCIA CENTRAL E DISPERSÃO DAS VARIÁVEIS CONTÍNUAS. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018 (N=254)

Variável	Média (DP)	Mediana (Min – Max)
Idade no recrutamento	35,88 (11,12)	34 (18-77)
Idade no início da atividade sexual	17,00 (3,06)	17 (11-42)
Idade no primeiro parto	20,5 (4,70)	19 (14-38)
Paridade	1,42 (1,70)	1 (0 -11)
Tempo de estudo	12 (4,36)	12 (0- 21)

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; DP: desvio padrão; Min: mínimo; Max: máximo.

Os dados epidemiológicos compilados foram estruturados de forma binária e estão demonstrados na Tabela 2, na qual se observa que a maioria das participantes tinha idade ≥ 30 anos; era solteira, separada ou viúva. Que grande porcentagem delas: relatou ter no máximo 2 filhos (79,5%) e estudado durante mais de 8 anos (84,3%); e negou ser tabagista (74,8%), usar preservativo habitualmente (83,1%) e histórico de IST (70,5%).

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO DA PESQUISA, CONFORME OS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS COMPILADOS. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018 (N=254)

Variável	N (%)
Idade	
< 30 anos	81 (31,9)
≥ 30 anos	173 (68,1)
Estado civil	
Casada/ união estável	121 (47,6)
Solteira/separada/viúva	133 (52,4)
Paridade	
Até 2 filhos	202 (79,5)
≥ 3 filhos	52 (20,5)
Escolaridade	
≥ 8 anos (média e alta)	214 (84,3)
< 8 anos (baixa)	40 (15,7)
Tabagismo	
Não	190 (74,8)
Sim	64 (25,2)
Preservativo	
Não	211 (83,1)
Sim	43 (16,9)
História de IST	
Não	179 (70,5)
Sim	75 (29,5)
Anticoncepcional hormonal	
Não	130 (51,2)
Sim	124 (48,8)

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa; IST: infecção sexualmente transmissível.

A análise bivariada da frequência de IST de acordo com a idade (Tabela 3) indica que: gonorreia e hepatite B não foram relatadas por nenhuma das mulheres do estudo; condiloma, herpes e clamídia foram as mais referidas pelas jovens, enquanto HIV, sífilis, trichomonas e hepatite C, pelas com mais de 30 anos. Algumas contaram ter tido mais de um tipo de IST, por isso que a soma do total da frequência (95) é maior que o das pacientes (75).

TABELA 3 - FREQUÊNCIA DE IST RELATADAS PELAS PACIENTES, CONFORME A FAIXA ETÁRIA. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018 (N=75)

IST	Idade		Total N (%)
	< 30 anos N (%)	≥ 30 anos N (%)	
HIV	1 (1,1)	10 (5,8)	11 (4,3)
Sífilis	1 (1,2)	11 (6,4)	12 (4,7)
Clamídia	4 (4,9)	3 (1,7)	7 (2,8)
Trichomonas	0 (0,0)	4 (2,3)	4 (1,6)
Herpes genital	6 (7,4)	12 (6,9)	18 (7,1)
Condilomas	18 (22,2)	22 (12,7)	40 (15,7)
Hepatite C	0 (0,0)	3 (1,7)	3 (1,2)
Total*	30	65	95

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa; IST: infecção sexualmente transmissível; HIV: vírus da imunodeficiência humana.

* a soma do total da frequência (95) foi maior que o das pacientes (75) porque algumas mulheres relataram ter tido mais de um tipo de IST.

A Tabela 4 apresenta a distribuição do período decorrido entre a realização da citologia do encaminhamento e a anterior, conforme a idade abaixo ou acima de 25 anos, pois esse é o limite inferior da faixa etária - 25 a 64 anos – recomendada pelo Ministério da Saúde do Brasil para início da investigação de câncer do colo uterino com exame de Papanicolaou. Assim foi possível observar que: nesse grupo 78,6% fez o exame no máximo 3 anos antes e apenas 2,9% nunca o havia feito; e que 72,7% das mulheres que não teriam indicação, já tinha começado o rastreamento.

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DO PERÍODO DECORRIDO DESDE A ÚLTIMA CITOLOGIA, CONFORME IDADE SUPERIOR OU INFERIOR A 25 ANOS. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018 (N=254)

Citologia anterior	< 25 anos N (%)	≥ 25 anos N (%)	Total N (%)
Menos de 1 ano	15 (34,1)	70 (33,3)	85 (33,5)
1 a 2 anos	15 (34,1)	69 (32,9)	84 (33,1)
2 a 3 anos	2 (4,5)	26 (12,4)	28 (11,0)
Mais de 3 anos	0 (0)	39 (18,6)	39 (15,4)
Nunca	12 (27,3)	6 (2,9)	18 (7,1)
Total	44 (100)	210 (100)	254 (100)

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa.

5.2 ANÁLISE DESCRITIVA DOS RESULTADOS DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

5.2.1 Citologia

O diagnóstico das colpocitologias do encaminhamento: foi lesão de baixo grau, na maior parte (53,6%) da população do estudo e sugestivo de câncer em 4,7% (Tabela 5).

TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO DA PESQUISA, CONFORME O DIAGNÓSTICO DA CITOLOGIA DO ENCAMINHAMENTO. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018 (N=254)

Variável	N (%)
ASC-US	65 (25,6)
LSIL	71 (28,0)
ASC-H	42 (16,5)
HSIL	58 (22,8)
AGC-SOE	6 (2,4)
AGC-NEO	11 (4,3)
Suspeita de câncer	1 (0,4)
Total	254 (100)

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa; ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H: células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau; LSIL: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; HSIL: lesão intraepitelial escamosa de alto grau; AGC-SOE: células atípicas glandulares sem outras especificações; AGC-NEO: células atípicas glandulares favorecendo neoplasia.

5.2.2 Colposcopia

Os achados da colposcopia eram: anormais e com lesão presente em 87,7% dos casos, sendo a maioria de grau menor (49,2%); normais em 5,5%; e insatisfatórios em 6,7%.

A zona de transformação do tipo 1 foi a mais prevalente (56,3%). Em grande número das pacientes (91,3%) foi realizado procedimento: biópsia dirigida nas 223 que apresentavam lesão; e EZT diagnóstica nas 9 das 17 que tinham JEC não visualizada e citologia do encaminhamento com alteração de alto grau.

O tamanho da lesão foi apurado em percentual de colo uterino acometido conforme recomenda a IFCPC (*International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy* – Rio de Janeiro 2011) e, em mais da metade dos casos (54,3%), o comprometimento era menor que 20% (Tabela 6).

TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO DA PESQUISA, CONFORME O DIAGNÓSTICO DA COLPOSCOPIA. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018 (N=254)

Variável	N (%)
Impressão colposcópica	
Normal	14 (5,5)
Insatisfatória	17 (6,7)
Grau menor	125 (49,2)
Grau maior	88 (34,6)
Sugestivo de câncer	10 (3,9)
Zona de transformação	
Tipo 1	143 (56,3)
Tipo 2	52 (20,5)
Tipo 3	59 (23,2)
Procedimento	
Biópsia dirigida	223 (87,8)
EZT diagnóstica	9 (3,5)
Sem procedimento	22 (8,7)
Lesão visível	
Sim	223 (87,8)
Não	31 (12,2)
Tamanho da lesão na colposcopia (% de comprometimento do colo)	
Até 20%	121 (54,3)
Entre 20 e 50%	65 (29,1)
> 50%	37 (16,6)

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa.

Após o cálculo da sensibilidade e especificidade do tamanho da lesão conforme a gravidade na histopatologia e obtidos seus respectivos valores (Tabela 7) foi elaborada uma Curva ROC (Figura 17) com o objetivo de verificar o melhor ponto de corte para detecção de NIC 2+, que ficou demonstrado ser em 20% com área de 0,834 ($p < 0,001$). Observou-se também que as lesões que acometem 50% ou mais do colo possuem alta especificidade, mas progressivamente perdem sensibilidade.

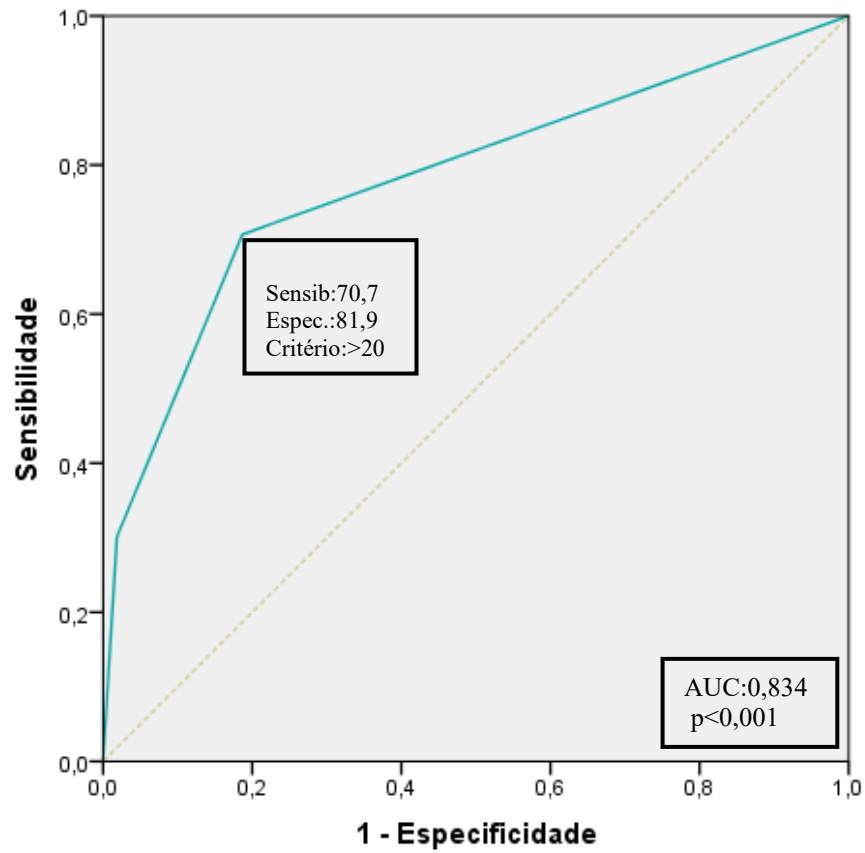
TABELA 7 - SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TAMANHO DA LESÃO NA COLPOSCOPIA CONFORME A GRAVIDADE NA HISTOPATOLOGIA. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018

Tamanho da lesão	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
≤ 5%	100	0
10%	97,4	26,6
15%	92,2	53,3
20%	70,7	81,9
30%	41,3	95,2
50%	20,7	100
70%	6,0	100
90%	2,5	100
100%	0	100

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; %: frequência relativa.

FIGURA 17 - CURVA ROC MOSTRANDO A SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TAMANHO DA LESÃO CONFORME A GRAVIDADE NA HISTOPATOLOGIA. HU-UFSC

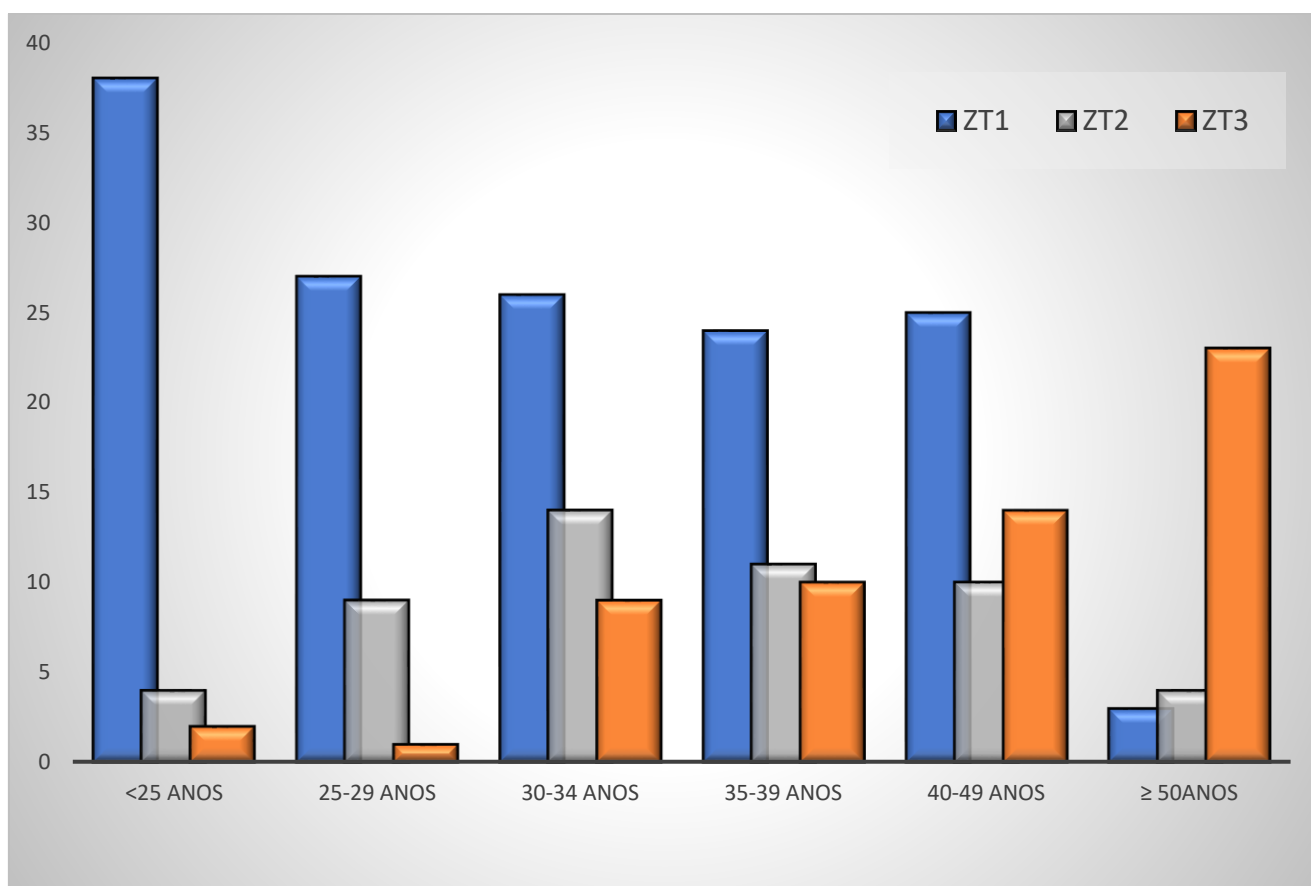


Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; Sensib.: sensibilidade; Espec.: especificidade; AUC: área sob a curva.

O Gráfico 2, que mostra a frequência do tipo de zona de transformação por faixa etária, evidencia que: quanto maior a idade da paciente mais a JEC vai se tornando endocervical e, por conseguinte, não totalmente visualizada; e que 76,6% das mulheres acima de 50 anos apresentava ZT do tipo 3.

GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO DO TIPO DE ZONA DE TRANSFORMAÇÃO, CONFORME A FAIXA ETÁRIA. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018



Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; ZT1: zona de transformação tipo 1; ZT2: zona de transformação tipo 2; ZT3: zona de transformação tipo 3.

5.2.3 Histopatologia

No primeiro atendimento foi obtido material para 232 exames histopatológicos que diagnosticaram: a mesma quantidade de lesões de menor e maior gravidade; e 14 pacientes com câncer (Tabela 8).

TABELA 8 - DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO DA PESQUISA, CONFORME O DIAGNÓSTICO DA HISTOPATOLOGIA. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018

Variável	N (%)
Condiloma/cervicite	41 (17,7)
NIC 1	68 (29,3)
NIC 2	72 (31)
NIC 3	37 (15,9)
Câncer microinvasor	2 (0,9)
CEC invasor	6 (2,6)
Adenoca “ <i>in situ</i> ”	2 (0,9)
Adenoca invasor	4 (1,7)
Total	232 (100)

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa; NIC: neoplasia intraepitelial cervical; CEC: carcinoma escamo celular; Adenoca: adenocarcinoma.

5.2.4 DNA-ICM e teste de HPV

DNA-ICM e teste de HPV foram realizados no material coletado em meio líquido na consulta inicial. O primeiro, em 252 amostras, pois em 2 não havia material suficiente para análise da ploidia e o segundo, em 121.

Aneuploidia foi observada em quase metade das amostras (44,8%) e algum tipo de HPV de alto risco, em 59,5%, com cerca de um terço constituído pelo genótipo 16 (Tabela 9 e 10).

TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO DA PESQUISA, CONFORME O DIAGNÓSTICO DA DNA-ICM. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018 (N=252)

Variável	N (%)
Presença de aneuploidia	
Não	139 (55,2)
Sim	113 (44,8)

Elaborado pela autora.

N: frequência absoluta; %: frequência relativa.

TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO DA PESQUISA, CONFORME O DIAGNÓSTICO DO TESTE DE HPV. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018 (N=121)

Variável	N (%)
Presença de HPV de alto risco*	
Não	49 (40,5)
Sim	72 (59,5)
Presença do HPV 16	
Não	88 (72,7)
Sim	33 (27,3)

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; DNA: ácido desoxirribonucleico; HPV: papilomavírus humano; N: frequência absoluta; %: frequência relativa;

*HPV de alto risco: 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68.

5.3 CORRESPONDÊNCIA DO GRAU DE GRAVIDADE ENTRE OS RESULTADOS DA CITOLOGIA, COLPOSCOPIA E HISTOPATOLOGIA

O Quadro 6 apresenta, de forma prática e didática, a relação do grau de gravidade entre citologia, colposcopia e histopatologia, para facilitar a análise cruzada dos resultados obtidos.

QUADRO 6 - CORRESPONDÊNCIA DA CITOLOGIA, COLPOSCOPIA E HISTOPATOLOGIA, CONFORME A GRAVIDADE.

Gravidade	Citologia	Colposcopia	Histopatologia
Baixo grau	ASC-US LSIL	Grau menor	Condiloma NIC 1
Alto grau	ASC-H HSIL ACG-SOE	Grau maior	NIC 2 NIC 3
Carcinoma e/ou sugestivo de carcinoma	AGC-NEO CEC AdenoCa “ <i>in situ</i> ” AdenoCa invasor	Sugestivo de câncer	CEC microinvasor CEC invasor AdenoCa “ <i>in situ</i> ” AdenoCa invasor

Elaborado pela autora.

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; ASC-H: células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau; HSIL: lesão intraepitelial escamosa de alto grau; ACG-SOE: células atípicas glandulares sem outras especificações; AGC-NEO: células atípicas glandulares favorecendo neoplasia; CEC: carcinoma de células escamosas; Adenocarcinoma; NIC: neoplasia intraepitelial cervical.

5.4 ANÁLISE CRUZADA DOS RESULTADOS DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

5.4.1 Citologia do encaminhamento e colposcopia

Foi realizada análise cruzada dos achados da citologia do encaminhamento com a colposcopia, por serem os exames usualmente utilizados no rastreamento do câncer cervical. Constatou-se clara correspondência entre eles, entretanto a lesão de baixo grau ASC-US era o diagnóstico citológico de 2 (20%) dos casos com colposcopia sugestiva de câncer (Tabela 11).

TABELA 11 - DISTRIBUIÇÃO DA CITOLOGIA, CONFORME A COLPOSCOPIA. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018 (N=254)

Citologia	Colposcopia					Total N (%)
	Normal N (%)	Insatisfatória N (%)	Grau menor N (%)	Grau maior N (%)	Sugestivo de câncer N (%)	
ASC-US	10 (71,4)	7 (41,2)	38 (30,4)	8 (9,1)	2 (20,0)	65 (25,6)
LSIL	1 (7,1)	1 (5,9)	54 (43,2)	15 (17,0)	0 (0,0)	71 (28,0)
ASC-H	2 (14,3)	1 (5,9)	16 (12,8)	20 (22,7)	3 (30,0)	42 (16,5)
HSIL	0 (0,0)	7 (41,9)	9 (7,2)	40 (45,5)	2 (20,0)	58 (22,8)
AGC- SOE	1 (7,1)	0 (0,0)	3 (2,4)	1 (1,1)	1 (10,0)	6 (2,4)
AGC-NEO	0 (0,0)	1 (5,9)	5 (4,0)	4 (4,5)	1 (10,0)	11 (4,3)
Suspeita de câncer	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (10%)	1 (0,4)
Total	14 (100)	17 (100)	125 (100)	88 (100)	10 (100)	254 (100)

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa; ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado; ; LSIL: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; ASC-H: células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau; HSIL: lesão intraepitelial escamosa de alto grau; AGC-SOE: células atípicas glandulares sem outras especificações; AGC-NEO: células atípicas glandulares favorecendo neoplasia.

5.4.2 Histopatologia e demais exames

Visto que a análise histopatológica é o padrão ouro para diagnosticar lesões do colo uterino, seus resultados foram comparados com os de todos os outros exames realizados.

5.4.2.1 Histopatologia e citologia do encaminhamento

A histopatologia do material das biópsias e EZT diagnósticas efetuadas na primeira colposcopia: ratificou o grau de gravidade da citologia do encaminhamento em 76,1% dos casos de baixo grau, em 67,9% dos de alto e em 28,6% dos com suspeita de câncer; e diagnosticou câncer em 14,3% dos de baixo grau e em 57,1% dos de alto grau (Tabela 12).

TABELA 12 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DA HISTOPATOLOGIA COM A CITOLOGIA DO ENCAMINHAMENTO. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018 (N=232)

Citologia	Histopatologia			Total N (%)
	Baixo grau N (%)	Alto grau N (%)	Câncer N (%)	
Baixo grau	83 (76,1)	32 (29,4)	2 (14,3)	117 (50,4)
Alto grau	21 (19,3)	74 (67,9)	8 (57,1)	103 (44,4)
Sugestiva de câncer	5 (4,6)	3 (2,8)	4 (28,6)	12 (5,2)
Total	109 (100)	109 (100)	14 (100)	232 (100)

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa.

5.4.2.2 Histopatologia e colposcopia

Os resultados da histopatologia e colposcopia do primeiro atendimento das 232 pacientes que tiveram indicação de procedimento convergiram no que tange à gravidade: mais de 90% dos condiloma e NIC 1 era grau menor; cerca de 70% das NIC 2 e 3, grau maior; e 100% dos CEC invasor e 75% dos adenocarcinomas teve o diagnóstico sugerido na colposcopia. A lesão não era visível em 50% dos 4 casos de câncer no estágio inicial (Tabela 13).

TABELA 13 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DA HISTOPATOLOGIA COM OS DA COLPOSCOPIA. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018 (N=232)

Impressão colposcópica	Histopatologia								Total N (%)
	Condiloma Cervicite N (%)	NIC 1 N (%)	NIC 2 N (%)	NIC 3 N (%)	Micro Invasor N (%)	CEC Invasor N (%)	Adenoca "in situ" N (%)	Adenoca Invasor N (%)	
Insatisfatória	1 (2,4)	1 (1,5)	1 (1,4)	5 (13,5)	1 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (3,9)
Grau menor	37 (90,2)	64 (94,1)	20 (27,8)	3 (8,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	125 (53,9)
Grau maior	3 (7,3)	3 (4,4)	51 (70,8)	29 (78,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	1 (25,0)	88 (37,9)
Sugestivo de câncer	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	6 (100)	0 (0,0)	3 (75,0)	10 (4,3)
Total	41 (100)	68 (100)	72 (100%)	37 (100)	2 (100)	6 (100)	2 (100)	4 (100)	232 (100)

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa; NIC: neoplasia intraepitelial cervical; CEC: carcinoma escamo celular; Adenoca: adenocarcinoma.

5.4.2.3 Histopatologia e DNA-ICM e teste de HPV

Também no cruzamento dos achados da histopatologia com os da citometria do DNA, foi observada relação na gravidade: 100% dos casos de câncer e 71,3% dos de alto grau, tinha aneuploidia; e 85,2% dos de baixo grau, padrão normal (Tabela 14).

TABELA 14 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DA HISTOPATOLOGIA COM OS DA DNA-ICM. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018 (N=230)^A

Ploidia do DNA	Histopatologia			Total N (%)
	Baixo grau N (%)	Alto grau N (%)	Câncer N (%)	
Euploide	92 (85,2)	31 (28,7)	0 (0,0)	123 (53,5)
Aneuploide	16 (14,8)	77 (71,3)	14 (100)	107 (46,5)
Total	108 (47,0)	108 (47,0)	14 (6,0)	230 (100)

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa; DNA: ácido desoxirribonucleico; HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa; NIC: neoplasia intraepitelial cervical.

^ADentre as 232 pacientes submetidas a biópsia, em o material não foi suficiente para a análise da ploidia.

Entre as pacientes que o material foi testado para HPV de alto risco, 108 foram submetidas a procedimento na colposcopia, possibilitando observar presença do vírus: em 50% dos casos com histopatologia de baixo grau; em 75,4%, de NIC 2 e 3; e em 71,4%, de câncer (Tabela 14). O teste para o genótipo 16, o mais prevalente entre os 108 casos, foi positivo em 40,4% dos diagnósticos de alto grau e em 71,4% dos de câncer (Tabela 15).

TABELA 15 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DA HISTOPATOLOGIA COM OS DO TESTE DE HPV DE ALTO RISCO. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018 (N=108)^A

HPV de alto ^b risco	Histopatologia			Total N (%)
	Baixo grau N (%)	Alto grau N (%)	Câncer N (%)	
Ausente	22 (50,0)	14 (24,6)	2 (28,6)	38 (35,2)
Presente	22 (50,0)	43 (75,4)	5 (71,4)	70 (64,8)
Total	44 (100)	57 (100)	7 (100)	108 (100)

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa; HPV: papilomavírus humano; NIC: neoplasia intraepitelial cervical.

^A Dentre as 121 pacientes nas quais foi realizado teste de HPV, 108 fizeram biópsia.

^b HPV de alto risco: 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68.

TABELA 16 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DA HISTOPATOLOGIA COM OS DO TESTE DE HPV 16. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018 (N=108)^A

HPV 16	Histopatologia			Total N (%)
	Baixo grau N (%)	Alto grau N (%)	Câncer N (%)	
Ausente	39 (88,6)	34 (59,6)	2 (28,6)	75 (69,4)
Presente	05 (11,4)	23 (40,4)	5 (71,4)	33 (30,6)
Total	44 (100)	57 (100)	7 (100)	108 (100)

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa; HPV: papilomavírus humano; NIC: neoplasia intraepitelial cervical.

^A Dentre as 121 pacientes nas quais foi realizado teste de HPV, 108 fizeram biópsia.

5.5 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

A acareação da sensibilidade e especificidade dos métodos usados na detecção de lesão do colo uterino de alto grau apontou que os maiores índices foram os da colposcopia (Tabela 17) e (Gráfico 3). O teste de Kappa mostrou força de concordância: boa, para colposcopia; moderada, para citometria do DNA e citologia oncótica; e fraca, tanto para HPV de alto risco quanto para o HPV 16.

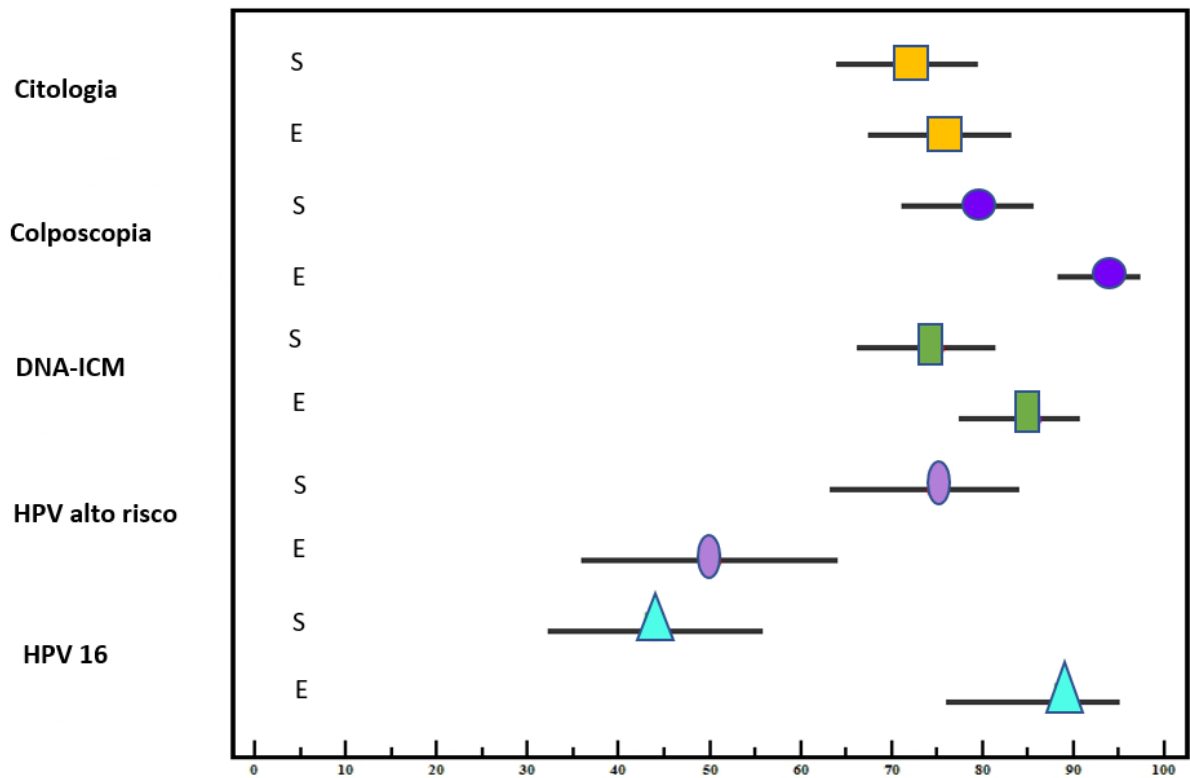
TABELA 17 - VALORES DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E TESTE DE KAPPA DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE LESÃO DE ALTO GRAU. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018

Método diagnóstico	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	Kappa (IC 95%)	P valor
Citologia	72,3% (63,9-79,4)	76,1% (67,3-83,1)	0,48 (0,35-0,61)	<0,001
Colposcopia	79,3% (71,0-85,6)	94,4% (88,3-97,4)	0,73 (0,60-0,86)	<0,001
DNA-ICM	74,6% (66,2-81,4)	85,3% (77,4-90,7)	0,59 (0,46-0,72)	<0,001
HPV de alto risco*	75,0% (63,1-84,0)	50,0% (35,8-64,1)	0,25 (0,06-0,44)	0,028
HPV 16	43,75% (32,2-55,9)	88,64% (76,0-95,0)	0,29 (0,13-0,45)	0,004

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; IC: intervalo de confiança; DNA-ICM: citometria do DNA; DNA: ácido desoxirribonucleico; HPV: papilomavírus humano; *HPV de alto risco: 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68.

GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE LESÃO DE ALTO GRAU. HU-UFSC



Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

citologia: em amarelo; colposcopia: em azul; DNA-ICM: verde escuro; HPV de alto risco: roxo; HPV 16: verde água; S: sensibilidade; E: especificidade; DNA-ICM: DNA citometria; DNA: ácido desoxirribonucleico; HPV: papilomavírus humano.

5.6 ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS COM O DIAGNÓSTICO DE NIC2+

As variáveis categóricas do grupo que realizou histopatologia no primeiro atendimento foram estudadas pelo teste qui-quadrado (χ^2), ficando demonstrado que idade, estado civil, paridade, escolaridade, tabagismo, tamanho da lesão, presença de aneuploidia, HPV de alto risco e HPV 16 são características que apresentaram associação ($p < 0,05$) com diagnóstico de NIC 2+ (Tabela 18).

TABELA 18- DISTRIBUIÇÃO DE NIC 2+ NA HISTOPATOLOGIA, CONFORME CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS, TAMANHO DA LESÃO NA COLPOSCOPIA E RESULTADO DA DNA-ICM E TESTE DE HPV. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018

Variável	NIC 2+		Qui-quadrado P valor*
	Sim N(%)	Não N(%)	
Idade			0,001
< 30 anos	29 (23,6)	48 (43,6)	
≥ 30 anos	94 (76,4)	61 (56,4)	
Estado civil			0,005
Casada/ união estável	68 (55,3)	41 (37,6)	
Solteira / viúva/ separada	55 (44,7)	68 (62,4)	
Escolaridade			0,004
Média / alta (≥ 8 anos)	97 (78,9)	100 (91,8)	
Baixa (< 8 anos)	26 (21,1)	9 (8,2)	
Tabagismo			0,008
Não	84 (68,3)	90 (82,7)	
Sim	39 (31,7)	19 (17,3)	
Paridade			0,005
0 – 2 filhos	91 (74)	96 (88,2)	
3 ou mais filhos	32 (26)	13 (11,8)	
Anticoncepcional hormonal			0,156
Não	64 (52)	49 (44,5)	
Sim	59 (48)	60 (55,5)	
Preservativo			0,292
Não	106 (86,2)	90 (82,7)	
Sim	17 (13,8)	19 (17,3)	
História de IST			0,283
Não	83 (67,5)	78 (71,8)	
Sim	40 (32,5)	31 (28,2)	
HIV+			0,216
Não	116 (94,3)	106 (97,3)	
Sim	7 (5,7)	3 (2,7)	
Tamanho da lesão na colposcopia (%)			< 0,0001
Até 20%	35 (29,3)	86 (81)	
>20%	82 (70,7)	20 (19)	
Aneuploidia			< 0,0001
Não	31 (25,4)	93 (85,3)	
Sim	91 (74,6)	16 (14,7)	
HPV de alto risco			0,007
Não	16 (25)	22 (50)	
Sim	48 (75)	22 (50)	
HPV 16			< 0,0001
Não	36 (56,2)	39 (88,6)	
Sim	28 (43,8)	5 (11,4)	

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; NIC2+: neoplasia intraepitelial cervical grau 2 ou pior; IST: doença sexualmente transmissível; HIV: vírus da imunodeficiência humana; HPV: papilomavírus humano.

*valores de p em negrito: com significância.

A análise ajustada das variáveis que tiveram associação com o desfecho apontou que idade da paciente superior ou igual a 30 anos, tamanho da lesão maior que 20%, presença de aneuploidia e de HPV 16 apresentaram risco aumentado na detecção de patologia cervical de alto grau, com porcentagem global de correta classificação de 85,4 ($p < 0,05$) (Tabela 19).

TABELA 19 - ANÁLISE MULTIVARIADA DAS CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS, TAMANHO DA LESÃO NA COLPOSCOPIA, ANEUPLOIDIA E HPV, CONFORME O RISCO DE NIC 2+. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018

Variável	Análise Bivariada			Análise Multivariada		
	OR	IC 95%	P valor*	OR	IC 95%	P valor*
Idade						0,050
< 30 anos	1,000			1,000		
≥ 30 anos	2,55	1,45 – 4,47	0,001	3,61	1,00 - 13,09	
Estado civil						0,042
Casada/união estável	1,000			1,000		
Solteira/viúva/separada	0,48	0,28 – 0,82	0,007	0,55	0,31 - 0,97	
Escolaridade						0,446
Média/alta (> 8 anos)	1,000			1,000		
Baixa (< 8 anos)	3,38	1,46 – 7,83	0,004	0,37	0,29 – 4,73	
Tabagismo						0,606
Não	1,000			1,000		
Sim	2,20	1,17 – 4,10	0,013	1,40	0,36 – 5,63	
Paridade						0,241
0 – 2 filhos	1,000			1,000		
3 ou mais filhos	2,84	1,38 - 5,85	0,005	5,57	0,31 – 98,54	
Tamanho da lesão na colposcopia (%)						0,001
Até 20%	1,000			1,000		
>20%	10,49	5,59 – 19,68	<0,0001	6,49	2,05 - 20,48	
Aneuploidia						<0,0001
Não	1,000			1,000		
Sim	16,87	8,64 -32,96	<0,0001	12,04	3,70 - 38,11	
HPV de alto risco						0,543
Não	1,000			1,000		
Sim	3,00	1,32 -6,79	0,008	1,53	0,38 – 6,08	
HPV 16						0,010
Não	1,000			1,000		
Sim	6,06	2,11 – 17,40	0,001	7,47	1,80 – 30,89	

Elaborado pela autora.

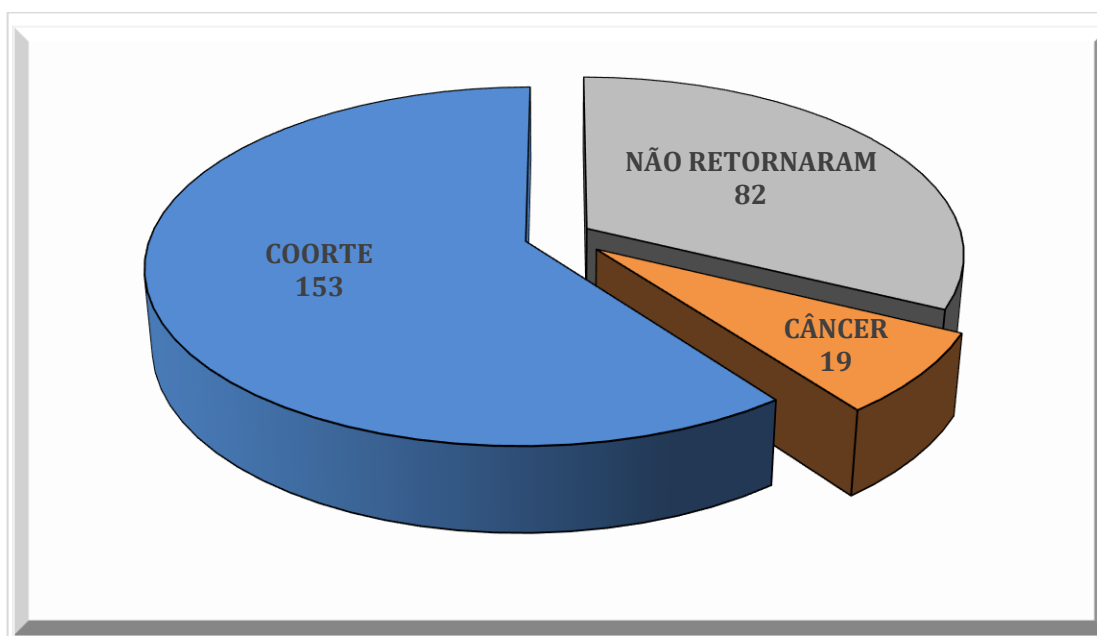
HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa; NIC 2+: neoplasia intraepitelial grau 2 ou pior; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; HPV: papilomavírus humano.

*valores de p em negrito: com significância.

5.7 COMPOSIÇÃO E DIVISÃO DA COORTE

Em outubro de 2019, com o término da pesquisa, foi possível constatar que 82 (32,3%) das 254 participantes não retornaram e, como inicialmente foram excluídas as 19 (7,4%) com diagnóstico de câncer realizado no primeiro atendimento, a coorte foi composta por 153 (60,3%) mulheres (Gráfico 4).

GRÁFICO 4 - COMPOSIÇÃO DO GRUPO DA PESQUISA. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018



Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina

Os dados epidemiológicos das mulheres que compuseram a coorte foram comparados com aquelas que não retornaram ao acompanhamento (Tabela 20). Em nenhuma das variáveis analisadas foi observado diferença significativa entre os dois grupos.

TABELA 20 - DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES, SEPARADAS EM FUNÇÃO DO COMPARECIMENTO, CONFORME CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E ANÁLISES DE DNA-ICM E TESTE DE HPV. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A OUTUBRO DE 2019

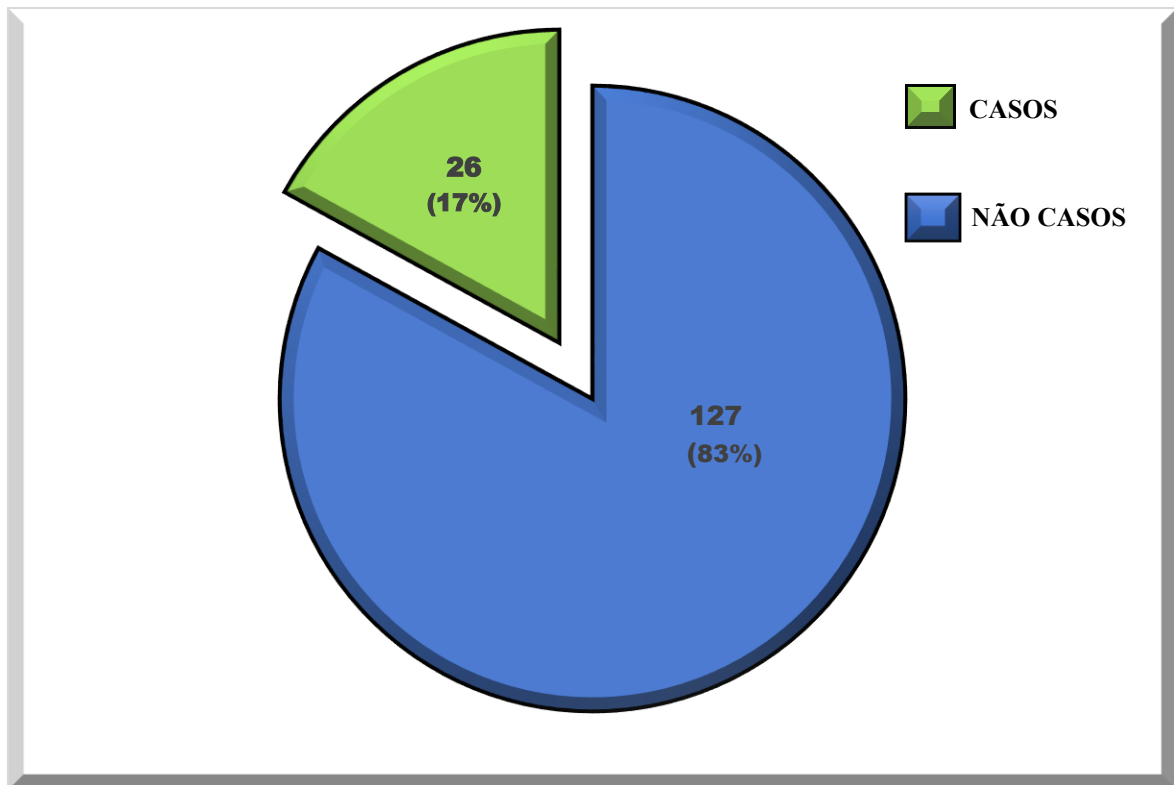
Variável	Comparecimento ao seguimento		Qui-quadrado P valor
	Sim N(%)	Não N(%)	
Idade			
< 30 anos	48 (31,4)	33 (40,2)	0,173
≥ 30 anos	105 (68,6)	49 (59,8)	
Estado civil			
Casada/ união estável	77 (50,3)	32 (39,0)	0,098
Solteira / viúva/ separada	76 (49,7)	50 (61,0)	
Escolaridade			
Média / alta (≥ 8 anos)	132 (86,3)	68 (82,9)	0,492
Baixa (< 8 anos)	21 (13,7)	14 (17,1)	
Tabagismo			
Não	120 (78,4)	57 (69,5)	0,131
Sim	33 (21,6)	25 (30,5)	
Paridade			
0 – 2 filhos	123 (80,4)	65 (79,3)	0,837
3 ou mais filhos	30 (19,6)	17 (20,7)	
Anticoncepcional hormonal			
Não	73 (47,7)	44 (53,7)	0,385
Sim	80 (52,3)	38 (46,3)	
Preservativo			
Não	129 (84,3)	65 (79,3)	0,331
Sim	24 (15,7)	17 (20,7)	
História de IST			
Não	110 (71,9)	54 (65,9)	0,336
Sim	43 (28,1)	28 (34,1)	
HIV+			
Não	148 (96,7)	77 (93,9)	0,324
Sim	5 (3,3)	5 (6,1)	
Aneuploidia			
Não	87 (57,2)	51 (63,0)	0,397
Sim	65 (42,8)	30 (37,0)	
HPV de alto risco			
Não	28 (37,8)	18 (46,2)	0,392
Sim	46 (62,2)	21 (53,8)	
HPV 16			
Não	52 (70,3)	32 (82,1)	0,173
Sim	22 (29,7)	7 (17,9)	

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa; IST: infecção sexualmente transmissível; HIV: vírus da imunodeficiência humana; HPV: papilomavírus humano.

A coorte, de acordo com o comportamento da doença, foi separada em dois grupos: “não casos”, com 127 (83%) e “casos”, com 26 (17%) (Gráfico 5).

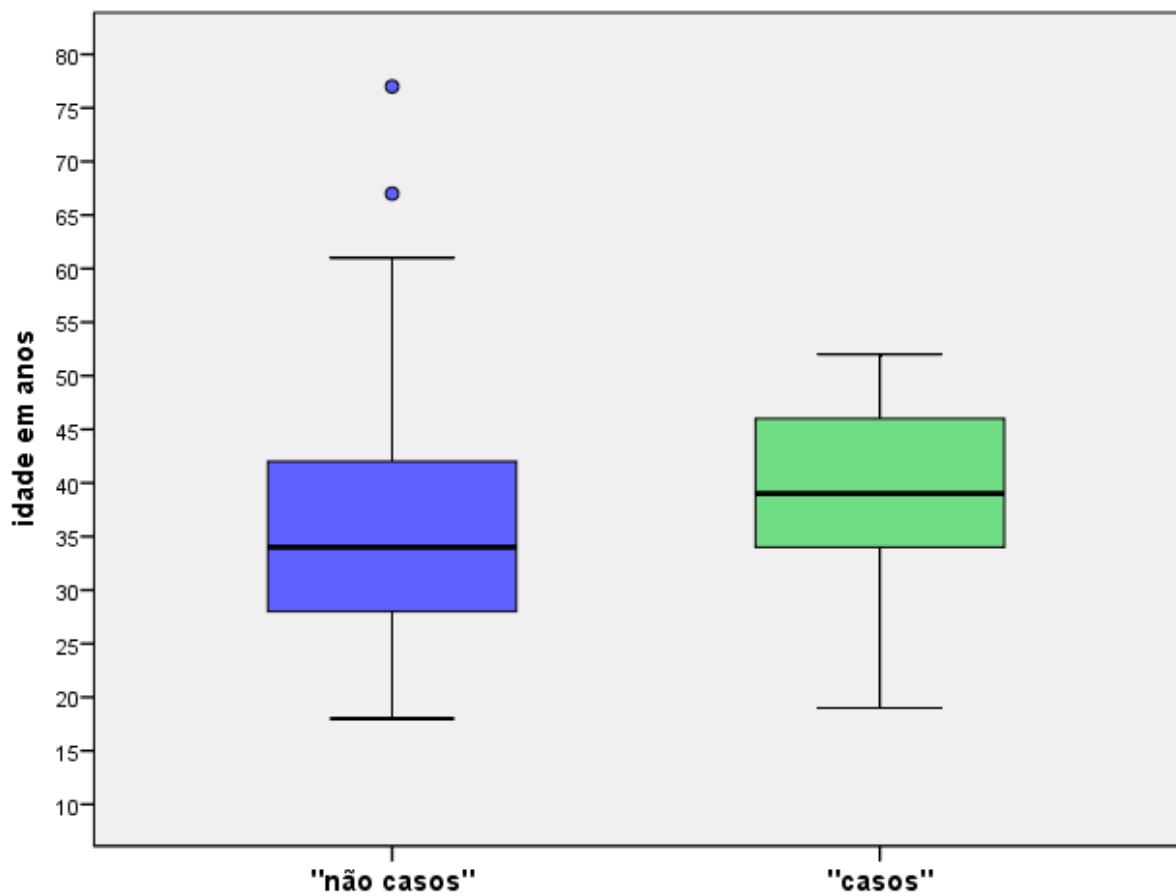
GRÁFICO 5- DISTRIBUIÇÃO DA COORTE ESTUDADA. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018



Elaborado pela autora.
HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina

A média de idade da coorte foi: 35 anos, no grupo “não casos”; e 38, no “casos”, sendo que a maioria tinha 30 anos ou mais e 5, menos de 25 anos (Gráfico 6).

GRÁFICO 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS DA COORTE, CONFORME A IDADE. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018

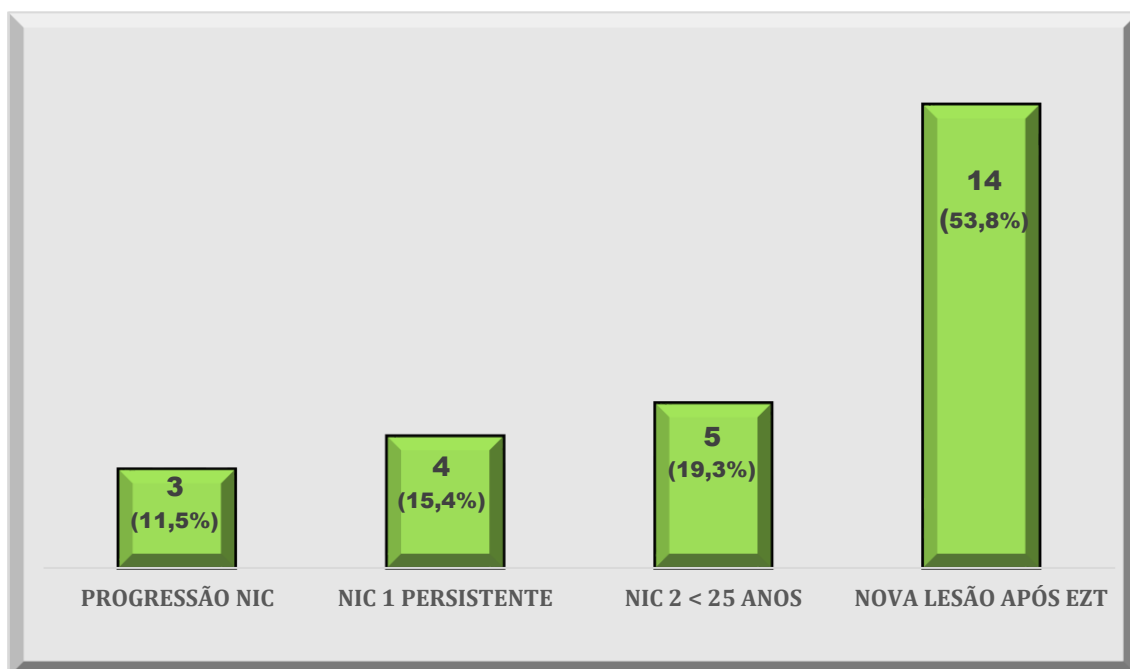


Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina

No grupo “casos”, o diagnóstico mais frequente foi o de nova lesão após tratamento cirúrgico (53,8%) (Gráfico 7) e a taxa de recorrência, considerando-se toda a coorte, foi de 9,1%.

GRÁFICO 7 - DISTRIBUIÇÃO DO GRUPO “CASOS”, CONFORME O DIAGNÓSTICO. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A SETEMBRO DE 2018



Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; NIC: neoplasia intraepitelial cervical; EZT: exérese da zona de transformação.

5.8 ANÁLISE DOS FATORES ASSOCIADOS COM O AGRAVAMENTO DA LESÃO CERVICAL

Visando investigar se os dados epidemiológicos e as análises da DNA-ICM e do teste de HPV, obtidos no início do atendimento, poderiam ajudar na predição do prognóstico, aplicou-se o teste qui-quadrado (χ^2) para avaliar a diferença entre as variáveis categóricas dos dois grupos da coorte, que apontou haver no grupo “casos” associação significativa ($p < 0,05$) com escolaridade, paridade, HIV+ e presença de aneuploidia (Tabela 19).

TABELA 21 - DISTRIBUIÇÃO DA COORTE, CONFORME CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E ANÁLISES DE DNA-ICM E TESTE DE HPV. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A OUTUBRO DE 2019

Variável	Casos N(%)	Não casos N(%)	Qui-quadrado P valor*
Idade			
< 30 anos	5 (19,2)	43 (33,9)	0,169
≥ 30 anos	21 (80,8)	84 (66,1)	
Estado civil			
Casada/união estável	14 (53,8)	63 (49,6)	0,694
Solteira/viúva/separada	12 (46,2)	64 (50,4)	
Escolaridade			
Média/alta (≥ 8 anos)	17 (65,4)	115 (90,6)	0,001
Baixa (< 8 anos)	9 (34,6)	12 (9,4)	
Tabagismo			
Não	17 (65,4)	103 (81,1)	0,076
Sim	9 (34,6)	24 (18,9)	
Paridade			
0 – 2 filhos	15 (57,7)	108 (85)	0,001
3 ou mais filhos	11 (42,3)	19 (15)	
Anticoncepcional hormonal			
Não	12 (46,2)	61 (48)	0,861
Sim	14 (53,8)	66 (52)	
Preservativo			
Não	20 (76,9)	109 (85,8)	0,225
Sim	6 (23,1)	18 (14,2)	
História de IST			
Não	15 (57,7)	95 (74,8)	0,077
Sim	11 (42,3)	32 (25,2)	
HIV+			
Não	21 (80,8)	127 (100)	< 0,0001
Sim	5 (19,2)	0 (0)	
Aneuploidia			
Não	5 (19,2)	82 (65,1)	< 0,0001
Sim	21 (80,8)	45 (34,9)	
HPV de alto risco			
Não	5 (38,5)	23 (37,7)	1,000
Sim	8 (61,5)	38 (62,3)	
HPV 16			
Não	8 (61,5)	44 (72,1)	0,510
SIM	5 (38,5)	17 (27,9)	

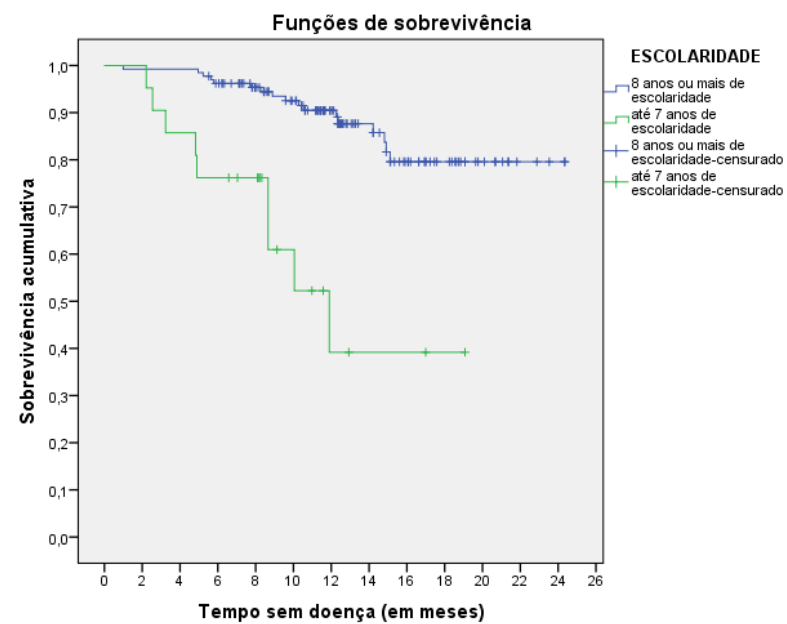
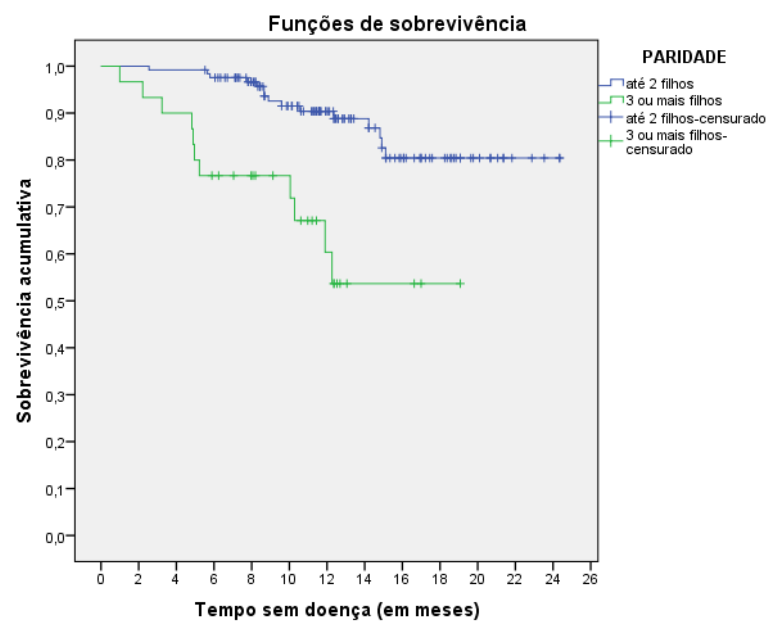
Elaborado pela autora.

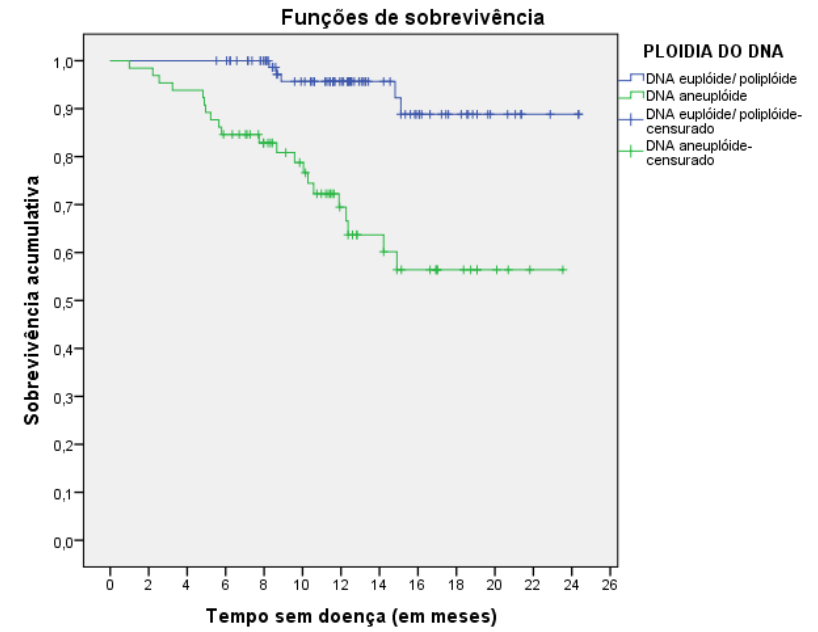
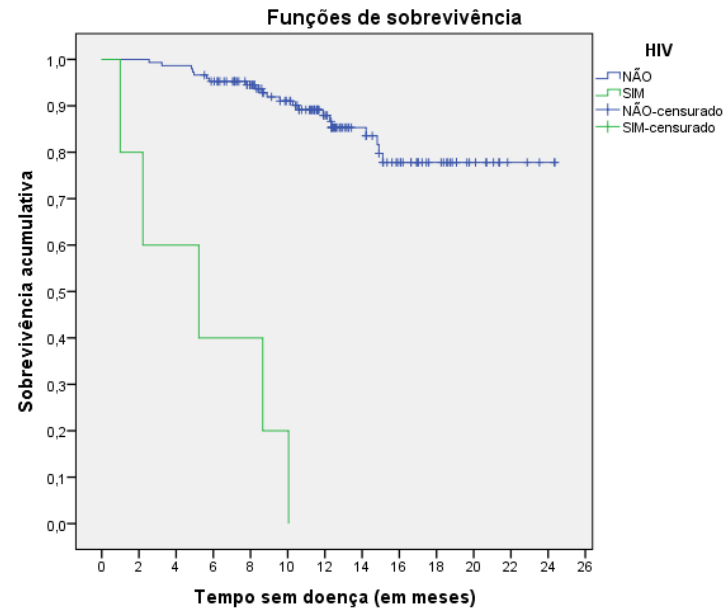
HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; N: frequência absoluta; %: frequência relativa; IST: infecção sexualmente transmissível; HIV: vírus da imunodeficiência humana; HPV: papilomavírus humano.

*valores de p em negrito: com significância.

A proporcionalidade dos riscos das variáveis que apresentaram significância no teste qui-quadrado foi verificada através de análise com gráficos de Kaplan-Meyer (Figura 18) que mostrou existir diferença de sobrevida entre os 2 grupos durante todo o período de observação, pois os testes Log-rank, Breslow e Tarone-Ware mostraram associação estatística.

FIGURA 18 - CURVAS DE KAPLAN MEYER DEMONSTRANDO A PROPORCIONALIDADE DOS RISCOS DAS VARIÁVEIS ASSOCIADAS AO GRUPO “CASOS”. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A OUTUBRO DE 2019





Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; HIV: vírus da imunodeficiência humana; DNA: ácido desoxirribonucleico.

A análise ajustada das variáveis que obtiveram associação solidificou que ser portadora do HIV e aneuploidia exerceram efeito independente de risco de agravamento da lesão (Tabela 22).

TABELA 22 - ANÁLISE MULTIVARIADA DAS CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E ANEUPLOIDIA, CONFORME O RISCO DE LESÃO DE PIOR PROGNÓSTICO. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A OUTUBRO DE 2019

Variável	Análise Bivariada			Análise Multivariada (Regressão de Cox)		
	HR ^a	IC 95%	P valor*	HR ^b	IC 95%	P valor*
Escolaridade			<0,001			0,271
Média/alta (> 8 anos)	1,000			1,000		
Baixa (< 8 anos)	5,81	2,54 – 13,25		1,78	0,63 – 4,97	
Paridade			<0,001			0,185
0 – 2 filhos	1,000			1,000		
3 ou mais filhos	4,37	1,98 – 9,63		1,83	0,74 – 4,48	
HIV+			<0,001			0,003
Não	1,000			1,000		
Sim	23,37	8,14 – 67,10		6,47	1,92 – 21,76	
Aneuploidia			<0,001			0,006
Não	1,000			1,000		
Sim	6,76	2,55 – 17,96		4,34	1,53 – 12,28	

Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; DNA-ICM: DNA citometria; DNA: ácido desoxirribonucleico; HR: *Hazard Ratios*; IC: intervalo de confiança; HIV: vírus da imunodeficiência humana.

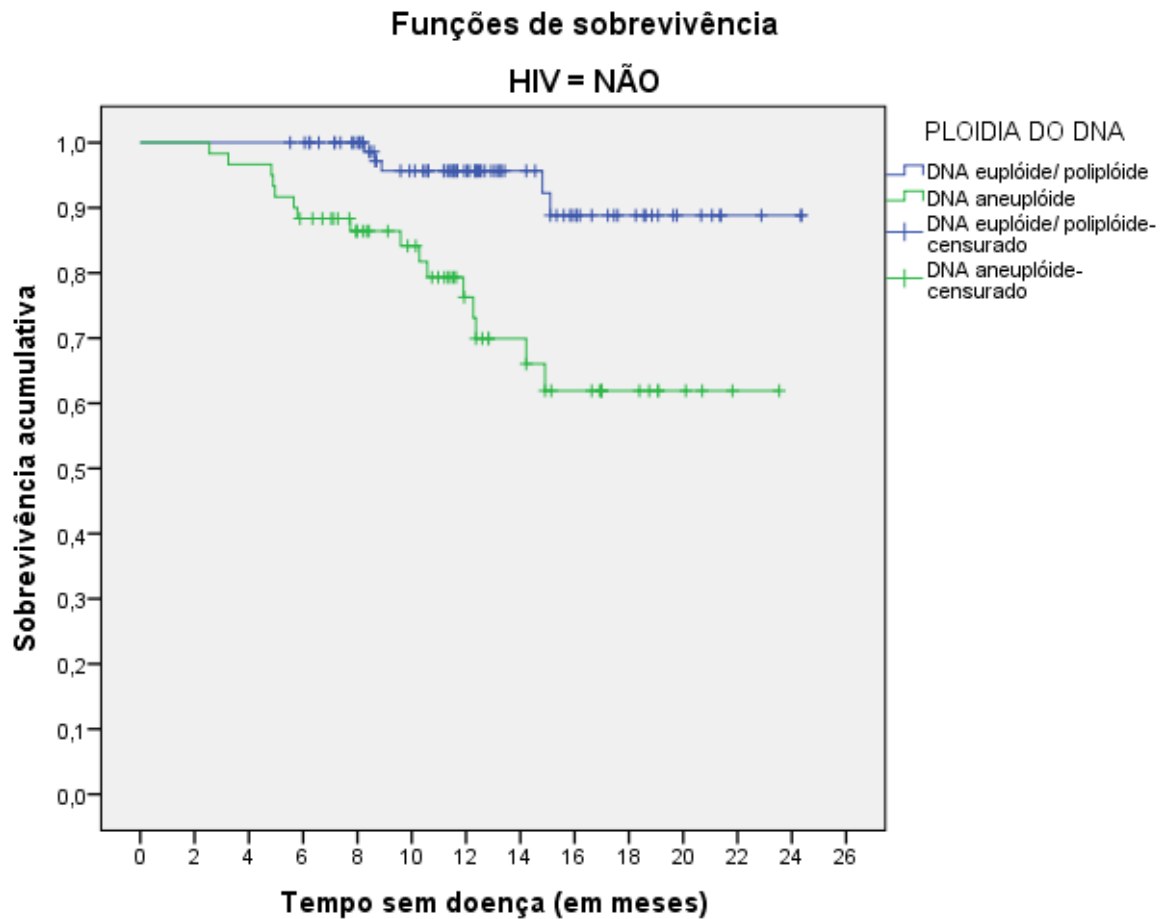
*valores de p em negrito: com significância (p < 0,05).

^aHR: *Hazard Ratios* bruta

^bHR: *Hazard Ratios* ajustada

A proporcionalidade dos riscos da “ploidia do DNA” sem a presença da variável “HIV” foi verificada através do gráfico de Kaplan-Meier, demonstrando pequena variação e manutenção da significância (Figura 19).

FIGURA 19 - CURVA DE KAPLAN MEYER DEMONSTRANDO A PROPORCIONALIDADE DOS RISCOS DA VARIÁVEL PLOIDIA DO DNA EXCLUINDO AS PACIENTES HIV+. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A OUTUBRO DE 2019

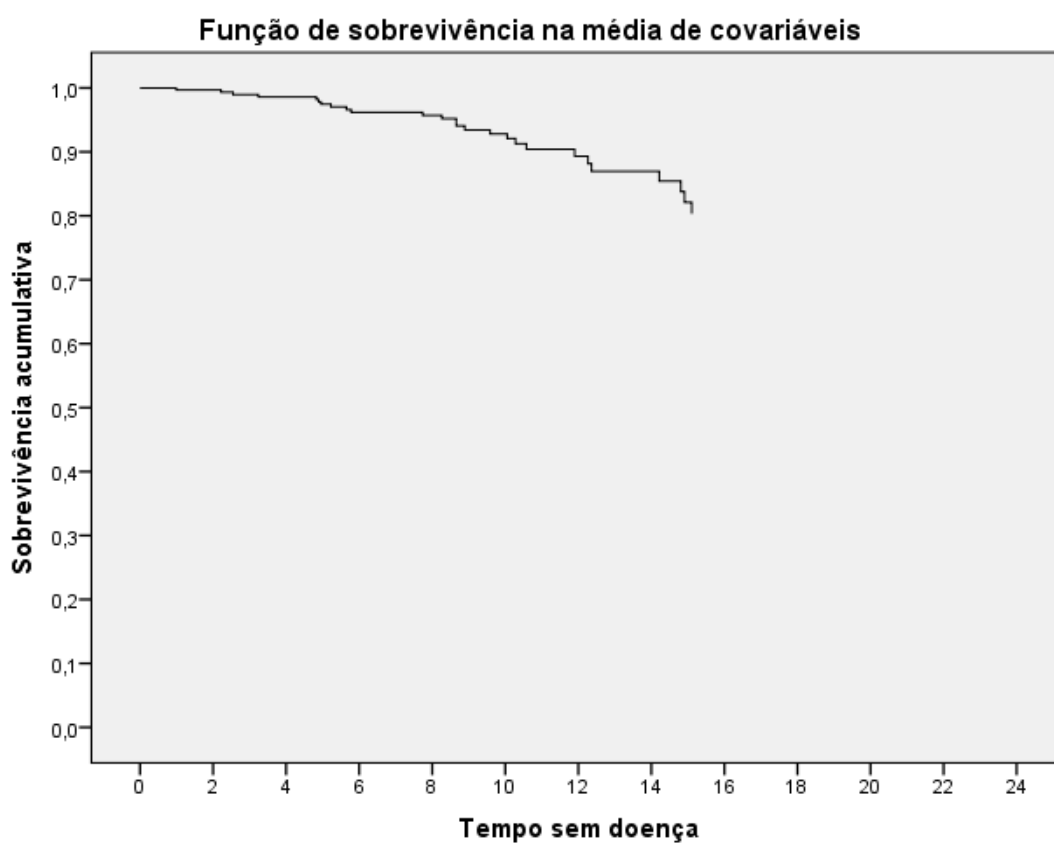


Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina; HIV: vírus da imunodeficiência humana; DNA: ácido desoxirribonucleico.

O modelo mostrou ser estatisticamente significativo com $p < 0,001$ e a curva de sobrevida geral está demonstrada na Figura 20. No tempo de 15 meses, 80% das pacientes não apresentaram lesão de pior prognóstico.

FIGURA 20 - CURVA GERAL DO MODELO DE SOBREVIDA DE COX ANALISADO. HU-UFSC, ABRIL DE 2017 A OUTUBRO DE 2019



Elaborado pela autora.

HU-UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina;

6 DISCUSSÃO

Esta discussão baseia-se principalmente na comparação da sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos realizados e na investigação dos fatores associados com os desfechos mais relevantes: as lesões cervicais graves (NIC 2+) e as que tiveram má evolução. Antes disso, porém, cabe debater algumas observações.

A comparação da frequência do rastreamento encontrada entre as participantes com dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) mostra que a taxa encontrada (78,6%) é condizente com a média do Brasil (79,4%), porém inferior à da região Sul (83%). Inclusive pode-se notar a efetividade do rastreio oportunístico vigente no país, pois 72,7% das mulheres com menos de 25 anos – antes da idade recomendada – já o realiza de rotina.

Observa-se, também, que o exame histopatológico do tecido biopsiado detectou a mesma quantidade de lesões de menor e maior gravidade e 6,1% de câncer, sendo 3,5% de carcinoma escamocelular e 2,6% de adenocarcinoma. A diferença entre a frequência dos dois tipos histológicos não foi tão significativa quanto a verificada em outros estudos brasileiros (KOIFMAN; FERREIRA, 2019), o que provavelmente decorre do baixo número de casos de doença maligna entre as pesquisadas.

Quanto à classificação da ZT, os achados são concordantes com a literatura: o tipo 1 foi o mais comum nas pacientes com menos de 30 anos; o tipo 3, na maioria das acima de 50 anos; e a distribuição do tipo 2 foi heterogênea (FAN et al., 2018; LUYTEN et al., 2015). Em função disso, a Sociedade Americana de Patologia Cervical e Colposcopia propôs divisão binária em ZT visível e não visível (WENTZENSEN et al., 2017).

No tocante à sensibilidade e especificidade da citologia oncótica, a análise cruzada com o exame padrão ouro mostra que, nos diagnósticos de baixo e alto grau, teve boa associação. Porém, nos casos que havia suspeita de câncer, somente 28,6% foi confirmado e em 2 de ASC-US, que normalmente não desperta preocupação, detectou doença invasora, autenticando as críticas que recebe de ter alto índice de falso negativo e baixa reprodutibilidade na interpretação (KOLIOPOULOS et al., 2018), já denunciadas por Leyden et al., (2005) e Subramaniam et al., (2011), que referem que 20 a 32% dos tumores invasivos não foram identificados por esse método.

A avaliação da colposcopia, em compensação, demonstra que: foi o método mais eficaz dentre os utilizados no manejo das pacientes; tem especificidade elevada (94,4%); e alta sensibilidade, permitindo, em 79,3% dos casos, diferenciar colo com lesão, do saudável, havendo supervalorização somente em 6% e, na maior parte dos 20,7% subestimados, o diagnóstico era NIC 2, o que é consistente com a literatura que relata que, de fato, ela é menos sensível na detecção dessa categoria intermediária (NAM, 2018). Os achados encontrados são equivalentes aos de investigações mais recentes, como: as de Fan et al. (2018), que descrevem 22,11% de subestimação, 12,3% de superestimados, e especificidade de 98% e sensibilidade de 71,6%, valores próximos aos citados por Brown & Tidy (2019), 68,5% e 75%, respectivamente; e as de Stuebs et al. (2019) que revelam que a exatidão para diagnosticar variou de 93,1% nas mais jovens a 80% nas acima de 55 anos. Outros trabalhos indicam resultados com acurácia flutuante (MASSAD; COLLINS, 2003), provavelmente por terem sido realizados antes da uniformização da nomenclatura, que foi criada para se obter evidências mais precisas e facilitar o confronto entre estudos (BORNSTEIN et al., 2012; KHAN et al., 2017), atestando a importância dessa padronização.

Relativamente à precisão diagnóstica da citometria do DNA, percebe-se que é semelhante à da citologia e maior que a do HPV de alto risco e do genótipo 16, ratificando o relato de Garner (2014) - com base no ensaio multicêntrico realizado por Hua et al. (2009) em 30.000 mulheres, de que DNA-ICM automatizada, além da vantagem de utilizar as mesmas lâminas do esfregaço citológico, possui custo-benefício superior ao do teste de HPV. Wong et al. (2018) constatam maior eficiência no diagnóstico quando o resultado da DNA-ICM automatizada foi analisado em conjunto com o da testagem para HPV 16 e 18.

A investigação da base do perfil epidemiológico possibilita uma série de observações.

A variável “idade” é a única que possui ligação com o diagnóstico de NIC 2+. Esta pesquisa revela que pacientes acima de 30 anos tiveram 3,6 vezes mais chance de detecção de lesão de alto grau, o que pode ser explicado pelo envolvimento do HPV na carcinogênese (BALASUBRAMANIAM et al., 2019). Apesar de a prevalência da infecção ser maior em jovens e sexualmente ativas (RACHEL SKINNER et al., 2016), a persistência é mais comum em mulheres mais velhas (ROSITCH et al., 2013), tanto é que, respaldados nisso, vários autores sugerem que a testagem para o vírus seja incluída no rastreamento desta população (THOMSEN et al., 2020; TIFAOU et al., 2018; ZHANG; BATUR, 2019). Alguns estudiosos do assunto

relatam um segundo pico de infecção no período da perimenopausa, que aconteceria por reativação de processos latentes ou nova contaminação à custa do envelhecimento do sistema imunológico (RIJKAART et al., 2006; TIFAOUY et al., 2018; TROTTIER et al., 2010). Adicionalmente, Bekos et al. (2018) indicam que, a cada 5 anos a mais na idade, a chance da infecção regredir diminui 21%, o que não foi evidenciado por Mark et al. (2019).

A variável “portar HIV” não mostra associação com NIC 2+, contudo tem relação com lesões que evoluíram mal, o que será adiante discorrido.

Na análise bivariada, “tabagismo” demonstra ligação com a detecção de NIC 2+ e “multiparidade” com os dois desfechos, porém não foram confirmadas na multivariada, o que difere de diversas publicações (JENSEN et al., 2013; KAPEU et al., 2009; ROURA et al., 2014; SMALL et al., 2017). Possivelmente, tal discrepância pode ser explicada pelo fato de que, ainda que o tamanho amostral tenha sido ideal, o número de participantes com tais características foi pequeno. Essa baixa incidência parece afigurar erro aleatório, porém, por analogia com trabalhos que abordam outras neoplasias - como de laringe (MOURAD et al., 2017) e de pulmão (PIERCE et al., 2019) - pode ser reflexo da efetividade de programas de antitabagismo e planejamento familiar, sinalizando que a clássica relação entre essas variáveis e a neoplasia cervical esteja se modificando.

Nesta pesquisa, a informação do tempo que a participante frequentou a escola foi usada para avaliar a situação socioeconômica, que é diretamente proporcional ao grau de instrução. Na análise bivariada, o grupo de pacientes de “baixa escolaridade” indica associação com ambos os desfechos, mas quando a variável foi examinada em conjunto com as outras, não foi confirmada. Isso evidencia que esse achado é fator de confundimento, posto que, na realidade, o fato de não ter estudado retrata a falta de acesso à prevenção e tratamento. É sabido, no âmbito mundial, que as áreas de maior pobreza são as mais afetadas pelo câncer de colo uterino (BRAY et al., 2018) e, no nacional, que a incidência e a mortalidade dessa neoplasia são desiguais nas diversas regiões e nitidamente superiores na Norte, detentora do menor IDH do Brasil (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

A despeito da metade da população da pesquisa usar contraceptivo hormonal, não se constata conexão com qualquer dos dois desfechos. Há divergências entre os autores: enquanto Roura et al. (2016) referem aumento de risco de NIC 3 e carcinoma invasivo em pacientes que usavam a droga por tempo maior que 15 anos, Jensen et al. (2013) falam de diminuição.

Referente aos fatores “história de IST” e “uso de preservativo”, apesar de não haver associação significativa com nenhum dos desfechos, o estudo mostra que condiloma acuminado foi a moléstia mais frequente dentre as participantes mais novas e que grande parte não usa proteção de barreira, consoante o relatório da Pesquisa Nacional da Prevalência do HPV (POP Brasil), que após avaliar 8.562 jovens brasileiros, aponta que a maioria não tem o hábito de usá-lo (WENDLAND et al., 2018). A literatura é consistente na demonstração de que ISTs são cofatores de lesão precursora (JENSEN et al., 2014; SMITH, 2002; SSEDYABANE et al., 2019), principalmente *Chlamydia trachomatis* e herpes genital, como conclui Castellsagué et al. (2014), em estudo multicêntrico. A baixa significância do histórico de IST pode caracterizar um viés da pesquisa, pois a informação dependeu da memória das pacientes e ao possível desconhecimento destas em relação às doenças de difícil detecção.

Em relação à identificação de lesão grave, o estudo transversal dos resultados dos exames apontou que: aneuploidia está presente na grande maioria das NIC 2+ e em todos os casos de câncer; e lesões que acometem mais do que 20% do colo uterino são as que apresentam melhor contrabalanço entre sensibilidade e especificidade.

A apuração em percentual do tamanho da lesão, incluída na última atualização da terminologia colposcópica (BORNSTEIN et al., 2012), é bastante inespecífica. Por esse motivo, nesta pesquisa, foi empregada a Curva ROC para verificar o melhor ponto de corte entre dimensão e gravidade da lesão na histopatologia, ratificando a relação diretamente proporcional entre elas, publicada há décadas por Kierkegaard et al. (1995), que apreenderam risco maior em lesões com extensão superior a 50%, e sancionada modernamente por Munmany et al. (2017), que evidenciaram chance menor, nas pequenas.

A pesquisa identificou que lesão acometendo mais de 20% do colo uterino é fator de risco independente para diagnóstico de NIC 2+ e que a partir de 50% a especificidade é muito alta. Surge, portanto, a oportunidade de propor classificação passível de menor subjetividade: até 20%, entre 20 e 50% e > 50%, para indicar, respectivamente, grau baixo, médio e alto de gravidade.

Conexão entre NIC 2+ e infecção por HPV de alto risco não é observada, mas isoladamente com o tipo 16, sim. Segundo a literatura, países que adotam o teste de HPV de alto risco como rastreamento, apesar de diagnosticarem maior quantidade de doenças cervicais de alto grau, realizam 80% mais encaminhamentos para colposcopia (REBOLJ et al., 2019),

sendo melhor usar exames com especificidade superior, como citologia e teste de HPV 16 e 18 (PASSAMONTI et al., 2017; REBOLJ et al., 2019; THOMSEN et al., 2020).

O levantamento realizado antes da análise prospectiva valida que o absenteísmo de algumas participantes não interferiu nos resultados e que a coorte observada é estatisticamente significativa, outorgando as ponderações mais expressivas.

A taxa de recorrência de lesão de alto grau verificada (9,1%) está de acordo com os relatos mais recentes. Arbyn et al. (2017) e Kalliala et al. (2020) reconhecem que é alto o risco de desenvolvimento de câncer em pacientes com lesão precursora submetida à exérese, pois observaram recidiva de 5 a 10% e chance maior de doença invasora por até 20 anos. Clarke et al. (2020) comunicam estimativa de 0,4% a 19,5% de NIC 2+ após tratamento cirúrgico.

Em conformidade com publicações anteriores, é legítimo anunciar que as variáveis “aneuploidia” e “portar HIV” são fatores de risco independentes para lesão de mau prognóstico.

Böcking et al. (2004) e Grote et al. (2004) relatam ter observado aneuploidia em casos de NIC de comportamento progressivo, e Bollmann et al. (2003) e Lorenzato et al. (2008) que, na existência dessa alteração, as ASC-US tinham comportamento semelhante às HSIL, salientando-se que tais autores não consideraram o perfil epidemiológico das pacientes.

Ceccato Junior et al. (2016) descrevem associação de lesão cervical grave em mulheres soropositivo e atribuem, como causa, a persistência de infecção por HPV a despeito do tratamento, típica nesse grupo. Abraham et al. (2014) e Silverberg et al. (2018) registram risco inversamente proporcional à imunidade aferida por CD4. Massad et al. (2017), ao acompanhar uma coorte durante 20 anos, constata menor incidência dessa neoplasia com a implementação de terapia antirretroviral e rastreamento eficaz.

A verificação de que “portar HIV” constitui fator independente para má evolução da doença cervical consente enfatizar que essas pacientes devem receber atenção especial na vigilância e no tratamento da doença de base, prioridade no atendimento em serviços de patologia cervical e na prevenção, especialmente gratuidade na imunização contra HPV independentemente da idade, pois atualmente no Brasil somente são elegíveis: meninas de 9 a 14 anos; e portadoras de HIV/AIDS, doentes oncológicas e transplantadas de órgãos sólidos e medula óssea, com idade entre 9 e 26 anos (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Apesar de não ser o caso de nenhuma das participantes, cabe registrar que transplantadas de órgão sólido possuem risco 3 vezes maior de NIC 2+, portanto devem ser

acompanhadas com a mesma atenção dispensada às portadoras de HIV (CHIN-HONG; REID, 2019; MOSCICKI et al., 2019), assim como pacientes que usam 3 ou mais drogas imunossupressoras (SILVERBERG et al., 2018).

O destaque desta pesquisa é a análise prospectiva da coorte e dos métodos diagnósticos em conjunto com o perfil epidemiológico das participantes.

As principais limitações deste estudo são: o teste de HPV não ter sido realizado no atendimento inicial de toda a população, nem depois do tratamento, impedindo a análise detalhada dos genótipos do vírus e a detecção de persistência da infecção, o que se justifica por ser exame de alto custo e de difícil acesso, salientando a necessidade de adequar os métodos diagnósticos com a realidade de cada instituição médica; e, como o número de mulheres que usavam dispositivo intrauterino com cobre (CU-IUD) e de sistema intrauterino de levonorgestrel (LNG-IUS) era muito pequeno no primeiro e inexistente no segundo, não ter sido possível analisar a relação dessas variáveis com NIC 2+, vez que se especula que o risco seria menor com CU-IUD e maior com LNG-IUS, por interferência na persistência da infecção por HPV (LEKOVICH et al., 2015; SPOTNITZ et al., 2020).

Estudos relacionados ao diagnóstico precoce e ao prognóstico de neoplasias malignas são cada vez mais incentivados e valorizados por permitirem maior índice de cura com vantagens econômicas. Badrick et al. (2019), apontam que uma das questões prioritárias, nessa área, é a utilização de testes não invasivos, indolores e de custo efetivo. Nessa perspectiva, esta pesquisa certifica a indicação de que aneuploidia detectada por DNA-ICM seja considerada preditora de lesão cervical mais grave.

7 CONCLUSÃO

O diagnóstico e o tratamento da lesão cervical precursora evitam o câncer de colo uterino, doença grave e de início normalmente assintomático. O rastreamento, na maior parte do mundo, é realizado pela citologia oncótica e, em alguns países também pelo teste de HPV de alto risco, mas mesmo assim, a incidência e a mortalidade dessa neoplasia ainda são significativas.

Esta pesquisa observou que o exame de Papanicolaou teve concordância moderada pelo teste de Kappa, o teste de HPV de alto risco, concordância fraca e que a colposcopia foi o método mais eficaz no diagnóstico de lesão cervical grave, realçando a importância de garantir, para todas as mulheres, o acesso a esse exame, que permite medir a lesão, realizar biópsia guiada e determinar a melhor conduta, evitando-se, assim, tratamentos desnecessários.

O reconhecimento de que a estimativa do tamanho da lesão pela norma da IFCPC é subjetiva e a constatação do melhor ponto de corte e maior especificidade entre medida e gravidade da lesão oportunizaram a proposta da classificação em 3 faixas, que se adotada, facilitará a padronização e a comparação entre os estudos.

Alguns fatores epidemiológicos há anos reconhecidos como de risco para lesão cervical grave não demonstraram relação, e as características que tiveram associação foram idade igual ou superior a 30 anos, positividade para HPV 16, tamanho da lesão acima de 20% e aneuploidia.

Quanto à citometria do DNA, realizada apenas no âmbito da pesquisa na maioria dos países, os achados corroboram com diversos trabalhos publicados e indicam que se esse exame for incorporado ao arsenal diagnóstico de rotina, ou ao menos nos casos duvidosos, como por exemplo, na colposcopia insatisfatória e com indício de lesão endocervical ou em mulheres jovens com NIC 2, irá auxiliar sobremaneira no manejo de pacientes com citológico alterado e na determinação da conduta adequada.

O estudo indicou que mulheres com aneuploidia do DNA nas células da amostra cervical têm chance 4,3 vezes maior de agravamento da lesão do que as sem alteração, e as HIV+ possuem 6,5 vezes mais risco do que a população em geral, atestando que aneuploidia é potencial biomarcador de prognóstico e autorizando propostas na abordagem clínica: que as

portadoras de HIV recebam atenção especial no tratamento e na vigilância da doença de base, seguimento mais frequente e prioritário em serviços especializados em patologia cervical e vacinação contra HPV gratuita sem limite de idade.

Finalizando, espera-se que este estudo possa motivar muitos outros, seja para ratificar ou debater os resultados observados, e incentive novas pesquisas de investigação da associação de neoplasia cervical com outras variáveis, como o uso de CU-IUD e de LNG-IUS.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A. G. et al. Invasive cervical cancer risk among HIV-infected women: A North American multi-cohort collaboration prospective study Alison. **J Acquir Immune Defic Syndr.**, v. 62, n. 4, p. 405–413, 2014.
- ADSUL, P. et al. Implementing Community-based Cervical Cancer Screening Programs using Visual Inspection with Acetic Acid in India: A Systematic Review. **Cancer Epidemiol.**, v. 49, p. 161–174, 2017.
- ALTOBELLI, E. et al. HPV-vaccination and cancer cervical screening in 53 WHO European Countries: An update on prevention programs according to income level. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 5, p. 2524–2534, 2019.
- ARBYN, M. et al. Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: Meta-analysis. **Bmj**, v. 337, n. 7673, p. 798–803, 2008.
- ARBYN, M. et al. Long term outcomes for women treated for cervical precancer. **BMJ (Online)**, v. 348, n. January, p. 9–10, 2014.
- ARBYN, M. et al. Incomplete excision of cervical precancer as a predictor of treatment failure: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Oncology**, 2017.
- BADRICK, E. et al. Top ten research priorities for detecting cancer early. **The Lancet Public Health**, v. 4, n. 11, p. e551, 2019.
- BALASUBRAMANIAM, S. D. et al. Key molecular events in cervical cancer development. **Medicina (Lithuania)**, v. 55, n. 7, 2019.
- BEKOS, C. et al. Influence of age on histologic outcome of cervical intraepithelial neoplasia during observational management: Results from large cohort, systematic review, meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.
- BERMAN, T. A.; SCHILLER, J. T. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases. **Cancer**, v. 123, n. 12, p. 2219–2229, 2017.
- BHATLA, N. et al. Cancer of the cervix uteri. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 143, p. 22–36, 2018.
- 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.
- BIESTERFELD, S.; GERRES, K.; BOCKING, A. Polyploidy non-neoplastic. p. 38–42, 1994.
- BÖCKING, A.; HUY NGUYEN, V. Q. 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, 2015.
- BOKIL, M.; LIM, B. Colposcopy: a closer look into its past, present and future. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 126, n. 4, p. 543, 2019.
- 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. 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, 2003.
- BORNSTEIN, J. et al. 2011 Colposcopic Terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. **Obstetrics and Gynecology**, v. 120, n. 1, p. 166–172, 2012.
- BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde amplia vacina de HPV para meninos de 11 até 15 anos incompletos. **Http://Portalms.Saude.Gov.Br/**, 2017.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BROWN, B. H.; TIDY, J. A. The diagnostic accuracy of colposcopy – A review of research methodology and impact on the outcomes of quality assurance. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 240, p. 182–186, 2019.
- BURKI, T. UNAIDS and IAEA join forces on HIV and cervical cancer. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10223, p. 484, 2020.
- CANCER, I. C. OF E. S. OF C. 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. **Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1609–1621, 2007.
- CARTIER, R.; CARTIER, I.; CALDAS, I. S. **Colposcopia prática**. [s.l.] Roca, 1994.
- CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 110, n. 3 SUPPL.2, p. 4–7, 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.
- CASTLE, P. E. et al. The relationship of community biopsy-diagnosed cervical intraepithelial neoplasia grade 2 to the quality control pathology-reviewed diagnoses: An alts report. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 127, n. 5, p. 805–815, 2007.
- CASTLE, P. E. et al. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. **Obstetrics and Gynecology**, v. 113, n. 1, p. 18–25, 2009.
- CECCATO JUNIOR., B. et al. Incidence of Cervical Human Papillomavirus and Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women with Positive and Negative HIV Status. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics**, v. 38, n. 0, p. 231–238, 2016.
- CHIECO, P. et al. **Image Cytometry: Protocols for 2D and 3D Quantification in Microscopic Images**. [s.l: s.n.]. v. 47
- CLARKE, M. A. et al. A Systematic Review of Tests for Postcolposcopy and Posttreatment Surveillance. **Journal of lower genital tract disease**, v. 24, n. 2, p. 148–156, 2020.
- CLAVEL, C. et al. Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. **Journal of Clinical Pathology**, v. 51, n. 10, p. 737–740, 1998.
- CUZICK, J. et al. Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening. **Vaccine**, v. 24, n. SUPPL. 3, p. 90–97, 2006.

- 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.
- 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.
- DUVLIS, S. et al. polymorphisms with cervical intraepithelial lesions and cervical carcinomas. **JBUON**, v. 25, n. 1, p. 132–140, 2020.
- EINSTEIN, M. H.; PHAËTON, R. Issues in cervical cancer incidence and treatment in HIV. **Current Opinion in Oncology**, v. 22, n. 5, p. 449–455, 2010.
- FAN, A. et al. Diagnostic value of the 2011 international federation for cervical pathology and colposcopy terminology in predicting cervical lesions. **Oncotarget**, v. 9, n. 10, p. 9166–9176, 2018.
- FERENCZY, A.; FRANCO, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **Lancet Oncology**, v. 3, n. 1, p. 11–16, 2002.
- FUSCO, E. et al. History of colposcopy: a brief biography of Hinselmann. **Journal of prenatal medicine**, v. 2, n. 2, p. 19–23, 2008.
- GAGE, J. C. et al. Number of cervical biopsies and sensitivity of colposcopy. **Obstetrics and Gynecology**, v. 108, n. 2, p. 264–272, 2006.
- 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, 2017.
- 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.
- GE, Y. et al. HPV status in women with high-grade dysplasia on cervical biopsy and preceding negative HPV tests. **Journal of the American Society of Cytopathology**, v. 8, n. 3, p. 149–156, 2019.
- GIAM, M. .; RANCATI, G. Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: A jackpot to chaos. **Cell Division**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2015.
- 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.
- HARDEN, M. E.; MUNGER, K. Human papillomavirus molecular biology. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 772, p. 3–12, 2017.
- HARDIE, D. C.; GREGORY, T. R.; HEBERT, P. D. N. From pixels to picograms: A beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 50, n. 6, p. 735–749, 2002.
- HAROSKE, G. et al. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. **Analytical Cellular Pathology**, v. 23, n. 2, p. 89–95, 2001.
- 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. 610373, 2013.
- HUA, T. et al. DNA ploidy cytometry testing for cervical cancer screening in China (DNACIC

Trial): A prospective randomized, controlled trial. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 20, p. 6438–6445, 2009.

HUH, W. K. et al. Final efficacy, immunogenicity, and safety analyses of a nine-valent human papillomavirus vaccine in women aged 16–26 years: a randomised, double-blind trial. **The Lancet**, v. 390, n. 10108, p. 2143–2159, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero**. 2. ed.rev. ed. Rio de Janeiro: INCA,2016: [s.n.].

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Incidência de Câncer no Brasil-estimativa 2020**. Rio de Janeiro: INCA,2019: [s.n.].

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.

JENSEN, K. E. et al. Chlamydia trachomatis and risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse in women with persistent human papillomavirus infection: A cohort study. **Sexually Transmitted Infections**, v. 90, n. 7, p. 550–555, 2014.

JIANG, Y. et al. Identification of Circulating MicroRNAs as a Promising Diagnostic Biomarker for Cervical Intraepithelial Neoplasia and Early Cancer: A Meta-Analysis. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

KALLIALA, I. et al. Incidence and mortality from cervical cancer and other malignancies after treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis of the literature. **Annals of Oncology**, v. 31, n. 2, p. 213–227, 2020.

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, 2009.

KHAN, M. J. et al. ASCCP Colposcopy Standards: Role of Colposcopy, Benefits, Potential Harms, and Terminology for Colposcopic Practice. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 21, n. 4, p. 223–229, 2017.

KIERKEGAARD, O. et al. **Association between colposcopic findings and histology in cervical lesions: The significance of the size of the lesion** *Gynecologic Oncology*, 1995.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histology and cell biology : an introduction to pathology**. [s.l: s.n.].

KOIFMAN, R. J.; FERREIRA, I. Caracterização de mulheres com câncer cervical atendidas no Inca por tipo histológico. **Revista de Saúde Pública**, p. 1–13, 2019.

KOLIOPOULOS, G. et al. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 8, 2018.

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

KYRGIU, M. et al. Adverse obstetric outcomes after local treatment for cervical preinvasive and early invasive disease according to cone depth: Systematic review and meta-analysis. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 71, n. 11, p. 646–648, 2016.

LAUREATES, N. P. A. **The nobel prize in physiology or medicine 2009** Disponível em:

- <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/>, 2009. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2008/summary/>>. Acesso em: 21 abr. 2020
- LEA, J. S.; LIN, K. Y. Cervical Cancer. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 39, n. 2, p. 233–253, 2012.
- LEKOVICH, J. P. et al. Comparison of human papillomavirus infection and cervical cytology in women using copper-containing and levonorgestrel-containing intrauterine devices. **Obstetrics and Gynecology**, v. 125, n. 5, p. 1101–1105, 2015.
- LEYDEN, W. A. et al. Cervical cancer in women with comprehensive health care access: Attributable factors in the screening process. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 9, p. 675–683, 2005.
- LOOPIK, D. L. et al. Justifying conservative management of CIN2 in women younger than 25 years - A population-based study. **Gynecologic Oncology**, v. 152, n. 1, p. 82–86, 2019.
- 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.
- LUYTEN, A. et al. Utility and Reproducibility of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy Classification of Transformation Zones in Daily Practice: A Multicenter Study of the German Colposcopy Network. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 19, n. 3, p. 185–188, 2015.
- MARK, K. et al. Rates of regression of cervical dysplasia between initial biopsy and excisional procedure in routine clinical practice. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 299, n. 3, p. 841–846, 2019.
- MARTINS, N. V.; RIBALTA, J. C. L. **Patologia do trato genital inferior diagnóstico e tratamento, colposcopia, cito-histopatologia, Biologia molecular, CAF-LASER**. [s.l.] Roca, 2005.
- MASSAD, L. S. et al. The accuracy of colposcopic grading for detection of high grade cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of lower genital tract disease**, v. 13, n. 3, p. 137–144, 2009.
- MASSAD, L. S. et al. Cervical cancer incidence after up to 20 years of observation among women with HIV. **Int J Cancer**, v. 141, n. 8, p. 1561–1565, 2017.
- MASSAD, L. S.; COLLINS, Y. C. Strength of correlations between colposcopic impression and biopsy histology. **Gynecologic Oncology**, v. 89, n. 3, p. 424–428, 2003.
- MAYEAUX, E. J.; COX, J. T. **Modern Colposcopy Textbook and Atlas: 9781608315475: Medicine & Health Science Books @ Amazon.com**. [s.l.: s.n.].
- 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.
- MEDRONHO, R. . **Epidemiologia**. 2ª edição ed. [s.l.] Atheneu, 2016.

- MONTEIRO, D. L. M. et al. Prognosis of intraepithelial cervical lesion during adolescence in up to two years of follow-up. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 23, n. 4, p. 230–236, 2010.
- 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, p. 1085–1092, 2002.
- MOSCICKI, A. B. et al. Guidelines for Cervical Cancer Screening in Immunosuppressed Women Without HIV Infection. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 23, n. 2, p. 87–101, 2019.
- MOURAD, M. et al. Epidemiological Trends of Head and Neck Cancer in the United States: A SEER Population Study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 75, n. 12, p. 2562–2572, 2017.
- MUNMANY, M. et al. Small lesion size measured by colposcopy may predict absence of cervical intraepithelial neoplasia in a large loop excision of the transformation zone specimen. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 124, n. 3, p. 495–502, 2017.
- NAM, K. Colposcopy at a turning point. **Obstetrics and Gynecology Science**, v. 61, n. 1, p. 1–6, 2018.
- NAUD, P. et al. História da colposcopia : do invento de Hinselmann aos ensaios clínicos atuais. n. 9, p. 597–605, 2006.
- NAYAR, R.; WILBUR, D. C. The Pap test and Bethesda 2014. **Cancer Cytopathology**, v. 123, n. 5, p. 271–281, 2015.
- ONOFRE, F. B. D. 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.
- ORR, B.; GODEK, K. M.; COMPTON, D. Aneuploidy. **Current Biology**, v. 176, n. 1, p. 100–106, 2015.
- ÖSTÖR, A. G. **Natural history of cervical intraepithelial Neoplasia: A critical review** *International Journal of Gynecological Pathology*, 1993.
- PASSAMONTI, B. et al. Cervical human papilloma virus (HPV) DNA primary screening test: Results of a population-based screening programme in central Italy. **Journal of Medical Screening**, v. 24, n. 3, p. 153–162, 2017.
- PERKINS, R. B. et al. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. **Journal of lower genital tract disease**, v. 24, n. 2, p. 102–131, 2020.
- PETRY, K. U.; LUYTEN, A.; SCHERBRING, S. Accuracy of colposcopy management to detect CIN3 and invasive cancer in women with abnormal screening tests: Results from a primary HPV screening project from 2006 to 2011 in Wolfsburg, Germany. **Gynecologic Oncology**, v. 128, n. 2, p. 282–287, 2013.
- PIERCE, J. P. et al. Trends in lung cancer and cigarette smoking: California compared to the rest of the United States. **Cancer Prevention Research**, v. 12, n. 1, p. 3–12, 2019.
- 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.

PISTA, A.; VERDASCA, N.; OLIVEIRA, A. Clinical performance of the CLART human papillomavirus 2 assay compared with the hybrid capture 2 test. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 2, p. 272–276, fev. 2011.

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.

POPPE, W. A. ET AL. Tobacco Smoking Impairs the Local Immunosurveillance in the Uterine Cervix. **Gynecologic and obstetric investigation**, v. 39, n. 1, p. 34–8, 1995.

POTAPOVA, T.; ZHU, J.; LI, R. Aneuploidy and chromosomal instability: a vicious cycle driving cellular evolution and cancer genome chaos. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2013.

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.

RAJKUMAR, T. et al. 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.

REBOLJ, M. et al. Primary cervical screening with high risk human papillomavirus testing: Observational study. **BMJ (Online)**, v. 364, 2019.

RIJKAART, D. C. et al. Alternating high-risk human papillomavirus infection: Consequences of progression to cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer**, v. 108, n. 6, p. 475–479, 2006.

ROSITCH, A. F. et al. Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: A literature review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 6, p. 1271–1285, 2013.

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 and Control**, v. 27, n. 1, p. 15–25, 2016.

SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N. Issues in optimising and standardising the accuracy and utility of the colposcopic examination in the HPV era. **Ecancermedalscience**, v. 9, p. 1–6, 2015.

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

SILVERBERG, M. J.; LEYDEN, W. A.; CHI, A. Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Non-HIV-Associated Immunosuppression and Risk oh Cervical Neoplasia. **Obstet Gynecol**, v.

131, n. 1, p. 47–55, 2018.

SKORSTENGAARD, M. et al. Conservative management of women with cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in Denmark: a cohort study. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 127, n. 6, p. 729–736, 2020.

SMALL, W. et al. Cervical cancer: A global health crisis. **Cancer**, v. 123, n. 13, p. 2404–2412, 2017.

SMITH, J. S. Herpes Simplex Virus-2 as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer. **CancerSpectrum Knowledge Environment**, v. 94, n. 21, p. 1604–1613, 2002.

SPOTNITZ, M. E. et al. Relative Risk of Cervical Neoplasms Among Copper and Levonorgestrel-Releasing Intrauterine System Users. **Obstetrics and gynecology**, v. 135, n. 2, p. 319–327, 2020.

SSEDYABANE, F. et al. HPV-chlamydial coinfection, prevalence, and association with cervical intraepithelial lesions: A pilot study at mbarara regional referral hospital. **Journal of Cancer Epidemiology**, v. 2019, 2019.

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.

STUEBS, F. A. et al. Accuracy of colposcopy-directed biopsy in detecting early cervical neoplasia: a retrospective study. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 299, n. 2, p. 525–532, 2019.

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. 110–113, 2011.

SUH, D. H. et al. Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2017. **Journal of Gynecologic Oncology**, v. 29, n. 2, p. 1–18, 2018.

TATTI, S.; BORNSTEIN, J.; PRENDIVILLE, W. Colposcopy: A Global Perspective. Introduction of the New IFCPC Colposcopy Terminology. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 40, n. 2, p. 235–250, 2013.

TERMINI, L.; VILLA, L. Biomarcadores na triagem do câncer do colo uterino. **DST–J bras Doenças Sex Transm**, v. 20, n. 2, p. 125–131, 2008.

THOMSEN, L. T. et al. Clinical performance of human papillomavirus (HPV) testing versus cytology for cervical cancer screening: Results of a large danish implementation study. **Clinical Epidemiology**, v. 12, p. 203–213, 2020.

TIFAOU, N. et al. High-risk HPV detection and associated cervical lesions in a population of French menopausal women. **Journal of Clinical Virology**, v. 108, n. August, p. 12–18, 2018.

TROTTIER, H. et al. Human papillomavirus infection and reinfection in adult women: The role of sexual activity and natural immunity. **Cancer Research**, v. 70, n. 21, p. 8569–8577, 2010.

TUERXUN, G. et al. Evaluation of careHPV, Cervista Human Papillomavirus, and Hybrid Capture 2 Methods in Diagnosing Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2+ in Xinjiang Uyghur Women. **The Oncologist**, v. 21, n. 7, p. 825–831, 2016.

WALBOOMERS, J. et al. Human Papillomavirus Is a Necessary Cause. **Journal of Pathology**, v.

189, n. May, p. 12–19, 1999.

WALKER, J. L. et al. Predicting absolute risk of CIN3 during post-colposcopic follow-up: Results from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 195, n. 2, p. 341–348, 2006.

WAXMAN, A. G. et al. Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. **Obstetrics and Gynecology**, v. 120, n. 6, p. 1465–1471, 2012.

WENDLAND, E. M. et al. Sexual behavior across the transition to adulthood and sexually transmitted infections. **Medicine**, v. 97, n. 33, p. e11758, 2018.

WENTZENSEN, N. et al. Evidence-Based Consensus Recommendations for Colposcopy Practice for Cervical Cancer Prevention in the United States. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 21, n. 4, p. 216–222, 2017.

WENTZENSEN, N. et al. A prospective study of risk-based colposcopy demonstrates improved detection of cervical precancers. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 218, n. 6, p. 604.e1-604.e8, 2018.

WILKINSON, T. M. et al. Recurrence of high-grade cervical abnormalities following conservative management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 212, n. 6, p. 769.e1-769.e7, 2015.

WONG, O. G. et al. An automated quantitative DNA image cytometry system detects abnormal cells in cervical cytology with high sensitivity. **Cytopathology**, v. 29, n. 3, p. 267–274, 2018.

WRIGHT, T. C. et al. 2006 Consensus Guidelines for the Management of Women With Cervical Intraepithelial Neoplasia or Adenocarcinoma in Situ. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 197, n. 4, p. 340–345, 2007.

WRIGHT, T. C. et al. The ATHENA human papillomavirus study: Design, methods, and baseline results. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 206, n. 1, p. 46.e1-46.e11, 2012.

ZHANG, S.; BATUR, P. Human papillomavirus in 2019: An update on cervical cancer prevention and screening guidelines. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 86, n. 3, p. 173–178, 2019.

ZHAO, C. et al. Prior high-risk human papillomavirus testing and papanicolaou test results of 70 invasive cervical carcinomas diagnosed in 2012: Results of a retrospective multicenter study. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 139, n. 2, p. 184–188, 2015.

ZUR HAUSEN, H. Condylomata acuminata and human genital cancer. **Cancer Research**, v. 36, n. 2, p. 1–2, 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. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise Multimodal das Atípias do Colo Uterino

Pesquisador: Alexandre Sherley Casimiro Onofre

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57423616.3.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.326.458

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda de um estudo Programa de pós-graduação em Ciências Médicas e Programa de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina orientado pelo professor dr. Alexandre Sherley Casimiro Onofre. 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. Os pesquisadores apresentaram como justificativa para a realização da emenda os seguintes aspectos: "Registrar que o teste de HPV previsto na metodologia o projetos será

realizado pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF). A declaração do diretor do referido Laboratório autorizando sua execução foi anexadas; Incluir a aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmácia Carolina Marian Pedrini(CPF: 060.245.850-50); Como algumas das metodologias do projeto não foram possíveis de serem executadas em tempo hábil por dificuldades relacionadas ao atraso de quase

um ano para a coleta das amostras das pacientes e obtenção dos reagentes para as metodologias previstas, alteração de cronograma ampliando o prazo de coleta de demais etapas." Os pesquisadores esclarecem que não houve alteração do projeto original em nenhuma das etapas, permanecendo, os mesmos objetivos e metodologias anteriormente propostas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

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: 3.326.458

Realizar uma análise multimodal das atipias 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 atipias 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)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:

Riscos:

Os riscos são mínimos decorrentes da coleta cêrvico-vaginal, já realizada e indicada rotineiramente.

Benefícios:

As pacientes que apresentarem resultados positivos nos métodos adjuvantes serão convidadas a visita médica para acompanhamento adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores realizaram a justificativa da emenda e anexaram a documentação informada relativo a inclusão do novo laboratório e de novo pesquisador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE sem alteração relacionada a primeira versão.

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conclusão: aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

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: 3.326.458

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1339024_E1.pdf	22/04/2019 11:00:35		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao.pdf	22/04/2019 10:59:01	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Outros	Emenda.pdf	22/04/2019 10:58:09	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoGuardaChuva2016.pdf	28/06/2018 15:00:45	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoDiretor.pdf	28/06/2018 15:00:27	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/06/2018 14:58:51	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	28/06/2018 14:54:13	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 15 de Maio de 2019

Assinado por:
Nelson Canzian da Silva
(Coordenador(a))

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 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.

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 Sherlley 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 – Questionário epidemiológico

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): _____
 DST prévias: () sim () não
 () sífilis () gonorréia () clamídia () trichomonas () condilomas () HIV
 () herpes genital () hepatite B () hepatite C Outros: _____
 Método anticoncepcional: () nenhum () ACO () DIU de cobre () DIU levonorgestrel
 () injetável mensal () injetável trimestral () implante transdérmico
 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.

ÚLTIMA VEZ QUE REALIZOU EXAME PREVENTIVO PARA O CÂNCER DE COLO DE ÚTERO:

- menos de 1 ano atrás
- de 1 a menos de 2 anos
- de 2 a menos de 3 anos
- 3 anos ou mais
- nunca fez

SE NUNCA FEZ EXAME PREVENTIVO, QUAL O PRINCIPAL MOTIVO DE NUNCA TER FEITO?

- nunca teve relações sexuais
- não acha necessário
- tem vergonha
- nunca foi orientada para fazer o exame
- não sabe quem procurar ou aonde ir
- tem dificuldades financeiras
- tem dificuldade de transporte
- dificuldade para marcar a consulta
- o tempo de espera da consulta é grande
- o serviço de saúde é muito distante
- o horário de funcionamento do serviço de saúde é incompatível com suas atividades de trabalho
- o plano de saúde não cobre a consulta
- está marcado, mas ainda não realizou.

RESULTADO DOS EXAMES:

IMPRESSÃO COLPOSCÓPICA:

- achados normais. ZTT tipo _____.
- alteração regenerativa.
- alteração de grau menor.
- alteração de grau maior.
- sugestivo de câncer invasor.

RESULTADO DA HISTOPATOLOGIA:

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

CITOMETRIA DO DNA:

euploide aneuploide

TESTE DO HPV:

negativo

baixo risco

alto risco

Genótipo: _____