

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

**ESTUDO CITOMORFOLÓGICO DE LESÕES DO COLO
UTERINO - ANÁLISE COMPARATIVA DE DIVERSAS
METODOLOGIAS**

CARLA FILIPPIN

FLORIANÓPOLIS

2004

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

**ESTUDO CITOMORFOLÓGICO DE LESÕES DO COLO UTERINO -
ANÁLISE COMPARATIVA DE DIVERSAS METODOLOGIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmácia como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cidônia de Lourdes Vituri.

CARLA FILIPPIN

FLORIANÓPOLIS

2004

A **Deus** pela força e coragem sempre constantes em minha vida,

A meus pais **Bruno** e **Rosi**, que mesmo distantes sempre se tornaram presentes,

A meu irmão **Carlo** pelo exemplo seguido e, principalmente a...

Caio, meu filho, que em sua inocência, soube perdoar minha ausência.

Eles são meu passado, presente e futuro.

“O homem encontra Deus atrás de cada porta que a ciência busca abrir”.

Albert Einstein

“São fúteis e cheias de erros as ciências que não nasceram da experimentação, mãe de todo conhecimento”.

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dr^a. Cidônia de Lourdes Vituri, por compartilhar comigo a alegria da vitória, também seu tema de pesquisa, sempre indicando a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade, sendo uma interlocutora disposta a oferecer estímulos e, principalmente, a percorrer novos caminhos, ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiam durante o processo de reflexão. Por ser paciente e generosa e pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude. Por sua amizade, principalmente. Pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Pela alegria de trabalharmos juntos.

Agradeço a colaboração da Prof^a Maria Cecília M. Ribeiro do departamento de Biologia pelo incentivo, conhecimento e apoio científico desprendido sempre que necessário na execução deste trabalho. Agradeço sinceramente a prof^a Cecília pela presença, e carinho que sempre demonstrou.

A amiga Larissa Duarte Christofolletti, pela presença sempre constante em todos momentos, com função de bolsista, mas que jamais se limitou a esta atuação, sendo empreendedora e dedicada em todos os momentos, realizando tarefas, opinando e discutindo em momentos decisivos, e sendo além de tudo companheira. Agradeço a felicidade de tê-la presente nesta fase de minha vida.

Agradeço imensamente ao Dr. Afonso Márcio Batista da Silva, da Maternidade Carmela Dutra, que com carinho e afeto nos cedeu atenciosamente o seu local de trabalho para que lá pudéssemos coletar as amostras necessárias para a execução desta pesquisa; e que sempre presente colou-nos a disposição seu conhecimento em citologia e colposcopia e assim pudéssemos usufruir e crescer em ciência e saber. Obrigada Dr. Afonso.

Ao amigo Dr. Fábio Massayuki Hamada pelo apoio prestado na coleta e obtenção das amostras na fase inicial de padronização de técnicas de nossa pesquisa.

A Carlos Pantaleão que em prol da ciência nos cedeu o programa de captura de imagem, parte de sua tese em doutorado por esta universidade, sempre com o intuito de poder ajudar para que o conhecimento chegue a todos.

A Tulio Vinicius Duarte Christofolletti e Diogo Fernandes Veiga que com paciência executaram o programa de análise de imagens compatível com nossas necessidades.

Aos colegas e amigos do mestrado, pela amizade e bom convívio desfrutados.

Aos integrantes do Hospital de Guarnição de Florianópolis pela compreensão prestada no decorrer do curso.

A todos os meus amigos, que comigo partilharam a conquista da vitória e o galgar do triunfo, os quais jamais ousaria nomear para não me deixar levar pela emoção e cair no esquecimento de não mencionar um deles.

Agradeço a todas as pessoas de bom coração que passaram pela minha vida durante a realização deste mestrado, que de maneira atenciosa me ajudaram e contribuíram para sua realização.

“Ele (Deus) é o dono de tudo. Devo a Ele a oportunidade que tive de chegar aonde cheguei. Muitas pessoas têm essa capacidade, mas não têm a oportunidade. Ele a deu a mim, não sei porque. Só sei que não posso desperdiçá-la”.

Ayrton Senna da Silva

RESUMO

O Câncer de colo uterino pode ser detectado através do exame preventivo do câncer nos seus estágios iniciais possibilitando o tratamento precoce. Para isso, depende o diagnóstico de lesões displásicas, pois estas podem se desenvolver em câncer; fato que em alguns casos podem ser inconclusivos, pois a técnica de Papanicolaou é uma análise subjetiva. Com finalidade de desenvolver auxílio diagnóstico, para as lesões limítrofes e duvidosas observadas nos exames de rotina realizados pelo método de Papanicolaou, buscou-se o estudo das NORs, regiões organizadoras de nucléolo, através da impregnação por nitrato de prata, pela Técnica AgNOR. Os NORs formam pontos no núcleo da célula, que podem ser contados e medidos sua área relativa e ser utilizado como marcadores de proliferação celular. No comportamento biológico das lesões intraepiteliais cervicais, os NORs têm se mostrado um fator preditivo de malignidade. Em consequência ao exposto o objetivo deste trabalho foi avaliar a técnica de AgNOR aplicada em esfregaços de material cervical uterino e analisar a sua associação com o diagnóstico citológico, colposcópico e histológico do colo uterino. Para isso foram realizados esfregaços citológicos de material cervical uterino e procedidos as técnicas de AgNOR, Papanicolaou e Shorr. Realizaram-se análises microscópicas e computadorizadas do material. Os resultados demonstraram associação, entre a técnica de AgNOR e o diagnóstico citológico, colposcópico e histológico com correlação positiva para número e área dos pontos de AgNOR. Verificou-se aumento do número de pontos de AgNOR, bem como da área relativa e alteração na sua forma conforme a gravidade da lesão.

Palavras-chave: AgNOR, câncer cervical uterino, displasia, Papanicolaou, citologia, colposcopia, histologia.

ABSTRACT

The uterine col Cancer can be detected through the preventive examination of the cancer in its initial periods of training making possible the precocious treatment. For this, the diagnosis depends on displásico injuries, therefore these can be developed in cancer; fact that in some cases can be inconclusive, therefore the technique of Papanicolaou is a subjective analysis. With purpose to develop diagnostic aids, for the bordering injuries and doubtful observed in the examinations of routine carried through by the method of Papanicolaou, one searched the study of the NORs, regions organizers of nucleolus, through the impregnation for nitrate of silver, the AgNOR Technique. The NORs forms points in the nucleus of the cell, that can count and be measured its relative area and to be used as marking of cellular proliferation. In the biological behavior of the cervical intraepithelial injuries, the NORs if has shown a prediction factor of malignidade. In consequence to displayed the objective of this work it was to evaluate the technique of AgNOR applied in smears of uterine cervical material and to analyze its association with the cytological diagnosis, colposcopic and histological of the uterine col. For this smears cytological of cervical material uterine and proceeded the techniques from AgNOR had been carried through, Papanicolaou and Shorr. Microscope and computerized analyses of the material had been become fulfilled. The results had demonstrated association, enter the technique of AgNOR and the cytological, colposcopic and histological diagnosis with positive correlation for number and area of the points of AgNOR. Increase of the number of points of AgNOR was verified, as well as of the relative area and alteration in its in agreement form the gravity of the injury.

Word-key: AgNOR, cervical, dysplasia uterine cancer, Papanicolaou, cytology, colposcopy, histology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	04
2.1 CÂNCER DE COLO UTERINO - IMPORTÂNCIA DIAGNÓSTICA.....	05
2.2 CARCINOGENESE.....	07
2.3 CITOLOGIA.....	09
2.4 COLPOSCOPIA.....	16
2.5 HISTOLOGIA.....	21
2.6 HPV.....	23
2.7 DISPLASIAS.....	25
2.8 REGIÃO ORGANIZADORA DE NUCLÉOLO.....	28
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4. METODOLOGIA.....	38
4.1 APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA.....	39
4.2 DELINEAMENTO ESPERIMENTAL.....	39
4.2.1 GRUPO CONTROLE	40
4.2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	40
4.2.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	40
4.3 AVALIAÇÃO COLPOSCÓPICA.....	41
4.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	42
4.4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	42
4.4.1.1 COLORAÇÃO DE HE.....	42
4.4.2 ANÁLISE CITOLOGICA.....	42
4.4.2.1PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS	42
4.4.3 PREPARAÇÃO DOS REAGENTES PARA COLORAÇÃO	43
4.4.3.1 REAGENTES UTILIZADOS NA COLORAÇÃO DE AgNOR.....	43
4.4.3.2 CORANTES UTILIZADOS NA COLORAÇÃO DE	43
PAPANICOLAOU.....	

4.4.3.3 REAGENTES UTILIZADOS NA COLORAÇÃO DE SHORR.....	45
4.4.4 TÉCNICAS DE COLORAÇÃO EMPREGADAS.....	46
4.4.4.1 COLORAÇÃO DE AGNOR.....	46
4.4.4.2 COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU.....	46
4.4.4.3 COLORAÇÃO DE SHORR.....	47
4.4.5 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS.....	47
4.4.5.1 SELEÇÃO DAS CÉLULAS.....	48
4.4.5.2 ANÁLISE DAS IMAGENS.....	48
4.5 CRITÉRIOS DE ANÁLISE MORFOLÓGICA E CLASSIFICAÇÕES ADOTADAS.....	49
4.6 ESTATÍSTICA.....	50
5. RESULTADOS	51
5.1 DISTRIBUIÇÃO DE CASOS DE ACORDO COM O DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO.....	52
5.2 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DOS CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS.....	52
5.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA COLORAÇÃO DE AgNOR NAS DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES CITOLÓGICAS.....	54
5.4 ASSOCIAÇÃO DA TÉCNICA DE AgNOR E DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO.....	62
5.4.1 CORRELAÇÃO ENTRE NÚMERO DE AgNOR E RESULTADOS CITOLÓGICOS.....	62
5.4.2 CORRELAÇÃO ENTRE VALORES DE ÁREA DE AgNOR E RESULTADOS CITOLÓGICOS.....	63
5.4.3 DISPERSÃO DOS VALORES DE NÚMERO E ÁREA DE AgNOR E RESULTADOS CITOLÓGICOS.....	63
5.5 ASSOCIAÇÃO DA TÉCNICA DE AgNOR E DIAGNÓSTICO COLPOSCÓPICO	65
5.5.1 CORRELAÇÃO ENTRE NÚMERO DE AgNOR E RESULTADOS COLPOSCÓPICOS.....	65

5.5.2 CORRELAÇÃO ENTRE VALORES DE ÁREA DE AGNOR E RESULTADOS COLPOSCÓPICOS.....	66
5.5.3 DISPERSÃO DOS VALORES DE NÚMERO E ÁREA DE AgNOR E RESULTADOS COLPOSCÓPICOS.....	66
5.6 ASSOCIAÇÃO DA TÉCNICA DE AgNOR E DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO.....	67
5.6.1 CORRELAÇÃO ENTRE NÚMERO DE AgNOR E RESULTADOS HISTOLÓGICOS.....	68
5.6.2 CORRELAÇÃO ENTRE VALORES DE ÁREA DE AgNOR E RESULTADOS HISTOLÓGICOS.....	68
5.6.3 DISPERSÃO DOS VALORES DE NÚMERO E ÁREA DE AgNOR E RESULTADOS HISTOLÓGICOS.....	69
5.7 AVALIAÇÃO DA ALTERAÇÃO DA FORMA DO AgNOR.....	70
5.8 ÍNDICE DE VARIAÇÃO DO NÚMERO DE AGNOR NAS DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES CITOLÓGICAS.....	71
6. DISCUSSÃO.....	75
7. CONCLUSÃO.....	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXOS.....	109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AgNOR	Método de Impregnação por Prata das Regiões organizadoras de nucléolo
ASCUS	Atipia em Célula Escamosa de Significado Indeterminado
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNA-r	Ácido desoxiribonucleico - ribossomal
E6	Oncogene viral
E7	Oncogene viral
G0	Fase gap 0 da ciclo celular
G1	Fase gap 1 da ciclo celular
G2	Fase gap 2 da ciclo celular
HE	Técnica histológica Hematoxilina-eosina
IFCPC	Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia
HPV	Human Papiloma Vírus
HSIL	Lesão Intraepitelial de Alto Grau
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JEC	Junção Escamo Colunar
LSIL	Lesão Intraepitelial de Baixo Grau
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NIC I	Neoplasia Intraepitelial Cervical grau I
NIC II	Neoplasia Intraepitelial Cervical grau II
NICIII	Neoplasia Intraepitelial Cervical grau III
NILM	Negativa para lesão intra epitelial ou neoplasia maligna
NORs	Regiões organizadoras de nucléolo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
P53	Proteína do gene p53
pRb	Proteína do gene Rb
RNA	Ácido rubonucleico

RNA-r	Ácido rubonucleico - ribossomal
S	Fase de síntese celular
SIL	Lesão Intraepitelial
TCA	Ácido Tricloroacético

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação das classificações citológicas de Papanicolaou - 1942, Regan - 1953, Richart - 1967 e Sistema Bethesda - 2001.....	12
Tabela 2	Comparação do desempenho da técnica de coloração de Papanicolaou e Shorr através de critérios morfológicos pré-estabelecidos.....	53
Tabela 3	Comparação do número de AgNOR entre diferentes graus de lesão segundo a classificação de Richard e Bethesda.....	72
Tabela 4	Comparação dos valores de área de AgNOR entre diferentes graus de lesão segundo a classificação de Richard e Bethesda.....	72
Tabela 5	Comparação do número de AgNOR nas diferentes classificações colposcópicas.....	73
Tabela 6	Comparação dos valores de área de AgNOR nas diferentes classificações colposcópicas.....	73
Tabela 7	Comparação do número de AgNOR nas diferentes classificações histológicas.....	74
Tabela 8	Comparação dos valores de área de AgNOR nas diferentes classificações histológicas.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do epitélio escamoso estratificado..	6
Figura 2	Esquema do aparelho reprodutor feminino.....	7
Figura 3	Freqüência de cada quadro citológico entre as lâminas de material cervical uterino analisado.....	52
Figura 4	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. Inflamatório. Coloração de Papanicolaou.....	53
Figura 5	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. Inflamatório. Coloração de Shoor.....	53
Figura 6	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HSIL – NIC II. Coloração de Papanicolaou.....	54
Figura 7	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HSIL – NIC II. Coloração de Shoor.....	54
Figura 8	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. Inflamatório. Coloração Citológica.....	55
Figura 9	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. Inflamatório. Técnica de AgNOR.....	55
Figura 10	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HPV. Coloração Citológica.....	56
Figura 11	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HPV. Técnica de AgNOR.....	56
Figura 12	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. ASCUS. Coloração Citológica.....	57
Figura 13	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. ASCUS. Técnica de AgNOR.....	57
Figura 14	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. LSIL – NIC I. Coloração Citológica.....	58
Figura 15	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HSIL – NIC I. Técnica de AgNOR.....	58

Figura 16	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HSIL – NIC II. Coloração Citológica.....	59
Figura 17	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HSIL – NIC I. Técnica de AgNOR	59
Figura 18	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HSIL – NIC III. Coloração Citológica.....	60
Figura 19	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HSIL – NIC III. Técnica de AgNOR.....	60
Figura 20	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. Carcinoma escamoso invasivo. Coloração Citológica.....	61
Figura 21	Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. Carcinoma escamoso invasivo. Técnica de AgNOR.....	61
Figura 22	Curva da média do número dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme classificação de Richard e Bethesda, valor de n=85.....	62
Figura 23	Curva da média dos valores de área dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme classificação de Richard e Bethesda, valor de n=82.....	63
Figura 24	Dispersão do número e dos valores relativos de área de AgNOR em cada classificação citológica.....	64
Figura 25	Curva da média do número dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme avaliação colposcópica de acordo com a IFCPC, valor de n=74.....	65
Figura 26	Curva da média dos valores de área dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme avaliação colposcópica pela IFCPC, valor de n=70.....	66
Figura 27	Dispersão do número e dos valores relativos de área de AgNOR em cada classificação colposcópica.....	67
Figura 28	Curva da média do número dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme avaliação histológica, valor de n=48.....	68

Figura 29	Curva da média dos valores de área dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme avaliação histopatológica, valor de n=47.....	69
Figura 30	Dispersão do número e dos valores relativos de área de AgNOR em cada classificação histológica.....	70
Figura 31	Percentagem de esfregaços com presença de formas espiculadas nos diferentes diagnósticos citológicos.....	71

1 - INTRODUÇÃO

No século XX, o mundo despertou para a importância da citologia no diagnóstico do Câncer da cérvix uterina, através das primeiras publicações de George Nikolas Papanicolaou. Paralelamente, foi escrito no Brasil, por Tinoco Cabral, o primeiro trabalho sobre Citologia, em sua tese de Doutorado apresentada em 1928 à Universidade de São Paulo, sob o título: “Modificações das células epiteliais da vagina humana na gravidez e na menopausa – seu estudo pelo método dos esfregaços”. Seguindo esta tendência outros trabalhos foram publicados, nos quais se empregava a citologia para a clínica. A utilização da Citologia no diagnóstico do Câncer em nosso País foi considerada pela primeira vez em 1942, em tese de Docência, elaborada por Antonio Vespasiano Ramos intitulada “Novo método de diagnóstico precoce do câncer uterino”.

Portanto desde a introdução do diagnóstico citológico das lesões pré-malignas cervicais, a cérvix uterina tornou-se uma das mais examinadas áreas do corpo humano. As alterações puderam, ser assim identificadas em esfregaços citológicos permitindo selecionar mulheres que pudessem ser tratadas em uma fase inicial antes que sinais ou sintomas venham a ocorrer (KOSS, 1989).

O câncer do colo do útero, apesar de apresentar decréscimo na sua taxa de mortalidade nos últimos anos, em 1947 era 2,5 mais elevado que em 1970, quando o exame de Papanicolaou estava sendo apresentado (CRAMER, 1974); ainda hoje mostra taxas elevadas, correspondendo a 15% de todos os tumores malignos na população feminina e representando dentre os diferentes tipos de cânceres a segunda maior causa de mortes de mulheres. Em nosso país os números são preocupantes, representando 80% de todos os cânceres ginecológicos registrados. A taxa de mortalidade por câncer de colo uterino nos últimos anos tem crescido em algumas regiões do país como na região sul (WÜNSCH FILHO, 2002). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer uterino foi responsável pela morte de 4.110 mulheres no Brasil em 2003. Tendo como taxa bruta de mortalidade e incidência o correspondente a 4,58 / 100.000 e 18,32 / 100.000 mulheres respectivamente. O número de mortes no mundo é estimado em cerca de 200.000 mulheres por ano por este tipo de

câncer, sendo 160.000 mulheres em áreas em desenvolvimento (CHAOUKI, *et al.*, 1998).

O câncer de colo uterino é ainda relevante, em termos de casos novos e morte no mundo, principalmente por estatísticas referentes aos países em desenvolvimento, sendo que 80% dos novos casos ocorrem nestas localidades. Observa-se, entretanto que, mesmo sendo uma causa de morte importante no Brasil e em outros países em desenvolvimento, a magnitude das taxas de mortalidade são bem menores do que as de incidência, refletindo-se em uma razão de mortalidade/incidência de aproximadamente de 25:100, graças isso ao diagnóstico precoce. As taxas de sobrevivência variam entre as regiões de maior ou menor desenvolvimento, porém, este câncer é considerado como de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente (PARKIN, 2001).

No estado de Santa Catarina temos como dados para o ano de 2003 a incidência de 430/100.000 novos casos com taxa de mortalidade de 160/100.000 mulheres; sendo na capital Florianópolis 40/100.000 novos casos com taxa de mortalidade de 10/100.000 mulheres (BRASIL, 2003).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) a partir de 2020 serão diagnosticados 15 milhões de novos casos de câncer por ano, e que, caso medidas de prevenção e controle não sejam adotadas, a incidência de câncer de colo uterino aumentará em aproximadamente 100%. Em países do continente africano, asiático, leste europeu e América central e sul os índices de novos casos e mortalidade são preocupantes (SHIBUJA, *et al.*, 2002; BRASIL, 2003).

Poder-se-ia evitar o surgimento de um quarto dos cânceres de colo uterino, aplicando-se simplesmente o conhecimento científico que se possui, e curar a terça parte deles com a tecnologia atual.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE COLO UTERINO - IMPORTÂNCIA DIAGNÓSTICA

O conceito das lesões precursoras do câncer cervical data de 1886, quando Williams noticiou, que próximo ao câncer invasivo, havia áreas do epitélio que ele reconheceu como não invasivas. Isso foi até 1900 quando Cullen melhor definiu essas lesões não invasivas, notando que elas se pareciam com cânceres invasivos, mas não invadiam o epitélio ainda; então o conceito de lesões precursoras de câncer se tornou mais aceito (SINGER & MONAGHAN, 2002).

Assim definido, o carcinoma escamoso invasivo do colo uterino ou cervical é precedido por alterações pré-cancerosas no epitélio cervical da zona de transformação onde podem ser identificados histologicamente e que são usualmente descritas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC - Richart 1967). As técnicas citológicas contribuem para o conhecimento dessas lesões e instalação de seu tratamento, conseqüentemente com a redução da incidência do câncer (REIS, *et al.*, 1992; REZENDE FILHO, *et al.*, 1993).

Estas alterações pré-malignas representam um aspecto contínuo de morfologia onde tem sido divididos em três estágios, NIC I, NIC II e NIC III, que são equivalentes na terminologia convencional à displasia leve, displasia moderada e displasia severa e carcinoma *in situ*, respectivamente (TAKAHASHI, 1982).

As alterações pré-malignas e malignas do câncer de colo uterino, onde o tipo mais comum é o carcinoma de células escamosas, ocorre com maior frequência, na Junção Escamo Colunar (JEC). A JEC ou zona de transformação (ZT) deve incidir sobre o orifício anatômico externo do colo uterino, onde se verifica o encontro do epitélio glandular cilíndrico ou colunar do canal endocervical e o epitélio escamoso pavimentoso pluriestratificado, que reveste a ectocérvice e a parede da vagina. Esta região compreende células de grande valor diagnóstico (SHIRATA, 1998; HERZBERG & SILVERMAN 1999, LIRA NETO, 2000).

O epitélio colunar é constituído por uma única camada de células altas especializadas em produzir muco, enquanto que o epitélio escamoso é formado

por três camadas de células: profundas (basais e parabasais), intermediárias e superficiais especializadas na proteção do tecido (GOMPEL & KOSS, 1997).

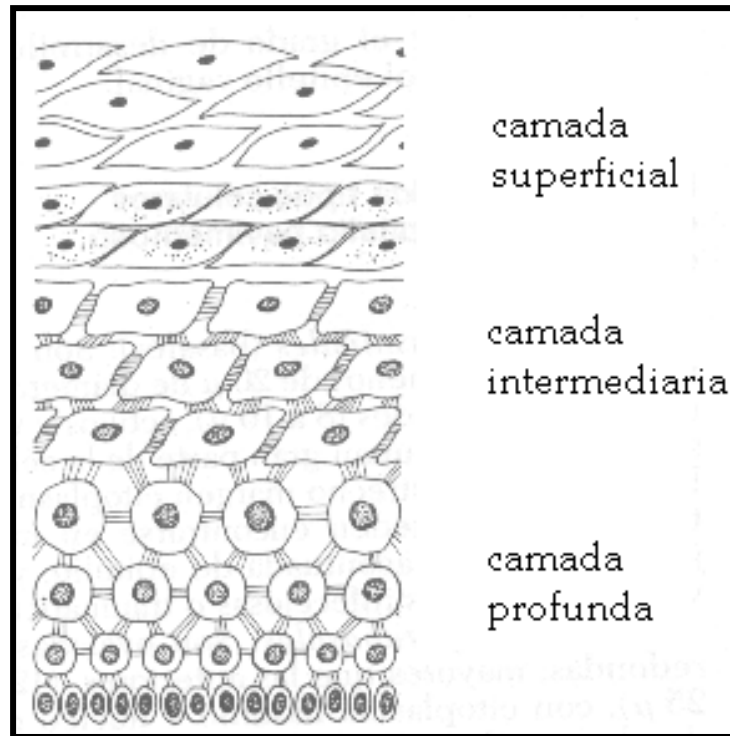


Figura 1: Representação esquemática do epitélio escamoso estratificado (GROSS E BARRASSO, 1999).

Em caso de ectopia, externalização da JEC em direção ao ectocérvice, a mucosa evertida mantém um contato direto com o meio vaginal normalmente ácido, o qual não é próprio à sua integridade estrutural, onde se inicia um processo reparativo. Esse processo é a metaplasia, que é uma alteração reversível no qual um tipo celular adulto é substituído por outro também adulto com a finalidade de formar um epitélio mais resistente a agentes externos. Portanto a metaplasia escamosa traduz a substituição do epitélio cilíndrico colunar simples pelo epitélio pavimentoso estratificado. Esta substituição se processa a custos de células de reserva indiferenciadas localizadas abaixo do epitélio cilíndrico. Na ausência de qualquer agente mutagênico, a metaplasia é do tipo fisiológico, enquanto na vigência de agente mutagênico ocorre o aparecimento de células metaplásicas atípicas (SUZUKI *et al.*, 1995; ROBBINS, 1996).

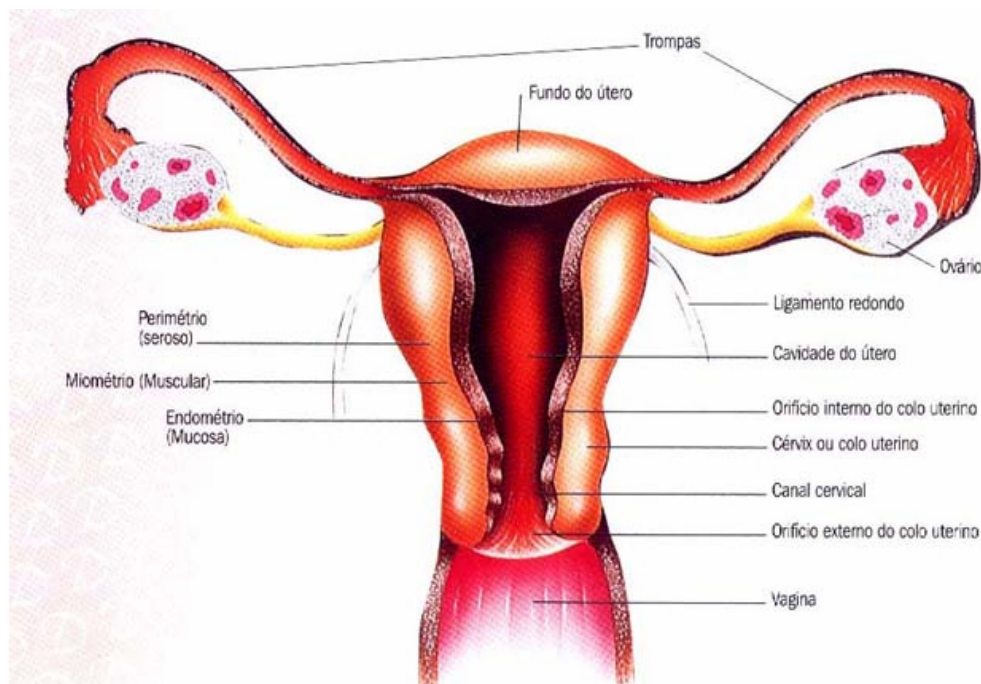


Figura 2: Esquema do aparelho reprodutor feminino.
[Http: //www.aborto.com.br/orgaos_genitais/feminino.htm](http://www.aborto.com.br/orgaos_genitais/feminino.htm).

Muitos pesquisadores sugeriram que o comportamento da metaplasia escamosa “mantêm a chave para a compreensão da oncogênese cervical”. (COPPLESON & REID, 1967 *apud* SINGER & MONAGHAN, 2002).

2.2 CARCINOGÊNESE

O ciclo celular corresponde aos processos que ocorrem na célula, desde sua formação, até sua divisão em duas células filhas. As fases G1, S, G2, M correspondem às fases consecutivas do ciclo celular. As fases G1, S, G2 correspondem às fases de interfase, que é um período de intensas atividades relacionadas com a proliferação celular, caracterizando-se por mudanças no conteúdo de DNA da célula e por alterações bioquímicas e fisiológicas. Um conjunto de mecanismos bioquímico regula o ciclo celular e muitas dessas reações envolvem proteínas reguladoras atuando na síntese de DNA na fase S e no processo de mitose (RABENHORST, *et al.*, 1993; LEVINE, *et al.*, 1994; HALL & COATES, 1995).

A descoberta de proteínas que atuam na replicação do material genético permitiu que se investigasse vários métodos de avaliação da proliferação celular.

Em resposta a estímulos externos específicos, as células iniciam o ciclo passando da fase G₀ (células quiescentes) ou G₁ (atividade biossintética) para as fases S (duplicação do DNA), G₂ (síntese de RNA e proteínas) e finalmente M (mitose), quando se completa a divisão celular .

A proliferação celular é necessária para equilibrar as perdas celulares e manter a integridade dos tecidos e órgãos. Esse processo requer a expressão coordenada de vários genes em determinados momentos do ciclo celular.

Para completar com sucesso a divisão celular, um número de genes *cdc* (cell-division-cycle) é ativado. Durante o processo, a célula passa por verificações de erros localizados entre os limites G₁/S e G₂/M, em que eventuais erros genéticos serão identificados e reparados (CALABRETTA & BASERG, 1991).

Os cânceres resultam normalmente por mudanças na seqüência de DNA da célula, e provavelmente uma única célula anormal origina um tumor, e esta passa a anormalidade para a sua progênie, sendo um processo genético. Mas em geral o câncer não pode ser o resultado de um único evento ou uma única causa, mas resultam da ocorrência de vários acidentes independentes em uma célula com efeitos cumulativos.

Em um minuto, ocorrem no corpo humano milhões de mutações genéticas. Tais danos são geralmente reparados rapidamente. Entretanto, se a replicação do DNA e a divisão celular ocorrerem antes do reparo, a lesão pode converter-se em um erro genético estável, dando origem a uma nova linhagem de células, genomicamente diferentes das do hospedeiro, caracterizando então o câncer.

O câncer origina-se de um erro genético ocorrido durante uma fase do ciclo de divisão celular que escapou dos mecanismos de controle dos genes supressores.

A carcinogênese é um processo dinâmico caracterizado por múltiplas etapas, definidas como: iniciação, promoção, progressão e manifestação (FUJITA, *et al.*, 1973; ODUKOYA & SHKLAR, 1984; MAREFAT, 1985; RUBIN & FARBER, 1990; HIGGINSON, 1993). A iniciação corresponde ao primeiro passo para o desenvolvimento neoplásico, sendo irreversível, porque lesa de forma permanente a estrutura do DNA. Uma vez a célula estando iniciada, ela passa por um período de latência, que corresponde ao intervalo entre a exposição ao carcinógeno e o aparecimento das alterações neoplásicas visíveis. As células iniciadas, em contato com o agente promotor, passam a expressar suas alterações, antes latentes. É a etapa de promoção da carcinogênese, em que os promotores, como o vírus HPV, estimulam a proliferação celular e modulam sua diferenciação, com o aparecimento de uma nova população celular, com propriedades diferentes da célula inicial, gerando a neoplasia (SANTOS, *et al.*, 2003; DIXON & KOPRAS, 2004). A etapa seguinte é a progressão, em que ocorre a evolução da neoplasia maligna. Segue-se a etapa de manifestação que é a fase de manifestação clínica do câncer (ROBBINS, *et al.*; 1996; RUBIN & FABER, 1990; RODRIGUEZ & CAMARGO, 1992).

2.3 CITOLOGIA

Historicamente, podemos relatar a introdução das diversas classificações citológicas desde o início do século, em 1907, quando se declarou que o diagnóstico do câncer do colo uterino poderia ser feito pelo aspecto celular, antes da fase destrutiva, isto é, antes da invasão do tecido conjuntivo (AUGUSTO, *et al.*, 1982). De 1908 a 1910, outros estudiosos concordaram com este achado; sendo que a descrição da doença corresponderia ao que, mais tarde, Schiller (1927) chamaria de carcinoma pré-invasor (AUGUSTO, *et al.*, 1982). Segundo KOSS (1989), no ano de 1924, George Nikolas Papanicolaou, médico grego, fez uma observação incidental de que as células cancerosas derivadas da cérvix uterina poderiam ser observadas em esfregaços vaginais. Esta observação foi apresentada em maio de 1928, e em 1941 foram divulgados os primeiros,

resultados de suas pesquisas, alcançando, portanto divulgação internacional a atualmente conhecida “Coloração de Papanicolaou”.

Em 1942, Papanicolaou demonstrou que o diagnóstico do câncer em sua fase inicial poderia ser realizado através dos caracteres morfológicos anormais das células esfoliadas do epitélio cervical uterino e propôs uma classificação dos esfregaços em cinco classes: classe I – normal; classe II - atípicas benignas; classe III – suspeito, que inclui as displasias; classe IV – fortemente sugestivo de malignidade; classe V – francamente maligno ou positivo para malignidade (NARDOZZA *et al.*, 1993).

Em 1953, Reagan e colaboradores, introduziram a classificação das displasias, referente a alterações do epitélio de revestimento do colo uterino, na Escola Norte-Americana, para diferenciar as várias fases de precursores do carcinoma cervical e o carcinoma *in situ* completamente desenvolvido, o que lhes conferia algum potencial de malignidade, na dependência de maior ou menor gravidade histológica. A diferenciação é realizada de acordo com a sua severidade, onde as alterações nucleares e citoplasmáticas são subdivididas em: displasia leve – quando se restringem às camadas superficiais; displasia moderada ou de grau intermediário – com envolvimento de mais da metade da espessura total do epitélio; displasia severa – quando quase toda espessura do epitélio está comprometida por células atípicas (NARDOZZA *et al.*, 1993).

A denominação displasia do grego *dis* (dificuldade, transtorno) e *plasia* (formação) – tem sido empregada em relação a processos benignos de outras origens (ossos, mamas). No colo uterino, a utilização do termo se refere a estados pré-malignos.

Em 1967, Richard introduziu o termo Neoplasia Intraepitelial Cervical: NIC (graus I, II, III e IV) em substituição, respectivamente as displasias e carcinoma *in situ* instituídos por Reagan. Em 1969, Richart acatou a opinião de especialistas, abolindo a classificação NIC IV, e mantendo a NIC III, como representativa de displasia severa e/ou carcinoma *in situ* (BUCKLEY, *et al.*, 1982; SUZUKI, 1996; SCHNEIDER & SCHNEIDER, 1998; SHIRATA, 1998).

O sistema Bethesda surgiu em 1988, quando pesquisadores de todo o mundo, reunidos em Bethesda (EUA), estabeleceram um consenso para maior precisão na informação diagnóstica, suprimindo as necessidades de duas décadas de avanços e permitindo melhor avaliação estatística das lesões detectadas; possibilitando assim a comparabilidade dos resultados citológicos e histológicos.

Em 1991, o Instituto Nacional do Câncer (USA) revisou a classificação e estabeleceu a terminologia de Bethesda para o diagnóstico citológico descritivo que seria aceita pela maioria dos laboratórios de citologia. Entretanto o Sistema Bethesda não substituiu completamente as classificações de Reagan e Richart, que ainda são utilizadas.

Em 2001, o Sistema Bethesda foi reformulado, e classifica as lesões cervicais escamosas dividindo-as em 4 categorias: Atipia em células escamosas de significado indeterminado (ASCUS), como aquelas alterações limítrofes, entre a normalidade e anormalidade e que não apresentam ainda os critérios necessários para classificá-las como displásicas; Lesão intraepitelial (SIL) de Baixo Grau (LSIL) como as alterações correspondentes à displasia leve e as alterações citopáticas do vírus HPV; Lesão intraepitelial (SIL) de Alto Grau (HSIL) às alterações correspondentes a displasia moderada e severa, bem como carcinoma *in situ*; carcinoma de células escamosas.

Observa-se abaixo na Tabela 1 a comparação entre as Classificações Citológicas, com uma tendência à redução do número de grupos de lesões desde a classificação de Papanicolaou até o Sistema de Bethesda.

Papanicolaou	Regan	Richart	Sistema Bethesda
I	Normal	Normal	Normal
II	Atipia reativa / inflamatória	Atipia reativa / inflamatória	Atipia reativa / inflamatória
II / III	Atipia	Atipia	ASCUS
III	Displasia leve	NIC I	SIL de baixo grau (LSIL)
III	Displasia moderada	NIC II	SIL de alto grau (HSIL)
III	Displasia acentuada	NIC III	SIL de alto grau (HSIL)
IV	Carcinoma in situ	NIC III	SIL de alto grau (HSIL)
V	Câncer invasivo	Câncer invasivo	Câncer invasivo

Tabela 1: Comparação das classificações citológicas de Papanicolaou - 1942, Regan - 1953, Richart - 1967 e Sistema Bethesda - 2001.

Na categoria ASCUS citologicamente são observadas alterações em células epiteliais escamosas, mais marcantes que as modificações inflamatórias ou regenerativas, porém, menos do que as encontradas naquelas com diagnóstico definitivo de NIC, como discreta hipertrofia nuclear de até duas vezes maior que o núcleo normal, apresentando cromatina finamente granular e pequenos cromocentros mais evidentes.

As alterações displásicas da cérvix uterina se manifestam por maturação atípica das diferentes camadas celulares, com queratinização anormal, freqüente e precoce; alterações nucleares e citoplasmáticas em graus variáveis e hiperatividade das camadas parabasal e basal, constituindo a maior parte do epitélio.

Em LSIL - Na displasia discreta, o esfregaço em geral contém somente um pequeno número de células displásicas, a maioria pertencendo às camadas de células superficiais, e algumas provenientes das camadas intermediárias. As

células descamadas são com freqüência binucleadas e apresentam discreta cariomegalia e hipercromasia. No entanto, o citoplasma é ainda abundante e a relação núcleo/citoplasma, acompanhado por aumento de volume do citoplasma, apesar de alterada, não difere em muito da correspondente às células normais, apresentam-se aumentados cerca de mais de três vezes ao de uma célula intermediária normal. O maior diâmetro nuclear é inferior à metade do maior raio citoplasmático. Existem já alterações na disposição da cromatina nuclear, que possibilitam diferenciar a displasia leve da metaplasia escamosa, na qual as células possuem núcleos normais (FOCCHI, *et al.*, 1987). Estas alterações correspondem a NIC I da classificação de Richart, 1967.

Poucas vezes as células das camadas mais profundas, parabasais e basais, apresentam anomalias discretas, insuficientes, no entanto, para causar confusão com células neoplásicas de carcinoma (FOCCHI, *et al.*, 1987).

Em HSIL - displasia moderada, o número de células displásicas e o grau de anormalidades nucleares e citoplasmáticas estão aumentadas. As células displásicas derivam das camadas superficiais e intermediárias, podendo ser encontradas, entretanto, células anormais das camadas profundas do epitélio escamoso normal ou metaplásico, com possíveis sinais de queratinização. Os núcleos estão aumentados de volume, variam em forma e tamanho e são hipercromáticos. A relação núcleo/citoplasma é maior do que no quadro anterior, de LSIL - displasia leve. O maior diâmetro nuclear é praticamente igual à metade do maior raio citoplasmático. Estas alterações correspondem a NIC II da classificação de Richart, 1967.

Nas células profundas alteradas não se observam ainda modificações nucleares tão evidentes como as do carcinoma, nem a relação núcleo/citoplasma está totalmente alterada, como acontece na HSIL - displasia severa e no HSIL - carcinoma *in situ* (FOCCHI, *et al.*, 1987).

Em HSIL - displasia severa, em contraste com a displasia leve ou moderada, é caracterizada por células marcadamente atípicas das camadas mais profundas, parabasais e basais, lado a lado com as células displásicas da

camada superficial, sendo que o número de células atípicas em geral está aumentado. O diagnóstico se baseia no encontro de células pequenas, de origem parabasal, redondas ou ovaladas, com evidentes sinais de agregado de cromatina nuclear. A relação núcleo/citoplasma bastante aumentada com o maior diâmetro nuclear superior à metade do maior raio citoplasmático. O núcleo mostra-se intensamente hipercromático com cromatina e membrana nuclear muito irregular. Na maioria das vezes, o citoplasma, denso e basófilo, é mais abundante do que o encontrado nas células do carcinoma *in situ* (FOCCHI *et al.*, 1987). Estas alterações correspondem a NIC III da classificação de Richart, 1967.

Do ponto de vista de critérios morfológicos de LSIL - displasia discreta a HSIL – displasia severa, estão muito bem determinados para atipias em células escamosas, quase sempre relacionados a efeitos citopáticos de infecção por HPV (SAHIMATA, *et al.*, 1996).

O quadro citológico do HSIL - carcinoma *in situ*, as células são ainda menores do que as anteriores existindo uma tendência à disposição em fila indiana. Os núcleos são relativamente grandes, o que torna bem evidente a alteração da relação núcleo/citoplasma, e ausência de nucléolos evidentes, característica importante para a avaliação, irregularidade de contornos nuclear, hipercromasia, multinucleação e, acima de tudo, o aparecimento marcante de espaços vazios. O citoplasma pode parecer normal, com algumas formas aberrantes. Haverá células malignas imaturas redondas ou ovais, com núcleo na posição central e que recebem o nome especial de células do 3º tipo. Estas alterações, também correspondem a NIC III da classificação de Richard, que uniu estes dois níveis de modificações citológicas.

As alterações celulares comprometem a espessura total da mucosa e são constituídas por células anaplásicas ou primitivas. O epitélio não apresenta mais sua capacidade de estratificação normal. Existe aumento no número de mitoses normais e anormais ou atípicas, com alterações na polaridade celular. Presença eventual de paraceratose constituída por varias camadas de células achatadas acidófilas na superfície são encontradas.

No carcinoma escamoso avançado cervical, as modificações celulares se referem também ao citoplasma, com células malignas que podem ser um pouco menores que no caso anterior e, usualmente, exibindo todas as formas aberrantes. A grande maioria das células apresenta citoplasma cianófilo, demonstrando ausência ou acentuada diminuição da ceratinização do citoplasma; núcleos com múltiplos macronúcleolos. A cromatina mostra um padrão hipercromático, grosseiramente granular. Nota-se também que, quanto mais avançado o estágio do carcinoma, menor a esfoliação de células malignas, especialmente as bem conservadas, apresentam também muitas células em girino, amebóides e outras formas aberrantes eosinófilas e cianófilas. Existe uma marcante diátese tumoral, e as células malignas são grandes e mostram anisocitose acentuada, aparecendo mais comumente isoladas, mas podem formar sincícios. A maioria dos casos de carcinoma escamoso cervical é classificada como carcinoma de células escamosas não ceratinizado (GOMPEL & KOSS, 1997).

O trabalho pioneiro de Papanicolaou introduziu o exame colpocitológico na pesquisa diagnóstica de prevenção e tratamento do câncer de colo uterino. Mais tarde, pelos avanços tecnológicos em citologia esfoliativa, demonstrou-se que este exame pode apontar para a solução de um enorme problema de Saúde Pública. Sendo o útero anatomicamente um órgão de fácil acesso, permite a realização da coleta de material para o exame citológico sem acarretar grandes distúrbios à mulher e realizar a importante tarefa de prevenção do câncer que mais a acometeria.

Para avaliar o grau morfológico das alterações celulares encontradas no material cervical pode-se utilizar a técnica de coloração de Papanicolaou, mais comumente empregada em avaliações citológicas e a técnica de Shorr.

A técnica de Papanicolaou tem como princípio, a hematoxilina que, por oxidação pelo óxido de mercúrio, se transforma em hematéina. A hematoxilina cora o núcleo em azul, após mordagem pelo alume de potassa. O orange G, a eosina, o verde luz e o marrom de Bismark são os corantes citoplasmáticos,

sendo o mais utilizado o EA 50 e o EA 36 em combinação com o Orange, na técnica de Papanicolaou.

A coloração de Shorr (BEÇAK & PAULETE, 1976) que emprega orange G, escarlate de Biebrich e verde luz associada ao corante hematoxilina de Harris é uma técnica baseada em princípios semelhantes à coloração de Papanicolaou. No entanto as substâncias que coram nucléolo e citoplasma sofrem variações produzindo contrastes mais marcantes das tonalidades citoplasmáticas e nucleares das células. Na década de 80 alguns pesquisadores (OETTLÉ & WELDHAGEN, 1982) apresentaram modificações na técnica propondo um método mais rápido. Os componentes do corante de Shorr favorecem a visualização da organização da cromatina, critério fundamental na classificação das displasias.

Esta coloração pode melhor identificar células retraídas, com aumento da acidofilia citoplasmática e condensação da cromatina nuclear, às vezes com fragmentação do núcleo e das células, caracterizando apoptose (SANTOS *et al.*, 2001).

2.4 COLPOSCOPIA

Com o surgimento da colposcopia que data do ano 1925, quando Hans Hinselmann, um ginecologista alemão, desenvolveu uma nova técnica para o auxílio no diagnóstico do câncer de colo uterino, ampliando as fronteiras em soluções para o seu tratamento. Com uma lupa de baixo poder, era visualizada a cérvix com um maior aumento. A aplicação deste método se desenvolveu de uma maneira lenta. Durante muitos anos a colposcopia e a citologia esfoliativa, foram consideradas competitivas no diagnóstico da displasia cervical e câncer. Somente nas últimas décadas, se tem aceitado que ambas as técnicas são importantes e tenham diferentes papéis no estudo das NICs e câncer cervical (MERLO, 1981).

É evidente que a citologia é, e seguirá sendo a melhor técnica de laboratório, no estudo das NICs. No entanto, é importante saber que a colposcopia permite saber uma evolução das mudanças que se sucedem na cérvix e, portanto útil no estudo de mulheres com citologias anormais pré-neoplásicas, e que apresentam suspeitas de neoplasias (MERLO, 1981).

O estudo colposcópico permite a identificação de características sutis do epitélio, imperceptíveis a olho nu, que são resultados da expressão patológica. No entanto, possui limitações, como a subjetividade das observações, a dificuldade das imagens e a quantificação de certas lesões, como a valorização de sua extensão (PUING-TINTORÉ, 2001).

Uma das muitas vantagens da colposcopia é a de diminuir o uso de biópsias da cérvix uterina. No entanto, é importante considerar que entre 5% e 20% das citologias anormais, somente a colposcopia não é suficiente para estabelecer um diagnóstico, requerendo, portanto a biópsia (MERLO, 1981). Não se pode duvidar que a colposcopia é um método de diagnóstico clínico que valoriza, sobretudo as mudanças de nível da superfície da cérvix, e que a citologia é uma técnica de laboratório que estuda as mudanças a nível celular. Por isto, a citologia e a colposcopia são consideradas como sistemas complementares inseparáveis para o estudo de pacientes com NIC (CARRERA, *et al.*, 1974; WETHICH, 1986; SANTOS, *et al.*, 2003).

É sabido que as terminologias usadas para diagnósticos citológicos e histológicos sejam semelhantes, de modo que eles possam estar relacionados com os achados colposcópicos. É também fundamental que a nomenclatura citológica e histológica seja baseada em dados clínicos e científicos suficientes, de modo que o médico possa inferir um comportamento clínico e o tratamento escolhido. Nos últimos 50 anos, a compreensão sobre a etiologia e a patogênese da neoplasia escamosa do trato genital inferior aumentou enormemente e, particularmente nos últimos 15 anos, o progresso e a compreensão dos eventos moleculares associados à neoplasia do trato genital desenvolveu-se rapidamente. Em resposta a esse conhecimento, a terminologia foi mudada para um novo sistema de classificação, fornecendo um alto grau de sofisticação que reflete o

pensamento científico atual correlacionando mais facilmente os diagnósticos laboratoriais com os dados colposcópicos e clínicos. Gradualmente a terminologia se tornou mais uniforme, e as implicações da citologia, histologia e conclusões clínicas tornaram-se mais seguras (SINGER & MONAGHAN, 2002).

Alguns sistemas têm sido propostos para aumentar a objetividade na graduação colposcópica. Um desses sistemas é o sugerido por Coppleson e Pixley (1992) que permite que correlações diagnósticas e prognósticas sejam feitas. Os quadros colposcópicos são constituídos por imagens e podem ser classificadas de acordo com as lesões encontradas:

Grau I (alterações insignificantes, pouco suspeitas) pelo qual incluem-se os processos inflamatórios (cervicopatias), constituídos pelas seguintes imagens colposcópicas: zona de transformação típica, o epitélio aceto-branco, as colpites em pontos vermelhos e pontos brancos, as leucoplasia leves e os vasos típicos. Estas alterações correspondem a NIC I da classificação de Richart 1967.

Grau II (alterações significantes, suspeitas): as imagens colposcópicas são: a leucoplasia leve ou simples, o pontilhado de base e os vasos de tipo típicos. Estas alterações correspondem a NIC II da classificação de Richart 1967.

Grau III (alterações altamente significantes, muito suspeitas); as imagens colposcópicas observadas são: leucoplasia simples, o pontilhado de base, o mosaico simples ou plano e vasos irregulares. Estas alterações correspondem a NIC III, incluindo carcinoma *in situ*, da classificação de Richart 1967.

No carcinoma microinvasivo se observa: leucoplasia hipertrófica, mosaico, pontilhado de base, vasos irregulares maiores.

No carcinoma invasivo se observa: leucoplasia hipertrófica, pontilhado de base, vasos atípicos grandes, e proliferação francamente carcinomatosa (SINGER & MONAGHAN, 2002).

Considera-se colposcopia satisfatória quando se observam os limites da zona de transformação em toda sua extensão e colposcopia insatisfatória quando

não se visualiza totalmente a zona de transformação, ou junção escamo colunar (JEC) e só se visualiza uma parte (MERLO, 1981). Isto é necessário porque é precisamente na união escamo-colunar, o sítio onde se localiza com preferência o câncer cervical. É importante lembrar, que esta zona de transformação ascende do interior do canal cervical principalmente na menopausada; por isto, de todas as pacientes a colposcopia não é satisfatória em 66% dos casos.

Pode-se considerar que o exame colposcópico se inicia com a colposcopia direta onde somente se observa a cérvix sem nenhuma preparação, geralmente se faz à limpeza do muco cervical com uma gaze impregnada com soro fisiológico. Nesta parte do exame, se visualiza a vascularização da cérvix com filtro verde, pois o emprego posterior do ácido acético por sua ação vasoconstritora dificulta o estudo da rede vascular (CARRERA, *et al.*, 1974).

Em seguida prossegue-se com a colposcopia ampliada na qual se impregna a cérvix com ácido acético de 3% a 5% e depois de 20 a 30 segundos se observam, sobre sua ação, com toda nitidez, as papilas do epitélio cilíndrico e se destacam as zonas atípicas. Por esta razão somente depois de aplicar o ácido acético, tem-se valor as observações colposcópicas.

As lesões correspondentes as NICs e carcinomas apresentam núcleos mais volumosos, hiper Cromáticos, com maior quantidade de DNA. Na colposcopia, este epitélio, quando submetido ao ácido acético usado, promove contração na membrana nuclear, condensando este material e tornando o epitélio mais opaco, de forma que se percebe o estroma não em vermelho, mas em branco-perolado, ou seja, em áreas aceto-brancas, que será mais aceto-branca quanto maior a atipia nuclear presente. Os núcleos também reagem a corantes vitais como o azul-de-toluidina, devido a sua acidofilia, teste chamado de Collins-Richart, que fixa em azul os núcleos ricos em ácido nucléico.

A prova de Schiller, descrito em 1929, marca delineando áreas de prováveis lesões displásicas e é realizado, somente depois que as observações colposcópicas com ácido acético estejam completadas. É empregada solução de iodo de 2% a 5% e observar-se coloração do colo uterino. Neste teste o epitélio

escamoso normal contendo glicogênio é facilmente diferenciado e irá se corar fortemente com iodo, dando origem ao estado chamado iodo positivo. Outros epitélios que não se coram são chamados de iodo negativos, Shiller positivo, como o epitélio metaplásico, epitélio imaturo, displasias e cânceres.

A colposcopia é usada em geral para avaliar mulheres selecionadas com citologias sugestivas de NIC com o fim de obter biópsia dirigida das lesões mais significativas. A biópsia dirigida deve ser realizada nos locais onde se observaram as imagens colposcópicas mais representativas, como as marcadas em epitélio aceto-branco, teste de Collins-Richart e teste de Schiller.

Sabendo-se que o câncer cervical constitui uma das maiores causas de morte em mulheres jovens, considera-se a colposcopia como um dos elementos importantes para avaliar as pacientes com citologias anormais. A citologia cervical e vaginal demonstra as NIC e, através da colposcopia, pode-se localizar as lesões e avaliar suas características delimitando sua extensão (STAFIL & WILBANKS, 1991).

Alguns trabalhos indicam índices de falsos negativos da citologia frente a colposcopia que oscila entre 10% e 13%. A correlação entre a citologia e o diagnóstico colposcópico, mostrou uma sensibilidade de 84.7% (FRANCO & GALLEGU, 1992). Esta sensibilidade baseia-se com os resultados colposcópicos que correlacionam claramente com a citología da paciente. Os protocolos de controle de qualidade para a prática colposcópica mencionam valores de sensibilidade entre 82% e 88% (FEJGIN, 1990; BENEDET, 1991; FRANCO & GALLEGU, 1992; GONZÁLEZ & JIMENÉZ, 1993).

A correlação entre o diagnóstico colposcópico e o estudo histológico das biópsias dirigidas, mostrou uma sensibilidade de 86.2%. Dessa maneira, se qualifica uma correlação positiva quando maior ou igual a 80% com cifras limites satisfatórias na prática da colposcopia, em torno de 86% (DIÁZ & ARAGÓN, 1992; GONZÁLEZ & JIMENÉZ, 1993).

A correlação entre a citologia e o estudo histológico das biopsias é de 80% nos protocolos antes mencionados; com estes percentuais se aceita uma cifra igual ou maior a 75% como limites normais para os laboratórios de citologias.

Analisando-se juntos os três métodos de diagnóstico, a citologia, a colposcopia e a biópsia se podem dizer sem equívocos, que a confiabilidade diagnóstica em conjunto para identificar uma neoplasia cervical se encontra entre 90% a 100%, (FEJGIN, 1990) e assim detectar mais rapidamente as lesões e acompanhar sua progressão e o emprego de uma profilaxia mais adequada para cada caso (HEINZ, 1982). Contudo, todas as NIC não possuem o mesmo comportamento, pois estudos epidemiológicos de neoplasia mostram que a prevalência de NIC é muito maior que a de câncer cervical, sugerindo que muitas lesões de NIC não progridem à invasão (NASIELL *et al.*, 1983).

O comportamento biológico da neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau (NIC II e NIC III) não pode atualmente ser previsto com segurança em uma única paciente. O problema é composto pelo fato de que o risco estimado de progressão da doença em diferentes grupos mostra marcante variação (ANDERSON, 1991). Não é possível separar lesões NIC II em subtipo puramente regressivo, persistente ou progressivo em bases histológicas, citológicas ou em critérios clínicos. O uso de parâmetros objetivos como o conteúdo de DNA nuclear merece maior atenção (FU, 1981; JAKOBSEN *et al.*, 1983; NASIELL, 1984; BIBBO *et al.*, 1985; FU & HALL, 1985; HALL & FU, 1985; MONSONEGO *et al.*, 1997).

2.5 HISTOLOGIA

A histologia é considerada a base para o tratamento e seguimento de alterações identificadas pela citologia, além de representar o teste de certeza nos estudos de patologia cervical (CARNEIRO *et al.*, 2004).

As alterações observadas nos materiais são classificadas de acordo com a classificação de cervicite ou alterações displásicas.

Cervicite é um processo tecidual que ocorre no colo uterino em resposta a fenômenos infecciosos, químicos ou mecânicos, incluindo aspectos da inflamação e da reparação. O material apresenta leucócitos monocleares, especialmente linfócitos, histiócitos e plasmócitos, além dos polimorfonucleares. O epitélio exibe arquitetura preservada, com camada basal, e superfície mostrando maturação. As alterações epiteliais mostram hiperplasia da camada basal, vacúolos citoplasmáticos sem presença de atipias nucleares, podendo apresentar metaplasia (WRIGHT & FERENCY, 1994)

Na NIC I ocorre proliferação de células epiteliais escamosas com discretas alterações de arquitetura do tecido e da morfologia celular, com hiperplasia da camada basal, característico do amadurecimento dos queratócitos em direção à superfície. As atipias nucleares mostram contornos irregulares, distribuição grosseira da cromatina e encontro de algumas mitoses. São incluídas nesta classe as alterações atribuídas ao efeito citopático do HPV, a coilocitose e a disqueratose (SCULLY, *et al.*, 1994).

Na NIC II verificamos proliferação de células epiteliais escamosas, com alterações moderadas da arquitetura do tecido e dos aspectos celulares. Além da intensa hiperplasia da camada basal, perda parcial da maturação dos queratócitos e evidências de células maduras na superfície. As atipias nucleares são mais marcantes, com maior aumento da relação núcleo/citoplasma e das alterações da cromatina, predominando os grânulos grosseiros e presença de mitoses freqüentes. Podem ser vistos efeitos citopáticos do HPV.

Na NIC III ocorre proliferação de células epiteliais escamosas com alterações acentuadas da arquitetura do tecido e dos aspectos celulares correspondendo às lesões correspondentes a displasias acentuadas e carcinomas *in situ*. Não ocorre ruptura da lâmina basal com invasão do estroma conjuntivo subjacente. A organização em extratos é perdida, sendo poucos os sinais de maturação em toda a espessura. As atipias nucleares são acentuadas e as mitoses incluindo as anormais são vistas em todas as camadas do epitélio. Podem ainda ser encontrados os efeitos citopáticos do HPV (WRIGHT & FERENCY, 1994).

2.6 HPV

Hoje se sabe basicamente, que o câncer de colo de útero se desenvolve a partir da transmissão sexual pelo Human Papiloma Vírus (HPV), principal responsável pela indução do câncer. Recentes dados da literatura, epidemiológicos e biomoleculares, mostram que o DNA do HPV é encontrado em 95 a 100% dos tumores epiteliais cervicais, conferindo o maior risco para o seu desenvolvimento. Além disso, em 1996, na OMS, considerou-se o HPV dos tipos 16 e 18 como o agente etiológico do carcinoma escamoso cervical. Ainda no mesmo ano, a Conferência de Consenso realizada pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos enfatizou que o câncer cervical, em todos os casos, é o primeiro tumor sólido essencialmente vírus-induzido. A evolução da infecção pelo HPV para o câncer invasor depende do tipo e da carga viral, da interação do vírus com a célula hospedeira, da resposta imunológica epitelial e da interação do vírus com certas oncoproteínas (CAMARA, 1993; REZENDE FILHO, *et al.*, 1993; COLLACO & PINTO, 1994; DORES, *et al.*, 1999).

Os Papilomavírus são capsídeos icosaédricos não envelopados compostos de 72 capsômeros, com diâmetro variando de 44 a 55 nm (KLUG, 1965; KLUG & FINCH, 1965; MELNICK, 1962 *apud* MEISELS & MORIN, 1997). Seu DNA é uma molécula de dupla fita, circular e fechada. Os tipos de HPV parecem ser estáveis como demonstrado por dados seqüenciais de vírus identificados em diferentes localidades geográficas e após muitos anos de propagação do DNA viral em animais e linhagens celulares (GIRI & DANOS 1986 *apud* MEISELS & MORIN, 1997). A pluralidade do HPV permanece inexplicável.

Mais de 100 tipos de HPVs tem sido identificados. Vários tipos são chamados de alto risco, tais como 16, 18, 31, 33 e 35 tem um papel etiológico na carcinogênese cervical (ZUR HAUSEN, 1994). O tipo HPV 16 tem sido encontrado em 60-70% dos casos de câncer cervical e NIC III, é também encontrado em 15-40% das lesões NIC I (NUOVO & RICHARD, 1990; CUZICK, *et al.*, 1994). É sabido mundialmente que pelo menos 95% dos carcinomas cervicais são HPV DNA positivo (BOSCH, *et al.*, 1995). Juntamente aos HPV 16 e 18, treze

outros tipos de HPV foram encontrados. A infecção pelo HPV oncogênico ocorre mais frequentemente em carcinoma de células escamosas e lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) do que em lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL). A presença de HPV oncogênico em LSIL pode levar a NIC II ou NIC III com 87% de sensibilidade (HERRINGTON, 1995). Em trabalhos de NUOVO (1998), as mulheres com atipia em células escamosas de significado indeterminado (ASCUS) que desenvolveram uma SIL confirmada pela biópsia em 6 meses, 67% tinham infecção pelo HPV oncogênico, onde apenas 10% das mulheres com ASCUS que não desenvolveram SIL eram HPV positivas (NUOVO, 1998).

Com estes resultados verifica-se que, a presença do vírus HPV unicamente, não é determinante para o surgimento de uma lesão de alto grau que necessariamente evolua para um carcinoma escamoso invasivo. São necessários vários fatores para desencadear a doença e, sobretudo novas técnicas diagnósticas que melhor avaliem e acompanhem as lesões iniciais pré-malignas.

O diagnóstico da infecção pelo HPV baseado unicamente em critério citológico é difícil, e pode levar a uma baixa estimativa de mulheres com infecção pelo HPV (HIRSCHOWITZ, *et al.*, 1992; WRIGHT & FERENCY, 2004).

Uma grande descoberta foi à habilidade da partícula HPV E6 e E7 de ligar e interromper, p53 e pRb, respectivamente, que são peças chaves no ciclo celular, sendo estes genes supressores de tumor (MINAMOTO, *et al.*, 2003).

A pRb ativada liga-se a fatores de transcrição para a cascata de ciclinas e ciclinas quinase e atua mantendo a célula nos estágios G0/G1, regulando a sua entrada na fase S do ciclo celular. Uma vez a pRb inativada e liberando os fatores de transcrição o ciclo celular se inicia. Mais adiante no ciclo, a p53 verifica danos do DNA da célula, regula a proliferação e a morte celular, antes de permitir replicação do DNA. Se for detectado dano no DNA, o p53 promove apoptose ou prolonga o ciclo celular. A perda da função da pRb pode resultar em hiperproliferação, e, perda da função da p53 o que denota em mutação gênica e instabilidade cromossômica levando ao descontrole do ritmo de proliferação celular.

2.7 DISPLASIAS

Estimativas, da duração das alterações pré-malignas tem sido feitas, com tempo médio até o desenvolvimento do câncer invasivo do colo uterino com intervalo de 10-15 anos. O tempo médio para diagnóstico dos graus de NIC é consistente com a progressão de NIC I (displasia leve) para NIC II (displasia moderada) até NIC III (displasia severa e carcinoma *in situ*) em mais de 10 anos (SAWAYA *et al.*, 2001).

A similaridade da citomorfologia de NIC III e câncer invasivo são baseados em estudos citogenéticos que mostram constituição cromossomal similar em displasia severa, carcinoma *in situ* e carcinoma escamoso invasivo da cérvix (SPRIGGS *et al.*, 1971). Há evidências que mais de um terço dos casos de NIC III progredirão para carcinoma invasivo se não tratado, e outros casos persistirão como NIC III (KINLEN & SPRIGGS, 1978; MCINDOE, *et al.*, 1984), mas é incerto se o NIC III regride a graus menos severos ou ao epitélio normal sem intervenção terapêutica. Tem sido estabelecido que o carcinoma invasivo pode se desenvolver a partir de NIC I ou NIC II sem um estágio de NIC III, quando a lesão inicia em áreas metaplásicas imaturas infectas pelo vírus HPV (BURGHARDT, 1976; GROSS & BARRASSO, 1999).

Entretanto, semelhanças epidemiológicas entre as displasias e os carcinomas cervicais reforçam o conceito de que se trata de estágios de um mesmo processo patológico.

NASIELL e colaboradores (1983) encontraram progressão na displasia moderada para displasia severa ou carcinoma *in situ*, persistência de displasia moderada e regressão ao normal em 30%, 16% e 54% respectivamente. No acompanhamento de pacientes com citologia indicando displasia leve houve progressão para displasia severa, carcinoma *in situ* e câncer invasivo em 16%, persistência da displasia leve em 22% e regressão ao normal em 62% em um período de 39 meses (NASIELL, *et al.*, 1986). A relação de NIC III e câncer invasivo deve ser na ordem de 4:1, que se correlaciona adequadamente com o

risco conhecido de progressão de NIC III ao carcinoma invasivo (KINLEN & SPRIGGS, 1978; MCINDOE, *et al.*, 1984).

Nos casos de NIC III, a mucosa escamosa cervical é substituída por células neoplásicas imaturas que se estendem no terço superior do epitélio e freqüentemente substitui completamente toda espessura da mucosa. A categoria NIC III inclui a displasia severa e o carcinoma *in situ*. Existem muito mais anormalidades celulares e nucleares no NIC III do que em graus menores de NIC, com maior perda de polaridade e amontoamento de células e uma tendência à orientação vertical do núcleo. As células e seus núcleos aumentados podem apresentar uma aparência monótona ou pode exibir um pleomorfismo marcante com ampla maturação citoplasmática, subtipando o NIC III na categoria de células pequenas e de células grandes não queratinizadas, respectivamente.

Alterações nucleares incluem aumento de relação núcleo/citoplasma, hipercromasia, granulação densa de padrão cromatínico, espessamento de membrana nuclear, irregularidade do contorno nuclear e mitose, incluindo formas anormais e espaços vazios no núcleo (FILIPPIN, *et al.*, 2000). O nucléolo encontra-se usualmente discreto. Ocasionalmente, a mucosa é substituída por células escamosas grandes pleomórficas com formas bizarras e queratinização celular individual.

Por definição, a membrana basal está intacta no NIC III. O epitélio anormal estende progressivamente pela ectocérvix ou ao longo do canal endocervical. Há um pronunciado infiltrado celular inflamatório no estroma cervical logo abaixo da membrana basal. Há evidência que lesões NIC III muito extensas estão associadas com uma maior probabilidade de invasão (TIDBURY, *et al.*, 1992). Graus menores de NIC e alterações do HPV estão usualmente, mas não invariavelmente, presentes em áreas adjacentes ao NIC III.

Na cérvix uterina a presença de aneuploidia, que é a alteração do número de cromossomos, quando presentes em NIC está bem correlacionada ao seu grau, estando presente em 75% a 100% das pacientes com lesões de alto grau (WALSH, *et al.*, 1995). A maioria dos tumores malignos e seus precursores

mostram cromossomos aneuplóides (BOLLMANN, *et al.*, 2001). Se a aneuploidia do epitélio escamoso ectocervical pode prever o desenvolvimento de uma anormalidade histomorfológica em lesões de alto grau, esta característica pode ser útil em identificar indivíduos que requerem maior atenção ou tratamento adicional. Além disso, se a aneuploidia fosse identificada adjacente a lesões de alto grau, este estado aneuplóide pode ser potencialmente importante na avaliação global de esfregaços cervicais de pacientes com difícil diagnóstico citológico (MCDERMOTT, 1997).

A aneuploidia é um marcador de malignidade (BÖHM & SANDRITTER, 1975). Nas neoplasias intraepiteliais cervicais, as lesões aneuplóides provavelmente persistem ou progridem até a malignidade, enquanto lesões diplóides ou poliplóides regridem (HANSELAAR *et al.*, 1988; HANSELAAR, *et al.*, 1998; FU, *et al.*, 1981; BIBBO, *et al.*, 1989).

Outro indicador importante no comportamento biológico em vários tumores malignos é a proliferação celular e é considerada como um direcionador para a terapia do câncer (BROWN & GATTER, 1990). É definida como o aumento do número de células resultantes da complementação do ciclo celular (RABENHORST, *et al.*, 1993). Na vida de uma célula existem três caminhos a serem seguidos: as células proliferam; permanecem vivas, sem divisão; ou morrem por apoptose. A fração de crescimento de um tumor é determinada pelo número de células que estão proliferando, sendo a capacidade proliferativa aumentada uma das principais características das células tumorais (RABENHORST, *et al.*, 1993; HOFSTÄDTER, *et al.*, 1995).

Para avaliar com mais profundidade a atividade proliferativa das neoplasias, marcadores biológicos tem sido propostos para quantificar a proliferação celular. Nos estudos de carcinomas epidermóides cervicais pode-se utilizar métodos histoquímicos na identificação das células no ciclo celular.

2.8 REGIÃO ORGANIZADORA DE NUCLÉOLO

Um dos marcadores biológicos de proliferação celular é o método histoquímico pela técnica de AgNOR, o qual traz novas perspectivas para a compreensão do crescimento tumoral, com conseqüentes repercussões para o prognóstico e a terapêutica dessas lesões (NEVILLE *et al.*, 1998).

Regiões organizadoras de nucléolo (NORs) foram descritas primeiramente por Heintz (1931) e por McClintock (1934) (DERENZINI, 2000), como sendo as regiões marcadas de cromatina em torno da qual, no fim da telofase, o nucléolo é reformado após seu desaparecimento durante a fase mitótica da célula. Estas regiões correspondem aos constituintes secundários de cromossomas da metafase (HOWELL, 1982).

NORs são regiões que contêm DNA ribossomal (DNA-r) que codifica para RNA ribossomal (RNA-r) 18S e 28S e estão envolvidas na formação do nucléolo durante a intérfase (SCHIMUIADY, *et al.*; 1979; MURTY, *et al.*, 1985; DOBIGNY, *et al.*, 2002). As NORs podem ser facilmente identificadas em microscópio convencional mediante a impregnação por prata coloidal. Um grupo peculiar das proteínas ácidas que são altamente argirofílicas é localizado também nos mesmos locais que os NORs, assim permitindo que NORs seja muito claramente visualizado rapidamente por procedimentos marcados pelo nitrato de prata (GOODPASTURE & BLOOM, 1975, OHNN, *et al.*, 1991). Essas proteínas ribonucleicas ácidas são as não histonas (B₂₃ e C₂₃) altamente fosforiladas (CROKER & SKILBECK, 1987; NEWBOLD, *et al.*, 1989; GUTIÉRREZ, 2000).

A fosforilação da proteína C23 ocorre no nucléolo por que esta é ativada, e a transcrição do DNA-r torna-se possível (PLATE *et al.*, 1992).

NORs reside nos braços curtos dos cromossomas humanos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22, estas áreas são os locais de hibridação de RNA-r e são de importância com respeito à síntese final da proteína (MURTY, *et al.*, 1985; ROWLANDS, 1988; YOKOYAMA, *et al.*, 1990; WATANABE, 1998).

Uma série de investigações ultraestruturais demonstrou que durante a fase de interfase as NORs ficam situadas nos componentes fibrilares dos nucléolos e representam conseqüentemente as fases interfase e metáfase (HERNANDEZ-VERDUN, 1983, FAKAN & HERNANDEZ-VERDUZ, 1986). Certamente, há uma evidência que os centros fibrilares mais o componente fibrilar denso em torno delas são os únicos componentes nucleolares que são marcados pelos métodos de prata que visualizam NORs em cromossomos da metáfase e contêm genes ribossomais. A identificação precisa das proteínas de AgNOR ao menos daquelas que são expressas mais quantitativamente durante o interfase tem sido obtida recentemente (ROUSSEL & HERNANDEZ-VERDUN, 1995; SIRRI, *et al.*, 2000).

Portanto estas regiões organizadoras de nucléolo (NOR) são fitas de DNA presentes no núcleo da célula e que possuem genes de RNA ribossômico, organizando assim como os nucléolos. Os NORs são produzidos por proteínas nucleolares facilmente identificáveis pela impregnação por prata e visualizados em regiões secundárias dos cromossomos (EGAN, 1988; CROKER & EGAN, 1988; SOOMRO, *et al.*, 1991).

Estas proteínas estão localizadas adjacentes as NORs desempenhando um papel de desconcentração e/ou na transcrição do RNA-r e na maturação do RNA-r. A proteína mais estudada é a AgNOR, por se tratar de uma proteína não histônica e argirofílica (LI, *et al.*, 1995). Pela sua argirofilia, essa proteína é considerada como marcadora da atividade celular e do potencial de transcrição do RNA-ribossômico (WALKER, 1988; MATOLCSY, *et al.*, 1992).

As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) são parcelas específicas do DNA, que, usa a enzima RNA-polymerase-1, para a transcrição do RNA-r. Este RNA-r dentro dos ribossoma é responsável pela síntese da proteína na célula (DERVAN *et al.*, 1989; KOBAYASHI, 1994).

Nenhuma síntese do RNA-r ocorre na ausência de proteínas de AgNOR. O número e o tamanho de NORs interfase são altamente variáveis dentro do nucléolos, de acordo com a atividade de transcrição do RNA-r. A área ocupada

pelo NORs na interfase prata-marcado dentro do nucléolos é relacionada à área nucleolar total e ao nível da biogênese do ribossomo (HOWELL, 1982). Conseqüentemente, a avaliação pela análise de imagem da área ocupada pelo NORs interfase prata-marcado dentro do nucléolo permite obter a informação precisa no tamanho e na função nucleolar em amostras citológicas e histológicas rotineiras (DERENZINI, *et al.*, 1998).

Em 1986, PLOTON e colaboradores, descreveram uma técnica modificada para a demonstração das NORs (Regiões organizadoras nucleolares) que foi aplicada em seções histológicas. Esta técnica ficou conhecida como AgNOR, onde é possível visualizar NORs, na microscopia de luz como estruturas redondas intranucleares de cor marrom-café .

A técnica de AgNOR consiste em coloração pela prata das proteínas associadas às regiões organizadoras nucleolares (NORs), que permitem identificar, através de análise quantitativa e morfométrica dessas regiões a atividade proliferativa celular. A prata utilizada é reduzida em micronúcleos de prata e depositada dentro dos núcleos celulares, onde se revela à posição ativa da transcrição da NOR dentro dos núcleos celulares, podendo ser utilizada para obter informações sobre a estrutura dos nucléolos e atividade nucleolar em condições hiperplásicas e neoplásicas (FAKAN & HERNANDEZ-VERDUN, 1986; WALKER, 1988; EGAN, *et al.*, 1988 a; HANSEN & OSTERGAARD, 1990; MATOLCSY, *et al.* 1992).

Alguns trabalhos correlacionam a análise quantitativa das NORs com a atividade celular, considerando-a como um bom marcador da proliferação celular, sendo utilizada como auxílio de diagnóstico, fornecendo a distinção entre células benignas e malignas, e até mesmo para a avaliação do prognóstico de várias entidades patológicas (SURESH, 1989; DERENZINI, *et al.*, 1990; SHIRO, *et al.*, 1993; THIELE & FISCHER, 1993; KASHYAP, *et al.*, 1998; KRUGER, *et al.*, 2000).

Portanto, com o uso da técnica de impregnação por prata, descrito por GOODPASTURE & BLOOM, (1975) e modificado por PLOTON e colaboradores (1986), NOR podem ser muito mais facilmente identificados. Com a técnica de

AgNOR o número, o tamanho e a forma de NORs podem ser estudados em uma maneira rápida e simples, não somente em preparações histológicas como em material celular a fresco (DERENZINI & TRERE, 2001). A quantidade do depósito de prata em uma célula reflete a quantidade de NORs que é envolvido na síntese de proteína, e relacionada à capacidade proliferativa dessa célula. O relacionamento exato entre a proliferação, a síntese de proteína e a expressão de AgNORs, é, entretanto, pouco compreendida. Conseqüentemente, nos últimos anos o método de impregnação por prata (AgNOR) transformou-se em uma ferramenta nova entre as possibilidades diagnósticas para histologia (DERVAN *et al.*, 1989; KOBAYASHI *et al.*, 1994).

Tal técnica é utilizada para avaliar proliferação celular, embora na realidade esteja medindo a síntese protéica. Quando as células estão sintetizando proteínas, a expressão de AgNOR no seu núcleo aumenta (VIDAL & MELLO, 1995).

O aumento da síntese de proteínas constitui uma das alterações que ocorre no processo de transformação neoplásica. No núcleo são observadas alterações morfológicas do nucléolo acompanhado por aumento do tamanho e número dos mesmos (ROBBINS & ANGEL, 1976; CROKER & MCGOVERN, 1988a).

Para quantificar os depósitos de prata após marcar uma célula, vários métodos diferentes estão sendo usados. Em estudos mais antigos utilizou-se a contagem dos números de pontos de prata intranuclear, empregando-se um microscópio ótico. Após a contagem de 100 células um número médio de AgNOR por célula poderia ser calculado. Na maioria dos estudos este método é ainda usado, e AgNOR é expresso como número médio dos pontos de AgNORs por célula ou por núcleo. As contagens da média de AgNOR nas células com proliferação lenta podem estar na escala entre 0.5 e 1.5, porém há somente muito poucos relatos que relacionam valores normais da média de AgNOR para tipos diferentes de tecidos humanos. As contagens da média de AgNOR são mais elevadas em tecidos de rápida proliferação (CROKER, 1990; CROKER, 1990 a).

Na análise, um problema principal é causado pela aglomeração de depósitos pequenos a um ponto maior, que é difícil e às vezes impossível de estabelecer o número total de pontos pequenos. Para superar este problema a área de superfície total dos pontos de prata pode ser medida, e que tem a vantagem de ser um método automatizado computadorizado, e a análise pode ser executada com maior confiabilidade (WIERZCHNIEWSKA, *et al.*, 1998).

Contar o número de AgNORs é sujeita a variação intra e interobservador, que é considerado freqüentemente como uma limitação à confiabilidade dos resultados. Entretanto, quando a variação do interobservador foi testada, pareceu que havia uma correlação positiva entre os resultados encontrados por dois observadores (AGARWAL, *et al.*, 1995; JOHNSON, *et al.*, 1995), mas o coeficiente de correlação era mais elevado em medir AgNOR áreas/núcleo do que nos números de AgNOR (TRERE, *et al.*, 1995; LOSI, *et al.*, 1995).

A maioria dos estudos de AgNOR fixa o foco na diferença em contagens de AgNOR entre classes de tumores e de tecidos diferentes e em estágios diferentes de neoplasia, isto é na displasia, no carcinoma *in situ* ou no carcinoma invasivo (CARDILLO, 1992). O estudo de AgNOR verifica a porcentagem das células do tumor ou do tecido que abrigue mais do que um determinado número de AgNORs por célula (na maior parte mais de 4), (SCHMIADY, *et al.*, 1979; WATANABE, *et al.*, 1998) este são chamados também à contagem da distribuição de AgNOR e às vezes o índice de proliferação de AgNOR. Alguns estudos, correlacionando os resultados da média de AgNOR com a atividade proliferativa, visto que a média de AgNOR correlaciona com a ploidia (MOURAD, *et al.*, 1992; MOURAD, *et al.*, 1993; CARBAJO, *et al.*, 1993).

Outro problema que pode ser levantado é quanto ao procedimento técnico, pelo qual pareceram ser importantes os fatores ao nível da oxi-redução e o tipo de gelatina usado (LINDNER, 1993). Em um outro estudo, muitos tipos de fixadores foram testados; acetona, etanol, metanol, glutaraldeído de 4%, formalina de 10% e formol-salina de 10% (SMITH, *et al.*, 1988 a). Nenhuma destes fixadores era uma limitação em adquirir uma perfeita contagem do AgNOR (ROWLANDS, *et al.*, 1993). Há estudos que relacionam como determinantes para a técnica os fatores

de temperatura, tempo de reação da coloração, fixação e visualização dos NORs (TRERÈ, 1994).

Muitos investigadores consideraram o tamanho e alguns deles também a forma e a localização dos pontos de AgNOR. (PAPADIMITRIOU, 1991; TOSI, *et al.*, 1992; CORTES-GUTIERREZ, *et al.*, 2001). Um relacionamento inverso entre o número e tamanho de AgNORs é relatado freqüentemente (RUSCHOFF, *et al.*, 1992; RUSCHOFF, *et al.*, 1993; CHATTOPADHYAY, 1993). Entretanto, em contradição a isto um aumento no tamanho de AgNOR junto com a displasia ou pré-malignidade crescente é também relatado (CHIDA, *et al.*, 1992; PEDAL, *et al.*, 1995; IWATA, *et al.*, 1995). No geral supõe-se que as células malignas mostram mais AgNORs por núcleo, têm pontos menores de AgNOR do que células benignas, mostrando um número menor de AgNORs grandes (CROCKER, 1989). Os pontos individuais de AgNOR se tornam menores enquanto seu número aumenta com a malignidade, a área total de AgNOR por célula aumenta junto com a malignidade (MARTIN, *et al.*, 1992; HABERLAND, *et al.*, 1996).

Portanto desde fins da década 80, pesquisadores demonstram que a técnica de AgNOR pode ser utilizada na tentativa de diferenciar maligno de benigno pela alteração dos pontos NORs afetado pela proliferação celular, atividade de transcrição aumentada, ploidia, pelos defeitos na associação nucleolar e amplificação do gene (YANG, *et al.*, 1992; LAHSHMI, *et al.*, 1993; PELUSI, *et al.*, 1997; TRERÈ, 1998; TERLIKOWSKI, *et al.*, 1998; TRERÈ, 2000; WRIGHT, *et al.*, 2004).

Também a localização do AgNOR dentro do núcleo pode ser relacionada ao comportamento da célula; com a malignidade crescente os pontos de AgNORs movem-se de central para a periferia dentro do núcleo (PEDAL, *et al.*, 1995; HABERLAND, *et al.*, 1996). Com a melhoria da técnica AgNOR e o uso das medidas computadorizadas da superfície/área dos precipitados dentro do núcleo, a técnica de AgNOR tornou-se muito mais reprodutível e de confiança (MARBAIX, *et al.*, 1989).

Segundo CROCKER (1987) existem três tipos de configurações para o AgNOR em células normais e neoplásicas: o primeiro é comum em linfócitos e em células que não estão proliferando, cujos NORs são totalmente agregados de forma arredondada correspondente ao nucléolo; o segundo é muito freqüente em células que estão proliferando, cujos NORs são vistos no interior do nucléolo. O terceiro tipo é muito freqüente em células malignas, onde se observam pequenas e numerosas NORs dispersas por todo núcleo.

Em 1990, DERENZINI e colaboradores, encontraram correlação positiva entre a atividade de duplicação do DNA e a quantidade de NORs das células. Quanto mais rápido o crescimento celular, maior a quantidade de NORs.

Existem algumas explicações para esse maior número das NORs/núcleo nos tumores malignos, incluindo: a) a proliferação celular é tanto ativa que a dissociação nuclear está presente em muitas células e as NORs, estariam conseqüentemente, dispersas em toda a parte do núcleo; b) existe um defeito na associação nucleolar, resultando na dispersão das NORs e; c) em células aneuplóides pode haver um maior número de cromossomos, incluindo os que representam os locais das NORs (ROSA *et al.*, 1990).

Alem disso, o AgNOR é um método útil e de fácil execução em laboratório, que pode ser usado para detectar alterações celulares incipientes, sendo uma contribuição para um diagnóstico fácil e um conhecimento do crescimento tumoral (PLATE, *et al.*, 1990; GENOVA, *et al.*, 1991; RAY, *et al.*, 2003).

Atualmente a contagem do número das AgNORs tem mostrado correlação com marcadores proliferativos celulares, como: a contagem mitótica, a avaliação da síntese de DNA, a detecção de antígenos proliferativos celulares: Ki-67, antígeno nuclear proliferativo (PCNA) e ainda tem sido usada como método na análise da proliferação celular (TRERÈ, 1993; JELEN, *et al.*, 2002).

Para a determinação do câncer de colo de útero, o uso das técnicas atuais, como o teste de Papanicolaou, apesar de serem subjetivos e confiáveis, apresentam baixos índices de reprodutibilidade. Os testes moleculares, quando

apresentam resultados positivos para tipos virais altamente oncogênicos, não determinam necessariamente o desenvolvimento de uma displasia, sendo necessários vários outros fatores concomitantes. Portanto, novas técnicas de análises preditivas, confiáveis e reprodutíveis devem ser admitidas.

Uma dessas técnicas é a de AgNOR, que além de ser de fácil execução e baixo custo, e representativa da atividade celular, obtém-se parâmetros objetivos que quantificam o mensurando, ou seja, a atividade celular, permitindo definições lógicas.

Portanto, considerando a importância de um diagnóstico mais objetivo para agilizar os procedimentos terapêuticos, a proposta desse trabalho foi avaliar as técnicas tradicionais de coloração e analisar a técnica de AgNOR, evitando assim a utilização de técnicas mais invasivas e tratamentos inadequados.

3 - OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a Técnica de AgNOR aplicada em esfregaços citológicos como parâmetro complementar no diagnóstico de lesões do epitélio cervical uterino.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a associação entre a Técnica de AgNOR e Diagnóstico Citológico de lesões do epitélio cervical uterino conforme as Classificações de Richart, 1967 e Bethesda, 2001; com o Diagnóstico Colposcópico do colo uterino conforme Classificação proposta pela Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia; e, com o Diagnóstico Histológico do epitélio cervical uterino conforme a Classificação de Richart, 1967;
- Verificar a variação do número e área de AgNOR entre os diferentes graus de lesão de acordo com diagnóstico citológico, colposcópico e histológico;
- Avaliar o desempenho das Técnicas de Coloração de Papanicolaou e Shorr utilizadas no Diagnóstico Citológico das lesões do epitélio cervical uterino.

4 - METODOLOGIA

4.1 APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA

Esta dissertação é resultado do projeto “Estudos citomorfológicos de lesões do colo uterino – análise comparativa de diversas metodologias”, que foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Maternidade Carmela Dutra, tendo sido aprovado em 06 de junho de 2003; e ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, aprovado em 29 de setembro de 2003.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo foi prospectivo em humanos com procedimentos experimentais *in vitro* com amostras de raspado celular de colo uterino.

Neste estudo, foram realizadas coletas de material cervical uterino de pacientes atendidas no Serviço de Residência Médica de Patologia Cervical da Maternidade Carmela Dutra. Optou-se por realizar o estudo neste serviço por ser um Centro de Referência do Estado de Santa Catarina em assistência de Patologia Cervical. A rotina assistencial deste Serviço mantém atendimento em ginecologia e recebe pacientes que foram encaminhadas de outros serviços públicos e particulares.

As pacientes foram primeiramente esclarecidas quanto ao objetivo da pesquisa, forma de condução (sigilo e privacidade), os métodos aplicados e os benefícios que o projeto poderia trazer. Após os esclarecimentos, as pacientes foram convidadas a participar da pesquisa, e, havendo interesse, foi obtido seu consentimento por escrito.

Durante o atendimento médico, foram catalogados o resultado da colposcopia e coletada amostra de material cervical com auxílio da espátula de Ayre. Foi confeccionado esfregaço em três lâminas que foram imersas imediatamente em álcool 96°GL e encaminhadas ao laboratório onde foram submetidas à rotina de coloração por AgNOR, Papanicolaou e Shorr,

unitariamente. Quando considerado necessário foi coletado material para biópsia e encaminhado ao laboratório conveniado.

4.2.1 GRUPO CONTROLE

Foram considerados grupos controle neste estudo: Pacientes submetidas a exames de rotina, com resultado clínico, colposcópico e histológico normal. Pacientes com resultado citológico normal ou inflamatório discreto com alterações reativas discretas, presença de agentes da flora vaginal normal e discreto infiltrado inflamatório; portanto, pacientes classificadas como NILM - Negativa para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna.

4.2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Na seleção foram incluídas pacientes que apresentavam histórico de exame anterior alterado, entre estes foram considerados: exame especular, colposcópico, história de infecção pelo Papiloma Vírus Humano, exame citológico prévio e histológico.

Um segundo critério de seleção foi a adequação da qualidade dos esfregaços, cujas lâminas deveriam conter no mínimo 100 células viáveis, com características citológicas suficientes para que pudessem ser classificadas.

Outro critério de seleção foi em relação ao exame colposcópico que deveria ser satisfatório.

4.2.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas desta pesquisa as pacientes menores de 18 anos, gestantes, e em tratamento ginecológico (quimioterapia, radioterapia,

cauterização, cirurgia e tratamento local com ácido tricloroacético (TCA), e outros medicamentos).

Um segundo critério de exclusão foram as pacientes que tiveram colposcopia insatisfatória e esfregaços que apresentavam número escasso de células viáveis. Os esfregaços contendo células metaplásicas foram agrupados separadamente, para análise estatística, por considerar que uma célula em transformação pode apresentar uma atividade celular alterada.

4.3 AVALIAÇÃO COLPOSCÓPICA

A avaliação colposcópica foi realizada durante a consulta por um profissional médico treinado capaz de reconhecer as lesões do epitélio e os vasos sangüíneos.

O colo uterino e a vulva foram observados com aumento, iluminação e filtros que permitissem determinar as características do epitélio e dos vasos subjacentes. Primeiramente o colo e o canal cervical foram limpos com gaze umedecida com solução salina, para eliminar o excesso de muco existente, após este procedimento o colo e a vulva foram observados. Em seguida foi aplicada sobre o colo com auxílio de uma gaze solução de ácido-acético a 2%, e observada toda região buscando-se áreas reagentes. Posteriormente foi aplicado azul-de-toluidina com gaze procurando visualizar os vasos sangüíneos, observando-se as regiões com auxílio de filtros. Ao final da colposcopia foi aplicada no colo e vagina solução de iodo a 2% com gaze embebida nesta solução, onde foram verificadas as áreas claras não coradas pelo iodo (SINGER & MONAGHAN, 2002). O resultado do exame foi anexado ao prontuário da paciente.

4.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

4.4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras destinadas às análises histológicas foram processadas em laboratório conveniado com a Maternidade Carmela Dutra. Os resultados foram coletados através da verificação do prontuário médico das pacientes selecionadas para o trabalho.

4.4.1.1 COLORAÇÃO DE HE

As amostras histológicas foram emblocadas, realizados cortes de 5 µm nos blocos celulares e posteriormente coradas pelo método HE (hematoxilina-eosina).

Para a coloração de HE são usados os corantes de Hematoxina de Harris e Eosina Y amarela.

4.4.2 ANÁLISE CITOLÓGICA

4.4.2.1 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Neste protocolo, foram utilizadas lâminas de microscopia com extremidade fosca previamente lavadas em água e sabão neutro e imersas por 1 hora em solução alcoólica de ácido clorídrico a 38%, em proporção de 4:1 e lavadas novamente em água destilada e secas ao ar. As lâminas foram utilizadas na coleta de material cervical.

O material foi coletado com o auxílio de espátula própria para este procedimento, espátula de Ayre, realizado esfregão na superfície da lâmina que foi imersa imediatamente em álcool 96° GL e colocado em frasco com tampa de rosca.

4.4.3 PREPARAÇÃO DOS REAGENTES PARA COLORAÇÃO

Os reagentes para as três técnicas empregadas, Papanicolaou, Shorr e AgNOR foram preparados no laboratório de Citologia Clínica da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.4.3.1 REAGENTES UTILIZADOS NA COLORAÇÃO DE AgNOR

Utilizou-se solução aquosa de gelatina (solução coloidal) preparada com dissolução de 0,5g de gelatina e 25ml de água deionizada, em meio aquecido e depois de resfriada acrescentou-se 0,25ml de ácido fórmico (SIGMA) a 1% em água deionizada (solução reveladora).

Solução de nitrato de prata foi preparada pela dissolução de 1g de cristais de nitrato de prata (MERCK) em 2ml água ultra pura, filtrada e acondicionada em frasco escuro, para evitar a oxidação do nitrato de prata. A preparação deve ocorrer no momento da coloração.

As duas soluções foram utilizadas na proporção de 1:2 respectivamente no momento da coloração.

4.4.3.2 REAGENTES UTILIZADOS NA COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU

Para a coloração de Papanicolaou utilizaram-se três corantes: Hematoxilina de Harris , Orange G e Eosina 50.

Hematoxilina de Harris:

- 5g de hematoxilina (SIGMA);
- 20g de sulfato de alumínio e potássio (SIGMA);

- 2,5g de óxido vermelho escuro (SIGMA).

Preparou-se solução alcoólica com 5g de hematoxilina em 50ml de álcool a 95%, (solução mãe).

Em seguida dissolveu-se 20g de sulfato de alumínio e potássio em 200 ml de água deionizada aquecida, e adicionar à solução mãe e novamente aquecer a $\pm 90^{\circ}$ C em placa de aquecimento.

Adicionou-se lentamente 2,5g de óxido de mercúrio vermelho e em seguida 200 ml de água deionizada. Ferver novamente e resfriar imediatamente em recipiente com gelo.

Acrescentou-se o restante da água deionizada q.s.p. 1 litro. Filtrou-se todo o volume em gaze. Colocou-se em frasco âmbar e deixamos a solução maturar.

Orange G:

- 5g de orange G (SIGMA);

- 0,15g de ácido fosfotungstico (SIGMA);

Preparou-se uma solução alcoólica dissolvendo 5g de orange G em 950ml de álcool 95%. Dissolveram-se separadamente 0,15g de ácido fosfotungstico em 50ml de água deionizada. Misturaram-se as duas soluções, agitou-se e aqueceu-se lentamente em placa aquecida. Filtrou-se em papel de filtro e acondicionar em frasco âmbar.

Eosina 50

- 2,5g de eosina (SIGMA);

- 0,5g de bismarck brown (SIGMA);

- 2g de light green (SIGMA).

Dissolveram-se 2,5g de eosina em 25ml de água deionizada formando uma solução a 10% e adicionar 500ml de álcool absoluto pró-análise (PA). Reservar.

Preparou-se solução aquosa a 10%, dissolvendo 0,5g de bismarck brown em 5ml de água deionizada. Acrescentou-se 100ml de álcool absoluto PA. Reservar.

Preparou-se solução aquosa de light green dissolvendo 2g do sal em 20ml de água deionizada, aquecer levemente. Acrescentou-se 500ml de álcool absoluto PA. Reservar.

Misturou-se 450ml da solução de eosina, 100ml da solução de bismarck brown e 20ml da solução de light green, homogeneizar e filtrar em gaze. Acondicionou-se em frasco âmbar bem vedado.

4.4.3.3 REAGENTES UTILIZADOS NA COLORAÇÃO DE SHORR

Para a preparação da coloração de Shorr utilizou-se o corante Hematoxilina de Harris anteriormente descrito e o corante de Shorr propriamente dito:

- 0,5g de escarlata de biebrich (SIGMA);
- 0,25g de orange G (SIGMA);
- 0,075 de verde rápido FCF (SIGMA);
- 0,5g de ácido fosfotungstico (SIGMA);
- 0,5g de ácido fosfomolibdico (SIGMA);
- 1ml de ácido acético glacial (SIGMA).

Todos os sais foram misturados em 100ml de álcool a 50° GL, acrescido do ácido acético glacial, homogeneizou-se e aqueceu-se levemente até dissolução em placa aquecida. Deixou-se esfriar e filtrou-se em gaze. Armazenar em frasco âmbar bem vedado.

4.4.4 TÉCNICAS DE COLORAÇÃO EMPREGADAS

4.4.4.1 COLORAÇÃO DE AGNOR

Retiraram-se as lâminas com material cervical do frasco, e deixou-se secar ao ar.

Preparo dos reagentes:

Neste protocolo utilizou-se solução aquosa de gelatina a 2% com ácido fórmico 1% e, solução aquosa de nitrato de prata a 50%, a ser preparada no momento da coloração e acondicionada ao abrigo da luz. A seguir, foram adicionadas ao esfregaço gotas das soluções na proporção de 1:2 respectivamente, até cobrir o esfregaço. Em seguida, as lâminas foram colocadas em banho-maria a 62°C por 7 minutos, sobre suporte de maneira que não tocassem a água; até obtenção de coloração marrom-dourado na superfície do esfregaço. As lâminas foram enxaguadas em água destilada e seca ao ar. Depois de coradas as lâminas permaneceram ao abrigo da luz até o momento da microscopia (HOWELL & BLACK, 1980).

4.4.4.2 COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU

As lâminas com material cervical foram retiradas do frasco e colocadas em berço próprio para coloração em cubas de vidro. As lâminas com material fixado em álcool passaram por um processo de hidratação em concentrações alcoólicas decrescentes, 96%, 80%, 70% e 50%. As lâminas foram mergulhadas 10 vezes em cada solução alcoólica. Em seguida foram colocadas em cubas com corante de hematoxilina de Harris, por 2 minutos e 30 segundos, coloração dos núcleos, lavadas em álcool 96% por 2 vezes durante 2 e 3 minutos respectivamente. Em seguidas, foram colocadas em cubas com corante orange G por 12 segundos, coloração dos nucléolos, queratina e glicogênio. Foram lavadas novamente em álcool 96% por 2 vezes durante 2 e 3 minutos respectivamente. Em seguida, foram colocadas em cubas com corante EA 50 por 1 minuto, coloração do citoplasma, novamente repetiu-se o processo de lavagem em álcool em 2 etapas

durante 2 e 3 minutos respectivamente. Posteriormente foram desidratadas em álcool absoluto por 3 minutos, clarificadas em xilol por 2 minutos e, fixadas e montadas com Entelan (GOMPEL & KOSS, 1997).

4.4.4.3 COLORAÇÃO DE SHORR

As lâminas com material cervical foram retiradas do frasco e colocadas em berço próprio para coloração em cubas de vidro. As lâminas foram coradas por hematoxilina de Harris por 30 segundos, lavadas em água corrente por 5 minutos e coradas em solução corante de Shorr por 1 minuto, colocando o berço em cubas com o corante. As lâminas foram lavadas novamente em água corrente até clarear sua superfície. Desidratadas em álcool em concentrações crescentes de 70% e 95 % por 30 segundo cada etapa. O berço foi colocado em cubas com álcool absoluto para completa desidratação por 30 segundo. Clarificou-se em xilol por 1 minuto, fixou-se e montou-se com Entelan (GOMPEL & KOSS, 1997).

Todos os esfregaços corados pela técnica de Papanicolaou e Shorr foram avaliados minuciosamente por microscopia ótica comum em aumentos de 100 X e 400 X. Nos esfregaços corados pela técnica de AgNOR foram contadas 100 células em objetiva de imersão, e analisados seus núcleos. Foi realizada análise computadorizada dos esfregaços corados pela técnica de AgNOR.

4.4.5 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS

A aquisição das imagens foi executada utilizando-se Software Image Pro Plus 4.0.

As células selecionadas foram digitalizadas através de um sistema composto por fotomicroscópio óptico Olympus BX41 com iluminação halógena, que inclui: uma objetiva de imersão Plan 100X com 1,25 de abertura numérica; um adaptador para câmera de vídeo Olympus U-PMTVC com uma fotocular PE

3,3 x 125 Olympus (determinando um aumento visual de 330 vezes em combinação com a objetiva), conectado a uma câmera de vídeo digital color CCD Sony Exwave HAD, modelo SCC-DC54A. Esta câmera apresenta alta sensibilidade (mínimo de 0.8 Lux de iluminação), resolução de até 752 (horizontal) X 582 (vertical) linhas, e relação sinal/ruído do vídeo de 50dB ou mais. A imagem foi transmitida a um computador Pentium III 750MHz com 128MB de memória RAM, através de uma placa de vídeo PROLINK, para slot PCI, modelo PV-BT878P. O sistema de saída possui um monitor de vídeo 15", de tecnologia CRT (Cathode Ray Tubes), capaz de exibir as imagens com resolução de até 1.024 x 768 pixels e 32 bits de cores distintas. Para o armazenamento das imagens foram disponibilizados 20 GB de memória de massa. As lâminas coradas pelo método de AgNOR foram analisadas utilizando-se a objetiva de 100X. O processamento da imagem foi iniciado com seu congelamento no monitor, e em seguida capturada e gravada para posterior análise no programa Sacci, Scion Image.

Imagens de boa qualidade refletem um instrumento importante em morfologia, com potencial a ser usado para definir casos de difícil discernimento pela citologia, histologia e colposcopia.

4.4.5.1 SELEÇÃO DAS CÉLULAS

Para cada lâmina corada pela técnica de AgNOR foram analisadas 25 células escamosas representativas da área de lesão, células com alterações citológicas e selecionados seus núcleos.

4.4.5.2 ANÁLISE DAS IMAGENS

Em parceria com a empresa Harbor de software de informática foi desenvolvido um programa de análise de imagens de acordo com as necessidades de nosso estudo.

Para as análises, os núcleos extraídos das imagens digitalizadas foram marcados, onde o sistema operacional Scion Image e o programa Sacci forneceram os seguintes dados: morfométricos – descrevendo o tamanho e forma dos núcleos; contagem dos pontos de AgNOR por núcleo; e a percentagem da relação área de AgNOR/tamanho do núcleo.

4.5 CRITÉRIOS DE ANÁLISE MORFOLÓGICA E CLASSIFICAÇÕES ADOTADAS

CrITÉrios morfológicos pré-estabelecidos foram determinados para análise citológica pela coloração de Papanicolaou e Shorr, e analisados unitariamente. Os critérios foram aqueles descritos por Gompel e Koss (1997) e adaptados por FILIPPIN, *et al.*, 2000 com algumas modificações.

Alteração da relação núcleo/citoplasma

Hipercromasia

Irregularidade da membrana nuclear

Espessamento da membrana nuclear

Irregularidade da cromatina

Presença de nucléolo

Alterações coilocitóticas

Para o diagnóstico citológico foi adotada a Classificação de Richard, 1967 e complementada com a Classificação de Bethesda 2001, com algumas modificações, descritas a seguir. Foram estabelecidos os seguintes graus de lesão:

Normal = citologia normal e/ou com discretos sinais de inflação; **HPV** = Citologia com alterações citopáticas do HPV, presença de coilócito e/ou no mínimo cinco critérios secundários do HPV, com ausência dos critérios referidos para displasia; **ASCUS**; **NIC I**; **NIC II**; **NIC III**; **carcinoma escamoso invasivo**.

4.6 ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente empregando-se o programa INSTAT-2. A verificação dos níveis de significância foi por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, onde foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

A análise da correlação foi verificada com o teste não-paramétrico de Spearman r , onde $r > 0,80$ foi considerado como bom índice de correlação.

5 - RESULTADOS

5.1 DISTRIBUIÇÃO DE CASOS DE ACORDO COM O DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO

Foram estudadas 85 pacientes na faixa etária de 18 a 65 anos de idade, avaliadas pelo especialista em Patologia Cervical e submetidas aos exames de colposcopia, coleta para exame citológico e coleta de fragmento de colo uterino para realização de exame histológico. A distribuição da avaliação citológica, de acordo com a classificação de Richart complementada pelo Sistema Bethesda, está apresentada na Figura 3.

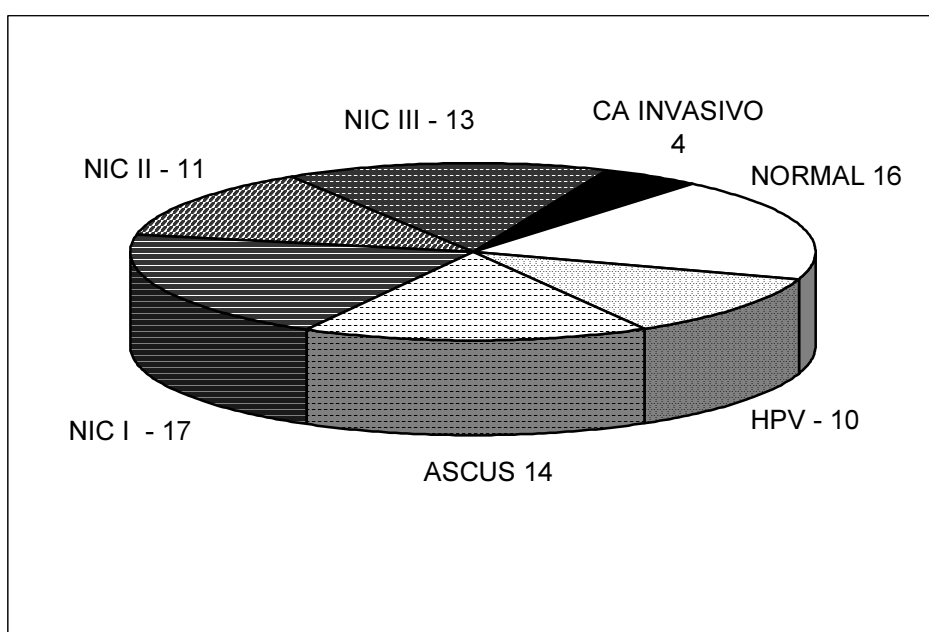


Figura 3. Frequência de cada quadro citológico entre as lâminas de material cervical uterino analisado (n = 85 casos).

5.2 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DOS CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS

Os critérios morfológicos pré-estabelecidos foram analisados pelas técnicas de Papanicolaou e Shorr em aumento de 100 e 400 X, unitariamente e relacionados com o diagnóstico citológico.

CRITÉRIO	PAPANICOLAOU	SHORR
Alteração da relação núcleo/citoplasma	+	+
Hipercromasia	+	++
Irregularidade da membrana nuclear	+	++
Espessamento da membrana nuclear	++	+++
Irregularidade da cromatina com formação de grumos	++	+++
Presença de nucléolo	++	+++
Alterações coilocitóticas	+	+

Tabela 2: Comparação do desempenho da técnica de coloração de Papanicolaou e Shorr através de critérios morfológicos pré-estabelecido.

Como observado os dados da tabela 2, as lâminas de material cervical uterino foram analisadas através das duas técnicas de coloração: Papanicolaou e Shorr. Verificou-se que alguns dos critérios principais para avaliação de malignidade como a alteração da cromatina com formação de grumos, presença de nucléolo, alterações de membrana nuclear e hipercromasia foram mais evidentes na coloração de Shorr; enquanto que em outros critérios, não menos importantes, como alteração da relação núcleo/citoplasma e a presença de coilócitos não foram observadas variações (Figuras: 4, 5, 6 e 7). No entanto não houve discrepância no diagnóstico citológico final. Portanto a técnica de Shorr pode ser utilizada para o diagnóstico citológico. Para este estudo optou-se pela utilização das duas técnicas de coloração.

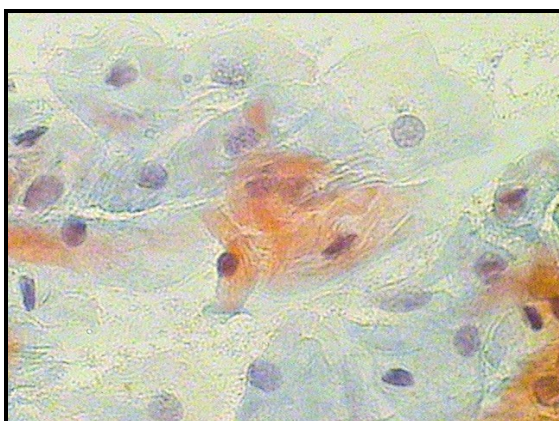


Figura 4: Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. Inflamatório. Coloração de Papanicolaou. (400x)



Figura 5: Fotomicrografia de esfregaço de material cervical uterino. Inflamatório. Coloração de Shorr. (400x)

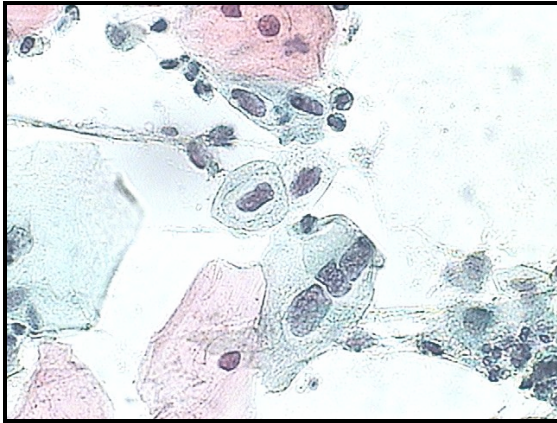


Figura 6:Fotomicrografia de esfregaço citológico material cervical uterino. HSIL-NIC II. Coloração de Papanicolaou. (400x)

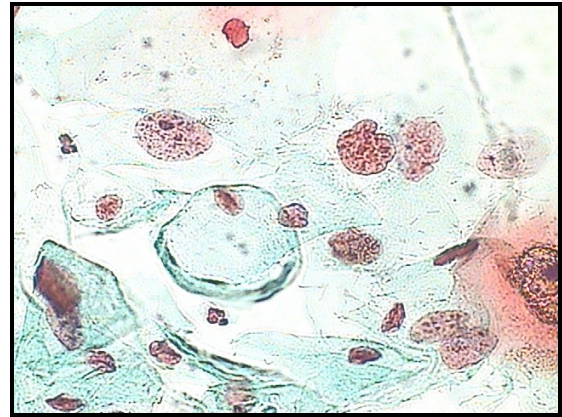


Figura 7:Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HSIL-NIC II. Coloração Coloração de Shoor. (400x)

5.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA COLORAÇÃO DE AgNOR NAS DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES CITOLÓGICAS

Com a técnica de coloração de AgNOR as células apresentam coloração amarelada com núcleos em castanho e os NORs observados com microscópio comum e objetiva de imersão, como estruturas pequenas e irregulares intranucleares de cor marrom-café a negro. Os pontos NORs, seu número, tamanho, forma e localização variam com a gravidade da lesão; onde observa-se pontos ligeiramente centrais, arredondados, em quantidade de até quatro e menores que o nucléolo em células normais. Entretanto em células onde se observam alterações morfológicas de pré-malignidade e malignidade os pontos variam em número, tamanho, forma e localização no interior do núcleo (Figuras 9, 11,13,15,17,19 e 21).



Figura 8: Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. Inflamatório. Coloração de Shorr. (400x).

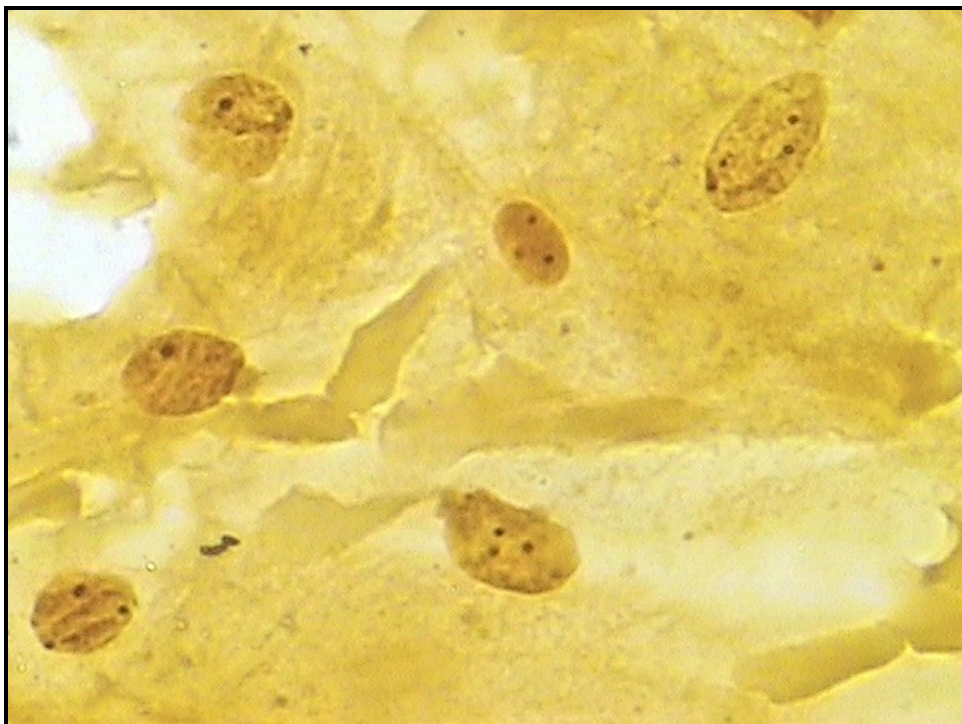


Figura 9: Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. Inflamatório. Técnica de AgNOR. (1000x).



Figura 10: Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HPV. Coloração de Shorr. (400x).

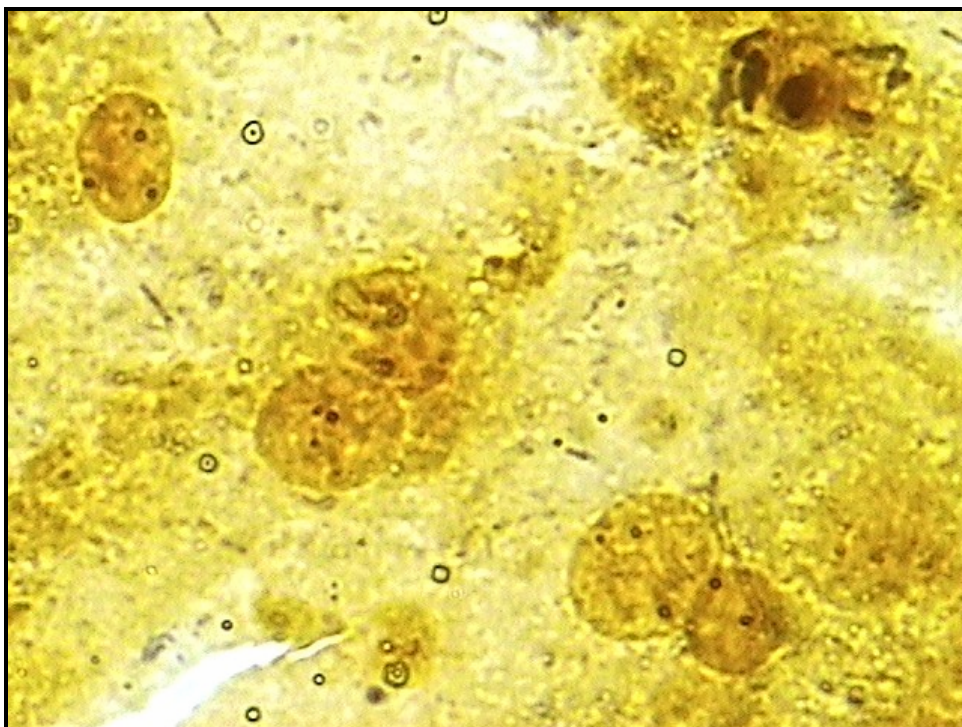


Figura 11: Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HPV. Técnica de AgNOR. (1000x).

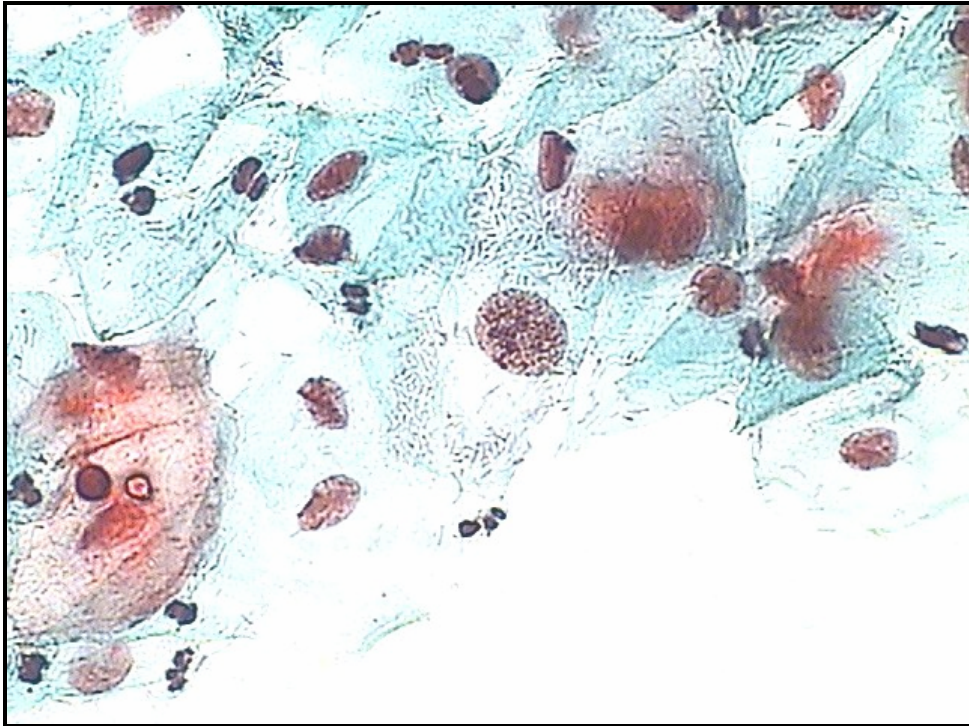


Figura 12: Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. ASCUS. Coloração de Shorr. (400x).

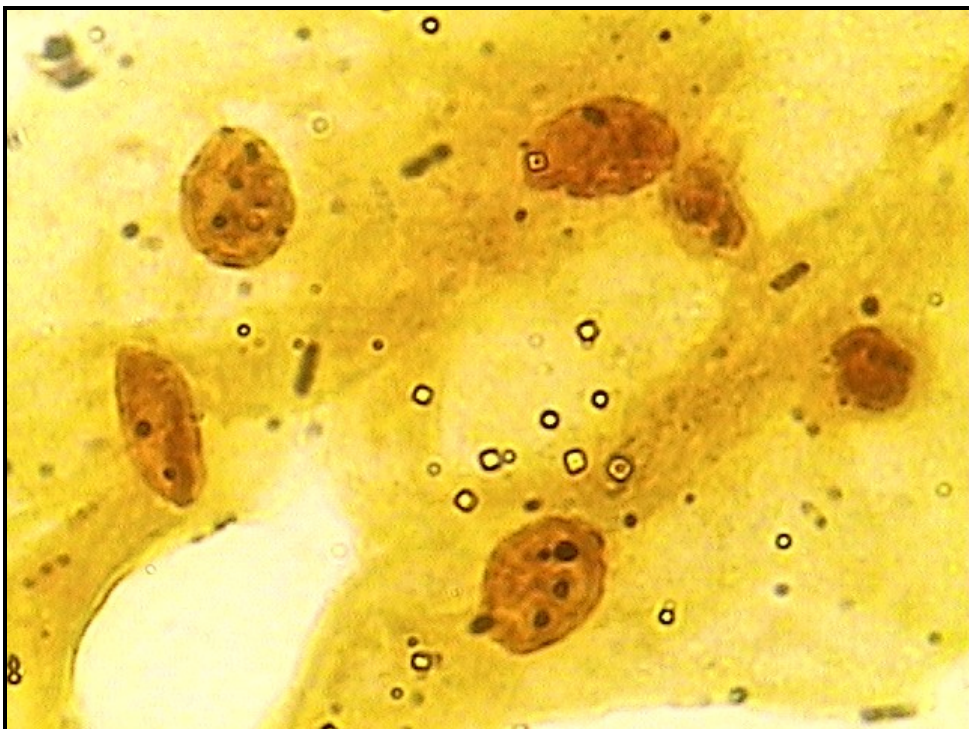


Figura 13: Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. ASCUS. Técnica de AgNOR. (1000x).



Figura 14: Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. LSIL – NIC I. Coloração de Shoor. (400x).

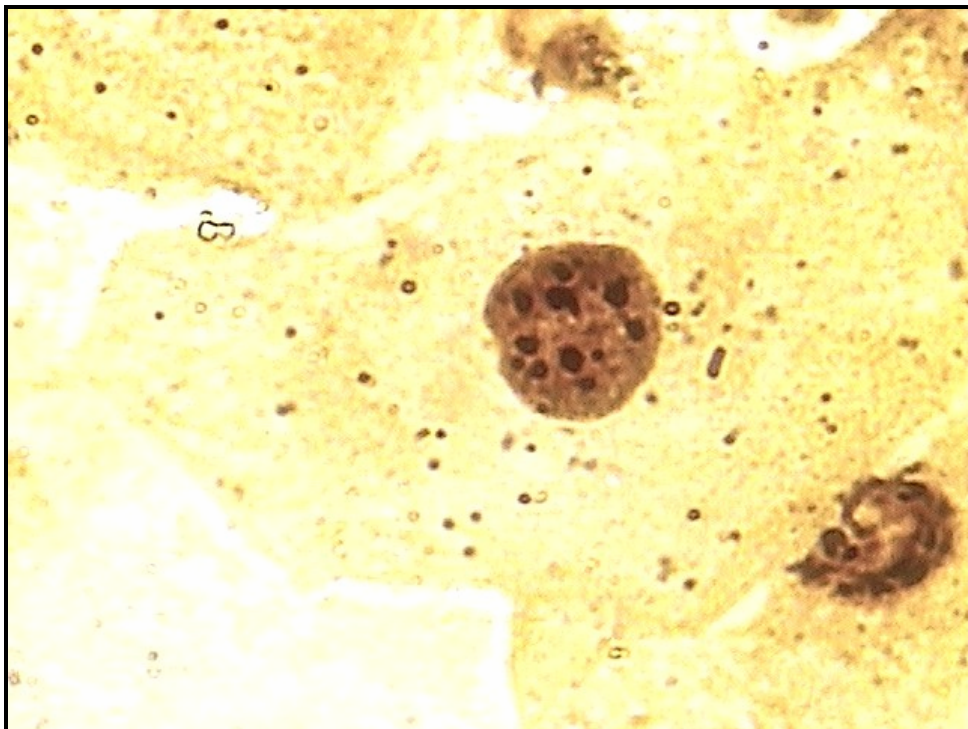


Figura 15: Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. LSIL - NIC I. Técnica de AgNOR. (1000x).



Figura 16: Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HSIL – NIC II. Coloração de Shoor. (400x).

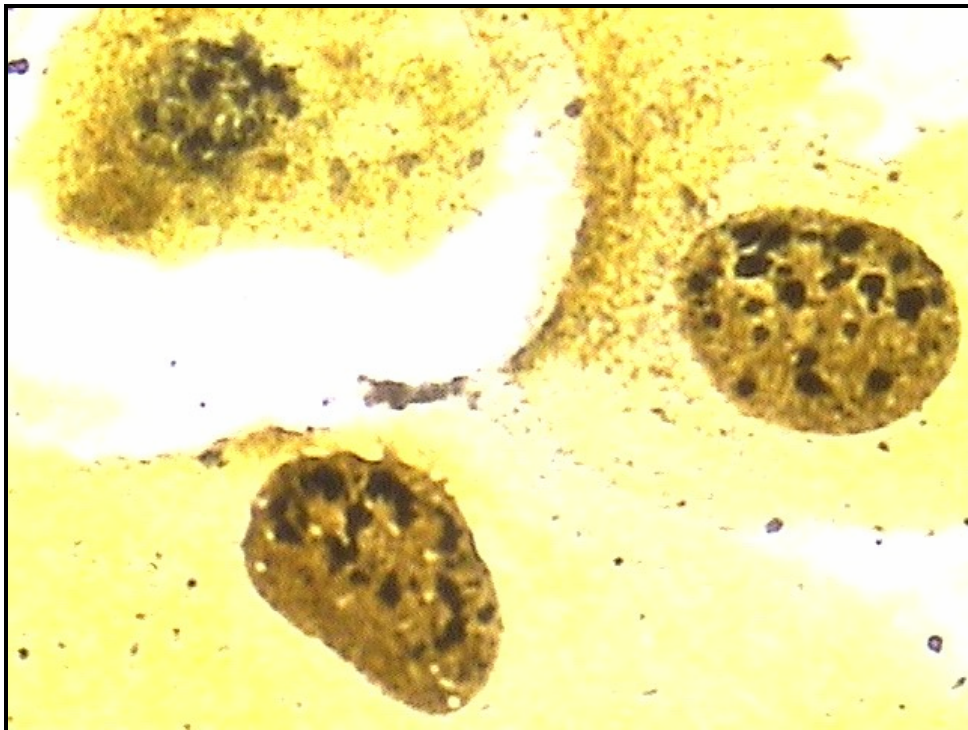


Figura 17: Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HSIL – NIC II. Técnica de AgNOR. (1000x).

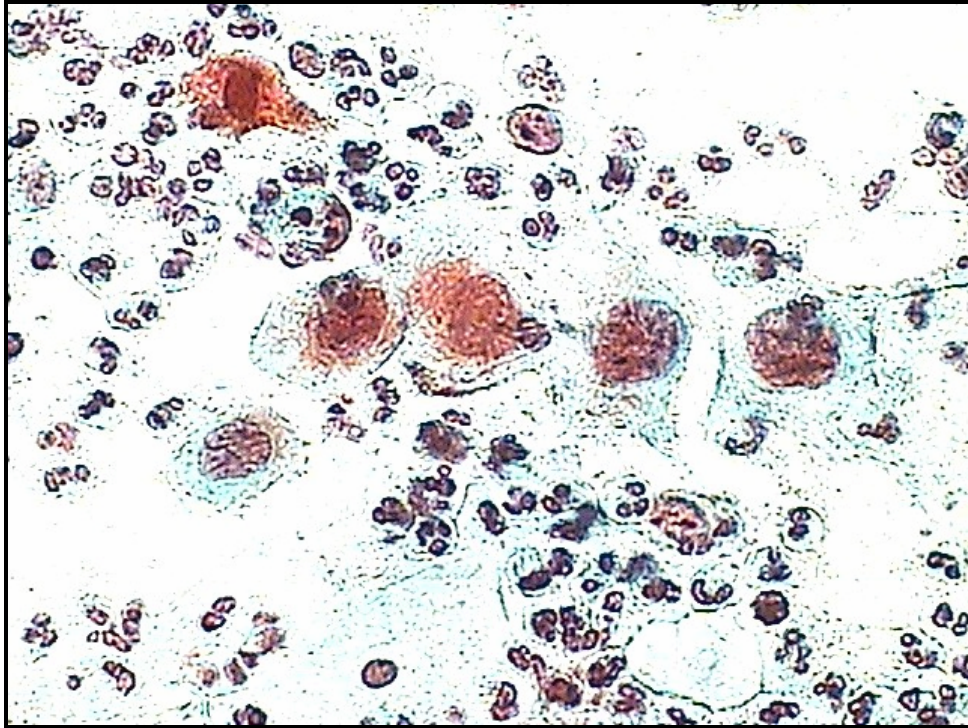


Figura 18: Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HSIL – NIC III. Coloração de Shoor. (400x).



Figura 19: Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. HSIL – NIC III. Técnica de AgNOR. (1000x).

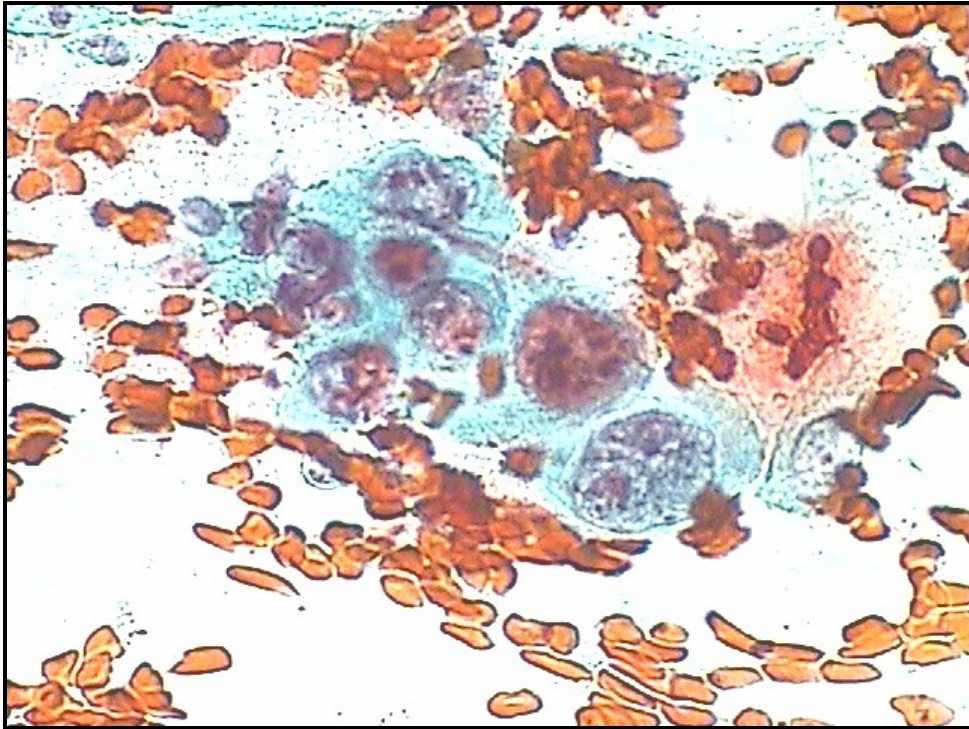


Figura 20: Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. Carcinoma escamoso invasivo. Coloração de Shoor. (400x).

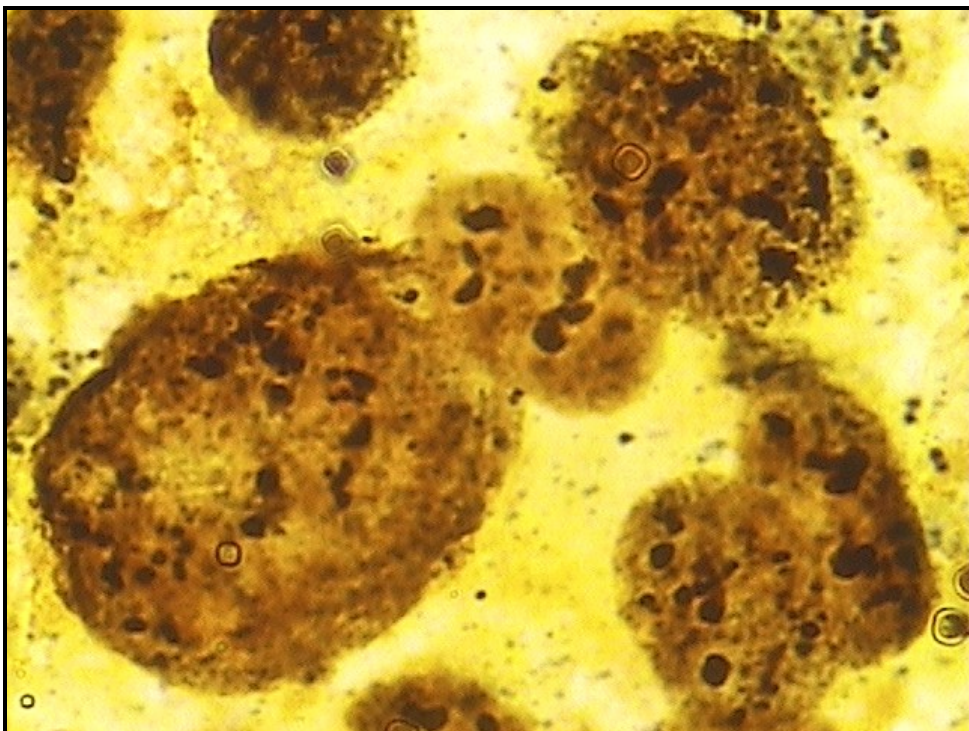


Figura 21: Fotomicrografia de esfregaço citológico de material cervical uterino. Carcinoma escamoso invasivo. Técnica de AgNOR. (1000x).

5.4 ASSOCIAÇÃO DA TÉCNICA DE AgNOR E DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO

As lâminas foram analisadas segundo número e valores relativos de área de AgNOR e agrupadas de acordo com a classificação do Diagnóstico Citológico.

5.4.1 CORRELAÇÃO ENTRE NÚMERO DE AgNOR E RESULTADOS CITOLÓGICOS

Apresenta-se na figura 22 os resultados obtidos através da média do número de AgNORs em relação à classificação citológica. Observa-se uma tendência crescente do número de pontos conforme a gravidade da lesão, mostrando acentuado índice de correlação entre a Técnica de AgNOR e Diagnóstico Citológico (Coeficiente de Spearman $r: 0,8468$).

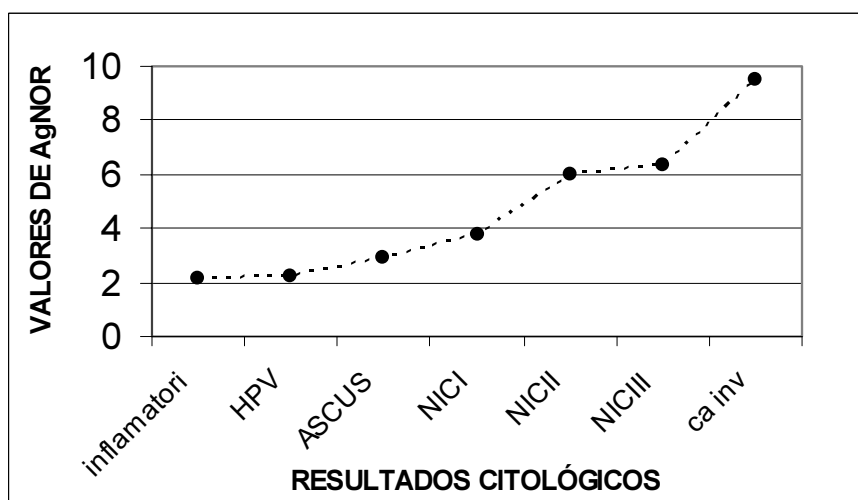


Figura 22: Curva da média do número dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme classificação de Richart e Sistema Bethesda, valor de $n=85$. O resultado da análise estatística pelo Coeficiente de Spearman $r: 0,8468$.

5.4.2 CORRELAÇÃO ENTRE VALORES DE ÁREA DE AgNOR E RESULTADOS CITOLÓGICOS

Verifica-se na figura 23 os resultados obtidos através da média dos valores de área de AgNORs em relação à classificação citológica. Observa-se uma tendência crescente da relação área/núcleo conforme a gravidade da lesão, mostrando bom índice de correlação entre a Técnica de AgNOR e o Diagnóstico Citológico (Coeficiente de Spearman $r: 0,7596$).

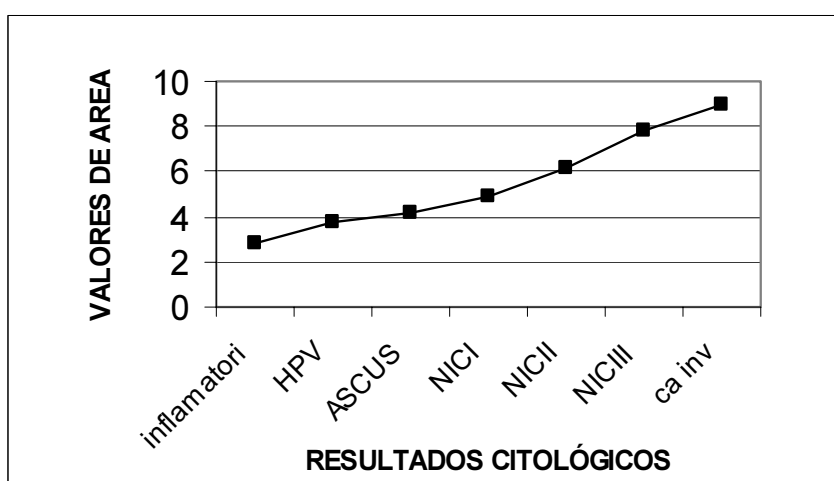


Figura 23: Curva da média dos valores de área dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme classificação de Richart e Sistema Bethesda, valor de $n=82$. O resultado da análise estatística pelo Coeficiente de Spearman $r: 0,7596$.

5.4.3 DISPERSÃO DOS VALORES DE NÚMERO E ÁREA DE AgNOR E RESULTADOS CITOLÓGICOS

Na figura 24 verifica-se a dispersão do resultado de número de AgNOR e valor de área/núcleo de AgNOR em cada classificação citológica. Observa-se em alguns diagnósticos citológicos como NIC I (D), NIC II (E) e câncer invasivo (G) uma linearidade de pontos. A mesma linearidade não se observa em relação aos diagnósticos: inflamatório (A), HPV (B), ASCUS (C) e NIC III (F), onde os pontos apresentam-se relativamente dispersos. Este fato demonstra que a Técnica de AgNOR pode ser útil na diferenciação entre diagnósticos citológicos, inflamatórios, NIC I e NIC II.

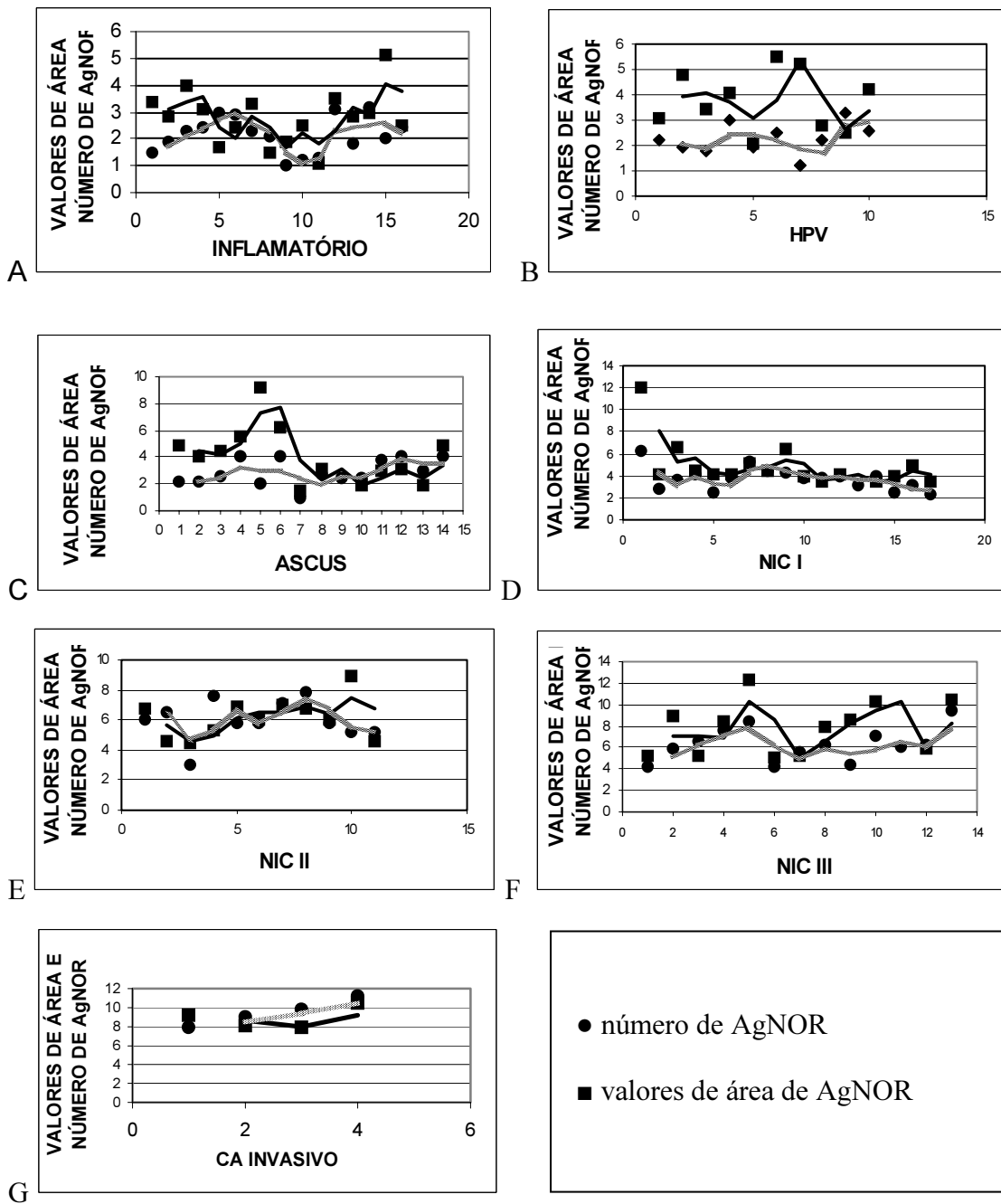


Figura 24: Dispersão do número e dos valores relativos de área de AgNOR em cada classificação citológica.

5.5 ASSOCIAÇÃO DA TÉCNICA DE AgNOR E DIAGNÓSTICO COLPOSCÓPICO

As lâminas foram reagrupadas de acordo com o diagnóstico especular e colposcópico. A classificação utilizada na avaliação dos aspectos colposcópicos foi à classificação formulada pela Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia (IFCPC), reunida em Roma em maio de 1990.

5.5.1 CORRELAÇÃO ENTRE NÚMERO DE AgNOR E RESULTADOS COLPOSCÓPICOS

Na figura 25 são apresentados os resultados obtidos através da média do número de AgNORs em relação à classificação colposcópica. Novamente, observa-se uma tendência crescente do número de pontos conforme a gravidade da lesão, mostrando razoável índice de correlação entre a Técnica de AgNOR e Diagnóstico Colposcópico (Coeficiente de Spearman r : 0,6993).

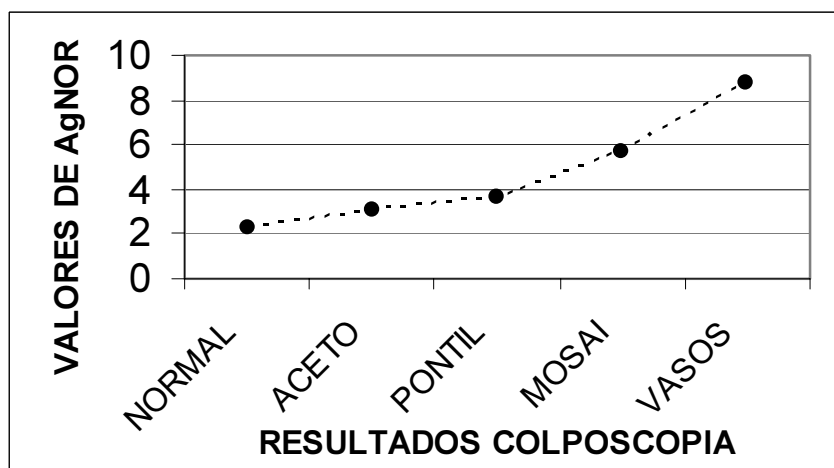


Figura 25: Curva da média do número dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme avaliação colposcópica de acordo com a IFCPC, valor de $n=74$. O resultado da análise estatística pelo Coeficiente de Spearman r : 0,6993.

5.5.2 CORRELAÇÃO ENTRE VALORES DE ÁREA DE AGNOR E RESULTADOS COLPOSCÓPICOS

Apresenta-se na figura 26 os resultados obtidos através da média dos valores de área de AgNORs em relação à classificação colposcópica. Assim como na associação da figura número 23 observa-se uma tendência crescente da relação área/núcleo conforme a gravidade da lesão, mostrando razoável índice de correlação entre a Técnica de AgNOR e Diagnóstico Colposcópico (Coeficiente de Spearman $r: 0,6207$).

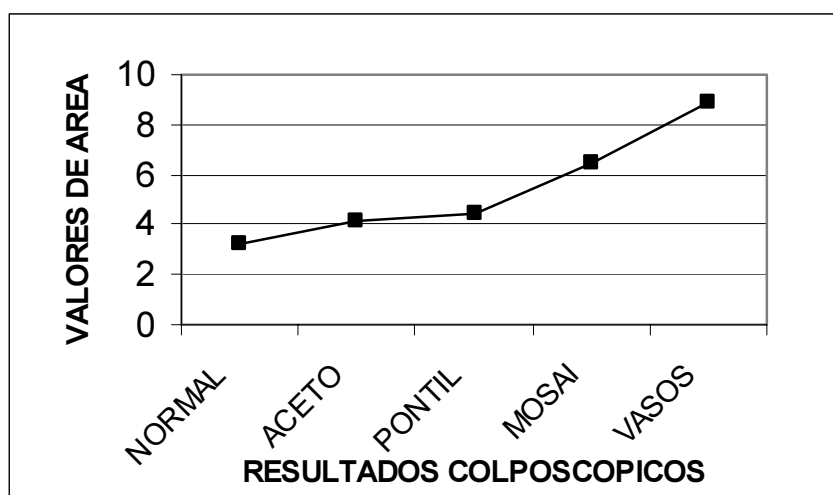


Figura 26: Curva da média dos valores de área dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme avaliação colposcópica pela IFCCPC, valor de $n=70$. O resultado da análise estatística pelo Coeficiente de Spearman $r: 0,6207$.

5.5.3 DISPERSÃO DOS VALORES DE NÚMERO E ÁREA DE AgNOR E RESULTADOS COLPOSCÓPICOS

Observa-se na figura 27 os resultados obtidos pela dispersão dos números de AgNOR dos valores relativos de área de AgNORs em cada classificação colposcópica. Verifica-se em alguns diagnósticos colposcópicos como áreas aceto-brancas (B), mosaico (D) e vasos atípicos (E) uma linearidade de pontos. A mesma observação não pode ser feita em relação aos diagnósticos: normal (A), e pontilhado (C), onde os pontos apresentam-se relativamente dispersos. Este fato

demonstra que a Técnica de AgNOR pode ser útil na diferenciação de pacientes com lesões aceto-brancas e mosaico bem como em presença de vasos atípicos.

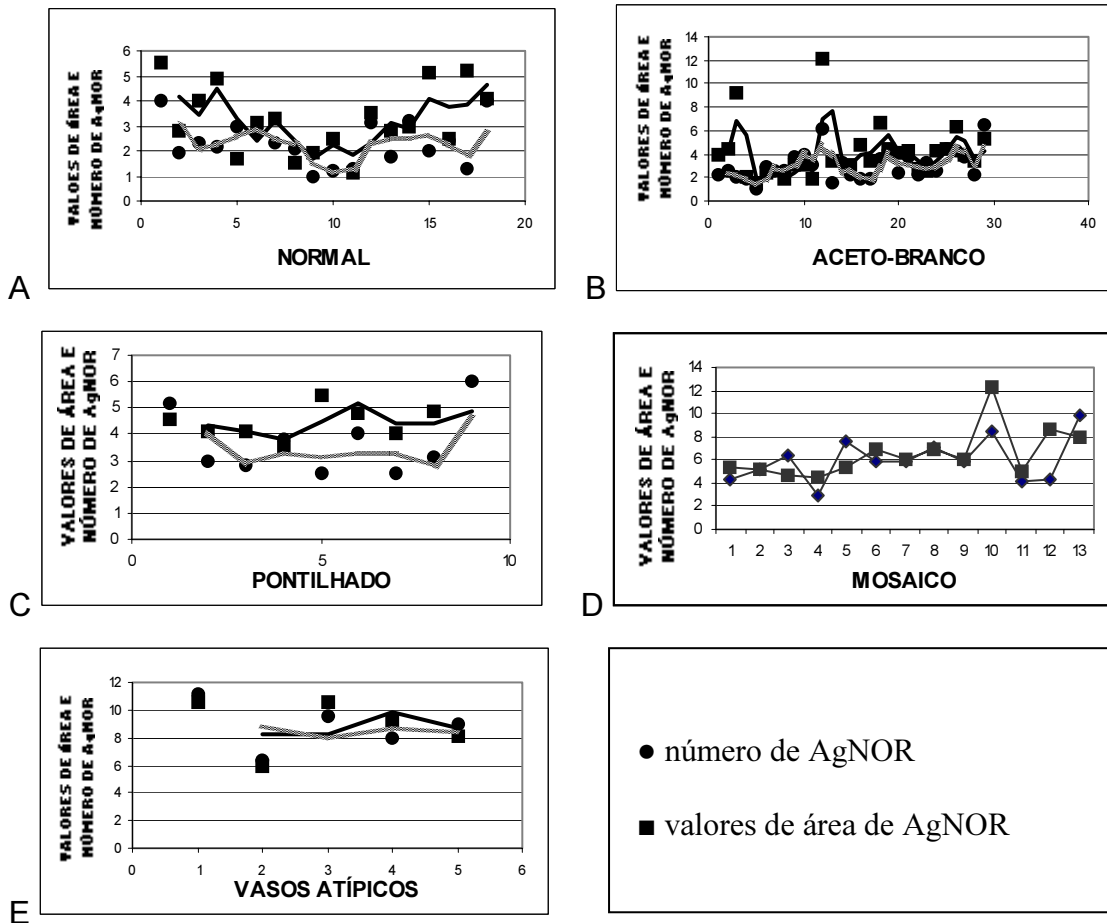


Figura 27: Dispersão do número e dos valores relativos de área de AgNOR em cada classificação colposcópica.

5.6 ASSOCIAÇÃO DA TÉCNICA DE AgNOR E DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICA

As lâminas foram novamente reagrupadas conforme os resultados histológicos do material de biópsia coletado durante o exame médico. O exame histológico foi classificado de acordo com a classificação de Richart, 1967.

5.6.1 CORRELAÇÃO ENTRE NÚMERO DE AgNOR E RESULTADOS HISTOLÓGICOS

Na figura 28 são apresentados os resultados obtidos através da média do número de AgNORs em relação à classificação histológica. Nesta associação também se observa uma tendência crescente do número de pontos conforme a gravidade da lesão, mostrando acentuado índice de correlação entre a Técnica de AgNOR e Diagnóstico Histológico (Coeficiente de Spearman $r: 0,8441$).

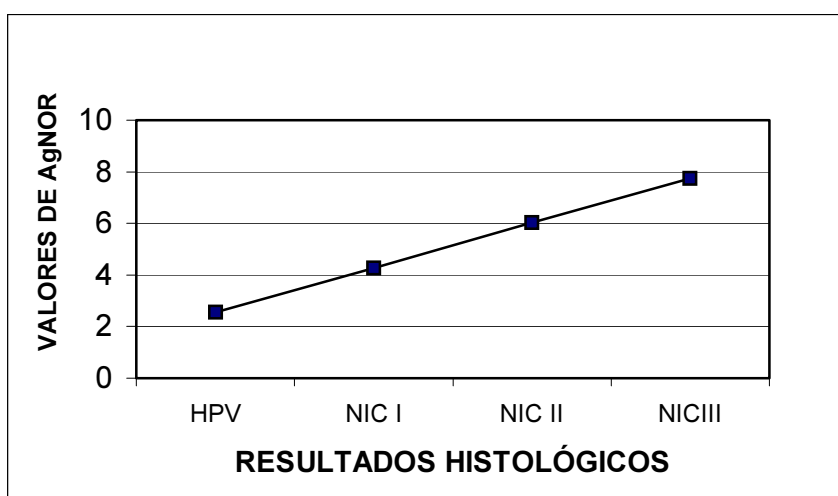


Figura 28: Curva da média do número dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme avaliação histológica, valor de $n=48$. O resultado da análise estatística pelo Coeficiente de Spearman $r: 0,8441$.

5.6.2 CORRELAÇÃO ENTRE VALORES DE ÁREA DE AgNOR E RESULTADOS HISTOLÓGICOS

Apresenta-se na figura 29 os resultados obtidos através da média dos valores de área de AgNORs em relação à classificação histológica. Verifica-se uma tendência crescente da relação área/núcleo conforme a gravidade da lesão, mostrando razoável índice de correlação entre a Técnica de AgNOR e Diagnóstico Histológico (Coeficiente de Spearman $r: 0,6732$).

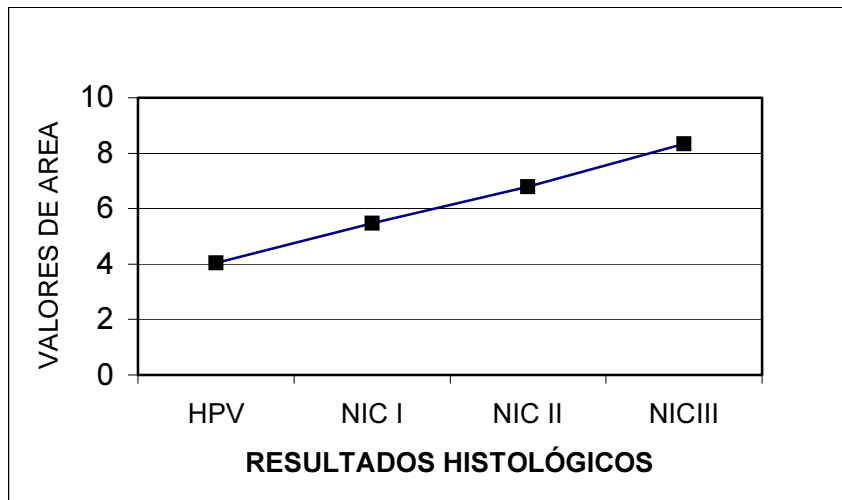


Figura 29: Curva da média dos valores de área dos pontos de AgNOR nos diferentes graus de lesão conforme avaliação histopatológica, valor de n=47. O resultado da análise estatística pelo Coeficiente de Spearman $r: 0,6732$.

5.6.3 DISPERSÃO DOS VALORES DE NÚMERO E ÁREA DE AgNOR E RESULTADOS HISTOLÓGICOS

Apresenta-se na figura 30 os resultados obtidos pela dispersão dos números de AgNOR dos valores relativos de área de AgNORs em relação à classificação histológica. Observa-se em alguns diagnósticos histológicos como NIC I (B), NIC II (C) e NIC III (D) uma linearidade de pontos. A mesma observação não pode ser feita em relação ao diagnóstico HPV (A) onde os pontos apresentam-se relativamente dispersos. Este fato demonstra que a Técnica de AgNOR pode ser útil na diferenciação de pacientes com lesões displásicas.

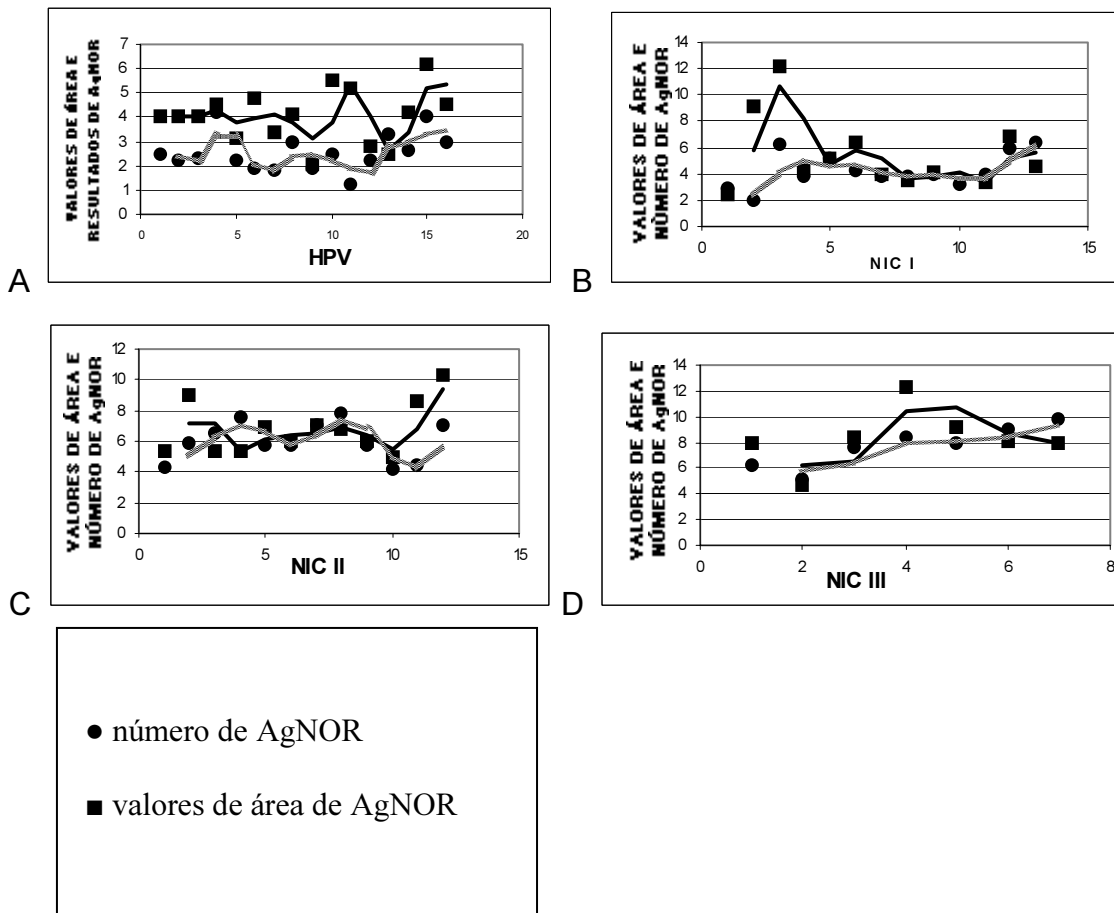


Figura 30: Dispersão do número e dos valores relativos de área de AgNOR em cada classificação histológica.

5.7 AVALIAÇÃO DA ALTERAÇÃO DA FORMA DO AgNOR

A figura 31 mostra uma tendência crescente da alteração da forma conforme a gravidade da lesão. Nos esfregaços classificados como normais e inflamatórios observou-se que os AgNORs apresentaram-se de forma arredondada e naqueles com resultados positivos a partir de ASCUS mostraram alterações apresentando-se de forma espiculada (figuras 15, 17, 19 e 21).

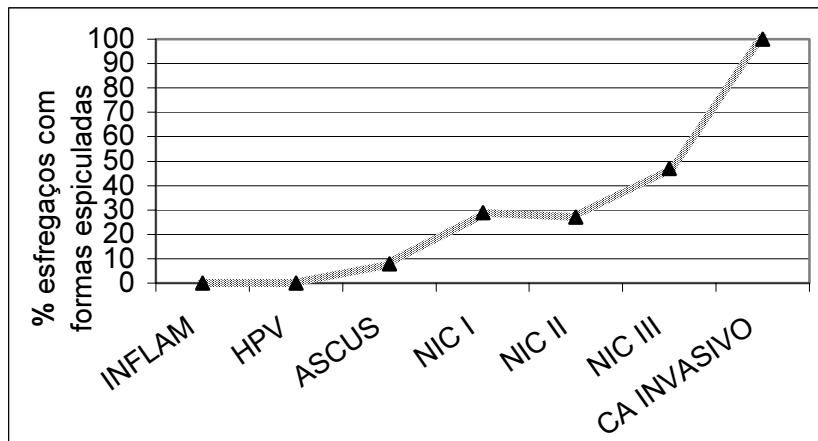


Figura 31: Percentagem de esfregaços com presença de formas espiculadas nos diferentes diagnósticos citológicos.

5.8 ÍNDICE DE VARIAÇÃO DO NÚMERO DE AGNOR NAS DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES CITOLÓGICAS

Todos os casos estudados pelo método de AgNOR, tiveram seus pontos contados e medidos a sua área em relação ao tamanho do núcleo e foram analisados estatisticamente entre os diferentes graus de lesão pelo Teste não paramétrico de Mann-Whitney, obtendo-se os dados a seguir:

classe	inflamatório	HPV	ASCUS	NIC I	NICII	NIC III	Ca invasivo
N	16	10	14	17	11	13	4
X ± SE	2,15±0,17	2,26±0,19	2,88±0,25	3,74±0,24	5,97±0,40	6,31±0,43	9,47±0,69
Mínimo	1,00	1,25	1,00	2,30	3,00	4,20	7,90
Máximo	3,20	3,30	4,00	6,20	7,80	9,50	11,20
Val de p	0,736	0,084	0,04*	0,0003***	0,60	0,0059**	

Tabela 3. Número de AgNOR em células escamosas do colo uterino, de acordo com o grau de lesão Segundo a Classificação de Richart e Sistema Bethesda estabelecidos em Citologia Cérvico Vaginal. Valores de “p”: p < 0,05 (*), p < 0,01 (**) e p < 0,001 (***).

Classe	inflamatório	HPV	ASCUS	NIC I	NICII	NIC III	Ca invasivo
N	16	10	13	16	11	12	4
X ± SE	2,78±0,24	3,77±0,37	4,12±0,58	4,91±0,53	6,18±0,41	7,80±0,71	8,92±0,59
Mínimo	1,10	2,10	1,50	3,40	4,50	5,00	7,90
Máximo	5,10	5,50	9,20	12,10	8,90	12,30	10,50
Val de p	0,046 *	0,927	0,268	0,002 **	0,133	0,446	

Tabela 4. Valores de área de AgNOR em células escamosas do colo uterino, de acordo com o grau de lesão Segundo a Classificação de Richart e Sistema Bethesda estabelecidos em Citologia Cérvico Vaginal. Valores de “p”: p < 0,05 (*) e p < 0,01 (**).

classe	normal	Aceto-branco	pontilhado	mosaico	Vasos atípicos
N	18	29	9	13	5
X ± SE	2,31±0,20	3,05±0,23	3,65±0,41	5,99±0,52	8,78±0,81
Mínimo	1,00	1,00	2,50	3,00	6,30
Máximo	4,00	6,50	6,00	9,80	11,2
Val de p	0,047 *	0,161	0,002 **	0,019*	

Tabela 5. Número de AgNOR em células escamosas do colo uterino, de acordo com o grau de lesão, nas diferentes classificações colposcópicas. Valores de “p”: $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**).

classe	normal	Aceto-branco	pontilhado	mosaico	Vasos atípicos
N	18	27	8	13	5
X ± SE	3,25±0,31	4,17±0,44	4,43±0,22	6,50±0,59	8,84±0,86
Mínimo	1,10	1,50	3,50	4,50	5,90
Máximo	5,50	12,1	5,50	12,3	10,5
Val de p	0,190	0,143	0,0018 **	0,046*	

Tabela 6. Valores de área de AgNOR em células escamosas do colo uterino, de acordo com o grau de lesão, nas diferentes classificações colposcópicas. Valores de “p”: $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**).

classe	HPV	NIC I	NIC II	NIC III
N	16	12	12	7
X ± SE	2,59±0,19	4,39±0,38	6,02±0,36	7,74±0,59
Mínimo	1,25	2,00	4,20	5,20
Máximo	4,20	6,45	7,80	9,80
Val de p	0,0004 ***	0,0056 **	0,0221 *	

Tabela 7. Número de AgNOR em células escamosas do colo uterino, de acordo com o grau de lesão nas diferentes classificações histológicas. Valores de “p”: p < 0,05 (*), p < 0,01 (**) e p < 0,001 (***).

classe	HPV	NIC I	NIC II	NIC III
N	15	12	12	7
X ± SE	4,06±0,29	5,47±0,80	6,79±0,48	8,34±0,85
Mínimo	2,10	2,40	5,00	4,60
Máximo	6,20	12,1	10,3	12,3
Val de p	0,236	0,0387 *	0,1673	

Tabela 8. Valores de área de AgNOR em células escamosas do colo uterino, de acordo com o grau de lesão nas diferentes classificações histológicas. Valores de “p”: p < 0,05 (*).

6 - DISCUSSÃO

O carcinoma de colo uterino tem sido intensamente estudado, pois é uma doença que se diagnosticada em suas fases iniciais pode ser controlada e mesmo evitada, sendo um dos raros exemplos de neoplasia prevenível (CARNEIRO *et al.*, 2004).

A realização do exame citológico tem sido reconhecida mundialmente como uma estratégia segura e eficiente para a detecção precoce da maioria dos casos de câncer do colo do útero. Apenas com o protocolo de diagnóstico padrão têm-se modificado as taxas de incidência e mortalidade. A efetividade da detecção precoce do câncer do colo do útero por meio deste exame associado a colposcopia e ao tratamento em seus estádios iniciais tem resultado em uma redução das taxas de incidência de carcinoma cervical invasor que pode chegar a 80%, segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS, quando realizado dentro dos padrões de qualidade (BRASIL,2003).

Para a realização deste exame pode-se utilizar a coloração de Papanicolaou e a coloração de Shorr, igualmente aplicadas na avaliação citológica de material cervical uterino. Estas colorações têm como fundamento à diferenciação das células escamosas normais e neoplásicas manifestadas por alterações do citoplasma e do núcleo. Nesse estudo foram avaliadas ambas as colorações e a técnica de Shorr mostrou-se um bom método de coloração.

Estima-se, entretanto, que no mundo 500.000 novos casos de câncer de colo de útero ocorram a cada ano, e em nosso país as taxa apresentadas são ainda alarmantes, sendo um dos cânceres que mais acometem as mulheres e um dos principais cânceres ginecológicos. Apesar de ser mais freqüente nas regiões menos favorecida do país, outras regiões vêm apresentando incidências crescentes, como a região sul (FERRIGNO & FARIA, 1992; ABRÃO, 1994; LOPES *et al.*, 1995; BEZERRA & BRANDT, 1996; BRASIL,2003).

Alguns casos são de difícil conclusão e necessitam de acompanhamento e realização de novos exames citológicos, em intervalo de tempo que variam conforme a gravidade (INCA, 2002), com isso, dificultando o tratamento e muitas vezes a perda da paciente. Desta forma, apesar dos procedimentos padrão serem

executados de maneira efetiva, dificuldades diagnósticas são relatadas, e para estes casos o emprego de outras técnicas auxiliares é indispensável.

Atualmente, vários trabalhos descrevem o emprego da técnica de AgNOR e sua aplicação em morfometria quantitativa, como método auxiliar na distinção entre células benignas e malignas, em diversos tecidos (MAKINEN, *et al.*, 1993; KRUGER, *et al.*, 2000). São considerados parâmetros de área e perímetro nuclear, relação núcleocitoplasmática e área absoluta e fracional das regiões organizadoras de nucléolo (BIBBO & LONGATTO FILHO, 2001).

Esta técnica, foi primeiramente descrita no início dos anos 30 e empregada na identificação de NORs em células na interfase, em citogenética, posteriormente foi adaptada em parafina para estudo da expressão de material NORs em biópsias. Baseado nestes dados esta técnica foi utilizada na investigação da taxa de proliferação celular em processos malignos (PLOTON, *et al.*, 1985; CALORE *et al.*, 1997; CALORE *et al.*, 1997a).

A formação dos NORs é constante em todas as células e, em relação à cérvix uterina o número deles está relacionado com a intensidade da ploidia, transcrição nucleolar e ciclo celular podendo agir como um determinante de replicação celular (VIDAL, *et al.*, 1994).

UNDERWOOD & GIRI, (1995) realizaram estudo histológico em material cervical uterino e descreveram os pontos de AgNOR como estruturas redondas solitárias argerofilicas, correspondendo a nucléolos pequenos, vistas em células na fase G₀; e os grupos de NOR dentro da matriz nucleolar, correspondendo aos nucléolos como pontos pequenos AgNORs verdadeiros espalhados por todo o nucleoplasma. Com o aperfeiçoamento da técnica de AgNOR, o procedimento tem sido aplicado no estudo de interfase das células neoplásicas para orientação diagnóstica e prognóstica.

Portanto novas técnicas estão sendo estudadas com o objetivo de auxiliar no diagnóstico desta doença. BARROS (1999), avaliou a confiabilidade da técnica de AgNOR para estabelecer diagnósticos diferenciais de lesões pré-neoplásicas,

de graus de malignidade entre neoplasias benignas e malignas e auxiliar no prognóstico e terapêutica do câncer de boca. Concluiu que a contagem das NORs/núcleo pela técnica de AgNOR mostra a proliferação celular e pode ser indicativo de comportamento tumoral, além de ser um método de fácil realização e interpretação. O aumento do número de NORs/núcleo, de forma irregular, tamanho diminuído e dispersas no núcleo, são indicativos característicos de um pior diagnóstico. Desta forma, a técnica de AgNOR tem sido estudada desde esta época em vários tecidos.

Esta técnica baseia-se na suposição de que todos os corpos argerofilicos são AgNORs e seu número esteja positivamente relacionado à atividade dos genes que codificam RNA e a proliferação celular. Portanto tem sido sugerido que o número de AgNOR por célula pode ser uma marca de atividade celular incluindo malignidade, e seu estudo quantitativo viável no campo oncológico, citológico e histológico, sendo que o número, tamanho e posição dos AgNORs podem fornecer dados morfológicos como critérios de malignidade (REEVES, *et al.*, 1982; CORTES-GUTIERREZ, *et al.*, 2001).

Os pontos são vistos ao microscópio ótico com objetiva de 100 vezes como núcleos negros em citoplasma amarelo (HOWELL, & BLACK, 1980). Os resultados mostram que a interação prata-iônica com os grupos carboxilas das proteínas ácidas, as quais são envolvidas no processo de transcrição do RNA-r são responsáveis pela seletividade da coloração de prata dos NORs, que são proteínas argirofílicas não histonas (OLERT, 1979; FAKAN & HERNANDEZ-VERDUN, 1986; SMITH, *et al.*, 1988). O número e localização dos NORs são geralmente específicos nas espécies, e são caracterizados pelos centros fibrilares e estruturas de cromatinas *in situ* e pela localização de genes ribossomais e certas proteínas como B23 e C23 associadas a eles, ativadas no nucléolo durante a interfase (HUBBELL, *et al.* 1979; HERNANDEZ-VERDUN, 1983).

Na leitura dos casos deste estudo observou-se variação na quantidade, forma e tamanho dos pontos de AgNOR, demonstrando alteração significativa destes parâmetros, de acordo com a avaliação citológica das pacientes. O número de AgNOR e sua área relativa variaram consideravelmente: nos casos

normais e/ou inflamatórios encontrou-se valores médios de número de 2,1 e área de 2,7; em HPV o número médio foi de 2,2 e área de 3,7; para ASCUS valores número médio foi de 2,8 e área de 4,1; enquanto que em NIC I (LSIL) o número médio foi de 3,7 e área de 4,9; em NIC II (HSIL) o número médio foi de 5,9 e área de 6,1; em NIC III (HSIL) o número médio foi de 6,3 e área de 7,8 e em carcinoma número médio foi de 9,4 e área de 8,9.

Os valores apresentados para o número e área de AgNOR foram significativos para os quadros citológicos segundo a classificação de Richad e Bethesda, aumentando com a gravidade da lesão, como mostra as figuras 22 e 23. Segundo CALORE *et al.* (1997), este método de contagem de AgNOR pode ser usado na identificação e classificação de casos de NIC e sua diferenciação nos casos de dificuldade diagnóstica; em seus estudos também observou que a variação de forma e tamanho é crescente de acordo com o grau de malignidade.

Verificou-se nesta pesquisa que o número de AgNOR encontrado nas pacientes diagnosticadas como inflamatório, que constitui o nosso grupo controle, um número de AgNOR abaixo de 4 pontos como refere a literatura, os quais são considerados como normais (SAKAI, *et al.*, 2001); entretanto estes valores aumentam discretamente nos casos de presença de efeitos citopáticos para HPV, mas não são considerados significantes.

Segundo CALORE e colaboradores (1997), nas células do epitélio cervical até mesmo em processos inflamatórios podem apresentar número aumentado de AgNOR. Em nossos resultados observamos o mesmo comportamento, como se observa na figura 24 (A), que demonstra uma variação entre os pontos AgNOR, no entanto a média manteve-se nos padrões de normalidade. Outra observação, entretanto, que pode ser feita é que estes pontos mantêm a forma arredondada específica própria dos pontos no interior do núcleo (figura 9).

Para os resultados observados nas pacientes classificadas como apresentando alterações citológicas para o vírus HPV, figura 24 (B), embora sem alterações citológicas características para NIC I, como aumento relação núcleo/citoplasma, hiper Cromasia, alteração de cromatina entre outros, mostrou

uma variação significativa para o número e valores de área de AgNOR entre si, mas com valores bem próximos das pacientes que não apresentam lesões no colo uterino, demonstrando que a invasão celular pelo vírus que ainda/ou que não apresentou alterações celulares não faculta um aumento de atividade celular, sugerindo que esta invasão celular possa ser eliminada ou tornar-se possivelmente latente (figura 11). Observa-se assim, que a presença do vírus HPV não necessariamente determina que a paciente venha a desenvolver uma displasia. Para que isto venha a ocorrer é necessário à presença de vários fatores concomitante como: presença de vírus altamente oncogênico, alta carga viral, baixa imunidade da paciente, e principalmente a presença de áreas metaplásicas que favorecem a invasão do vírus, propiciando assim o desenvolvimento das displasias. Segundo EIFEL & LEVENBACK (2005), a infecção por HPV é freqüentemente transitória, e a história da infecção pelo vírus HPV não foi ainda completamente compreendida.

A alteração dos AgNORs no ASCUS, (figura 13) quando comparados com os inflamatórios mostram que as discretas diferenças, no número e tamanho indicam que a célula está reativa. O número de AgNOR é significativo quando comparado com NIC I, (tabela 2), demonstrando que ASCUS figura 24 (C) apesar de apresentar uma atividade celular mais intensa não qualifica suas células como uma lesão incipiente pré-maligna. Portanto considera-se ASCUS como classificação de difícil diagnóstico e prognóstico como refere à literatura, onde estas devem ser acompanhadas como pacientes de risco (MORIN, 2000).

Nos casos de lesão de baixo grau (NIC I) observou-se valor mais elevado de número e área de AgNOR, que os encontrados nos normais. Esta diferença é relatada nos estudos de CALORE e colaboradores (1997), que descreve uma diferença mais evidente entre os graus de displasia e os casos de cervicite crônica.

Nas pacientes com diagnóstico citológico de NIC I, figura 24 (D), verifica-se uma uniformidade nos valores de pontos de AgNOR além de valores médios mais elevados que os normais, tanto para o número como para a relação área de AgNOR. Outra característica relevante é que estes pontos AgNOR em alguns

casos apresentaram uma alteração de forma, não sendo totalmente arredondados, mas alongados ou espiculados, assim verifica-se que o método de AgNOR pode ser referido como um bom método auxiliar diagnóstico para os casos de lesões de baixo grau (figura 15). Embora, em contradição com a literatura (ROWLANDS, 1988; CALORE *et al.*, 1997) que referem que as pacientes sem alterações no colo uterino e/ou com cervicite apresentam número de AgNOR não significativos em relação a NIC I, observou-se em nosso estudo um aumento significativo nos valores de AgNOR nas pacientes NIC I em relação as pacientes normais.

Nos casos de lesão de alto grau, observam-se valores mais expressivos, com uniformidade de pontos em NIC II figura 24 (E), entretanto a diferença do número e área de AgNORs entre os diagnósticos de NIC II e NIC III não são significantes, (tabela 2 e 3) enquanto que os valores entre NIC I e NIC II são extremamente significantes para o número e significantes para a área (tabela 2 e 3). A não significância observada entre os diagnósticos NIC II e NIC III favorecem realmente a unificação destas duas classificações em HSIL como ocorre na classificação de Bethesda. E NIC I em LSIL segundo Bethesda em um grau isolado.

Contudo os valores observados nas lesões para carcinoma escamoso invasivo são extremamente elevados em relação a número e área de AgNOR se comparados com os observados nos casos de lesão de alto grau. Esses dados são correspondentes com os da literatura que expressam valores de número de AgNOR crescentes de acordo com a gravidade da lesão (EGAN, *et al.*, 1988; EGAN, *et al.*, 1990).

Estes dados também são relatados por (ROWLANDS, 1988) onde refere que em neoplasia cervical podem ser observados pequenos aumentos de AgNOR em NIC I e NIC II, mas o aumento torna-se significativo em NIC III e Carcinoma *in situ*. O aumento não ocorre somente em número, mas, em tamanho e são mais proeminentes, dados também relatados por YOKOYAMA, *et al.* (1990), onde relata que o número de AgNOR em displasia moderada e displasia severa é significativamente mais alto que seu número em células escamosas cervicais

normais. No entanto, segundo estes autores, a diferença entre o número de AgNORs em carcinoma *in situ* e carcinoma escamoso invasivo não é significativa.

Nos casos de pacientes NIC II diagnosticados citologicamente, verifica-se um aumento significativo de número e área de AgNOR, bem como uma uniformidade entre estes pontos como mostra a figura 24 (E), e também uma maior deformidade morfológica dos mesmos, mostrando-se categoricamente alongados ou espiculados (figura 17), onde verificamos que o método de AgNOR pode ser auxiliar diagnóstico da diferenciação dos casos de lesão de baixo e alto grau também por este aspecto.

Segundo YOKOYAMA e colaboradores (1990) e SAKAI (2001), os pontos de AgNOR são significativamente mais elevados nos casos de lesão de alto grau quando comparados com pacientes normais e refere que nos casos de displasia que progrediram os pontos são significativamente mais elevados que os casos que regrediram.

Nos casos de NIC III, figura 24 (F), os pontos referentes ao número de AgNOR e a relação área apresentam-se pouco uniformes desqualificando a tendência de que apresentavam que com o aumento da gravidade da lesão melhor era a uniformidade de valores. Isto se deve ao fato de que, por estarmos seguindo a classificação citológica de Richard, e esta unifica em NIC III os casos de displasia severa e câncer *in situ*, os valores apresentados para os dados de pontos AgNORs apresentam-se mais dispersos. O que pudemos observar é que em displasia severa (NIC III), os AgNORs seguem os mesmos parâmetros apresentados nos casos anteriores, somente que com valores de pior prognóstico; mas nos casos de câncer *in situ* (NIC III) os AgNORs são maiores e em menor número do que os esperados seqüencialmente, ocupando conseqüentemente, uma área de AgNOR maior (figura 19). Portanto, na figura 22, observa-se os valores de média de número de AgNOR em NIC III, onde são relativamente iguais aos valores de NIC II (NIC II 5,97 \cong NIC III 6,31), pois a média torna-se mais baixa quando são contados os pontos dos casos câncer *in situ* juntamente com os de displasia severa (NIC III). Esta técnica de contagem é

recomendada segundo CROCKER *et al.*, (1989) que menciona que os AgNOR podem ser contados unitariamente e quando aparecem em grupos sobrepostos também são contados unitariamente.

Contudo, na figura 24 (G), verificamos os pontos referentes aos valores de número e área de AgNOR dos casos de carcinoma escamoso invasivo. Neste caso, observamos uma linearidade de valores com média elevada, muito acima dos valores dos casos de lesões pré-malignas. Os pontos tornam-se muitos pequenos e alterados em sua forma, apresentou-se pulverizados pelo núcleo, demonstrando uma total desorganização nuclear (figura 21). O número de AgNOR é muito significativo quando comparado com NIC III (tabela 2). Estes aspectos creditam a técnica de AgNOR como mais um referencial auxiliar diagnóstico nos casos de alterações cervicais escamosas.

Os pontos AgNOR aumentam com o número de cromossomos acrocêntricos, pois estão presentes no braço curto destes cromossomos. Quando em casos de tumor os AgNOR não aparecem somente nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos, devido a irregularidades no nucléolo, encontrados nestas células malignas, aparecendo portanto pulverizados pelo núcleo. Assim sendo, em contraste com as células normais, as células malignas freqüentemente demonstram alterações de AgNOR em número, forma e tamanho (TRENT, *et al.*, 1981).

Os valores apresentados para o número e área de AgNOR, em todos os casos analisados, refletem uma tendência progressiva para esses parâmetros, demonstrando ser esta Técnica um método válido e útil como auxílio diagnóstico, nas lesões de colo uterino.

Em uma segunda análise reorganizamos os dados de todos os pacientes de maneira a estudá-los de acordo com as alterações observadas no exame colpocópico. Através do teste com ácido acético realizado durante a colposcopia, no qual ocorre à coagulação das proteínas e o epitélio escamoso torna-se progressivamente opaco, de acordo com a gravidade da lesão.

Observa-se na figura 25 e 26 um aumento crescente do número e área de AgNOR, em relação às alterações colposcópicas observadas. Verifica-se um discreto aumento dos valores nos casos de epitélio aceto-branco em referência ao padrão normal, pois este tipo de epitélio somente demonstra a presença do vírus HPV, sem normalmente referirem necessariamente a presença de uma lesão de baixo ou alto grau, como ocorre normalmente em epitélio em pontilhado. Entretanto no caso de epitélio em mosaico o aumento dos valores de número e área de AgNOR torna-se mais evidentes demonstrando uma lesão aparente e de maior gravidade. No caso de presença de epitélio com vasos atípicos, demonstra notoriamente uma intensa atividade celular irregular e normalmente a presença de uma lesão característica de malignidade, corroborando pelo maior número de pontos de AgNOR pulverizados pelo núcleo com aumento conseqüente da área ocupada pelos mesmos. Segundo EGAN & CROCKER (1988), o número de AgNOR pode ser correlacionado com o conteúdo de DNA, tendo um número baixo de AgNOR em células normais e HPV, embora ligeiramente maiores e um aumento progressivo de AgNOR em displásicas e neoplásicas.

Na figura 27 (A) temos os pontos dos valores dos números e de área de AgNOR em pacientes avaliadas como normais pelo exame colposcópico. Observa-se que os valores de número de pontos de AgNORs mantêm-se sempre abaixo dos valores tidos como normais para células escamosas de acordo com a literatura, (BUCKLEY, *et al.*, 1982) no epitélio aceto-branco, como mostra a figura 27 (B), verifica-se uma maior proximidade dos pontos, embora ainda mantendo-se próximo dos valores normais, pois estas alterações conotam a presença do vírus HPV e, normalmente sem alterações citológicas relevantes. A diferença de número de AgNOR entre epitélio aceto-branco e normal são significantes, demonstrando portanto a presença de lesão (tabela 4).

A figura 27 (C) mostra número e área de AgNOR nos casos classificados como epitélio em pontilhado, estes valores são mais elevados que no caso anterior, e provavelmente classificados citologicamente como lesão de baixo grau.

Nos epitélios em mosaico, apresentados na figura 27 (D), verifica-se uma maior homogeneidade dos pontos e um aumento progressivo dos valores de

número e área de AgNOR em relação ao epitélio em pontilhado. Este tipo de epitélio normalmente é observado em pacientes classificados citologicamente como de alto grau. Os valores de número e área AgNOR são muito significativos quando comparados com pontilhado (tabela 4 e 5). Em relação à forma dos AgNOR, estas se apresentam alteradas, perdendo o padrão arredondado.

Nas alterações colposcópicas com presença de vasos atípicos são classificadas citologicamente como câncer *in situ* e carcinoma escamoso invasivo. Observa-se que o número e área de AgNOR são mais elevados, apesar destes serem menores e dispersos pelo núcleo, demonstrando uma grande desorganização celular bem como uma atividade celular intensa. Estes valores são nitidamente diferentes em relação aos valores demonstrados nos casos apresentados com colposcopia normal e significativa (tabela 4 e 5) quando comparados com epitélio em mosaico, portanto devem ser considerados e observados durante a avaliação diagnóstica.

Segundo MUSCARA (1996), os AgNORs são vistos como simples pontos em células não malignas, enquanto que em células malignas são irregulares e disformes e em maior número. Concluindo que a área e a distribuição dos pontos são parâmetro que contribuem para um diagnóstico clínico patológico mais preciso e útil como prognóstico, influenciando a subsequente terapêutica.

Reorganizamos novamente os dados das pacientes, de acordo com os resultados histológicos, preconizado como diagnóstico de certeza. Verificamos que o número e a área dos pontos AgNOR aumenta de maneira crescente a produzir uma reta linear, onde o maior número de pontos e a maior área são observados nos casos de lesão de maior gravidade. Estes resultados podem ser observados nas figuras 28 e 29.

Na figura 30 (A), verifica-se os pontos de número e área de AgNOR em pacientes com resultados de HPV pela histologia. Observamos que os pontos estão relativamente dispersos o que corresponde aos mesmos dados observados nos casos de pacientes de HPV pela citologia, isto sugere novamente que em alguns casos não há uma desestruturação a nível celular com aumento da

atividade celular, mas somente uma invasão da célula pelo vírus que subsequente pode ser eliminado ou tornar-se latente sem provocar doença. Desta maneira algumas destas células apresentam pouca atividade celular, portanto menor número de AgNOR e em menor tamanho, enquanto que outros já apresentam uma maior atividade celular resultante de um início de progressão à displasia.

Pois segundo PLOTON *et al.*, (1984); GIRI *et al.*, (1989); DERENZINI *et al.*, (1990), a relação entre atividade proliferativa celular e AgNOR, é assim demonstrada através dos pontos AgNOR, sendo portanto esta técnica útil como uma chave da atividade celular e seu controle.

Entretanto na figura 30 (B), observa-se uma uniformidade maior no número de pontos e relação área de AgNOR, pois estes dados refletem pacientes diagnosticadas como NIC I pela histologia, onde se tem material celular com alterações significativas e portanto maior atividade celular. Observa-se também que o número de pontos de AgNOR supera o valor para células normais que é de 4 pontos, segundo literatura e, considerado extremamente significativo quando comparados com os casos HPV e muito significantes quando comparados com NIC II (tabela 6), em relação a área são significantes quando comparados com NIC II (tabela 7).

DONG (1997), em seus estudos mostra que a investigação por AgNOR pode ser correlacionada com o diagnóstico histológico, onde o método de AgNOR revela a atividade celular biológica do tumor através das alterações do número, tamanho e forma dos pontos de impregnação por prata.

Nos pacientes diagnosticados como NIC III pela histologia, figura 30 (D), observa-se uma uniformidade de pontos, com valores elevados para o número e área de AgNOR. Estes valores são significantes quando comparados com NIC II em relação ao número de AgNOR e não significantes em relação a área (Tabelas 6 e 7) e, portanto, podem ser agrupados como acontece em HSIL no Sistema Bethesda para o diagnóstico citológico.

Em relação à forma dos pontos de AgNOR (figura 31, e figuras 15,17,19,21) observamos que estes se tornam irregulares e espiculados, perdendo sua forma padrão que é redonda, de acordo com o aumento da gravidade da lesão, demonstrando uma desestruturação da organização celular.

Nos casos de câncer *in situ* (NIC III, HSIL), os pontos tornam-se em média menos espiculados e retomam o padrão arredondado (figura 19), só que em tamanho muito maior; sem teste estatístico para este grau de lesão. Verifica-se também uma queda na percentagem de formas espiculadas no caso de câncer *in situ*, retornando a aumentar drasticamente para os casos de carcinoma escamoso invasivo, onde os pontos são múltiplos, espiculados e pequenos, apresentando-se de forma pulverizada no interior no núcleo.

Portanto o uso adicional deste método seria de valia no estudo de lesões pré-malignas cervicais, pois de acordo com o Primeiro Consenso Brasileiro de HPV (2000), marcadores como o de AgNOR estão sendo estudados para sinalizar a tendência evolutiva das lesões neoplásicas intra-epiteliais (CARVALHO & OYAKAWA, 2000).

A análise de imagem citológica deve ser considerada como um método caracterizado por uma alta precisão e reprodutibilidade na determinação da área total de AgNOR por célula. O método de contagem é imprescindível e deve ser realizado conjuntamente com a análise da área do AgNOR (AUBELE, *et al.*, 1994; MAHOVLIC, *et al.*, 1999).

Avaliando as dados referentes ao material que apresenta metaplasia escamosa, observou-se, que estas células apresentam um número mais expressivo de pontos de AgNOR e um valor área maior que as células escamosas normais e inflamatórias, pois estas células apresentam maior atividade celular por estarem em transformação de tecido cilíndrico em escamoso. Entretanto estes pontos de AgNOR apresentam menor área e número que os encontrados em lesões pré-malignas. Verifica-se, portanto, que o emprego da técnica de AgNOR em metaplasia deve ser melhor avaliado.

Assim segundo COLORE *et al.*, (1997); ROCHER (2002), significativas diferenças são encontradas entre esfregaços normais, inflamatórios, com metaplasia escamosa e cada grau de displasia, onde se pode concluir que a técnica de AgNOR pode ser útil para evolução de interpretações duvidosas nos esfregaços vaginais. Esta técnica pode ser útil na histologia e importante na citologia cervical onde a contagem de AgNORs para diferenciar inflamatório de células metaplásicas e de células pré-malignas e para diferenciar os graus de displasia em esfregaços vaginais. Este método pode ser útil em casos individuais aumentando a sensibilidade e especificidade da leitura da rotina de citologia cervical.

Observou-se também em análise posterior, embora não se tenha feito um estudo aprofundado, que o método de coloração de Shorr, por ser uma técnica que melhor evidencia a cromatina nuclear sua condensação e suas alterações, melhor mostrou os pontos negros intranucleares de depósito de proteína associadas às regiões organizadoras nucleares (NORs) que são corados pela prata reduzidas a micronúcleos. Os pontos observados na técnica de coloração de Shorr como pontos avermelhados no interior do núcleo, provavelmente correspondem em forma e tamanho aos mesmos pontos que seriam impregnados pela prata na técnica de AgNOR.

Portanto, se após minuciosa análise do material cervical uterino, através da técnica citológica, a conclusão diagnóstica for duvidosa, pode-se empregar o técnica de AgNOR como método auxiliar mais objetivo.

Atualmente, novas técnicas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de melhorar a acurácia do exame citopatológico, destacando-se entre elas a citologia em meio líquido ou citologia em camada delgada, que diminui a sobreposição celular, obtendo-se uma amostra mais uniforme, facilitando o emprego de outras técnicas diagnósticas (EIFEL & LEVENBACK, 2005).

Assim, além da técnica de AgNOR ser de fácil execução e baixo custo, este procedimento torna-se ainda mais simples quando se emprega o método de camada delgada na execução da análise citológica. Pois, além da maior

quantidade de material disponível, esta metodologia em camada delgada, facilita a análise de imagem permitindo uma contagem automatizada dos AgNORs bem como a medida de sua área relativa mais aprimorada. Portanto, com o advento da citologia em camada delgada o emprego da técnica de AgNOR busca sanar de maneira rápida, segura e objetiva as dificuldades encontradas na realização deste importante exame laboratorial.

7 – CONCLUSÃO

A Técnica de AgNOR em material citológico do epitélio cervical uterino mostrou índices de correlação positiva, associadas às metodologias de Diagnóstico Citológico, Diagnóstico Colposcópico e Diagnóstico Histológico. Considerando-se a progressão das lesões, demonstrou ser útil na diferenciação entre:

Diagnóstico Citológico

- ASCUS e NIC I;
- NIC I e NIC II;
- NIC III e carcinoma escamoso invasivo.

Diagnóstico Colposcópico

- Epitélio normal e epitélio aceto-branco;
- Epitélio em pontilhado e epitélio em mosaico;
- Epitélio em mosaico e vasos atípicos.

Diagnóstico Histológico

- HPV e NIC I;
- NIC I e NIC II;
- NIC II e NIC III.

Portanto, conclui-se que a Técnica de AgNOR é eficiente, e que apresenta resultados que propicia uma melhor análise do material cervical uterino e que pode ser empregada com maior ênfase naqueles casos onde os demais exames possam gerar dúvidas.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, F.S. Câncer ginecológico: perspectivas. **Acta Oncológica Brasileira**. v.14, p.70-79. 1994.

AGARWAL, P.K.; MEHROTRA, A.; CHANDRA T. Diagnostic relevance of silver stained nucleolar organizer region (AgNORs) in benign and malignant breast lesions. **Indian J Exp Biol**. v.33, n.10, p.715-720.1995.

ANDERSON, M. C. Cervical precancer. In: Symmers WStC, editor, Systemic Pathologic. **Female Reproductive System**. London: Churchill Livingstone, 91-104, 1991.

AUBELE, M. et al. Guidelines of AgNOR quantitation. **Zentralbl Pathol**. v. 140, p. 107-108. 1994.

AUGUSTO, A . et al. Sobre a história natural do câncer do corpo uterino. Um estudo retro e prospectivo. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**. v. 92, n. 6, p. 317-324. 1982.

BARROS, R. M. G. Análise crítica do método de detecção das (NORs) AgNOR na avaliação prognóstica do carcinoma epidermóide de boca. 1999. 80 f. Dissertação (mestrado em Patologia). Faculdade de Odontologia. Universidade de São Paulo. São Paulo.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. Técnicas de citologia e histologia. V.1. Livros Técnicos Científicos. Rio de Janeiro. 1976.

BENEDET, J.L. A quality control program for colposcopic practice. **Obstet Gynecol**. v.78, p.872-875. 1991.

BEZERRA, A. L.R.; BRANDT, C.T. Carcinoma da cérvix uterina no estado de Pernambuco: fatores prognósticos. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**. v.41, p.11-18. 1996.

BIBBO, M. et al Ploidy patterns in cervical dysplasia. **Analytical Quantitative Cytology and Histology**. v.7, p.213-217. 1985.

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

BIBBO, M.; LONGATTO FILHO, A. Derrames cavitários. Aspectos clínicos e laboratoriais. **Revinter**. Rio de Janeiro. 2001.

BÖHM, N.; SANDRITTER, W. DNA in human tumors: a cytophotometric study. **Current Topics in Pathology**. v.60, p.151-219. 1975.

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.

BOSCH, F.X. et al. Prevalence of human papillomavirus in human cervical cancer: A worldwide perspective. **Journal of National Cancer Institute**. v. 87, p.796-802. 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: **INCA**. p.92. 2003.

BROWN, D. C. ; GATTER, K. C. Monoclonal antibody ki-67: it is use in histopatology> Histopatology. V. 17, n. 6, p.489-503. 1990.

BUCKLEY, C. H.; BUTLER, E. B.; FOX, H. Cervical intraepithelial neoplasia. **J Clin Pathol**. v. 35, p. 1-13. 1982.

BURGHARDT, E. Premalignat conditions of the cervix. **Clinical Obstetritcs and Gynecology**. v. 3, p.257-294. 1976.

CALABRETTA, B.; BASERG, R. Control of cell growth and diferentiation. In: Hoffman,R. et al. **Hematology**. p.59-69. 1991.

CALORE, E. E. et al. Silver staining method for nucleolar organizer regions in cervical smears. **Diagnostic Cytopathology**. v. 16, n. 6. p. 497-499. 1997.

CALORE, E. E. et al. Study of organizer nucleolar regions by the argyrophil technique in cervical intraepithelial neoplasias. **Minerva Ginecol**. v. 49, p. 59-62. 1997.(a)

CAMARA, P. A. D. Papilomavírus Humano. Agente causal ou casual do carcinoma do colo uterino? **GO**. v. 2, n. 5. 1993.

CARBAJO, S. et al. Expression of silver-stained nucleolarorganizer regions is coupled to cell cycle in rat thymic cells. **Cytometry**. v.14, n.1, p.46-52. 1993.

CARDILLO, M. R. AgNOR counts are useful in cervical snears. **Diagn Cytopathol**. v. 8, n. 3, p. 208-210. 1992.

CARNEIRO, S. S.; MOREIRA, M. A . R.; ALMEIDA NETTO, J. C. HPV e câncer do colo uterino. **Revista de patologia Tropical**. v. 33, n.1, p. 01-20. 2004.

CARRERA, J.M.; DEXEUS, S.; COPES, F. Tratado y atlas de colposcopia. 3 ed, **Salvat Editores**, p. 6-10. 1974.

CARVALHO, J. J. M.; OYAKAWA, N. I consenso Brasileiro de HPV. 1 ed. **BG Cultural**. São Paulo. 2000.

CHAOUKI, N. et al. The viral origin of cervical cancer in Rabat, Morocco. *International Journal of Cancer*. v.75, p.546-554. 1998.

CHIDA, T.; AJIOKA, Y.; Watanabe, H. Use of nucleolar organizer regions in the histopathological diagnosis of colorectal epithelial neoplasia. *Jpn J Clin Oncol*. v.22, n.2, p. 73-78. 1992.

CHATTOPADHYAY, A. AgNORs in tumoral pathology. Review of literature and observations on the technic and reaction in normal oral epithelium. *Indian J Dent Res*. v. 4, n. 2, p. 47-53. 1993.

COLLACO, L. M.; PINTO, A. P. Aspectos citológicos na coloração de papanicolaou da associação de HPV com displasias e carcinoma do colo uterino. *Jornal Brasileiro de Ginecologia*. v. 104, n. 11/12, p. 419-421. 1994.

CORTES-GUTIERREZ, E. I. et al. Polymorphism of Ag(+)-NORs in cervical smears from women with cervical cancer. *Anal Quant Cytol Histol*. v. 23, n. 1, p. 9-14. 2001.

CROCKER, J.; NAR, P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol*. v.151, p.111-8, 1987.

CROCKER, J.; SKILBECK, N. Nucleolar organizer regions associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. *J. Clin. Pathol*. v.40, p. 885-889, 1987.

CROCKER, J; EGAN, M. J. Correlation between NOR sizes and numbers in on Hodgkins lymphomas. *J.Pathol*. v. 156, p.23-29, 1988.

CROCKER, J.; MCGOVERN, J. Nucleolar organizer regions in normal, cirrhotic, and carcinomatous livers. *J.Clin, Pathol*. v. 41, p.1044-1048, 1988a.

CROCKER, J., BODDY, D. A. R.; EGAN, M. J. How should we count Ag-NORs? Proposals for a standardized approach. *J. Clin. Pathol*. v.158, p.185-188, 1989.

CROCKER, J. Nucleolar Organizer Regions. In: Current topics in pathology. **Ed. J.C.E.** New York, 1990.

CROCKER, J. Nucleolar organizer regions. *Pathol*. v.82 p.91-149, 1990 a.

CUZICK, J. et al. Human papillomavirus type 16 DNA in cervical smears as a predictor of high-grade cervical cancer. *Lancet*. v.339, p.959-960. 1994.

DERENZINI, M.; PESSION, A.; TRERÉ, D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in câncer cells. **Lab Invest.** v.63, n. 1, p. 137-140. 1990.

DERENZINI, M. et al. Interphasic nucleolar organizer regions distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant ephitelial tumors of human intestine. **Virchows Arch.B Cell Pathol.** v.54, p.334-340, 1998.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron.** v . 31, p. 117-120. 2000.

DERENZINI, M.; TRERE, D. Silver-satined nucleolar organizer regions (AgNOR). **Pathologica.** v. 93, n. 2, p. 99-105. 2001.

DERVAN, P.A. et al. Breast carcinoma kinetics: argyrophilic nucleolar organizer region counts correlate with ki-67 scores. **Am.J.Clin.Pathol.** v. 92, p.401-407, 1989.

DÍAZ, C.A.; Aragón, M. Correlación citológica e histológica de las imágenes colposcópicas en el diagnóstico de neoplasia cervical. **Rev Colomb Obstet Ginecol.** v. 43, p.122-123. 1992.

DIXON, K.; KOPRAS, E. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. **Cancer Biology.** 2004. (*in press*).

DOBIGNY, G. et al. Ag-NORs are not always true NORs: new evidence in mammals. **Cytogenet Genome Res.** v. 98, n. 1, p. 75-77. 2002.

DORES, G. B. et al Diagnóstico da infecção cervicovaginal por papilomavírus humanos. Valor da colposcopia, citologia e da histologia como métodos diagnósticos. **Paul Medical.** v. 109, n. 3, p.102-108. 1991.

DONG, D. Morphometric determination of AgNORs in ovarian cancer cells. Bronx High Scholl of Science. 1997. Disponível em <http://oak.cc.connocolledu/~ddon/biol,htm>. Acesso em: 07 de novembro de 2003.

EGAN, M.J.; CROCKER, J. Nucleolar organizer regions in cutaneous tumours. **J.Pathol**, v.154, p.247-253, 1988.

EGAN, M.J. et al. Nucleolar organizer regions in fibrous proliferations of childhood and infantile fibrosarcoma. **J. Clin. Pathol.** v.41, p.31-33, 1988.

EGAN, M.; FREETH, M.; CROCKER, J. Untraepithelial neoplasia, human papilloma virus infection and argyrophilic nucleoprotein in cervical epithelium. **Histopathology.** v. 13, p. 561-567. 1988 a.

EGAN, M.; FREETH, M.; CROCKER, J. Relationship between intraepithelial neoplasia of the cervical and the size and number of nucleolar organizer regions. **Gynecologic oncology**. v.36, p. 30-33. 1990.

EIFEL, P.; LEVENBACK, C. Câncer do trato genital inferior feminino. Revinter. **Rio de Janeiro**. 2005.

FAKAN, S.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus and the nucleolar organizer regions. **Biology of the cell**. v. 56, p. 189-206. 1986.

FEJGIN, J.C. Diagnostic value of colposcopic in the investigation of cervical neoplasia. **Am J Obstet Gynecol**. v. 137, p. 588-590. 1990.

FERRIGNO, R.; FARIA, S.L.C.O . Prevenção do câncer cérvico-uterino: perfil das mulheres com câncer invasor. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.38, p.29-33. 1992.

FILIPPIN, C. et al. Estudos sobre a variação interobservadores em citologia cérvico-vaginal. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 32, n. 4, p. 239-242. 2000.

FOCCHI, J.; TERREIRO, L. M.; RIBALTA, J. C. L. Displasia cervical. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**. v. 97, n. 9, p. 449-454. 1987.

FRANCO, P.; GALLEGU, G. Evaluación de la colposcopia en el estudio de las pacientes con neoplasia cervical. **Rev Colomb Obstet Ginecol**. v. 43, p. 208-211. 1992.

FU, Y.S.; REAGAN, J.W.; RICHART, R.M. Definition of precursors. **Gynecologic Oncology**. v.12, p. 220-231. 1981.

FU, Y.S.; HALL, T.L. DNA ploidy measurements in tissue sections. **Analytical Quantitative Cytology**. v.7, p.90-95. 1985.

FUGITA, K.; TAKU, T.; SASAKI, M. Experimental production of lingual carcinoma in ham: tumor characteristics and site of formation, **J Dental Res**. V. 52, n. 6, p.1176-1185.1973.

GENOVA, G. et al. Argyrophilic nucleoproteins of the epithelium in HPV infection and intrepithelial neoplasia. **Pathologica**. v. 83, n. 1086, p.461-466. 1991.

GIRI, D. D. et al. Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in bening and malignant breast lesions: correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. **Journal of Pathology** . v. 157, p. 307-313. 1989.

GOMPEL, C.; KOSS, L. Citología ginecológica e suas bases anatomoclínicas. **Manole**. São Paulo. 1997.

GONZÁLEZ, A.; JIMÉNEZ, M.E. Experiencia en el diagnóstico colposcópico en un centro de patología cervicouterina a nivel regional. **Rev Colomb Obstet Ginecol** v.44, p. 49-52. 1993.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S.E. Visualization of Nucleolar Organizer Regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**. V.53, p.37-50,1975.

GROOS, G. E.; BARRASSO, R. Infecção por Papilomavírus humano. Atlas clínico de HPV. **Artmed**. Porto Alegre. 1999.

GUTIÉRREZ, E. I. C.; ELIZONDO, E. L.; GARZA, C. H. L. Estudio de la Inestabilidad Cromosómica y de la Actividad Transcripcional (18s y 28s) en Pacientes con Cáncer Cervicouterino. **Salud Publica e Nutricion**. v. 1, n.2, 2000.

HABERLAND, C, et al. AgNOR-analyse bei astrocytomen deskindesalters. **Zentralbl Neurochir**. v .57, p.511, 1996.

HALL, T. L.; FU, Y.S. Applications of quantitative microscopy in tumor pathology. **Laboratory Investigative**. v. 53, p. 5-21.1985.

HALL, P. A.; COATES, P. J. Assesment of cell proliferation in phatology – what next? **Histopatolgy**. V. 26, p. 105-112. 1995.

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

HANSELAAR, A.G.J.M. et al. DNA-cytometry of progressive and regressive cervical intraepithelial neoplasia. **Analytical Cellular Pathology**. v.16, p.11-27. 1998.

HANSEN, A. B.; OSTERGAARD, B. Nucleolar organizer regions in hiperlastic and neoplastic prostatic tissue. **Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol**. v.417, p.9-13,1990.

HEINZL, S. et al. Observations on the development of dysplasia. **Acta Cytologica**. v. 26, n.4. 1982.

HERRINGTON, C.S. Human papillomaviruses and cervical neoplasia. II. Interaction of HPV with other factors. **Journal of Clinical Pathology**. v.48, p.1-6. 1995.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolar organizer regions. **Biol. Cell.** v. 49, p. 191-202. 1983.

HERZBERG, A. J.; SILVERMAN, J. F. Color atlas of normal cytology. **Churchill Livingstone.** Philadelphia. 1999.

HIGGINSON, J. Environmental carcinogenesis. **Cancer.** v.72, n.3, p. 971-977. 1993.

HIRSCHOWITZ, L. et al. Long term follow-up of women with borderline cervical smear results: effects of age and viral infection on progression to high grade dyskaryosis. **British Medical Journal.** v.304, p.1209-1212. 1992.

HOFSTÄTER, F.; KNÜCHEL, R.; RÜSCHOFF, c. Cell proliferation assessment in oncology. **Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.** v. 427, n.3, p. 323-341. 1995.

HOWELL, W. M; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia.** v. 36, 1980.

HOWELL, W. M. Visualization of ribosomal gene activity: Silver stains proteins with RNA-r transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma.** v. 62, p. 361-367. 1982.

HUBBELL, H., ROTHBLUM, L. I.; HSU, T. C. identification of a silver binding protein associated with the cytological silver staining of actively transcribing nucleolar regions. **Cell biology International Reports.** v. 3, n. 7. 1979.

INCA. Periodicidade de realização do exame preventivo do câncer de colo uterino. **Revista Brasileira de Cancerologia.** n.48, v.1 p. 13-15. 2002.

IWATA, H. et al. Validation of silver-stained nucleolar organizer regions for evaluation of invasive character of urinary bladder carcinoma in rats and mice. **Urol Res.** v.23, n.1, p.27-32. 1995.

JAKOBSEN, A.; BAEK KRISTENSEN, P.; KVIST POULSEN, H. Flow cytometric classification of biopsy specimens from cervical intraepithelial neoplasia. **Cytometry.** v, 4, p.166-169.1983.

JELEN, M. et al. Nucleolus organizer regions (AgNORs) and Ki-67 antigens expression from the cervix and cervical canal smears with respect to changes in ASCUS and AGUS (atypical cells of undetermined significance) according to Bethesda Cytological System of Classification. **Ginekol Pol.** v. 73, n. 12, p. 1192-1198. 2002.

JOHNSON, G.C.; MILLER, M.A.; RAMOS-VARA, J.A. Comparison of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) and mitotic index in distinguishing benign from malignant canine smooth muscle tumors and in separating inflammatory hyperplasia from neoplastic lesions of the urinary bladder mucosa. **J Vet Diagn Invest.** v. 7, n.1, p.127-136.1995.

KASHYAP, S. et al. Nucleolar organizer regions and morphologic subtypes of squamous cell carcinoma of cervix. **Indian J Pathol Microbiol.** v. 41, n.3, p. 303-308. 1998.

KINLEN, L.J.; SPRIGGS, A.I. Women with positive cervical smears but without surgical intervention. **Lancet.** v.2, n.6. p.463-465, 1978.

KLUG, A. Structure of viruses of the papilloma-polyoma type: II. Comments on other works. **Journal of Molecular Biology** . v.11, p.424-431. 1965.

KLUG, A. FINCH, I.T. Structure of viruses of the papilloma-polyoma type. I. Human wart virus. **Journal of Molecular Biology.** v. 11, p.403-423.1965.

KOBAYASHI, I. et al. The proliferative activity in displasia and carcinoma in situ of the uterine cervix analysed by proliferating cell nuclear antigen immunostaining and silver-binding argyrophilic nucleolar organizer region staining. **Human pathol.** v.24, p. 198-202, 1994.

KOSS, L. G. The Papnicolaou test for cervical cancer detection. **The Journal American of Medical Association.** v.261, n. 5, p. 737-743. 1989.

KRUGER, S.; STAHLHUT, M.; MULLER, H. cell cycle-dependent AgNOR analysis in invasive breast cancer. **Anal Quant Cytol Histol.** v. 22, n. 5, p. 358-363. 2000.

LAHSHMI, S. et al. Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in inflammatory pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. **Cancer Lett.** v. 30, n.71(1-3), p. 197-201. 1993.

LEVILE, A. J.; et al. The rolo of the p53 tumour suppressor gene in tumorigenesis. **Br. J. Cancer.** v.69, n.3, p. 409-416.1994.

LI, Q. et al. Argyrophilic nucleolar organizer regions. A revised version of the Ag-NOR-staining technique. **Histochem Cell Biol.** v.104, n.2, p.145-150. 1995.

LINDNER, L. E. Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). **Journals of Histochemistry e Cytochemistry.** v.41, n.3, p. 439-445. 1993.

LIRA NETO, J. B. Atlas de citopatologia e histologia do colo uterino. Medsi. Rio de Janeiro. 2000.

LOPES, E.R.; et al. Comportamento da população feminina em relação ao câncer cérvico-uterino. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**. v.105, p.505-516. 1995.

LOSI, L. et al. Interphase cytogenetic and Agnor analyses of hydatidiform moles. **J Clin Pathol**. v. 51. p. 438-443.1995.

MAHOVLIC, V. et al. Digital image analysis of silver-stained nucleolar organizer region-associated proteins in endometrial cytologic samples. **Anal Quant Cytol Histol**. v.21, n.1, p. 47-53. 1999.

MAKINEN, K. et al. Ag-NORs related to flow cytometry, morphometry and prognosis in patients with pancreatic cancer. **Anticancer Res**. v.13, n. 1, p. 157-160. 1993.

MARBAIX, E. et al. Nucleolar organizer regions in the normal and carcinomatous epithelium of the uterine cervix. A morphometric study. **Int J. Gynecol Pathol**. v. 8, n. 3, p. 237-245. 1989.

MAREFAT, M. P. The effect of the shortdose schedule of DMBA application in inducing lingual neoplasia in inbred Syrian hamster. **J. Oral Pathol**. v. 14, n. 5, p. 383-389. 1985.

MARTIN, H. et al. Nucleolar organizer region-associated proteins in cancer cells. Quantitative investigations on gliomas, meningiomas, urinary bladder carcinomas and pleural lesions. **Anal Quant Cytol Histol**. v. 14, n.4, p.61 312-319. 1992.

MATOLSCSY, A. et al. Nucleolar organizer regions of megakaryocytes in chronic myeloproliferative disorders. **Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol**. v.420, p. 441-5, 1992.

MCDERMOTT, N. et al. Ploidy profile of morphologically normal squamous epithelium adjacent to high grade cervical intraepithelial neoplasia. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**. v.104, p.623-625. 1997

MCINDOE, W.A.; MCLEAN, M.R.; JONES, R.W. The invasive potential of *carcinoma in situ* of the cervix. **Obstetrics and Gynecology**. v. 64, p.451-458. 1984.

MEISELS, A.; MORIN, C. Human papillomavirus-induced changes and The human papillomaviruses and cancer of the uterine cervix. In: *Cytopathology of the uterus*. 2 ed. **ASCP**, 1997.

MERLO, J.G. Diagnóstico precoz del cáncer genital femenino. **Salvat Editores**, p. 31-62. 1981.

MINAMOTO, H. et al. Tumour cell and stromal features in metastatic and non-metastatic non-small cell lung carcinomas. **Histopathology**. v. 43, p. 427-443. 2003.

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

MORIN, C. et al. Cytologic Predictors of cervical intraepithelial neoplasia in women with an ASCUS pap smear. **Acta Cytologica**. V.44. n.4. 2000.

MOURAD, W.A. et al. Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma. Correlation with DNA flow cytometry, histopathology, and lymph node status. **Cancer**. v. 69, n.7, p.1739-1744. 1992.

MOURAD, W.A. et al. The correlation of two argyrophilic nucleolar organizer region counting methods with bromodeoxyuridine-labeling index: a study of metastatic tumors of the brain. **Hum Pathol**. v. 24, n.2, p.206-210. 1993.

MURTY, V. V. V.; MITRA, A. B.; SHARMA, J. K. Nucleolar organizer regions in patients with precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. **Cancer Genetics and Cytogenetics**. v. 18, p. 275-279. 1985.

MUSCARA, M. et al. Gallbladder Carcinoma: A video image análisis of AgNOR distribution and its relation to tumour stage and grade. **Path. Res. Pract.** v.192, p. 407-413. 1996.

NARDOZZA, L. M. M. et al. Avaliação comparativa entre a citologia, a colposcopia e a histopatologia nas displasias leve e moderada na puerparidade . Conduta proposta. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**. v. 103, n. 7, p. 243-247. 1993.

NASIELL, K.; NASIELL, M.; VACLAVINKOVA, V. Behaviour of moderate cervical dysplasia during long-term follow up. **Obstetrics and Gynecology**. v. 61, p.609-614. 1983.

NASIELL, K.; NÄSLUND, I.; AUER, G. Cytomorphologic and cytochemical analysis in the differential diagnosis of cervical epithelial lesions. **Analytical Quantitative Cytology**. v. 6, p.196-200. 1984.

NASIELL, K.; ROGER, V.; NASIELL, M. Behaviour of mild cervical dysplasia during long term follow-up. **Obstetrics and Gynecology**. v. 67, p.665-669. 1986.

NEVILLE, D. W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C. M. Patologia epithelial in _____ Patologia oral & maxilofacial. **Guanabara Koogan**. Rio de Janeiro. 1998.

NUOVO, G.J.; RICHARD, R.M. A comparison of slot blot, Southern blot, and *in situ* hybridisation analysis for human papillomavirus in genital tract lesions. **Obstetrics and Gynaecology**. v. 74, p.673-678. 1990.

NUOVO, G.J. Detection of human papillomavirus in Papanicolaou smears: correlation with pathologic findings and clinical outcome. **Diagnostic of Molecular Pathology**. v.7, p.158-163, 1998.

ODUKOIA, O.; SHKLAR, G. Initiation and promotion and experimental oral carcinogenesis. **Oral Surg**. v.58, n.3, p.315-320. 1984.

OETTLÉ, E. E.; WELDHAGEN, A. A. A modified Shorr's stain: a practical rapid stain for canine vaginal cytology. *J S Afr Vet Assoc*. v. 53, n. 4, p. 267-268.1982.

OHNN, T. et al. Nucleolar organizer regions in bone tumors. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, n.272, p.287-91, 1991.

OLERT, J. Cytological and histochemical studies on the mechanism of the selective silver staining of nucleolus organizer regions (NORs). **Histochemistry**. v. 60, p. 91-99. 1979.

PAPADIMITRIOU, C. S. et al. Nucleolar organizer regions in the normal, hyperplastic cancer endometrium. **Virchows Arch B Cell Pathol**. v.60, p.155-160. 1991.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.; DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Journal of Cancer**, v.37, p.4-66, 2001.

PEDAL, W. P. et al. Location of nucleolar organizer regions (AgNORs) in the nuclei of astrocytic tumors. **Clin Neuropathol**. v.14, n. 1, p.55-61. 1995.

PELUSI, G. et al. AgNOR protein quantity of cervical smears correlates with that of histological sections in cervical intraepithelial neoplasia. **Eur J Histochem**. v. 41, n. 2., p.105-110. 1997.

PLATE, K. H, et al., Proliferative potential of human brain BRAIN TUMOURS, as assessed by nucleolar organizer regions (Ag-NORs) and ki-67 immunoreactivity. **Acta neurochir**. v.104, p.103-109. 1990.

PLATE, K. H.; Ruschoff, J.; Mennel, H. D. Application of the AgNOR technique to neurooncology. **Acta Histochem Suppl**. v.42 p. 171-178. 1992.

PLOTON, D.; MANEGER, M.; ADNET, J. Simultaneous high resolution localization of Ag-NOR proteins and nucleoproteins in interphase and mitotic nuclei. **Histochemical J**. v. 16, n. 897-906. 1984.

PLOTON, D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem J.** v. 18, p. 5-14, 1986.

PUING-TINTORÉ, L. M. et al. Colposcopia digital em la neoplasia cervical intraepithelial, Correlacion histológica e utilidad clinic. **Prog Obstet Ginecol.** v.44, p.490-496. 2001.

RABENHORST, S. H.; BURINI, R. C.; SCHMITT, F. C. L. Marcadores de proliferação celular. **Revista Brasileira de Patologia Clínica.** V. 29, n. 1, p. 24-29. 1993.

RAY, J. G.; CHATTOPADHYAY, A.; CAPLAN, D. J. Usefulness of AgNOR counts in diagnosing epithelial dysplasia. **J. Oral Pathol Med.** v. 32, n. 2, p. 71-76. 2003.

REEVES, B. R.; CASEY, G.; HARRIS, H. Variations in the activity of nucleolar organizer in different tissues, demons by silver staining of human normal and leukemic cells cancer gent. **Cytogenet.** v .6, p.223-230. 1982.

REIS, A. F. F. et al. Valor da citologia e da biópsia dirigida pela colposcopia no diagnóstico das neoplasias cervicais uterinas. **Jornal Brasileiro de Ginecologia.** v. 102, n. 5, p. 163-167. 1992.

REZENDE FILHO, J. et al. Neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC). Aspectos atuais da etiologia e do tratamento. **Jornal Brasileiro de Ginecologia.** v. 103, n. 5, p. 147-151. 1993.

ROBBINS, S. L.; ANGEL, M. Basic Pathology. 2 ed. **W B Saunders Press.** Philadelphia. 1976.

ROBBINS, S. L. et al. Patologia estrutural e functional. **Guanabara Koogan.** 5 ed. Rio de Janeiro. 1996.

RUBIN, E.; FARBER, J. L. Patologia. **Interlivros.** Rio de Janeiro. 1990.

ROSA, J.; MEHTA, A., FILIPE, M. I. Nucleolar organizer regions in gastric carcinoma and its precursor stages. **Histopathology.** v. 16, n.3, p.265-269. 1990.

ROCHER, A. E.; PALAORO, L. A.; BLANCO, A . M. Técnica de detección de la región del organizador nucleolar en células exfoliadas de cuello uterino. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.** v. 36, n. 3, p. 393-399. 2002.

RODRÍGUEZ, M. A. M.; CAMARGO, J. L. V.; Carcinogênese. In.: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Patologia: Processos gerais. 3 ed. **Ateneu.** SãoPaulo. 1992.

ROUSSEL, P.; HERNÁNDEZ-VERDUN, D. Cell biologic basic of AgNOR staining. **Virchows Arch. A Patho Anat Histopathol.** v. 427, n. 3, p. 326-327. 1995.

ROWLANDS, D. C. Nucleolar organizing regions in cervical intraepithelial neoplasia. **J Clin Pathol.** v. 41, p. 1200-1202. 1988.

ROWLANDS, D. C.; AYRES, J. G; CROCKER, J. The effect of different fixatives and length of fixation time on subsequent AgNOR staining for frozen and paraffin-embedded tissue sections. **Histochem J.** v.25, n.2, p.123-132. 1993.

RUSCHOFF, J. et al. Silver-stained nucleolar organizer proteins in urothelial bladder lesions. A morphometric study. **Pathol Res Pract.** v.188, n.4-5, p.593-598. 1992.

RUSCHOFF, J. et al. Nucleolar organizer regions and glycoprotein-hormone alpha-chain reaction as markers of malignancy in endocrine tumours of the pancreas. **Histopathology.** v.22, n.1, p.51-57. 1993.

SAHIMATA, N. K. et al. Atipias glandulares em esfregaços cérvico-vaginais: correlação cito-histológica. **Jornal Brasileiro de Ginecologia.** v. 106, n. 9, p. 341-344. 1996.

SAKAI, Y. I. et al. Morphometric evaluation of nucleolar organizer regions in cervical intraepithelial neoplasia. **Pathology Res. Pract.** v. 197, p. 189-192. 2001.

SANTOS, F. G. A. et al. Apoptose em tumor venéreo transmissível canino: características morfológicas e evidenciação bioquímica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v.53, n. 5, p. 557-562. 2001.

SANTOS, A. L. F. *et al.* Performance of cervical cytology with review by different observers and hybrid capture II in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia grades 2 and 3. **Saúde Pública.** v.19, n.4, p.1029-1037. 2003.

SAWAYA, G. F. et al. Current approaches to cervical-cancer screening. **N. Engl J Med.** v.344, n.21. p. 1603-1607. 2001.

SCHMIADY, H.; MÜNKE, M.; SPERLING, K. Ag-staining of nucleolus organizer regions on human prematurely condensed chromosomes from cells with different ribosomal RNA gene activity. **Exp Cell Res.** v. 121. p. 425-428. 1979.

SCHNEIDER, M. L.; SCHNEIDER, V. Atlas de diagnóstico diferencial em citologia ginecológica. Rio de Janeiro: **Revinter.** 1998.

SCULLY, E. et al. Histologic typing of female genital tract tumours. World Health Organization. International Histological Classification of Tumours, 2th, Ed., **Springer-Verlag**, Berlin, 1994.

SHIBUJA, K.; et al. **BMC Cancer**. v .2, n. 1 p. 37. 2002.

SHIRATA, N. K. et a.al. Celularidade dos esfregaços cervicovaginais: importância em programas de garantia de qualidade em citopatologia. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**. v. 108, n. 3, p. 63-66. 1998.

SHIRO, T. et al. A correlation of argyrophilic nucleolar organizer regions with stages of hepatocellular carcinoma. **Cancer**. v.171, p. 44-49, 1993.

SINGER, A.; MONAGHAN, J. M. Colposcopia – Patologia e Tratamento do Trato Genital Inferior. 2ed. **Revinter**. Rio de Janeiro, 2002.

SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. **Micron**. v. 31, p.121-126. 2000.

SMITH, P. J. et al. The effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. **Journal of pathology**. v. 155. p. 109-112. 1988.(a).

SOOMRO, I.; PATEL, N.; WHIMSTER, W. F. Distribution and estimation of nucleolar organizer regions in various human lung tumours. **Pathol. Res. Pract.**, v.187, p.6872, 1991.

SPRIGGS, A.I.; BOWEY, C.E.; COWDELL, H. Chromosomes of precancerous lesions of the cervix uteri. **Cancer**. v.27, p.1239-1254. 1971.

STAFIL, A, WILBANKS, G.D. Terminología internacional de la colposcopia. Reporte de la nomenclatura de Comité de la Federación Internacional de Patología Cervical y Colposcopia. **Obstet Gynecol**. v.77, p.26-28. 1991.

SURESH, U. R. et al. Do Agnor counts reflect cellular ploidy or cellular proliferation? A study of trophoblastic tissue, 1989.

SUZUKI, N. C. et al. Carcinoma de colo de útero com possíveis metástases cerebrais: relato de um caso incomum. **Acta Oncológica Brasileira**. v. 15, n. 2, p. 18-83. 1995.

TAKAHASHI, M. Atlas color - Citologia del cancer. **Panamericana**. 2 ed. Buenos Aires. 1982.

TERLIKOWSKI, S. et al. Diagnostic value of nucleolus organizer regions (NORs) in premalignant and malignant lesions of the cervix. **Ginekol Pol.** v. 69, n. 5, p. 232-236. 1998.

THERÈ, D. Critical analysis of the methods commonly employed in the assessment of cell proliferation advantages of the NOR silverstaining technique in routine cytohistopathology. **Anal. Cell Pathol.** v.5, p. 191-201, 1993.

THERÈ, D. Technical and methodological aspects of silver staining and measurement of nucleolar organizer region (NOR). **Zentralbl Pathol.** v. 140, p. 11-14. 1994.

TREERE, D.; MIGALDI, M.; TRENTINI, G.P. Higher reproducibility of morphometric analysis over the counting method for interphase AgNOR quantifying. **Anal Cell Pathol.** v. 8, n.1, p.57-65. 1995.

TREERE, D. Quantitative analysis of AgNOR proteins: a reliable marker of the rapidity of cell duplication and a significant prognostic parameter in tumor pathology. **Adv Clin Path.** v. 2, n.4, p. 261-270. 1998.

THERÉ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron.** v. 31, p. 127-131. 2000.

THIELE, J.; FISCHER, R. Bone marrow tissue and proliferation markers: results and general problems. **Virchows Arch. A Pathol. Ant. Histopathol.** v.423, p.409-419, 1993.

TIDBURY, P.; SINGER, A.; JENKINS, D. CIN 3: the role of lesion size in invasion. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology.** v.99, p.583-586. 1992.

TOSI, P. et al. Prognostic factors in invasive cervical carcinomas associated with human papillomavirus (HPV). Quantitative data and cytokeratin expression. **Pathol Res Pract.** v. 188. n. 7, p. 866-873. 1992.

TRENT, J. M.; CARLIN, D. A.; DAVIS, J. R. expression of silver-stained nucleolar organizing regions (AgNORs) in human cancer. **Cytogenet. Cell. Genet.** V. 30, p. 31-38. 1981.

UNDERWOOD, J. C. F.; GIRI, D.D. Nucleolar organizer regions are diagnostic discriminations for malignancy. **J.Pathol.** v. 155, p. 95-96. 1995.

VIDAL, B. C. et al. Quantitative evaluation of AgNOR in liver cells by high-resolution image cytometry. **Anal Cell Pathol.** v. 7, n. 1, p. 27-41. 1994.

VIDAL, C; MELLO, M. L. Re-evaluating the AgNOR staining response in Triton X-100-treated liver cells by image analysis. **Anal Cell Pathol.** v. 9, n.1, p.39-43. 1995.

WALKER, R. A. The histopathological evaluation of nucleolar organizer region proteins. **Histopathology**. v.12, n.3, p. 221-223. 1988.

WALSH, C.B. et al. DNA quantification is technically feasible and of value in cervical smears samples: possible applications for determination of progression in low grade dyskaryosis. **Cytopathology**. v.6, p.88-94, 1995.

WATANABE, M.; et al. Interphase cytogenetic and AgNOR analyses of hydatidiform moles. **J Clin Pathol**. v. 51, p. 438-443. 1998.

WETHICH, D. W. Analysis of the factors involved in the colposcopic evaluation of 2,194 patients with anormal PAP smears. **Am J Obstet Gynecol**. v.154, p.1339-1342. 1986.

WIERZCHNIEWSKA, A.; WAGROWSKA-DANILEWICZ, M.; DANILEWICZ, M. Value of AgNOR counts and morphometric analysis of nucleolar parameters in premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. **Pol J Pathol**. v. 49, n. 4, p. 297-301. 1998.

WRIGHT, T. C.; FERENCY, A . Bening disease of the cervix. In: Kurman RJ. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. 4 Ed. **Springer-Verlag**, New York, p.203-227. 1994.

WRIGHT, T. C. et al. Interim guidance for the use of Human Papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. **Obstet Gynecol**. v. 103, p. 304-309. 2004.

YANG, A. H.; WANG, T. Y.; LIU, H. C. Comparative study of the prognostic value of nuclear grade and silver-binding nucleolar organizer regions in renal cell carcinomas. **J. Pathol**. v.166, p.157-161, 1992.

YOKOYAMA, Y. et al. Nucleolar organizer regions in malignant transformations of uterine cervix. **Gynecologic oncology**. v. 39, p. 309-313. 1990.

ZUR HAUSEN, H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific HPV types. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 86, p.131-156. 1994.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Meu nome é **Carla Filippin** e estou desenvolvendo a pesquisa “**Estudo citomorfológico de lesões do colo uterino – análise comparativa de diversas metodologias**”, com o objetivo de **permitir uma análise mais precisa das lesões do colo uterino**. Este estudo é necessário **porque algumas lesões do colo uterino são de difícil detecção** e será realizada **coleta de material cervical** como procedimentos, bem como a coleta de dados do prontuário médico. Isto não traz riscos e desconfortos, mas esperamos que traga melhora no controle e tratamento de lesões do colo uterino, como benefícios. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone 331-9712. Se você estiver de acordo em participar, posso garantir que as informações fornecidas serão confidenciais e o material coletado só será utilizado neste trabalho.

Assinaturas:

Pesquisador principal _____
Carla Filippin

Pesquisador responsável _____
Cidônia de Lourdes Vituri

Eu, _____, fui esclarecida sobre a pesquisa “**Estudo citomorfológico de lesões do colo uterino – análise comparativa de diversas metodologias**” e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Florianópolis ____/____/____

Assinatura: _____ RG: _____