

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

**CITOMETRIA DE IMAGEM DO CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR DE
CÉLULAS EPITELIAIS DO COLO UTERINO**

SABRINA GONÇALVES

**Florianópolis
2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**CITOMETRIA DE IMAGEM DO CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR DE
CÉLULAS EPITELIAIS DO COLO UTERINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientador:

Prof. Dr. Celso Spada

Florianópolis

2006

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Citometria da Universidade Federal de Viçosa – MG, coordenado pelo Professor Dr. Carlos Roberto de Carvalho (Departamento de Biologia Geral) e pelo professor Dr. Celso Spada (Departamento de Análises Clínicas, CCS) da Universidade Federal de Santa Catarina.

Dedico este trabalho aos meus avós maternos, Manoel Biolo e Onilda Carletto Biolo, por me inspirarem com sua força, coragem e determinação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por minha existência, por tudo que vivenciei, por me permitir concretizar mais um sonho e dar mais um passo em minha caminhada e, principalmente, por semear em mim o amor incondicional e a compreensão perante as adversidades.

Aos meus pais, Lisandro e Maria Inês, por minha vida, por representarem a bússola da minha existência e por tornarem possível tudo que sou.

Aos meus avós Manoel e Onilda, que desencarnaram deixando uma lacuna e saudade da presença física, mas a certeza de que não nos separamos.

Ao professor e amigo, Celso Spada, por todos os seus ensinamentos, pela confiança, por todas as oportunidades, por direcionar minha busca pelo conhecimento e por me mostrar que a capacidade crítica pode caminhar junto com a humildade.

À professora e amiga, Patrícia Haas por acreditar em mim, por me fazer compreender o sentido de muitas palavras, em especial, dedicação, compromisso e ciência e, principalmente, por me ensinar que as dificuldades nunca serão maiores do que a vontade de superá-las.

Agradeço imensamente ao professor Carlos Roberto de Carvalho, Universidade Federal de Viçosa, por ser paciente e generoso e pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, assumindo os riscos inerentes a esta atitude.

À doutoranda Maria Andréia Corrêa Mendonça da Universidade Federal de Viçosa, pela colaboração profissional.

Agradeço a colaboração da Dra. Clarisse Salete Fontana e do Dr. Luciano Rangel, da divisão de Tocoginecologia do Hospital Universitário, e também ao Dr. Paulo Roberto da Cunha, ginecologista do SASC/HU, que com carinho coletaram as amostras necessárias para execução desta pesquisa.

Aos professores Alexandre Sherlley C. Onofre e Alfred Bocking, do Instituto de Citopatologia da Alemanha, pelo fornecimento da maioria dos artigos utilizados neste estudo.

Às sempre amigas Juliana Helena Chávez e Vanessa Müller, por todo o incentivo, atenção, carinho, cumplicidade e por me ensinarem o verdadeiro significado da amizade.

Ao meu amigo Iuri Campana, que surpreendeu a todos com sua passagem precoce ao plano espiritual, mas que deixou muita saudade em cada coração que o amava.

Aos amigos Regina Fellipi, Débora Denardin Luckemeyer, Amanda de Fátima Dias Carvalho, Araceli Aparecida Hastreiter, Luciana Cristina Chávez, Thiago Caon, Mara Dagmar Prando da Silveira, Elaine Nunes Daminelli, Irma Luiza Christmann e Marcelo Blatislav por toda amizade e compreensão.

A Senhora Helena Maria Xavier Faraco, enfermeira do Ambulatório de Ginecologia do Hospital Universitário, pelo apoio incondicional recebido.

À Secretaria do Programa de Pós-graduação em Farmácia, por disponibilizar todo o suporte técnico.

A CAPES por tornar financeiramente possível a concretização desta etapa da minha vida.

À Universidade Federal de Santa Catarina, por possibilitar minha formação profissional e humana e por não me fazer esquecer que o acesso à educação deve ser um direito inerente a todos.

A cada momento que fez parte desta maravilhosa experiência, por ter me transformado e por promover a busca incessante da transformação.

A todas as pessoas e situações que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, as quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser humano, a minha eterna gratidão,

Sabrina Gonçalves

Florianópolis, 2006.

“Se não puder se destacar pelo talento, vença pelo esforço”.

Dave Weinbaum

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana”.

Louis Pasteur

RESUMO

Na luta contra a malignidade cervical e seus precursores, vários métodos diagnósticos adjuvantes tem sido propostos para aumentar a acurácia de diagnósticos citológicos. A aneuploidia cromossomal tem sido aceita como um evento chave precoce na tumorigênese causada pela instabilidade genética. A aneuploidia do DNA, equivalente citométrico de aneuploidia cromossomal, detectado pela citometria de imagem, pode servir como um marcador de neoplasia. Durante as últimas décadas, o aparecimento de uma nova geração de *hardware* com alta capacidade de armazenagem juntamente com a utilização de *software* apropriado, tem facilitado o desenvolvimento de elevado desempenho dos sistemas de citometria de imagem. Um consenso internacional sobre a aplicação clínica da citometria tem sido alcançado. Entretanto, no Brasil esta técnica ainda não é utilizada para complementar o *screening* citológico. O objetivo deste trabalho foi padronizar a metodologia de citometria de imagem para avaliar o conteúdo de DNA nuclear de células escamosas do colo uterino. Os resultados demonstraram que os procedimentos envolvendo o preparo da lâmina, fixação e coloração do DNA pela reação de Feulgen, foram apropriados para obtenção dos valores de densidade óptica integrada, que foram reescalados em termos de valor-C relativo à ploidia do DNA. Além disso, a análise do DNA de lesões cervicais revelou resultados diplóides e poliplóides, confirmando a utilidade da citometria de imagem como um método adjuvante adequado para diagnóstico e prognóstico de lesões intra-epiteliais cervicais e carcinoma cervical invasivo. A excepcional eficiência do sistema de análise de imagem, empregado neste estudo, foi possível realizar análises de epitélios com custos relativamente baixos, quando comparado aos sistemas de citometria utilizados nos Países desenvolvidos. Isto nos permite inferir que a implementação deste sistema de análise de imagem pode facilitar o seu uso na rotina laboratorial em diversos centros de prevenção e controle de câncer de colo uterino.

Palavras-chave: citometria de imagem, conteúdo de DNA, citopatologia cervical, lesão intra-epitelial escamosa, papilomavírus humano.

ABSTRACT

“DNA image cytometry of epithelial cells cervix”

In the fight against cervical malignancy and its precursors, several adjuvant diagnostic methods have been proposed to increase the accuracy of cytologic diagnoses. Because chromosomal aneuploidy has been accepted as an early key event in tumorigenesis caused by genetic instability. The DNA aneuploidy, cytometric equivalent of chromosomal aneuploidy, detected by image cytometry may serve as a marker of neoplasia. During the last decade, the appearance of a new generation of hardware with storage capacities together with the development of appropriate software has facilitated the development of high performance image cytometry systems. International consensus on the clinical application of image cytometry has been reached. However, in Brazil this technique is still not used to complement cytological screening. The objective of this work was to standardize the methodology of image cytometry to evaluate nuclear DNA content of squamous cells of the cervix. The results had demonstrated that the procedures involving the preparation of the smear, fixation and DNA staining for the Feulgen reaction had been appropriate for attainment of the values of integrated optical density, that had been scaling in terms of relative c value for ploidy of the DNA. Moreover, the DNA analysis of cervical lesions disclosed resulted diploid and polyploid, confirming the utility of the image cytometry as an adjuvant method suitable for the diagnosis and prognosis of cervical intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma. The bonanza efficiency of the analysis of image system, used in this study, was possible to carry through analyses of epithelial with relatively low costs, when compared with the used cytometry systems in the developed countries. This in allows to conclude that the implementation of this image analysis system can facilitate to its use in laboratorial routine in diverse prevention centers and control cervical cancer.

Key words: image cytometry, DNA content, cervical cytopathology, squamous intraepithelial lesion, human papillomavirus.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ASC	American Society of Cytopathology
ASC	Células escamosas atípicas
ASC-H	Células escamosas atípicas, não é possível excluir uma HSIL
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
CA	Carcinoma invasivo
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CV	Coeficiente de variação
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DOI	Densidade óptica integrada
DST	Doença sexualmente transmissível
EBV	Vírus de Epstein-Barr
ESACP	<i>European Society for Analytical Cellular Pathology</i>
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
G0	Fase <i>gap</i> 0 do ciclo celular
G1	Fase <i>gap</i> 1 do ciclo celular
G2	Fase <i>gap</i> 2 do ciclo celular
HBV	Vírus da hepatite B
HCl	Ácido clorídrico
HPV	Papilomavírus humano
HSIL	Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau
IFCPC	Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JEC	Junção Escamo Colunar
KSHV	Herpesvírus do sarcoma de Kaposi
LSIL	Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau
N/C	Proporção núcleo/citoplasma
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
NIC I	Neoplasia intra-epitelial cervical grau I

NIC II	Neoplasia intra-epitelial cervical grau II
NIC III	Neoplasia intra-epitelial cervical grau III
NILM	Negativo para lesão intra-epitelial e malignidade
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia de polimerase
q.s.p	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
S	Fase de síntese celular
SIL	Lesão intra-epitelial escamosa
spp	Espécies
TBS	Sistema Bethesda
TCA	Ácido tricloroacético
UV	Raios ultravioleta
ZT	Zona de transformação

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura da ectocérvice: CT= tecido conectivo, BM= membrana basal, L1= células basais (1 camada), L2= células parabasais (2 camadas), L3= células intermediárias (aproximadamente 8 camadas), L4= células superficiais (5 ou 6 camadas) e L5= células exfoliando. **20**
- Figura 2.** Zona de transformação (ZT): epitélio escamoso normal (estrela vermelha), metaplasia escamosa (estrela verde) com algumas células endocervicais remanescentes (flecha azul). **21**
- Figura 3.** Representação esquemática do ciclo biológico do HPV nos queratócitos. **27**
- Figura 4.** ASC-US - Núcleos aumentados, porém perfil nuclear ainda liso, discreta granularidade da cromatina. (obj. 40x). **32**
- Figura 5.** LSIL - Células intermediárias com aumento nuclear, cromatina finamente granular, hipercromatismo e coilocitose. (obj. 40x). **33**
- Figura 6.** HSIL - Agrupamento celular com discariose severa, citoplasma pouco visível e hipercromatismo acentuado. (obj. 40x). **33**
- Figura 7.** HSIL com suspeita de futura invasão: Agrupamento celular com discariose severa, citoplasma pouco visível, e hipercromasia proeminente. Cromatina grosseiramente granular com zonas de clareamento em um dos núcleos. Fundo do esfregaço hemorrágico. (obj. 40x). **34**
- Figura 8.** Amostra do conjunto de imagens capturadas de núcleos de células epiteliais da cérvix (caso **Pil_02**) e do padrão epitélio bucal, utilizada para fazer a medida da densidade óptica integrada. Barra 10 µm. **67**

Figura 9. Amostra do conjunto de imagens capturadas de núcleos de células epiteliais da cérvix (caso **Pil_05**) e do padrão epitélio bucal, utilizada para fazer a medida da densidade óptica integrada. Barra 10 μm . **68**

Figura 10. Amostra do conjunto de imagens capturadas de núcleos de células epiteliais da cérvix (caso **T_06**) e do padrão epitélio bucal, utilizada para fazer a medida da densidade óptica integrada. Barra 10 μm . **69**

Figura 11. Amostra do conjunto de imagens capturadas de núcleos de células epiteliais da cérvix (caso **T_13**) e do padrão epitélio bucal, utilizada para fazer a medida da densidade óptica integrada. Barra 10 μm . **70**

Figura 12. Amostra do conjunto de imagens capturadas de núcleos de células epiteliais da cérvix (caso **Pil_04**) e do padrão epitélio bucal, utilizada para fazer a medida da densidade óptica integrada. Barra 10 μm . **71**

Figura 13. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **Pil_02**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide (normal), *Stemline* em 2c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B). **74**

Figura 14. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **T_07**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide (normal), *Stemline* em 2c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B). **75**

Figura 15. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **Pil_05**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA poliplóide, *Stemline* em 2c e picos menores em 4c e 8c; 5cEE > 0 e 9cEE = 0 (B). **76**

Figura 16. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **T_06**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide, *Stemline* em 2c e pico menor em 4c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B). 77

Figura 17. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **T_01**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide, *Stemline* em 2c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B). 78

Figura 18. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **T_02**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide, *Stemline* em 2c e pico menor em 4c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B). 79

Figura 19. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **T_03**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide, *Stemline* em 2c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B). 80

Figura 20. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **T_12**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide, *Stemline* em 2c e pico menor em 4c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B). 81

Figura 21. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **T_13**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA poliplóide, *Stemline* em 2c e picos menores em 4c e 8c; 5cEE > 0 e 9cEE = 0 (B). 82

Figura 22. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **Pil_03**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide, *Stemline* em 2c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B).

83

Figura 23. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **Pil_04**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide, *Stemline* em 2c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B).

84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação das classificações citológicas de Papanicolaou – 1942, Regan – 1953, Richart – 1967 e Sistema Bethesda – 2001.	35
Tabela 2. Sistemas de citometria de imagem, distribuidores e número de usuários.	47
Tabela 3. Correlação de diagnóstico citopatológico, frequência de células com conteúdo de DNA > 5c e > 9c e grau de oncogenicidade do HPV.	53
Tabela 4. Correlação de ploidia do DNA, diagnóstico citopatológico e grau de oncogenicidade do HPV.	53
Tabela 5. Algoritmos para a diferenciação entre euploidia e aneuploidia em histogramas de DNA da cérvix uterina.	65
Tabela 6. Comparação entre o número de núcleos do epitélio bucal (padrão de referência), número de núcleos do epitélio cervical (anteriormente diagnosticados pelo Papanicolaou como NILM, ASC-US, LSIL ou HSIL) em relação a MODA da DOI por lâmina.	72
Tabela 7. Distribuição da ploidia nas amostras citológicas.	85

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE COLO UTERINO	17
2.2	HISTOLOGIA DO APARELHO GENITAL FEMININO	19
2.3	CARCINOGENESE	22
2.3.1	<i>Carcinogênese Química</i>	23
2.3.2	<i>Carcinogênese por Radiação</i>	24
2.3.3	<i>Carcinogênese Viral</i>	24
2.4	CLASSIFICAÇÕES CITOLÓGICAS	30
2.5	SISTEMA BETHESDA	31
2.6	DIAGNÓTICO LABORATORIAL	37
2.6.1	<i>Exame Citopatológico</i>	37
2.6.2	<i>Colposcopia e Exame Histopatológico</i>	40
2.6.3	<i>Exame Imunocitoquímico</i>	42
2.6.4	<i>Biologia Molecular</i>	43
2.6.5	<i>Citometria de Imagem</i>	45
3	OBJETIVOS	56
	OBJETIVO GERAL	56
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
4	MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1	APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA	57
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	57
4.3	GRUPO CONTROLE	58
4.4	GRUPO DE INCLUSÃO	58
4.5	GRUPO DE EXCLUSÃO	58
4.6	ESTUDO CEGO	59
4.7	AVALIAÇÃO CITOPATOLÓGICA	59
4.8	ANÁLISE DAS AMOSTRAS	60
4.8.1	<i>Preparação dos espécimes citológicos</i>	60
4.8.2	<i>Citometria de imagem</i>	63
5	RESULTADOS	66
5.1	BIBLIOTECA DE IMAGENS	66
5.2	RESOLUÇÃO DO SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGEM	72
5.3	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA DAS AMOSTRAS	74
6	DISCUSSÃO	86
7	CONCLUSÕES	94
8	PERSPECTIVAS	96

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
ANEXO 1.....	113
ANEXO 2.....	116

1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical apresenta prognóstico bastante favorável, todavia no Brasil continua sendo um problema de saúde pública, com 19.260 novos casos estimados para o ano de 2006 (INCA, 2005). Isso porque apenas 30% das mulheres submetem-se ao exame citopatológico pelo menos três vezes na vida, o que resulta em diagnóstico já na fase avançada da moléstia, em 70% dos casos (MOTTI *et al.*, 2005).

Com a introdução do diagnóstico citológico das lesões pré-malignas cervicais, as alterações podem ser identificadas em esfregaços, permitindo selecionar mulheres que possam ser tratadas em uma fase inicial, antes que sinais ou sintomas viessem a ocorrer (KOSS, 1989).

Entretanto, vários estudos, como os de Gompel, 1974; Rylander, 1976; Foltz, 1978; Ceccini, 1985 E Van Der Graaf, 1987, chamaram a atenção sobre resultados falsamente negativos, já que o exame citológico é um processo complexo, trabalhoso, cujo resultado final depende inteiramente da habilidade do profissional que faz a análise (GOMPEL & KOSS, 1997; CARVALHO & OYAKAWA, 2000).

Cabe ao clínico a análise crítica das alterações citológicas mínimas, pois a maioria das pacientes não apresenta sinais detectáveis no momento do exame. Entretanto, um contingente não-desprezível de pacientes alberga alterações virais mínimas ou quadros mais graves no espectro de lesões intra-epiteliais de colo e da vagina. As estatísticas mundiais demonstram que aproximadamente 10% das pacientes com alterações citológicas indeterminadas irão desenvolver lesões intra-epiteliais de alto grau, sendo, portanto, necessário o uso de procedimento diagnóstico invasivo, como a biópsia, orientada pela colposcopia (CARVALHO & OYAKAWA, 2000).

Atualmente, a epidemiologia do câncer de colo uterino está bem estabelecida em relação à existência de um agente carcinogênico. Tanto os carcinomas escamosos, quanto os adenocarcinomas são uma consequência rara e desenvolvida em longo prazo, a partir de uma infecção viral com subtipos do Papilomavírus Humano (HPV). A prevalência mundial do DNA de

HPV em carcinomas cervicais é de 99,7% (RABELO, 2002; WALBOOMERS *et al.*, 1999).

Entretanto, aproximadamente 60% dos casos de condiloma (lesões verrucosas causadas pelo HPV) apresentam coilócitos (efeito citopático do Papilomavírus Humano) óbvios nos esfregaços. Conseqüentemente, cerca de um terço das infecções por HPV podem passar despercebidas citologicamente se o diagnóstico for baseado apenas no encontro de alterações coilocitóticas (CARVALHO & OYAKAWA, 2000).

Nos Estados Unidos das 13.000 mulheres que desenvolvem câncer cervical anualmente, aproximadamente 30% é em decorrência de erros na coleta das amostras e na interpretação do citopatologista em detectar a presença de células anormais na lâmina. Para reduzir esses erros, os Estados Unidos contam com novas tecnologias e testes adjuvantes (NUOVO *et al.*, 2001).

A citometria de imagem é uma das novas tecnologias que vem sendo utilizada com sucesso nos Estados Unidos e em outros Países desenvolvidos, como ferramenta diagnóstica auxiliar em casos duvidosos, diagnosticados na colpocitologia oncótica. Nestes Países, a citometria de imagem é aplicada com maior freqüência para solucionar casos de diagnóstico de ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado), e em casos que os critérios morfológicos para distinção da coilocitose de uma LSIL (lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau) variam entre os pesquisadores. Além disto, esta metodologia também tem oferecido subsídios para reconhecer alterações precoces do conteúdo genético da célula da porção vaginal do colo uterino, servindo como prognóstico de lesões malignas (HANSELAAR *et al.*, 2001; NUOVO *et al.*, 2001; BOCKING & NGUYEN, 2004).

No Brasil este método ainda não tem sido utilizado como complemento para análises laboratoriais de rotina. Logo, o objetivo principal do presente trabalho é padronizar a metodologia de citometria de imagem, para avaliar o conteúdo da ploidia de DNA nuclear de células escamosas do colo uterino e, conseqüentemente, disponibilizar esta técnica para outros laboratórios que possam ter interesse na sua implementação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE COLO UTERINO

Segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer) são dois os indicadores que caracterizam o câncer como problema de saúde pública no Brasil: o aumento gradativo da incidência e mortalidade e, o desafio que o mesmo representa ao SUS, no sentido de garantir o acesso pleno e equilibrado da população ao diagnóstico e tratamento da doença (BRASIL, 1999).

Os custos sociais do câncer, ainda que de difícil quantificação, são seguramente elevados. Para RICE & HODGSON, 1999, as implicações para os doentes, a família e a sociedade em geral são a dor, sofrimento, incapacidade e a morte, representando alguns anos de vida perdidos. Para a sociedade além do sentimento de perda ainda representam elevados recursos financeiros gastos e uma redução do potencial de trabalho humano.

Os gastos com assistência aos pacientes com neoplasias pelo SUS, no ano de 2000, foram de aproximadamente R\$ 713 milhões, representando 6,44% do total de gastos com assistência médica. O atendimento ambulatorial de alta complexidade oncológica absorveu 67% dos recursos, compreendendo os tratamentos com quimioterapia 55,2% e radioterapia 11,8%. Os demais recursos foram gastos com internações hospitalares (SBOC, 2000).

Atualmente o câncer se constitui na segunda causa de morte por doenças no Brasil. Somente na região Nordeste é que as neoplasias representam a terceira causa de morte por doença, ficando apenas 0,02% depois das doenças infecciosas e parasitárias (SERRANO, T., 2002).

À medida que nos deslocamos para o sul do País, as doenças cardiovasculares constituem-se na primeira causa de morte e os neoplasmas a segunda (INCA, 2001). Segundo a Secretaria de Estado da Saúde, no Estado de Santa Catarina, em conformidade com a tendência nacional, as neoplasias representam a segunda causa morte por motivos definidos desde 1997 (SES, 2004).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata que o câncer cervical tem uma incidência de 500.000 novos casos por ano no mundo, dos quais, 45% resultam em morte (IARC, 2002).

No Brasil, o câncer de colo uterino é o terceiro tipo de câncer mais freqüente em mulheres (em primeiro lugar está o câncer de pele e em segundo, o câncer de mama). A estimativa do número de novos casos por câncer de colo uterino invasivo para o ano de 2006 no Brasil é de 19.260 (INCA, 2005).

Para a região Sul do Brasil, foram estimados 3.840 casos de câncer de colo de útero, para o ano de 2006, ocupando o quarto lugar das neoplasias primárias. Já, no Estado de Santa Catarina e na respectiva Capital (Florianópolis), as estimativas para o mesmo ano, são de 670 e 50 casos desta neoplasia, respectivamente (INCA, 2005).

O câncer de colo uterino representa 10% de todos os tumores malignos em mulheres, embora seja uma doença de caráter preventivo, ainda está diretamente vinculada ao grau de desenvolvimento do país. Apesar do Brasil ter sido um dos primeiros países do mundo a introduzir o exame Papanicolaou para detecção precoce do câncer do colo uterino, a doença continua a ser um problema de saúde pública. Ao contrário do que ocorre nos países mais desenvolvidos, as taxas de mortalidade por esta doença continuam elevadas e, do ponto de vista cronológico, vêm aumentando no Brasil (VIVA MULHER, 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, 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).

A neoplasia de colo uterino, no entanto, por apresentar um crescimento indolente na maioria das lesões, por apresentar uma lesão precursora definida e por ter a medicina descoberto um método aparentemente efetivo de detecção precoce, o exame de Papanicolaou, é considerada uma doença que pode ser

prevenida, desde que os sistemas de acolhimento e encaminhamento das pacientes sejam eficazes.

2.2 HISTOLOGIA DO APARELHO GENITAL FEMININO

A histologia do aparelho genital feminino evidencia diversas variedades de tecidos; estes compreendem os revestimentos epiteliais dos diferentes órgãos e os tecidos de sustentação subjacentes (ELEUTÉRIO Jr, 2003).

O epitélio malpighiano ou pavimentoso estratificado não-queratinizado é encontrado nos lábios menores da vulva, na vagina e na parte externa do colo (exocérvice). Este epitélio se divide em três camadas: profundas, intermediárias e superficiais (ELEUTÉRIO Jr, 2003).

As camadas profundas são formadas de uma ou duas fileiras de células basais que se assentam na lâmina basal. Essas células mostram forma arredondada, medem cerca de 15 μm de diâmetro e têm um núcleo relativamente volumoso de 8 μm circundado por um citoplasma pouco abundante. São a sede das divisões celulares que permitem a renovação do epitélio em aproximadamente quatro dias (GOMPEL & KOSS, 1997; McKEE, 2001).

As camadas intermediárias formam o estrato mais espesso do epitélio normal. São várias camadas de células que crescem, progredindo em direção à superfície do epitélio. As células medem 15 a 40 μm de diâmetro e possuem um núcleo arredondado de 8 a 10 μm , com cromatina finamente granulosa. O citoplasma é cianófilo e contém glicogênio. A carga glicogênica aumenta sob a ação da progesterona e é máxima durante a gestação. A presença de junções celulares explica a descamação em aglomerados (GOMPEL & KOSS, 1997; McKEE, 2001).

As camadas superficiais são constituídas por células grandes, medindo 40 a 60 μm de diâmetro; representam a última etapa da maturação celular. Nas camadas mais superficiais do epitélio, os núcleos se tornam picnóticos (6 a 5 μm de diâmetro), se contraem e são envolvidos por uma zona citoplasmática clara, circular e estreita. O desaparecimento das junções celulares favorece a

descamação celular em forma de elementos isolados. O citoplasma claro é rico em filamentos intermediários protéicos de queratina (GOMPEL & KOSS, 1997; McKEE, 2001).

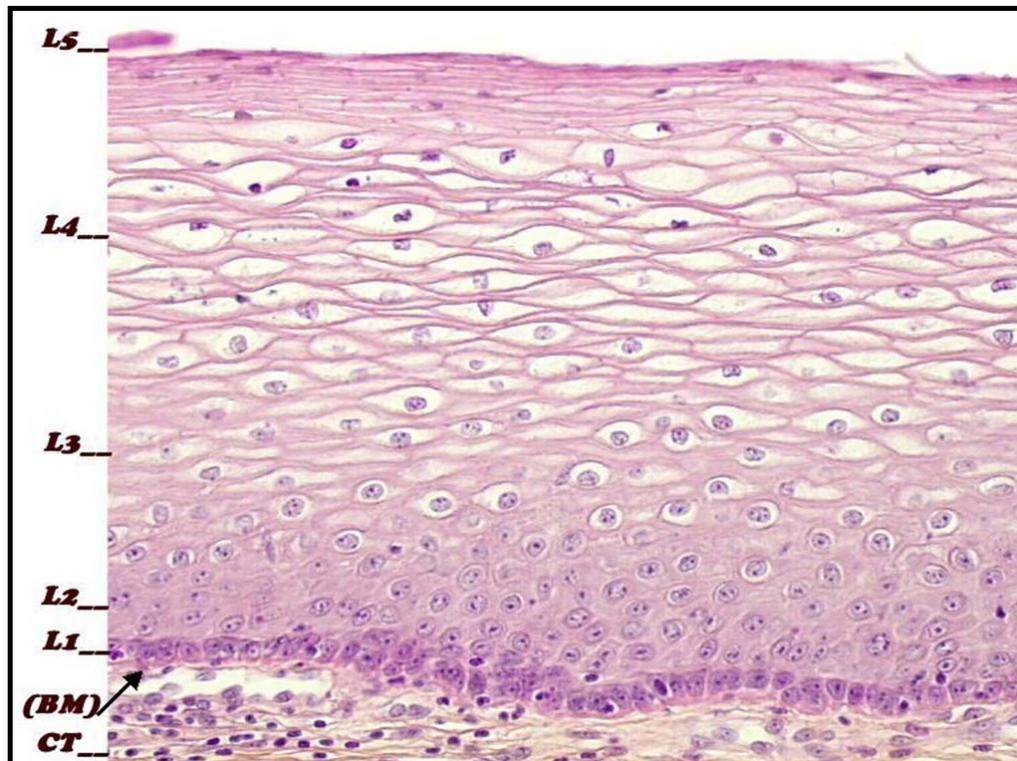


Figura 1. Estrutura da ectocérvice: CT= tecido conectivo, BM= membrana basal, L1= células basais (1 camada), L2= células parabasais (2 camadas), L3= células intermediárias (aproximadamente 8 camadas), L4= células superficiais (5 ou 6 camadas) e L5= células exfoliando. (Adaptado de: <http://screening.iarc.fr/atlashisto.php>). Acesso em: 14 de fevereiro de 2006.

O epitélio cilíndrico endocervical é composto por camada única de células cilíndricas secretoras de muco, cujas dimensões e características variam conforme a ação hormonal, sendo o muco mais fino durante o pico estrogênico periovulatório. A superfície do epitélio colunar é irregular com invaginações que se estendem até 8 mm no estroma cervical. Na base do epitélio endocervical, estão às células de reserva, importantes pela sua totipotencialidade, estando envolvidas no processo de reparo de lesões epiteliais e ensejando quadros de metaplasia (transformação de um epitélio maduro em outro epitélio maduro) (McKEE, 2001; ELEUTÉRIO Jr, 2003).

As alterações pré-malignas e malignas do câncer de colo uterino (onde o tipo mais comum é o carcinoma de células escamosas) ocorrem com maior

freqüência, 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).

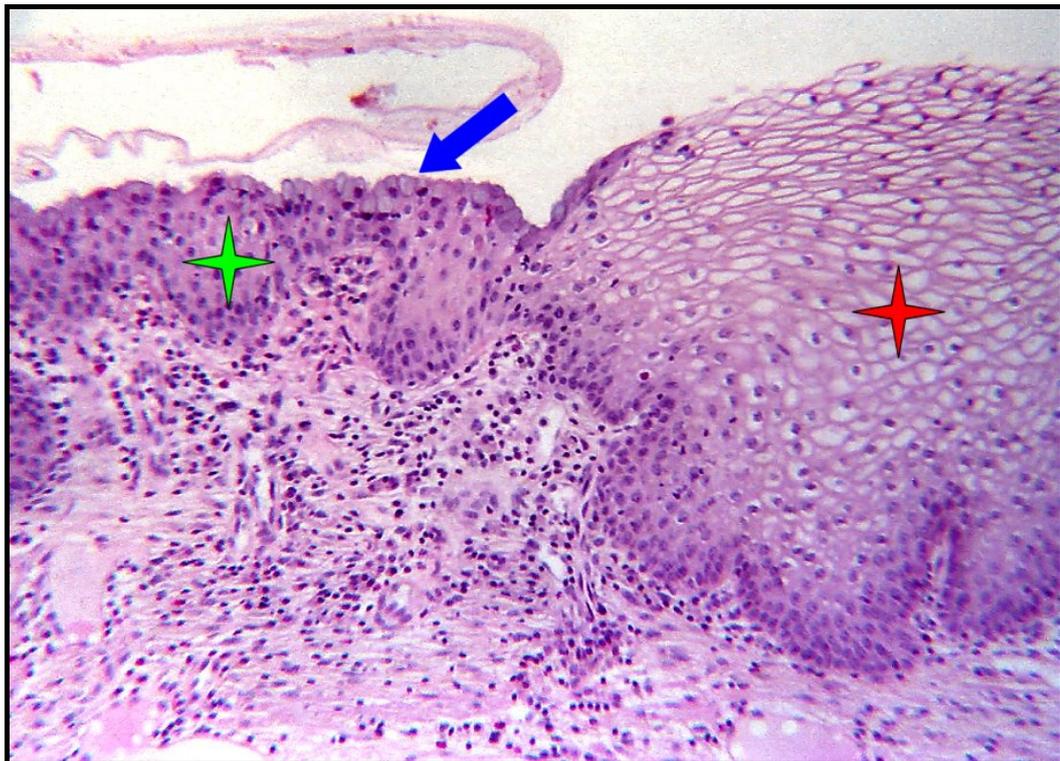


Figura 2. Zona de transformação (ZT): epitélio escamoso normal (estrela vermelha), metaplasia escamosa (estrela verde) com algumas células endocervicais remanescentes (flecha azul). (Adaptado de: <http://screening.iarc.fr/atlashisto.php>). Acesso em: 14 de fevereiro de 2006.

Em caso de ectopia, externalização da JEC em direção a 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 de reparação. Esse processo é a metaplasia, que é uma alteração reversível, na qual as células adultas são substituídas por outras células também adultas 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 as custas 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; COTRAN *et al.*, 1996).

SINGER & MONAGHAN, 2002, sugeriram que o comportamento da metaplasia escamosa “mantêm a chave para a compreensão da oncogênese cervical”.

2.3 CARCINOGENESE

No decorrer da vida, o DNA sofre alterações denominadas de mutações, que podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA, na divisão celular. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Muitas das mutações não implicam mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passam despercebidas. Outras mutações podem determinar a morte celular e, por conseqüência, não são, também, detectáveis. Assim, apenas um pequeno número de mutações que ocorrem em genes específicos pode determinar vantagens e um crescimento desordenado das células (RIBEIRO & MARQUES, 2003).

Os chamados agentes mutagênicos que vão alterar a sequência das bases no DNA, podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Após passar por várias divisões, uma célula poderá acumular mutações que, se em número elevado, poderão determinar a perda do controle de sua divisão, determinando, assim, o aparecimento do câncer (RIBEIRO & MARQUES, 2003).

Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar intrinsecamente ligados. A mutação é uma conseqüência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos inicia a formação do tumor. A literatura tem mostrado que mutações em vários genes críticos têm sido encontradas nas neoplasias. Os primeiros genes identificados foram os protooncogenes, nos quais mutações

ocorrendo em um ou poucos códons críticos, podem gerar um produto gênico ativado que causa a transformação celular (BISHOP, 1991). Por outro lado, há os genes supressores de tumor que codificam proteínas essenciais para o controle do crescimento celular. Quando esses genes são inativados por perda ou mutação, podem resultar em crescimento celular aberrante (MARX, 1993).

Grande número de agentes causa lesão genética e induzem transformação neoplásica das células. Enquadram-se nas seguintes categorias: (1) carcinógenos químicos; (2) energia radiante; e (3) micróbios oncogênicos, principalmente vírus. Cada grupo de agentes é considerado separadamente, embora vários possam atuar em conjunto ou de modo sinérgico com os efeitos de outros (COTRAN *et al.*, 2000).

2.3.1 Carcinogênese Química

Substâncias químicas seguras ou presumivelmente cancerígenas encontram-se amplamente distribuídas na natureza e compreendem desde alimentos naturais até compostos altamente modificados pelo homem (AMES & GOLD, 2000).

Os carcinógenos químicos são divididos em duas grandes categorias: (1) carcinógenos diretos; (2) carcinógenos indiretos. Os primeiros são agentes alquilantes ou acilantes que já possuem atividade eletrofílica intrínseca; por isso podem provocar câncer diretamente. A maioria das substâncias cancerígenas, contudo, precisa primeiro sofrer modificações químicas no organismo antes de se tornarem eletrofílicas e ativas como é o caso dos carcinógenos indiretos (BRASILEIRO FILHO, 2004).

Os carcinógenos químicos diretos ou indiretos agem sobre o DNA e causam mutações. O principal mecanismo de ação dos carcinógenos químicos é a formação de compostos covalentes com o DNA, que aumentam a probabilidade de ocorrerem erros durante a replicação. No entanto, nem sempre uma mutação leva à formação de tumores, pois o organismo dispõe de sistemas eficazes de reparação do DNA. Entretanto, alguns carcinógenos químicos, como aldeídos e agentes alquilantes, além da sua ação mutagênica, podem inibir a atividade das enzimas reparadoras. Logo, substâncias químicas

provocam tumores na dependência de vários fatores individuais e do ambiente (BRAUNWALD *et al.*, 2002).

2.3.2 Carcinogênese por Radiação

A energia radiante, seja na forma de raios UV da luz solar ou na forma de radiação ionizante eletromagnética e particulada, pode induzir neoplasias *in vivo*. A luz UV está claramente implicada na causa de cânceres de pele, enquanto as radiações ionizantes de origem médica, ocupacional e da bomba atômica produziram uma variedade de formas de neoplasia maligna (COTRAN *et al.*, 2000).

Embora a contribuição da radiação para a carga humana total de cânceres seja provavelmente pequena, a latência bem conhecida da energia radiante e seu efeito cumulativo exigem períodos extremamente longos de observação, dificultando a avaliação de seu significado total. Somente agora, depois de várias décadas, é que a incidência aumentada de câncer de mama tornou-se evidente entre mulheres expostas durante a infância à bomba atômica. Além disso, seus possíveis efeitos aditivos ou sinérgicos sobre outras influências carcinogênicas potenciais acrescentaram outra dimensão (COTRAN *et al.*, 2000).

Na carcinogênese química, as radiações também provocam mutações gênicas e podem ativar oncogenes (principalmente o *ras*) e/ou inativar genes supressores de tumor (BRASILEIRO FILHO, 2004).

2.3.3 Carcinogênese Viral

Numerosos vírus DNA e vírus RNA demonstraram ser oncogênicos numa grande variedade de animais, desde anfíbios até primatas, e há evidências cada vez maiores de que algumas formas de câncer humano são de origem viral (COTRAN *et al.*, 2000).

Muitos vírus de DNA estão associados com neoplasias diversas, benignas ou malignas, em diferentes espécies animais. Dentre os diversos vírus de DNA humanos, quatro deles (papilomavírus [HPV], vírus de Epstein-Barr [EBV], vírus da hepatite B [HBV] e herpesvírus do sarcoma de Kaposi

[KSHV]) possuem interesse particular, uma vez que foram implicados na causa de câncer humano (COTRAN *et al.*, 2000).

Basicamente há dois tipos de comportamento da infecção por um vírus de DNA oncogênico. No primeiro, o vírus infecta a célula e permite a transcrição de genes precoces e tardios, além da duplicação do DNA; com isso, formam-se novas partículas virais, e a célula é destruída (efeito lítico). Quando ocorre essa seqüência de eventos, a célula é chamada "permissiva". No outro tipo, a célula não permite a replicação viral e é considerada "não-permissiva". Nela, os genes tardios, responsáveis pela codificação das proteínas do capsídeo, não são expressos; todavia, os genes precoces são transcritos e o DNA viral integra-se ao genoma da célula hospedeira. Esses dois fenômenos – expressão de genes precoces e integração do DNA viral – parecem ser os responsáveis comuns pela transformação celular (BRASILEIRO FILHO, 2004).

Outro possível mecanismo carcinogênico dos vírus de DNA é a transcrição de genes virais que levam à síntese de proteínas que, na membrana da célula hospedeira, comportam-se como receptores ativados transduzindo sinais que ativam fatores de transcrição para genes ativadores de proliferação e de sobrevivência das células. Alguns vírus de DNA podem ter genes que codificam proteínas transativadoras, as quais ativam protooncogenes celulares (BRAUNWALD *et al.*, 2002).

No caso do HPV, seu estado físico varia de acordo com o tipo de lesão. Na maioria dos carcinomas, o genoma viral está integrado ao da célula hospedeira, enquanto nas lesões benignas o vírus encontra-se na forma episossomal (BRASILEIRO FILHO, 2004). Isso sugere que a integração do DNA viral é importante na transformação maligna. Embora o sítio de integração viral nos cromossomos do hospedeiro seja randômico (o DNA viral é encontrado em diferentes locais em diferentes cânceres), o padrão de integração é clonal, isto é, o local de integração é idêntico no interior de todas as células de determinado câncer (COTRAN *et al.*, 2000).

2.3.3.1 HPV

O HPV é um vírus da família *Papoviridae*, com diâmetro variando de 44 a 55 nm, de forma icosaédrica não envelopado composto por um capsídeo consistindo de 72 capsômeros, que apresenta o genoma viral fechado covalentemente e organizado em uma fita de DNA dupla circular, (LEVI, 1996; MEISELS & MORIN, 1997).

O ciclo biológico do HPV está totalmente ligado ao das células epiteliais hospedeiras, os queratócitos, onde a replicação viral acompanha a diferenciação e a maturação, sendo nas camadas superiores do epitélio em que se encontra maior atividade replicativa e maior quantidade de partículas virais (CRUM & NUOVO, 1991; LEVI, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 2002).

O HPV atinge o núcleo das células basais através de microlacerações no epitélio, sendo que os primeiros sinais de transcrição do genoma virótico aparecem cerca de 4 semanas após a infecção. O período de incubação varia de 2 semanas a 18 meses e a persistência das lesões pode ser avaliada em semanas, meses ou anos. As alterações podem levar ao surgimento de doença ativa ou ao aparecimento de lesões subclínicas. Nas mulheres com doença latente, 20% podem apresentar uma regressão espontânea e outras 60% necessitam de tratamento simples. Os 20% restantes representam um desafio para um diagnóstico mais aprimorado (HOWLEY, 1991; YAMAMOTO *et al.*, 2002).

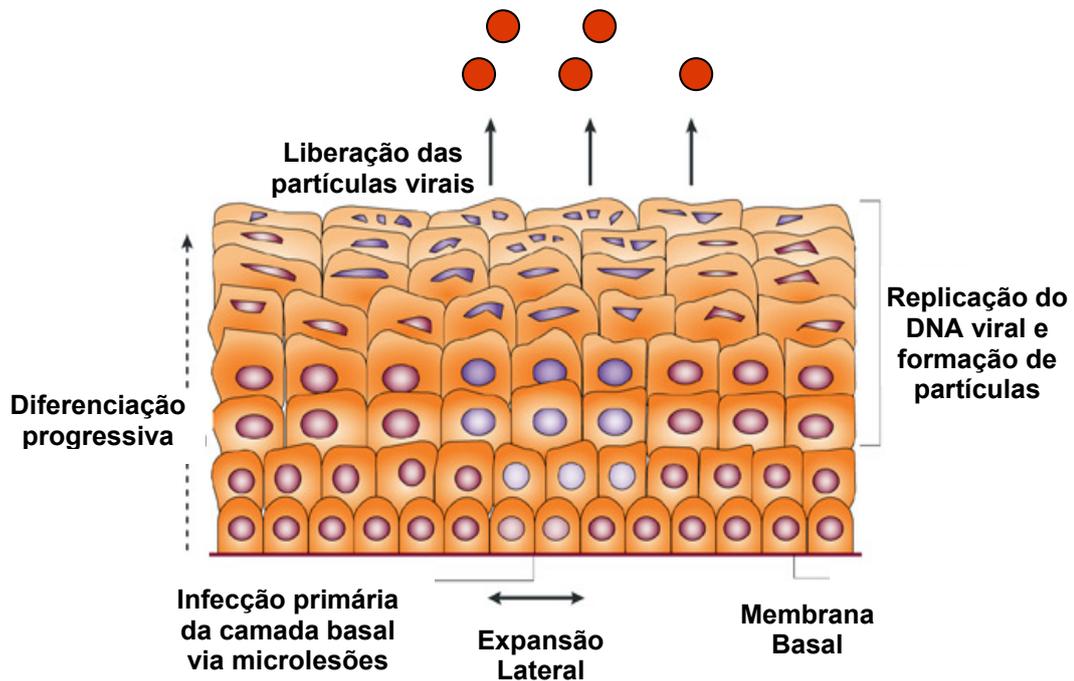


Figura 3. Representação esquemática do ciclo biológico do HPV nos queratócitos. (Adaptado de: www.ircm.qc.ca/.../ms_textes/lifecycle.png). Acesso em: 05 de abril de 2005.

Apesar da infecção pelo HPV ser agente importante, somente o vírus não é suficiente para induzir transformação maligna. Co-fatores individuais parecem ser determinantes na expressão do caráter latente, replicante ou transformante desse vírus. Os co-fatores de risco para câncer cervical são, na grande maioria, relacionados à atividade sexual. Estes fatores epidemiológicos são conhecidos e incluem: idade precoce à primeira relação sexual, história de múltiplos parceiros sexuais, fatores imunológicos, multiparidade, gravidez, fumo, história ou parceiro com doença sexualmente transmissível (DST), contraceptivos orais e deficiências nutricionais (RABELO, 2002).

O número de parceiros sexuais é considerado um fator de risco importante para a aquisição da infecção pelo HPV. O estado de imunodeficiência, especialmente o relacionado à deficiência de imunidade do tipo celular, como a AIDS, aumenta a susceptibilidade a infecções em geral, sendo alta a prevalência da infecção pelo HPV nestes grupos, tanto por

reativação de uma infecção latente como por aquisição de uma nova infecção (ELLERBROOK *et al.*, 2000).

Os estudos têm demonstrado que a multiparidade é um fator de risco de grande relevância na instalação do câncer de colo (independente de infecção pelo HPV), entretanto, esta associação é ainda controversa (FERENCZY, 1989; LINDSEY *et al.*, 2004).

Nas pacientes fumantes, altas concentrações de nicotina e cotidina são encontradas no muco cervical e podem transformar o tecido infectado pelo HPV. O fumo diminui também a população de células de Langerhans, que são células apresentadoras de antígenos da epiderme, facilitando a aquisição da infecção por diversos vírus, entre eles o HPV (ROTELI-MARTINS *et al.*, 1998).

Em termos básicos, o câncer de colo de útero pode se desenvolver a partir da transmissão sexual pelo *Human Papiloma Vírus* (HPV), principal responsável pela indução do câncer. Recentes dados epidemiológicos e biomoleculares da literatura mostram que o DNA do HPV é encontrado em 95 a 100% dos tumores epiteliais cervicais, conferindo o maior risco para o seu desenvolvimento. Segundo a OMS (1996), os subtipos 16 e 18 de HPV são os agentes etiológicos 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 (CAMARA, 1993; REZENDE FILHO *et al.*, 1993; COLLACO & PINTO, 1994; DORES *et al.*, 1999).

O número de pessoas infectadas pelo HPV é cada vez maior no Brasil. Tal fato deve-se principalmente, a falta de hábito das pessoas usarem preservativos nas relações sexuais. O Ministério da Saúde estima que aproximadamente 25% da população sexualmente ativa do Brasil esteja contaminada pelo HPV, entretanto, algumas pesquisas estrangeiras sinalizam que este número pode chegar a 50% entre adolescentes e jovens adultos (FIOCRUZ, 2005).

A infecção pelo HPV tem sido muito questionada em decorrência da ausência de sintomas que grande parte dos casos apresenta e também pela

regressão espontânea das lesões pré-cancerosas, não evoluindo para o câncer. Das mulheres infectadas: 80% não apresentam sintomas clínicos e, em cerca de 60 a 70% dos casos, a infecção regride espontaneamente. Somente em 14% progredem até lesões intra-epiteliais (NICOLAU, 2003).

No período de 2002 a 2004, foram notificados 18.017 casos de infecção por HPV na Região Sul, sendo 10.503 (58,29%), 3.859 (21,42%) e 3.655 (20,29%) casos referentes aos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina, respectivamente. A faixa etária mais acometida por esta infecção foi de 20 a 24 anos (21,55%, 3.883/18.017) em todo o período analisado e em toda a Região Sul, corroborando os dados propostos pela literatura (DA SILVEIRA *et al.*, 2004; HASTREITER *et al.*, 2005; BASEMAN, 2005).

Entre as infecções vaginais, a candidíase apresenta-se com maior prevalência entre pacientes com HPV. O HPV por si só não exerce efeito imunossupressor, entretanto, quando associado a outras infecções, como a candidíase teria seu desenvolvimento favorecido. A clamídia parece desempenhar algum papel na oncogênese genital por estimular os fatores de proliferação celular (CARVALHO & OYAKAWA, 2000). Em estudos que analisaram vários tipos de HPV, observou-se a concomitância de cervicite com infecção pelo HPV em 71,4% dos casos (CARVALHO, *et al.*, 1997; KUBOTA *et al.*, 1999; CARVALHO & OYAKAWA, 2000).

O uso de contraceptivos orais por período prolongado, também parece aumentar a prevalência da infecção pelo HPV, uma vez que, *in vitro*, fatores hormonais influenciam a transcrição do genoma do HPV (MORRISON *et al.*, 1991).

Carências nutricionais, tais como de vitaminas "A" e "C", beta caroteno e ácido fólico estão relacionadas com um aumento do risco de infecção pelo HPV (PARELLADA *et al.*, 1999).

Existem cerca de 150 tipos diferentes de HPV, que se apresentam divididos em dois grupos, quanto à oncogenicidade: os de baixo risco [6, 11, 41, 42, 43 e 44], que são encontrados principalmente nas lesões benignas, como o condiloma acuminado ou plano e neoplasias intra-epiteliais de baixo grau e os de alto risco [16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 66,

preferencialmente os tipos 16 e 18], presentes na maioria das neoplasias intra-epiteliais de alto grau e carcinomas do colo uterino (AC CAMARGO, 2003).

A progressão das lesões intra-epiteliais pré-neoplásicas estão associadas ao grau de oncogenicidade do HPV, logo, a evolução destas lesões correspondem ao grupo de HPV envolvido, distinguindo-se, desta forma, duas categorias de lesões: a) uma, designada de lesão intra-epitelial de baixo grau (LSIL), associada principalmente ao grupo de HPV de baixo risco oncogênico, tendo potencial maligno apenas nos casos em que está associada ao grupo de alto risco e b) a lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL) que contém grupos potencialmente oncogênicos e espera-se que se comportem como uma lesão precursora do câncer (COPELAND, 1996).

A presença de HPV oncogênico em LSIL pode levar a HSIL com 87% de sensibilidade (HERRINGTON, 1995). Em trabalhos de NUOVO, 1998, as mulheres com atipia em células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) que desenvolveram uma SIL confirmada pela biópsia em 6 meses, 67% tinham infecção pelo HPV oncogênico, onde apenas 10% das mulheres com ASC-US que não desenvolveram SIL eram HPV positivas (NUOVO, 1998).

2.4 CLASSIFICAÇÕES CITOLÓGICAS

O conceito das lesões precursoras do câncer cervical data de 1886, quando Williams noticiou, que próximos 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).

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 de secreção vaginal. 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” (KOSS, 1989).

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 malignidade, 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 grave – quando quase toda espessura do epitélio está comprometida por células atípicas (NARDOZZA *et al.*, 1993).

Em 1967, Richart introduziu o termo Neoplasia Intra-Epitelial Cervical: NIC (graus I, II, III e IV) em substituição, respectivamente as displasias e carcinoma *in situ* instituídos por Reagan. Em 1969, Richart acatou o consenso de especialistas, abolindo a classificação NIC IV, e mantendo a NIC III, como representativa de displasia grave e/ou carcinoma *in situ* (BUCKLEY *et al.*, 1982; SUZUKI, 1995; SCHNEIDER & SCHNEIDER, 1998; SHIRATA, 1998).

2.5 SISTEMA BETHESDA

Em 1988, um grupo de especialistas em citologia, histopatologia e tratamento de pacientes participaram de um encontro promovido pelo *National Cancer Institute* (NCI) em Bethesda, Maryland. Este tinha como objetivo desenvolver um sistema de descrição dos esfregaços de Papanicolaou que

representaria a interpretação citológica de um modo claro e relevante para o clínico. Antes disto, os laboratórios usavam um sistema de classificação do Papanicolaou numérico, confuso e frequentemente idiossincrático, ou a terminologia “displasia”, que apresenta pouca reprodutibilidade entre os observadores, na prática (SOLOMON & NAYAR, 2005).

Em 2001 o Sistema Bethesda foi reformulado, e a nova classificação das lesões cervicais escamosas foi dividida em 4 categorias: a) Atipia em células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) e células escamosas atípicas, não é possível excluir uma HSIL (ASC-H), como aquelas alterações limítrofes, entre a normalidade e anormalidade e que não apresentam ainda os critérios necessários para classificá-la como displásicas; b) Lesão Intra-epitelial de Baixo Grau (LSIL), como alterações correspondentes à displasia leve e as alterações citopáticas do vírus HPV; c) Lesão Intra-epitelial de Alto Grau (HSIL) às alterações correspondentes a displasia moderada e grave, bem como carcinoma *in situ*; d) carcinoma de células escamosas (SOLOMON & NAYAR, 2005).

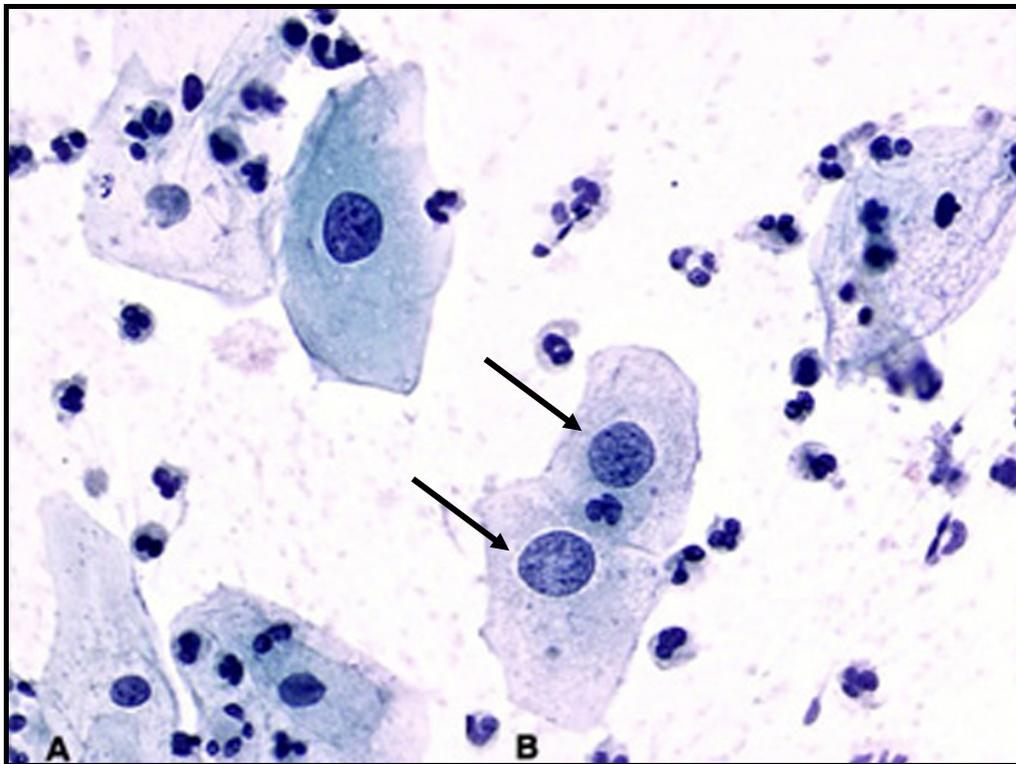


Figura 4. ASC-US - Núcleos aumentados, porém perfil nuclear ainda liso, discreta granularidade da cromatina. (obj. 40x). (Adaptado de: <http://screening.iarc.fr/atlashisto.php>). Acesso em: 14 de fevereiro de 2006.

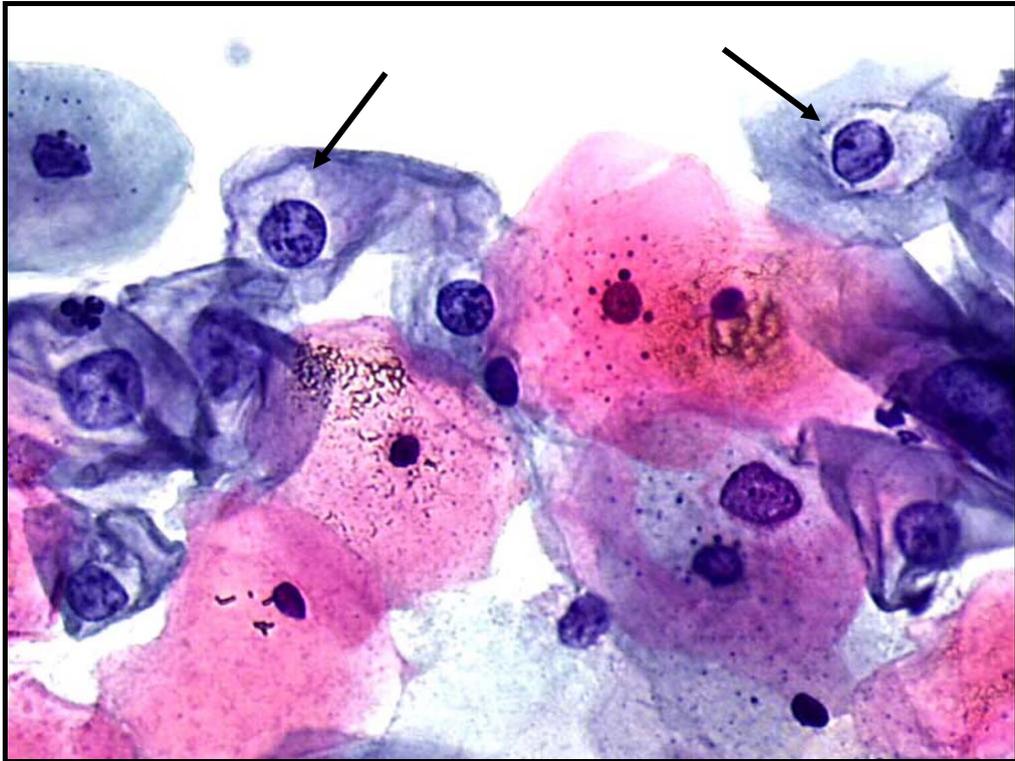


Figura 5. LSIL - Células intermediárias com aumento nuclear, cromatina finamente granular, hiper cromatismo e coilocitose. (obj. 40x). (Adaptado de: <http://screening.iarc.fr/atlashisto.php>). Acesso em: 14 de fevereiro de 2006.

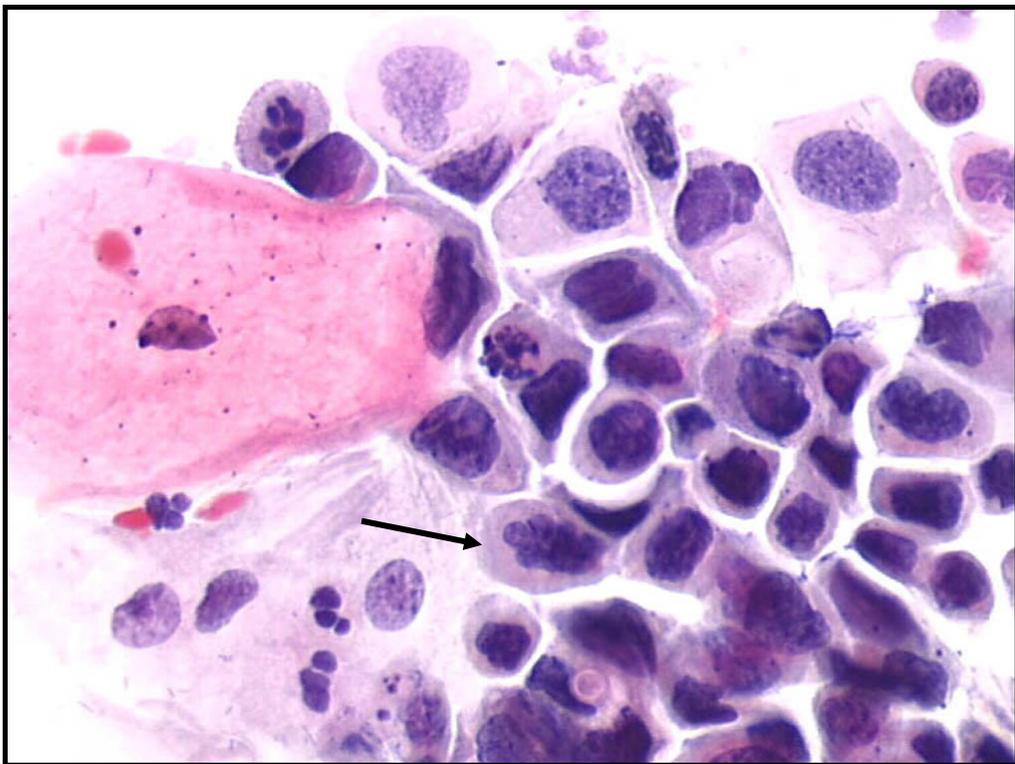


Figura 6. HSIL - Agrupamento celular com discariose severa, citoplasma pouco visível e hiperchromatismo acentuado. (obj. 40x). (Adaptado de: <http://screening.iarc.fr/atlashisto.php>). Acesso em: 14 de fevereiro de 2006.

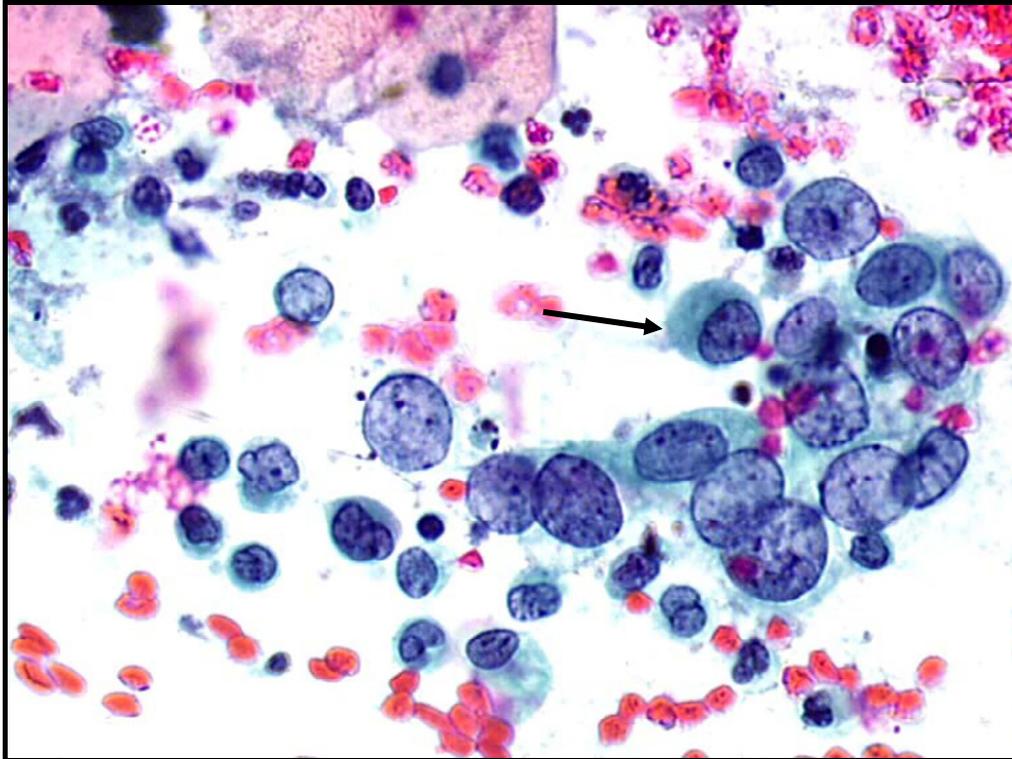


Figura 7. HSIL com suspeita de futura invasão: Agrupamento celular com discariose severa, citoplasma pouco visível, e hiperchromasia proeminente. Cromatina grosseiramente granular com zonas de clareamento em um dos núcleos. Fundo do esfregaço hemorrágico. (obj. 40x). (Adaptado de: <http://screening.iarc.fr/atlashisto.php>). Acesso em: 14 de fevereiro de 2006.

O Sistema Bethesda de 2001 incluiu alterações que se baseiam no acúmulo de dados e nos avanços na compreensão da biologia do câncer cervical. Os participantes da conferência de Bethesda de 2001 concordaram que a citologia cervical deve ser considerada primariamente como um “teste de *screening*, que, em alguns casos, pode servir como uma consulta médica, fornecendo uma interpretação capaz de levar a um diagnóstico” (SOLOMON *et al.*, 2002). Um diagnóstico final da paciente e seu plano terapêutico integram não somente o resultado da citologia cervical, mas também a história, os achados clínicos e outros resultados laboratoriais como a interpretação da biópsia. Esta mudança na terminologia enfatiza que o resultado da citologia representa um componente que nem sempre reflete diagnóstico final da paciente (SOLOMON & NAYAR, 2005).

Observa-se 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 Bethesda.

Tabela 1. Comparação das classificações citológicas de Papanicolaou – 1942, Regan – 1953, Richart – 1967 e Sistema Bethesda – 2001 (FILIPPIN, 2004; SOLOMON & NAYAR, 2005).

Papanicolaou	Regan	Richart	Sistema Bethesda
I	Normal	Normal	NILM*
II	Atipia reativa/ Inflamatória	Atipia reativa/ Inflamatória	
II/III	Atipia	Atipia	ASC-US ASC-H
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 <i>in situ</i>	NIC III	SIL de alto grau (HSIL)
V	Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo

*Negativo para lesão intra-epitelial e malignidade

O objetivo do Sistema Bethesda sempre foi promover uma comunicação eficaz dos achados relevantes de citologia entre os achados clínicos e laboratoriais, para fornecer o melhor tratamento para a paciente. Testes auxiliares são propostos para serem incorporados no laudo da citologia como o teste do DNA do HPV, bem como outros testes moleculares que possam ser desenvolvidos no futuro (SOLOMON & NAYAR, 2005).

A simplificação da classificação das lesões epiteliais em dois grupos (lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau e de alto grau) responde às dificuldades de distinguir as nuances entre diferentes degraus de intensidade das lesões pré-cancerosas do colo e minimiza o aspecto subjetivo da avaliação. Deve-se notar que, frequentemente, a citologia não reflete fielmente a gravidade e a extensão da lesão neoplásica. Assim como as outras, essa

classificação não pode estabelecer uma correlação entre a gravidade da imagem microscópica e o futuro clínico da lesão (GOMPEL & KOSS, 1997).

O Sistema Bethesda introduz uma apreciação sobre a qualidade do esfregaço, que o citopatologista teme expor pessoalmente, preocupado em não se indispor com o seu interlocutor clínico. Utilizando esse sistema, ele se respalda nas exigências de uma classificação internacional (GOMPEL & KOSS, 1997).

A expressão precursora da nova categoria “Células escamosas atípicas (ASC)” era a interpretação mais amplamente definida de células escamosas atípicas de significado indeterminado (SOLOMON *et al.*, 2002; SOLOMON & NAYAR, 2005). Um estudo nos Estados Unidos sobre a prática de laudos, em 768 laboratórios, durante o ano de 1996, descobriu que a classificação de células escamosas atípicas de significado indeterminado, correspondia a uma média de 5,2% e uma mediana de 4,5% de todos os laudos de citologia cervical (DAVEY *et al.*, 2000). Esses dados indicam que diversos laboratórios nos Estados Unidos não foram capazes de atingir o alvo, de manter uma frequência de registro, para células atípicas de significado indeterminado abaixo de 5%. Esses achados levaram ao desenvolvimento de uma nova categoria ASC, que apresenta uma definição mais restrita e um sistema dicotômico simples de qualificadores (SOLOMON & NAYAR, 2005).

As Atipias em células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) e SIL, observadas no Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 2000 a 2004, tiveram índices de 1,1% e 0,7%, respectivamente, corroborando os índices propostos pela literatura (GONÇALVES, 2005; KURMAN & SOLOMON, 1997).

O ASC-US se refere às alterações sugestivas tanto de LSIL como de SIL de grau indeterminado. Apesar de a maioria das interpretações de ASC-US serem sugestivas de LSIL, o qualificador “significado indeterminado” é preferível porque aproximadamente 10 a 20% das mulheres portadoras de ASC-US apresentam um NIC II ou NIC III subjacente (THE ALTS GROUP, 2003). Espera-se que o ASC-US ocorra em mais de 90% das interpretações ASC na maioria dos laboratórios. O ASC-H é uma designação reservada para a

minoria dos casos ASC (espera-se que represente menos de 10%) onde as alterações citológicas são sugestivas de HSIL. Apenas amostras duvidosas especialmente preocupantes de HSIL devem ser diferenciadas do volume de ASC, usando-se a designação ASC-H. Os casos classificados como ASC-H estão associados a maior valor preditivo positivo para detectar um NIC II ou NIC III subjacente do que ASC-US, mas são menos preditivos de NIC II ou diagnóstico pior do que as interpretações definitivas de HSIL (SOLOMON & NAYAR, 2005).

A classificação do esfregaço na categoria “atípica” cria, tanto para o médico quanto para a paciente, um sentimento de incerteza e de insegurança e não permitem definir uma conduta clínica adequada, com isso frequentemente os clínicos se sentem obrigados a avaliar a paciente com colposcopia, um procedimento demorado e caro (GOMPEL & KOSS, 1997; SOLOMON & NAYAR, 2005).

2.6 DIAGNÓTICO LABORATORIAL

2.6.1 Exame Citopatológico

Apesar do exame de Citopatologia ser o método mais utilizado para o rastreamento do câncer do colo do útero, desde o início da década de oitenta vem sofrendo uma série de críticas relacionadas com a alta proporção de resultados falso-negativos, que variam de 2% a 62%. As principais causas são atribuídas a erros na coleta de material, no escrutínio do esfregaço ou na interpretação dos diagnósticos (ATTWOOD *et al.*, 1985; KOSS, 1989; BOSCH *et al.*, 1992; MITCHELL & MEDLEY, 1995).

Há mulheres que apresentam câncer invasivo após terem um exame citopatológico negativo (FIGGE *et al.*, 1970; HATEM & WILBUR, 1995; WILBUR, 1997). É importante preocupar-se com a qualidade do exame citopatológico, pois não diagnosticar uma lesão, no caso de um esfregaço falso negativo, é um resultado desastroso, tanto para a mulher quanto para os

custos dos serviços públicos de saúde (ROHR, 1990; GUIMARÃES & SILVA, 1995; HOWELL *et al.*, 1997).

GAY *et al.*, 1985, observaram que 62% dos resultados falso-negativos foram atribuídos a erros de coleta de material e 38% foram atribuídas a erros de escrutínio ou de interpretação do diagnóstico.

Existem evidências de que erros de escrutínio e de interpretação de diagnóstico estão associados com certos padrões de esfregaços. BOSCH *et al.*, 1992, mostraram que esfregaços que foram erroneamente diagnosticados como negativos freqüentemente continham poucas células anormais. Outro estudo mostrou que lesões de pequenas células são menos detectadas no escrutínio (JARMULOWICZ *et al.*, 1989).

MICHEL & MEDLEY, 1995, analisaram 71 esfregaços falso-negativos e o mesmo número de esfregaços detectados corretamente como HSIL. Os pesquisadores verificaram que os esfregaços diagnosticados corretamente continham um número significativamente maior de células anormais quando comparados com os esfregaços falso-negativos, que corresponderam a erros de escrutínio. Estes autores verificaram que o risco de um diagnóstico falso negativo era 23,7 vezes maior nos esfregaços que continham menos de 50 células anormais do que nos esfregaços que continham mais de 200 células anormais.

Várias estratégias foram elaboradas para diminuir os resultados falso-negativos. Foram introduzidos novos tipos de instrumentos, como espátulas modificadas a partir do tradicional modelo de Ayre e escovas de vários desenhos, para alcançar mais eficientemente as células da junção escamo-colunar, região onde se localizam a maioria das lesões recentes (LUZZATTO *et al.*, 1993; McCORD *et al.*, 1993; BUNTINX & BROUWERS, 1996; SHIRATA *et al.*, 1998; ZEFERINO *et al.*, 2000; PLESSIS *et al.*, 2001). Atualmente há vários estudos sugerindo que a técnica de coleta que utiliza o meio líquido tem melhor desempenho do que a técnica de coleta convencional do exame citopatológico (AMANDA & JOHNSON, 2001; BAKER, 2002; MOSELEY & PAGET, 2002; WANG *et al.*, 2002).

A citologia de base líquida surgiu para atender às demandas de escrutínio computadorizado. Para viabilizar a leitura das lâminas por computadores, era necessário um preparado que apresentasse o menor número possível de artefatos e sobreposições celulares; dessa forma, os preparados citológicos em base líquida foram chamados a princípio de citologia de mono camada ou camada fina (TAKAHASHI & NAITO, 1997; VELASCO, 2001).

O número de células em meio líquido é considerado ideal, uma vez que ao ser acomodado no recipiente, a quase totalidade das células coletadas é transferida ao meio. Ao se preparar às amostras, essas células são randomizadas por agitação (independente dos métodos disponíveis no mercado) e oferecem, teoricamente, uma amostra mais representativa. Essa metodologia traz um grande avanço no preparo citológico, uma vez que há evidências de que apenas 20% do material colhido pelo método convencional é transferido para a lâmina; o restante, que está aderido à escova/espátula, é descartado (VELASCO, 2001).

Além disso, tem sido advogado que a citologia de base líquida apresenta uma série de vantagens em relação à citologia cervical convencional, como características citomorfológicas nítidas e de fácil interpretação, melhor disposição celular (distribuição homogênea), menor área de análise. Há, também, evidente redução do número de hemácias, exsudato inflamatório, muco e preparo de lâminas adicionais do mesmo caso sem ter que convocar a paciente e utilização do material residual para testes moleculares para identificação de agentes etiológicos, como o HPV (GUPTA *et al.*, 2001; BERNSTEIN *et al.*, 2001).

A citologia de base líquida é o resultado de mais de uma década de pesquisas, onde se buscou um único meio, com condições de preparo citológico de excelência em fixação, preservação celular e de moléculas protéicas e ácidos nucléicos para estudos biomoleculares (VELASCO, 2001).

Uma característica do exame citopatológico é que predominam claramente o trabalho manual, desde a coleta do material até a emissão e liberação do resultado pelo laboratório. Portanto, o desempenho pode estar

relacionado com a qualidade dos recursos humanos envolvidos. É de fundamental importância à participação destes profissionais nos programas de educação continuada, aprimoramento individual e teste de proficiência (ANDERSON *et al.*, 1987; CDC, 1992; MODY *et al.*, 2000; ASC, 2001).

Também podem influenciar no desempenho do profissional escrutinador, fatores tais como fadiga ou carga excessiva de trabalho, pois o escrutínio do esfregaço é uma tarefa repetitiva que requer intensa concentração e dedicação (REUTER & SCHENCK, 1986).

A citologia, para MERLO, 1981, era a melhor técnica de laboratório, no estudo das SILs. No entanto, em estudos posteriores, o mesmo autor observou que a colposcopia permite identificar uma evolução das mudanças que se sucedem na cérvix sendo, portanto, uma técnica útil no estudo de citologias anormais pré-neoplásicas, e que apresentam suspeitas de neoplasias.

2.6.2 Colposcopia e Exame Histopatológico

O estudo colposcópico permite a identificação de alterações 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 de 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 seja 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 mudanças a nível celular. Por isto, a citologia e a colposcopia são consideradas como sistemas complementares inseparáveis para o estudo de pacientes com SIL (CARRERA *et al.*, 1974; WETHICH, 1986; SANTOS *et al.*, 2003).

Alguns trabalhos indicam índices falsos negativos da citologia frente à colposcopia que oscila entre 10% e 13%. A correlação entre a citologia e o diagnóstico colposcópico, mostrou uma sensibilidade de 84,7% (FRANCO & GALLEG0, 1992). Esta sensibilidade baseia-se em resultados colposc6picos que se correlacionam claramente com a citologia da paciente. Os protocolos de controle de qualidade para a pr6tica colposc6pica mencionam valores de sensibilidade entre 82% e 88% (FEJGIN, 1990; BENEDET, 1991; FRANCO & GALLEG0, 1992; GONZ6LEZ & JIMEN6EZ, 1993).

A correla73o entre diagn6stico colposc6pico e o estudo histol6gico das bi6psias dirigidas, mostrou uma sensibilidade de 86,2%. Dessa maneira, se quantifica uma correla73o positiva quando maior ou igual a 80% com cifras limites satisfat6rias na pr6tica da colposcopia, em torno de 86% (DI6AZ & ARAG6N, 1992; GONZ6LEZ & JIMEN6EZ, 1993).

A correla73o entre a citologia e o estudo das bi6psias 6 de 80% nos protocolos antes mencionados; com estes percentuais se aceita uma cifra igual ou superior a 75% como limite normal para os laborat6rios de citologia (FILIPPIN, 2004).

Analisando-se juntos os tr6s m6todos de diagn6stico, a citologia, a colposcopia e a bi6psia, pode-se dizer sem equ6vocos, que a confiabilidade diagn6stica em conjunto para identificar uma neoplasia cervical se encontra entre 90% a 100% (FEJGIN, 1990) e assim detectar mais rapidamente as les6es e acompanhar sua progress3o e o emprego de uma profilaxia mais adequada para cada caso (HEINZ, 1982). Contudo, todas as SIL n3o possuem o mesmo comportamento, pois estudos epidemiol6gicos de neoplasias mostram que a preval6ncia de SIL 6 muito maior que a de c6ncer cervical, sugerindo que muitas SIL n3o progridem 3o invas3o (NASIELL *et al.*, 1983).

O comportamento biol6gico da neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau (NIC II e NIC III) n3o pode atualmente ser previsto com seguran73a em uma 6nica paciente. O risco estimado de progress3o da doen73a em diferentes grupos mostra marcante varia73o (ANDERSON, 1991). N3o 6 poss6vel separar les6es NIC II em subtipo puramente regressivo, persistente ou progressivo em bases histol6gicas, citol6gicas ou crit6rios cl6nicos. O uso de par6metros

objetivos como o conteúdo de DNA nuclear merece maior atenção (FU, 1981; JAKOBSEN *et al.*, 1983; NASIELL, 1984; BIBBO *et al.*, 1985; MONSONEGO *et al.*, 1997).

Os critérios de diagnóstico histopatológico também se baseiam em aspectos morfológicos o que confere o caráter subjetivo da decisão diagnóstica. Embora alguns autores tenham relatado elevado nível de concordância diagnóstica interobservador, ainda existe considerável discrepância, principalmente nas lesões limítrofes, uma vez que, do ponto de vista morfológico, estas alterações formam um espectro. A conduta de simplesmente desvalorizar a presença de "alterações menores", traz o risco, de se permitir que lesões subdiagnosticadas evoluam para fases mais avançadas. Por outro lado, o diagnóstico em excesso, acarreta gastos desnecessários com tratamento e, ainda danos físicos, psicológicos e sociais para as pacientes (FRANQUEMONT *et al.*, 1989).

Em face destas dificuldades é fundamental que haja perfeito entendimento entre os patologistas e ginecologistas, pois o acesso a dados clínicos e laboratoriais pertinentes, bem como a possibilidade de correlação com eventuais exames histológicos ou citológicos prévios é condição fundamental para que se garanta a máxima qualidade do diagnóstico histopatológico (DI LORETO & ALVES, 1992).

2.6.3 Exame Imunocitoquímico

O método imunocitoquímico baseia-se no reconhecimento de algumas características antigênicas dos papilomavírus através do uso de anticorpos mono ou policlonais. Essa identificação poderá ser visualizável à microscopia óptica, de acordo com vários procedimentos, em que se incluem os que empregam imunocomplexos enzimas-antienzima e métodos com marcação prévia como a avidina-biotina-peroxidase (ELIAS, 1990).

As imunorreações, tanto com anticorpos monoclonais como policlonais são, em geral, bastante específicas, o que traduz uma alta confiabilidade dos

resultados positivos. Entretanto, muitos casos de infecção viral comprovada, mostram-se negativos por esta metodologia (GUPTA *et al.*, 1987).

Estudos da imunorreatividade de esfregaços citológicos sugestivos de infecção por papilomavírus humano através do uso de anticorpo policlonal anti-BPV-1 com o método da peroxidase-antiperoxidase, conseguiram positividade de 44% (SHIH *et al.*, 1988). Em outro estudo, ALVES *et al.*, 1988, com biópsias de colo uterino, mostraram positividade de 56% em condilomas vegetantes e 80% nos condilomas virais aplainados. Estes achados demonstraram o antígeno do capsídeo viral em apenas 2 dentre 14 amostras sem coilocitose, enquanto 11 dentre 16 casos com coilocitose mostraram-se positivos (LONGATTO FILHO & ALVES, 1998). CAVALIERE e colaboradores, 1990, estudaram esfregaços citológicos com coilócitos sugestivos de HPV e obtiveram 60,7% de positividade.

As possíveis causas para a negatividade imunocitoquímica em casos de infecção comprovada por outros métodos podem incluir a destruição de antígenos virais pela fixação ou ainda a diversidade antigênica entre os mais de 100 tipos de HPV já descritos. A negatividade poderia decorrer também da baixa sensibilidade da própria metodologia ou da existência de fases de infecção com diferente expressão antigênica (JENSON *et al.*, 1980).

2.6.4 Biologia Molecular

Mesmo reconhecendo a elevada especificidade de métodos citológicos, histológicos e ultra-estruturais na identificação de alterações devidas ao HPV, a existência de grande número de casos de infecção, sem reflexos morfológicos, define as técnicas moleculares como as mais sensíveis para a detecção viral (LONGATTO FILHO & ALVES, 1998).

O método ideal de detecção do HPV deve se basear na presença de DNA de HPV, já que o vírus não precisa estar intacto para induzir doença. A utilidade clínica desses métodos ainda precisa ser determinada, mas seu uso em pesquisa básica é fundamental. A detecção molecular inicial de DNA de HPV foi efetuada através do uso de técnicas de hibridização de ácido nucléico,

como a hibridização *Southern* (ou *blotting*). Esse foi o método original de primeira escolha para a detecção de DNA de HPV, em decorrência do seu elevado grau de especificidade e sensibilidade. Esse método permite uma diferenciação precisa dos diferentes tipos de HPV, e é o único através do qual os médicos podem descobrir tipos desconhecidos. A desvantagem do *Southern blotting* é o fato de ser caro e trabalhoso, e, de requerer quantidades relativamente grandes de tecido, que precisa ser congelado imediatamente após a excisão do espécime. Simplificadas técnicas automatizadas de hibridização, como as técnicas de *dot-blot*, são mais rápidas e fáceis, mas comprometem a especificidade dos resultados (SCHIFFMAN, 1992).

Através de uma técnica modificada, conhecida como hibridização *in situ*, é possível se identificar DNA de HPV nas células, com a garantia de que o HPV detectado não é um contaminante extracelular que se encontra na superfície epitelial. Entretanto, a sensibilidade do exame é sacrificada com essa técnica porque o DNA do espécime está presente apenas em pequenas quantidades em cada célula, ao invés de encontrar-se isolado e concentrado como no caso do *Southern blotting* (GUPTA et al., 1987).

A aplicação de uma técnica biológica molecular poderosa, chamada de reação em cadeia de polimerase (PCR), tem permitido aos pesquisadores maior facilidade na busca de DNA de HPV. Com a PCR, segmentos específicos de DNA podem ser amplificados até um milhão de vezes em questão de horas, transformando minúsculas quantidades de DNA de HPV em quantidades que podem ser facilmente detectáveis. Além da sua maior simplicidade em comparação ao *Southern blotting*, a PCR tem o benefício de uma sensibilidade sem paralelo na detecção do HPV com quase a mesma especificidade. As técnicas de PCR foram desenhadas para detectar um único tipo específico de HPV ou até 25 tipos diferentes em 1 reação, o que pode acelerar em muito as buscas de HPV (LONGATTO FILHO & ALVES, 1998).

Em decorrência da sua simplicidade, custo e sensibilidade inigualável, a PCR é atualmente o método preferido para a detecção de HPV. Entretanto, a sua maior vantagem também pode ser a sua maior desvantagem. Como milhões de cópias de um segmento genético selecionado são produzidos pela

PCR, há um grande potencial de disseminação dessas moléculas por todo o laboratório - em mesas de trabalho, pipetas, soluções e nas mãos. Essas moléculas contaminantes soltas podem se introduzir em subseqüentes reações PCR e dar lugar a falsos positivos. Os pesquisadores devem tomar muito cuidado e seguir um estrito protocolo a fim de evitar essa grande possibilidade real, do contrário, correrão o risco de gerar dados com altas prevalências falsas de HPV (RAKOCZY *et al.*, 1990).

Atualmente, a detecção molecular do HPV é principalmente utilizada em pesquisa de laboratório e não faz parte do processo de decisão clínica. Entretanto, à medida que os resultados se tornem cada vez mais aceitos, as técnicas biológicas moleculares adquirirão grande potencial no diagnóstico e tratamento de doenças relacionadas com o HPV (STOLER *et al.*, 1992).

2.6.5 Citometria de Imagem

Nos estudos mais recentes da doença tumoral, a quantificação de substâncias celulares como DNA assumiram grande valor diagnóstico, indicador terapêutico e prognóstico. O princípio da determinação quantitativa do DNA baseia-se no conhecimento de que uma alteração no conteúdo dos cromossomos (aneuploidia) se correlaciona freqüentemente com crescimentos tumorais. A quantificação do DNA no núcleo celular, desenvolvida a partir dos trabalhos de Katemensky e Melamed, 1967, vem sendo utilizada nas últimas duas décadas para avaliação da atividade tumoral de vários tipos de câncer (YAMAMOTO *et al.*, 2002).

Mudanças características da constituição dos cromossomos, que estão presentes em muitos tumores, oferecem frequentemente parâmetros adicionais independentes da morfologia, que podem ser usados para o diagnóstico e a determinação do grau de malignidade do tumor. Muitas neoplasias humanas, algumas benignas, revelam aberrações cromossômicas detectáveis microscopicamente (BOCKING *et al.*, 1994; BOCKING, 1995).

Os estudos citogenéticos têm sido empregados em uma grande variedade de tumores, mas os procedimentos são impraticáveis, no momento,

para propósitos clínicos, pois consomem muito tempo e são caros, não podendo ser introduzidos na rotina diária para diagnóstico dos tumores (ONOFRE *et al.*, 2003). Alternativamente, a quantificação dos efeitos das aberrações cromossômicas no conteúdo do DNA nuclear pode ser usada como marcador diagnóstico. A aneuploidia do DNA é equivalente a aneuploidia cromossomal, portanto, a detecção de aneuploidia cromossomal ou a do DNA, por citometria, consistem em marcadores confiáveis para evidenciar a neoplasia (BOCKING *et al.*, 1994; BOCKING, 1995).

O conteúdo de DNA nuclear tem sido estudado em vários tipos de tumores através da citometria de fluxo e da análise de imagem. Estas técnicas são baseadas na determinação da ploidia do DNA e são empregadas com o objetivo de criar parâmetros com a caracterização da malignidade, que possam fornecer informações mais precisas sobre o comportamento biológico dos tumores em adição ao método histológico tradicional e a distribuição do ciclo celular nos tumores, correlacionando-os com as características clínico-patológicas (BRESCHIA *et al.*, 1990; KIMBALL *et al.*, 1996; LAGE *et al.*, 1992).

A citometria de imagem é uma das novas tecnologias que vem sendo utilizada com sucesso em Países desenvolvidos como complemento para análises laboratoriais de rotina. Além disso, a citometria de imagem também pode ser usada como um método de controle de qualidade em diagnósticos histológicos e citológicos. Em pacientes com diagnóstico citológico positivo para células tumorais e acompanhamento histológico negativo, a detecção de aneuploidia do DNA deveria motivar o patologista a trabalhar mais completamente um dado espécime de conização ou biópsia (BOCKING & NGUYEN, 2004).

Mais de 40 laboratórios na Europa, Estados Unidos e Ásia trabalham com 13 diferentes sistemas de citometria como observado na Tabela 2.

Tabela 2. Sistemas de citometria de imagem, distribuidores e número de usuários (HAROSKE *et al.*, 2000).

Sistemas	Distribuidor	Número de usuários
AxioHOME	Zeiss/Alcatel (Alemanha/França)	3
ACAS	Ahrens (Alemanha)	1
CAS 160	Becton & Dickinson (EUA)	3
CAS 200	Becton & Dickinson (EUA)	2
CIRES/QUIC-DNA	Zeiss/Roche (Alemanha/França)	3
CM-1	Hundt (Alemanha)	3
KONTRON	Zeiss (Alemanha)	1
OPTIMAS	Optimas (EUA)	5
Pathology Workstation	Roche (França)	1
Quanticyt	UDDL	1
Qploidy	Leica (Alemanha)	1
SAMBA	Unilog (França)	4
VITUM	SIS (Alemanha)	1

A citometria de imagem pode ser aplicada a pequeno número de células, permite medidas seletivas de células classificadas morfológicamente em populações mistas, identifica e seleciona medidas de possíveis eventos raros, é um controle de qualidade de imagens dos núcleos armazenados ou para novas medidas após realocização. Além disso, associa padrões histológicos de classificação de tumores aos padrões de quantificação do DNA e pode ser utilizada em esfregaços previamente corados que são descorados para utilização da reação de Feulgen (BOCKING *et al.*, 1994; BOCKING, 1995; CAREY, 1994).

A reação de Feulgen é uma técnica citoquímica específica para DNA (HARDIE *et al.*, 2002). Essa técnica baseia-se na exposição de grupos aldeído na molécula de DNA, como resultado de uma hidrólise ácida, e na posterior ligação da pararosanilina, rosanilina ou mangenta rosa, presentes no reativo de Schiff, aos grupos aldeído formados pelo tratamento com ácido clorídrico (CHIECO & DERENZINI, 1999).

A imagem capturada na citometria de imagem é convertida em pixels, que estão relacionados a uma cor e uma intensidade em específico, e processada automaticamente pelo programa de análise de imagens, gerando valores de absorvância relacionados com a área, denominados valores de densidade óptica integrada (DOI) (HARDIE *et al.*, 2002).

A distribuição dos valores relativos do conteúdo de DNA obtidos pela DOI são reescalado em unidades de valor-C, para facilitar a plotagem de um padrão de histograma característico, no qual são analisados os picos G0/G1 e G2/M, conforme algoritmos de interpretação diagnóstica propostos por Haroske e Bocking em 2001 e 2004, respectivamente (HAROSKE *et al.*, 2001; BOCKING & NGUYEN, 2004).

As células em proliferação ativa passam por quatro estágios, designados como G1, S, G2 e M. O estado diplóide de repouso é denominado fase G0. Células 2c, em humanos, contêm 7,14 picogramas de DNA até a entrada no ciclo de proliferação, sendo neste ponto denominado fase G1 (*gap* 1). Durante a fase S, cada célula duplica seu conteúdo de DNA nuclear até atingir 14,28 picogramas. A fase G2 apresenta um índice de DNA equivalente a 4c. Na fase M, a célula se divide, gerando duas células diplóides que podem entrar na fase G0 ou permanecer em ciclo celular (ALBERTS *et al.*, 1994; RIVOIRE *et al.*, 2001).

A maioria das análises realizadas, via citometria de imagem, utiliza fonte de luz mono ou policromáticas que é processada pelas câmeras analógicas/digitais. Entretanto, no caso de luz com três canais (24 bits - RGB), apenas o canal referente ao comprimento de onda na faixa verde é utilizado. No caso de imagens monocromáticas, estudos citométricos em humanos têm utilizado, principalmente, a escala de valor do pixel com 8 bits (256 tons de cinza) (VOLGMAYR & GREILHUBER, 1998) ou 12 bits (4.096 tons de cinza) (FONTES, 2003; ROSADO, 2004; CLARINDO, 2004).

Conforme o consenso ESACP (*European Society for Analytical Cellular Pathology*) 2001 alguns critérios são levados em consideração para a quantificação do DNA como: (i) utilização de células de referência, isto é, de padrões com valor 2c previamente estabelecido, para comparação das

medidas de densidade; (ii) preparação e análise dos padrões juntamente com as amostras do espécime, de tal forma que as células de referência passem pelos mesmos processos que a amostra, em iguais condições; e, (iii) o coeficiente de variação (CV) entre as medidas obtidas tanto para as amostras quanto para os padrões deve ser inferior a 5% (COEN *et al.*, 1992; BOCKING *et al.*, 1995; HAROSKE *et al.*, 1998; HAROSKE *et al.*, 2001).

A citometria de imagem do DNA tem sido aceita na patologia e na citopatologia como meio mais objetivo para obter informações relativas ao diagnóstico e prognóstico nos cânceres humanos (DOUDKINE *et al.*, 1995). As aplicações da citometria de imagem no diagnóstico e prognóstico de diversas neoplasias podem ser observadas em vários estudos:

- BOCKING *et al.*, 1986, diagnosticaram carcinoma *in situ* da cérvix com uma sensibilidade de 98,6% e especificidade de 100%;
- HAFIZ *et al.*, 1988, diagnosticaram mesoteliomas com uma sensibilidade de 89% e especificidade de 100%;
- CHATELAIN *et al.*, 1989, identificaram lesões *borderline* (displasia leve a moderada) de epitélio com colicitose (HPV) da cérvix uterina com um valor preditivo positivo de 100%;
- NADJARI *et al.*, 1999, diagnosticaram melanomas e carcinomas de células escamosas da córnea e conjuntiva com uma sensibilidade e especificidade de 100%;
- NADJARI *et al.*, 1999, identificaram neoplasias de tireóide com um valor preditivo positivo de 100%;
- REMMERBACH *et al.*, 2001, alcançaram uma sensibilidade de 98,2% e especificidade de 100% para o diagnóstico citológico precoce de câncer oral invasivo;
- BIESTERFELD *et al.*, 2001, conseguiram uma sensibilidade de 95,9% e especificidade de 100% para o diagnóstico de adenocarcinoma cervical;
- SUDBΦ *et al.*, 2001, puderam prever o desenvolvimento de câncer invasivo oral com um valor preditivo positivo de 90% dentro de cinco anos;

- Em lesões pré-neoplásicas como ASC-US e LSIL, GROTE *et al.*, 2004, puderam prever histologicamente a malignidade dentro de dois meses com um valor preditivo positivo de 54%;

A citometria de imagem possibilita ampla avaliação da aneuploidia do DNA em vários tumores. Os dados indicam, geralmente, um prognóstico ruim nos tumores aneuplóides que são relacionados à menor sobrevida e tempo de recorrência (COHEN, 1996). No entanto, os resultados da análise do conteúdo de DNA não devem ser usados como única base para decisões clínicas, e sim, serem usados em conjunto com parâmetros clínicos e outros testes laboratoriais (CAREY, 1994; COHEN, 1996; HAROSKE *et al.*, 1997; WALDMAN *et al.*, 1996). A combinação de dois ou mais métodos adjuvantes no mesmo material aumenta a acurácia diagnóstica (BOCKING *et al.*, 2004) como observado nos estudos:

- PLANZ *et al.*, 2001, alcançaram uma sensibilidade de 94% e especificidade de 100% para a identificação citológica de câncer de bexiga em urina aplicando a combinação imunocitoquímica e citometria de imagem;
- LORENZATO *et al.*, 2001, alcançaram uma sensibilidade de 90,9% e especificidade de 95,4% para a identificação citológica de HSIL na cérvix uterina aplicando a combinação captura híbrida II e citometria de imagem;

Métodos diagnósticos adjuvantes correntemente propostos para aumentar a acurácia diagnóstica da citologia e histologia cervical são ensaios para a detecção e tipagem do HPV e citometria de imagem (BOCKING, 1995; BOCKING & MOTHERBY, 1999; BOCKING & NGUYEN, 2004). Em uma série de 50 pacientes com displasia cervical leve, moderada e severa, Kashyap e colaboradores descobriram que 44% dos pacientes mostraram um padrão aneuplóide de DNA, ao passo que a positividade para HPV de alto risco oncogênico foi encontrado em 46% dos pacientes. O acompanhamento dos dados revelou que 72,7% dos pacientes que tiveram um padrão aneuplóide de

DNA e foram positivos para o HPV de alto risco progrediram para carcinoma *in situ*, comparado com somente 4,4% dos pacientes que foram positivos para o HPV de alto risco e tiveram um padrão euplóide de DNA (KUHNS *et al.*; 2000).

Em casos de equívocos no diagnóstico citológico, a detecção citométrica de aneuploidia do DNA revela a potencial presença futura de células malignas, especialmente quando há discrepâncias entre diagnóstico citológico e histológico. Em uma série de 170 amostras cervicais de rotina, aparentemente falso-positivas, a aneuploidia do DNA foi encontrada em 47 amostras sem explicação histológica. Usando aneuploidia do DNA como um sensível marcador de malignidade no epitélio uterino, os autores classificaram àqueles casos como histologicamente falso-negativos, e não como diagnóstico citológico falso-positivo (BOCKING & NGUYEN, 2004).

Nas neoplasias intra-epiteliais cervicais, as lesões aneuplóides provavelmente persistem ou progridem até a malignidade, enquanto lesões diplóides ou poliplóides regredem. Na cérvix uterina a presença de aneuploidia em SIL está estritamente correlacionada ao seu grau, estando presente em 75% a 100% das pacientes com lesões de alto grau (WALSH *et al.*, 1995; ONOFRE *et al.*, 2003).

Se a aneuploidia do epitélio escamoso ectocervical pode predizer 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 poderia ser potencialmente valioso na avaliação global de esfregaços cervicais de pacientes com difícil diagnóstico citológico (McDERMOTT, 1997).

Tem sido relatado que a ploidia de DNA é um indicador válido de resposta para radioterapia em mulheres com malignidade cervical. Em 1991, Yu e colaboradores descobriram que tumores com aneuploidia de DNA eram mais radiosensíveis que tumores diplóides. Eles concluíram que há uma correlação direta entre conteúdo de DNA e radiosensibilidade em carcinoma cervical invasivo (BIESTERFELD *et al.*; 2001).

A aneuploidia é largamente aceita como marcador de malignidade em lesões *borderline* da cérvix uterina. Muitos autores consideram aneuploidia somente se uma lesão revela um padrão de distribuição de DNA diferente de 2c, 4c ou poliploidia (c = quantidade de DNA em uma célula haplóide). Entretanto, outros consideram uma lesão aneuplóide somente se células individuais apresentarem um conteúdo de DNA > 5c. Este conceito está baseado na observação que células com um conteúdo de DNA > 5c não ocorrem em lesões benignas que não foram infectadas por vírus (CHATELAIN *et al.*; 1989).

Em 1989, Chatelain e colaboradores desenvolveram um algoritmo para diagnóstico de DNA de malignidade. Este diagnóstico foi baseado na detecção de núcleos com um conteúdo de DNA > 5c (5c eventos excedentes), mas excluindo 8c e $16c \pm 12,5\%$. Este algoritmo não era aplicável para amostras que tivessem sido irradiadas ou que revelassem sinais morfológicos de infecção viral, pois os vírus podem causar poliploidia euplóide, que podem resultar em diagnóstico falso-positivo. O HPV é encontrado frequentemente em displasias cervicais e pode resultar em poliploidia acima de 8c. Por esta razão foi ajustado um limiar de detecção de células aneuplóides para 9c de lesões com infecção pelo HPV morfológicamente detectáveis. Os eventos excedendo a 9c (9c EE) representam o número de núcleos com um conteúdo de DNA > 9c em uma preparação citológica e reflete atipia celular, logo pode ser considerado um marcador biológico útil (CHATELAIN *et al.*; 1989).

Mais recentemente, Bollmann e colaboradores descobriram que ASC-US com eventos raros de DNA > conteúdo de DNA 9c foi encontrado exclusivamente em combinação com HPV de alto risco oncogênico (BOLLMANN *et al.*; 2003).

Existem poucos estudos relacionando o conteúdo de DNA e o grau de oncogenicidade do HPV em lesões como ASC-US, LSIL e HSIL, como observado na Tabela 3. O mesmo é observado em estudos relacionando porcentagem de ploidia, lesões intra-epiteliais pré-neoplásicas e grau de oncogenicidade do HPV como observado na Tabela 4.

Tabela 3. Comparação de diagnóstico citopatológico, frequência de células com conteúdo de DNA > 5c e > 9c e grau de oncogenicidade do HPV.

Citologia	Frequência de células com conteúdo de DNA > 5c	Frequência de células com conteúdo de DNA > 9c	Grau de Oncogenicidade do HPV	Autores
ASC-US	menor	maior	alto	BOCKING <i>et al.</i> , 2004
LSIL	maior	menor	alto* baixo	BOLLMANN <i>et al.</i> , 2003
HSIL	menor	maior	alto	BOLLMANN <i>et al.</i> , 2003
HSIL	maior	menor	alto	MÉHES <i>et al.</i> , 2004
HSIL	NA	maior	alto	BOLLMANN <i>et al.</i> , 2005

* Maior número de casos em relação ao HPV de baixo risco; NA = Não foi analisado no estudo;

Tabela 4. Comparação de ploidia do DNA, diagnóstico citopatológico e grau de oncogenicidade do HPV.

Ploidia de DNA	ASC-US (%)	LSIL (%)	HSIL (%)	Grau de Oncogenicidade do HPV	Autores
Diplóide	NA	NA		NA	BOCKING <i>et al.</i> , 2004
Aneuplóide		20	68,8	alto	
Poliplóide		NA		NA	
Diplóide	NA	39	4	NA	BOLLMANN <i>et al.</i> , 2001
Aneuplóide		4	79		
Poliplóide		57	17		
Diplóide	NA	55	10	NA	SHIRATA <i>et al.</i> , 2001
Aneuplóide		40	75		
Poliplóide		5	15		
Diplóide	NA			NA	NGUYEN <i>et al.</i> , 2004
Aneuplóide	44	40,3	94,9		
Poliplóide	NA				

NA = Não foi analisado no estudo;

Recentemente, Nguyen e colaboradores relataram uma correlação inter-observador de 94,1% em medidas do DNA realizadas em 202 esfregaços de rotina ASC-US positivo. O alto valor de concordância inter-observador alcançado neste estudo foi de 20% maior que as taxas relatadas na literatura para diagnóstico morfológicamente baseado na citologia ou histologia de displasias cervicais. Explicações deste alto valor podem abranger a alta padronização de medidas do DNA e interpretação de dados diagnósticos e a objetividade do método (BOCKING & NGUYEN, 2004).

A citometria de imagem do DNA nuclear também pode contribuir para a prevenção de custos que os resultados de repetidos e desnecessários controles citológicos, histológicos e clínicos podem oferecer, bem como para os procedimentos cirúrgicos desnecessários em pacientes com ASC-US/LSIL. Se a aneuploidia do DNA é detectada, então a indicação da intervenção cirúrgica (conização, excisão com alça cirúrgica de alta frequência – LEEP, etc) deveria ser assumida, também evitaria os custos que ocorrem quando carcinomas avançados requerem tratamento (BOCKING, 1995; BOCKING & NGUYEN, 2004).

Em suma, o valor da determinação da ploidia do DNA no carcinoma da cérvix uterina, permite inferir que as variações anormais, na distribuição do conteúdo de DNA, nas células tumorais na interfase, estão relacionadas com as anormalidades cromossômicas. Estudos cromossômicos e medidas do conteúdo de DNA nas células de carcinoma cervical confirmam que clones anormais são encontrados nos estágios tardios, pré-invasivos (HSIL). No mínimo metade das lesões tem um valor modal alto, acima de triploide e muitas vezes estão na região hipotetraploide (SILVA FILHO & BIBBO, 1998; HAROSKE *et al.*, 2000).

Tumores com modos normais ou próximos do normal frequentemente têm um prognóstico favorável, mas isto não é verdadeiro para os tumores de todos os tipos ou locais, incluindo o carcinoma epidermóide da cérvix, no qual os tumores próximos de triploide podem ter prognóstico relativamente favorável (HAROSKE *et al.*, 2000).

Várias evidências biológicas e dados clínicos confirmam a utilidade da citometria de imagem como um método adjuvante, adequado para o diagnóstico e prognóstico de lesões intra-epiteliais cervicais e carcinoma cervical invasivo. Anteriormente uma ferramenta de pesquisa, a citometria de imagem do DNA padronizada tem se tornado um método laboratorial proveitoso e de baixo custo para estabelecer, objetivamente e com reprodutibilidade, um diagnóstico precoce de lesões intra-epiteliais cervicais suspeitas de progressão, com alto nível de qualidade. Além disso, pode contribuir para a avaliação de relevantes parâmetros prognósticos e para o monitoramento do tratamento de pacientes com carcinoma cervical invasivo (BOCKING & NGUYEN, 2004).

Para a determinação do carcinoma cervical, o uso das técnicas atuais, como o teste de Papanicolaou, apresenta 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 quantificação da ploidia de DNA por citometria de imagem, que além de apresentar excepcional eficiência nos países de primeiro mundo como Estados Unidos, Alemanha e França, seguramente estará ao alcance dos patologistas brasileiros em futuro próximo, desde que padronizada dentro de nossas condições laboratoriais e solicitada, pelos médicos, como exame complementar aos já estabelecidos como ferramenta na luta contra o câncer.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Padronizar a metodologia de citometria de imagem para avaliar o conteúdo de DNA nuclear de células escamosas do colo uterino;

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar procedimentos para calibração do sistema de análise de imagem, quanto à estabilidade, linearidade das medidas de densidade óptica e uniformidade da iluminação na imagem de captura, a fim de obter parâmetros que demonstrem a confiabilidade das medidas de densidade óptica integradas;
- Aplicar metodologias de preparação de lâminas, fixação, hidrólise e coloração por meio da reação de Feulgen para estudos de citometria de imagem em núcleos de células epiteliais de colo uterino;
- Analisar por citometria de imagem e dentro das condições padronizadas, amostras de epitélio clinicamente normal, ASC-US, LSIL e HSIL;
- Verificar a existência de diferenças no conteúdo de DNA, em termos de valor C, entre células epiteliais normais de colo uterino, ASC-US, LSIL e HSIL;
- Elaborar histogramas, a partir dos resultados obtidos, que possam evidenciar com confiabilidade as eventuais semelhanças e diferenças características de cada caso;
- Disponibilizar esta metodologia para outros laboratórios que possam ter interesse na sua implementação na rotina;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA

Esta dissertação é resultado do projeto “Citometria de Imagem do DNA Nuclear de Células Epiteliais do Colo Uterino de Mulheres Sexualmente Ativas”, que foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, aprovado em 26 de abril de 2004 (anexo 1).

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 Tocoginecologia do Hospital Universitário. Optou-se por realizar o estudo neste Serviço em decorrência da rotina assistencial que 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 (anexo 2).

Durante o atendimento médico, foi catalogado o resultado do exame citopatológico e coletada amostra de material cervical, utilizando-se o *kit* DIGENE[®], que é composto de um *swab* e um tubo plástico que contém um líquido universal citológico, o qual foi desenvolvido para preservação de células, DNA, RNA e proteínas. Em seguida, os tubetes foram resfriados entre 2° e 8° C, para garantir a viabilidade das células, e encaminhados ao Laboratório de Citogenética e Citometria da Universidade Federal de Viçosa - MG, onde houve a preparação dos espécimes citológicos utilizando-se como

base o consenso ESACP (*European Society for Analytical Cellular Pathology*) 2001 e as diretrizes de citometria de imagem do DNA em citologia cervical de 2004.

4.3 GRUPO CONTROLE

Foi considerado grupo controle neste estudo:

- Pacientes escolhidas ao acaso, durante consulta ao ginecologista, para a coleta do epitélio da mucosa bucal.

4.4 GRUPO DE INCLUSÃO

Foram considerados grupos de inclusão neste estudo:

- Pacientes submetidas a exames de rotina, com resultado citológico Negativo para lesão intra-epitelial e malignidade (NILM);
- Pacientes com alterações como células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US);
- Pacientes com diagnóstico citológico de lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL);
- Pacientes com diagnóstico citológico de lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL).

4.5 GRUPO DE EXCLUSÃO

Foram considerados grupos de exclusão neste estudo:

- Pacientes gestantes e em tratamento ginecológico (quimioterapia, radioterapia, cauterização, cirurgia e tratamento local com ácido tricloroacético (TCA), e outros medicamentos);
- Pacientes com diagnóstico citológico ou histológico de carcinoma invasor.

4.6 ESTUDO CEGO

Para testar a hipótese proposta neste estudo foi realizado um estudo cego, onde o pesquisador, que processou as análises por Citometria de Imagem, não tinha conhecimento do resultado da colpocitologia oncótica.

4.7 AVALIAÇÃO CITOPATOLÓGICA

A avaliação citopatológica foi realizada anteriormente à consulta ao médico a fim de que o mesmo pudesse analisar o resultado do exame e, então, coletar a amostra para este estudo.

Nesta pesquisa foi adotada a classificação Bethesda de 2001 por ser uma terminologia que comunica informações clinicamente relevantes a partir do laboratório para o médico responsável pelo atendimento das pacientes, por ser uma terminologia uniforme e razoavelmente reprodutível entre diferentes patologistas e laboratórios e também por refletir a compreensão mais atual da neoplasia cervical (SOLOMON & NAYAR, 2005).

Basicamente os critérios adotados pelo citopatologista na classificação, segundo SOLOMON & NAYAR, 2005, foram:

- NILM: Ausência de evidência celular e nuclear de neoplasia;
- ASC-US: Núcleos com aproximadamente 2 ½ a 3 vezes o tamanho da área do núcleo de uma célula escamosa normal intermediária (aproximadamente 35 μm^2). A proporção núcleo e citoplasma é ligeiramente aumentada (N/C). A hiper Cromasia nuclear é mínima e há irregularidade na distribuição da cromatina ou da forma nuclear;
- LSIL: O aumento nuclear é pelo menos três vezes a área do núcleo de uma célula intermediária normal, resultando em aumento da relação núcleo/citoplasma. Graus variáveis de hiper Cromasia nuclear são acompanhados por variações no tamanho nuclear, número e formato. A binucleação ou multinucleação estão geralmente presentes. A cromatina apresenta em geral uma distribuição regular, apesar de ser grosseiramente granular; por outro lado, a cromatina pode parecer borrada ou degenerada. O contorno das membranas nucleares é frequentemente e ligeiramente irregular, mas pode ser liso;

- HSIL: A hiper Cromasia nuclear é acompanhada por variações no tamanho nuclear e na sua forma. O grau de aumento nuclear é mais variável do que o visto na LSIL. Algumas células com HSIL apresentam o mesmo grau de aumento nuclear como na LSIL, mas a área do citoplasma está diminuída, levando ao aumento acentuado da proporção núcleo/citoplasma. Outras células apresentam uma proporção núcleo/citoplasma muito elevada, mas o tamanho real dos núcleos pode ser consideravelmente menor do que na LSIL. A cromatina pode ser fina ou grosseiramente granular e com distribuição regular. O contorno da membrana nuclear é bastante irregular e frequentemente demonstra entalhes proeminentes ou sulcos.

4.8 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

4.8.1 Preparação dos espécimes citológicos

4.8.1.1 Fixação Celular

As amostras contidas nos *kits* de coleta foram primeiramente agitadas em vórtex, durante aproximadamente 30 segundos. Em seguida, todo o conteúdo de cada tubo do *kit* (aproximadamente 1 ml) foi transferido para Eppendorfs, e o volume foi completado (q.s.p. 2ml) com solução fixadora de etanol 70%. O material foi centrifugado a 1.100 rpm, durante 5 minutos e o sobrenadante descartado. Repetiu-se esta etapa fixadora por 3 vezes com intervalos de 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram armazenadas na mesma solução fixadora, em freezer à - 20° C.

4.8.1.2 Preparação da Lâmina

A suspensão de células armazenada em freezer foi centrifugada a 1.100 rpm, durante 5 minutos e o sobrenadante descartado. Ao centrifugado completou-se para o volume final de 0,5 ml de etanol 70% . Após uma etapa de vórtex, por 40 segundos, retirou-se 50 µl da suspensão, que foi gotejada em lâmina rigorosamente limpa. A lâmina foi seca ao ar, com agitação, e em chapa aquecedora (60° C), por no mínimo 1 hora.

Cada lâmina foi preparada com gotejamentos de uma suspensão de células-padrão normal, proveniente do epitélio bucal, gotejada do lado A (esquerdo) e de uma suspensão celular obtida do epitélio cervical uterino, gotejada no lado B (direito).

Para cada amostra foram confeccionadas 3 lâminas em dias diferentes e com soluções e corantes recém-preparados.

4.8.1.3 Pós-fixação

As lâminas foram colocadas em solução pós-fixadora de formaldeído 4% durante 60 minutos. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 10 minutos e submetidas à hidrólise em HCl 5 M, à 20° C, durante 60 minutos. Após a hidrólise, as lâminas foram lavadas novamente, durante 3 minutos, em água destilada, com 3 repetições.

4.8.1.4 Coloração

As lâminas foram colocadas em câmara úmida, no escuro, e com Reativo de Schiff durante 12 horas. Após a coloração, as lâminas foram submetidas a três lavagens em água sulfurosa durante 2 minutos para remoção do excesso de Reativo de Schiff. Em seguida, as lâminas foram submetidas a três lavagens em água destilada durante 1 minuto. As lâminas foram secas ao ar, montadas com lamínula e óleo de imersão, e armazenadas no escuro até o momento da captura das imagens (MENDONÇA, 2006).

- A Reação de Feulgen foi realizada conforme a especificação seguinte:

Soluções:

a) Reativo de Schiff (com Fucsina básica):

- 0,5 Fucsina básica (Merck®);
- 85 ml de água destilada (fervendo);
- 15 ml de HCl 1 M;
- 2,23 g de $K_2S_2O_5$;
- 24 h em repouso;
- Carvão ativo;

b) Água Sulfurosa:

- 90 ml de água destilada;
- 5 ml HCl 1 M;
- 5 ml de metabissulfito 10% (p/v);

c) Metabissulfito 10% (p/v);

d) HCl 5 M;

e) Solução Pós-fixadora: Formaldeído 4%

- 4 ml de formaldeído (solução 35%);
- q.s.p 100 ml de água destilada;

4.8.2 Citometria de imagem

4.8.2.1 Sistema de análise de imagem

O sistema de análise de imagem utilizado no presente estudo consistiu de um fotomicroscópio OlympusTM, modelo BX60 com fonte de luz estabilizada, acoplado com uma câmera digital Photometrics[®], monocromática CCD de 12 bits, do *kit* de análise de imagem Cool SNAP-proTM. Utilizou-se um filtro de interferência de cor verde (IF 550) e filtros de densidade neutra (OlympusTM). Cada imagem foi capturada com uma objetiva UPlanFI de 40x com 0,75 de abertura numérica. Após a calibração do sistema óptico, pelo método de *Köhler*, as imagens dos núcleos foram capturadas e processadas com auxílio das ferramentas do programa Image Pro[®] Plus 4.5, do *kit* de análise de imagem Cool SNAP-proTM. Uma curva de calibração foi obtida a partir de filtros de densidades conhecidas (DO = 0,15; 0,30; 0,40; 0,60; 0,90; 2,50), e certificados pela Edmund Industrial Optics.

4.8.2.2 Calibração do sistema óptico e digital

A avaliação do sistema de análise de imagem foi realizada conforme descrito por PUECH & GIROUD, 1999, HARDIE *et al.*, 2002, VILHAR & DERMASTIA, 2002, MENDONÇA, 2006 e consistiu da realização de testes de estabilidade, linearidade e uniformidade da densidade óptica integrada (DOI) do núcleo, para atender as normas do ESACP 2001.

O teste de estabilidade consiste na determinação do tempo que o sistema de análise de imagens necessita, a partir do instante em que foi ligado, para tornar-se estável. Para a realização do teste de estabilidade foram calculados os valores de DOI de um pixel e de um núcleo de eritrócito de fêmea de *Gallus domesticus* posicionados no centro da imagem de captura. As imagens foram capturadas em intervalos de 4 minutos, durante 88 minutos.

O teste de linearidade é um procedimento de verificação da correlação entre a DOI real dos objetos e a gerada pelo sistema de análise de imagens. Tal correlação deve ser linear. A avaliação da linearidade do sistema foi

realizada seguindo a metodologia descrita por HARDIE *et al.*, 2002. Utilizou-se de filtros de densidade calibrada (Stepped Density Filter - Edmund Industrial Optics).

Realizou-se um teste de uniformidade para verificar se cada região do campo de visão e de captura da imagem recebe a mesma intensidade luminosa. Este teste avaliou a DOI de um mesmo núcleo posicionado em diferentes coordenadas do campo de captura da imagem. Adotou-se para este procedimento a metodologia descrita por VILHAR & DERMASTIA, 2002, MENDONÇA, 2006.

4.8.2.3 Captura das Imagens

Utilizou-se uma função Macro de programação para automatizar a captura de núcleos individualizados e posteriormente foram agrupados em uma biblioteca de imagens.

A seleção dos núcleos a terem as imagens capturadas seguiu um procedimento semi-interativo, o qual descartou núcleos cuja morfologia não se apresentava íntegra ou que não pertencia ao epitélio escamoso.

4.8.2.4 Cálculo da Densidade Óptica Integrada (DOI)

O processamento da imagem e o cálculo da DOI foram realizados automaticamente pelas ferramentas do sistema de análise de imagem (Image Pro[®] Plus 4.5).

4.8.2.5 Análise de dados

Para as análises estatísticas dos dados obtidos da citometria de imagem das células epiteliais de colo uterino foi utilizado o *software* SPSS 11.4 versão Macintosh[™].

O valor de leitura da DOI de cada núcleo foi reescalonado em termos de valor-C relativo à ploidia do DNA da amostra-padrão, para a elaboração dos histogramas.

4.8.2.6 Análise do histograma de DNA

Seguiram-se basicamente as diretrizes e os algoritmos do ESACP 2001 para a interpretação dos histogramas de DNA dentro da análise de citometria de imagem, conforme Tabela 5 (HAROSKE *et al.*, 2001; BOCKING & NGUYEN, 2004).

Tabela 5. Algoritmos para a diferenciação entre euploidia e aneuploidia em histogramas de DNA da cérvix uterina (BOCKING & NGUYEN, 2004).

DNA-euplóide	Diplóide: $1,8c \leq STL \leq 2,2c$; $5cEE = 0$
	Poliplóide: $1,8c \leq STL \leq 2,2c$ ou $3,6c \leq STL \leq 4,4c$; $9cEE = 0$
DNA-aneuplóide	<i>Stemline</i> – aneuploidia: STL nem diplóide nem poliplóide
	<i>Single cell</i> – aneuploidia: $9cEE > 0$

STL = stemline; 5cEE = Eventos excedentes a 5c; 9cEE: Eventos excedentes a 9c;

Segundo o consenso ESACP 2001, o Coeficiente de Variação (CV) da razão entre a MODA da DOI das células de referência e das células não-patológicas G0/G1 em uma série de medidas deve ser $< 5\%$.

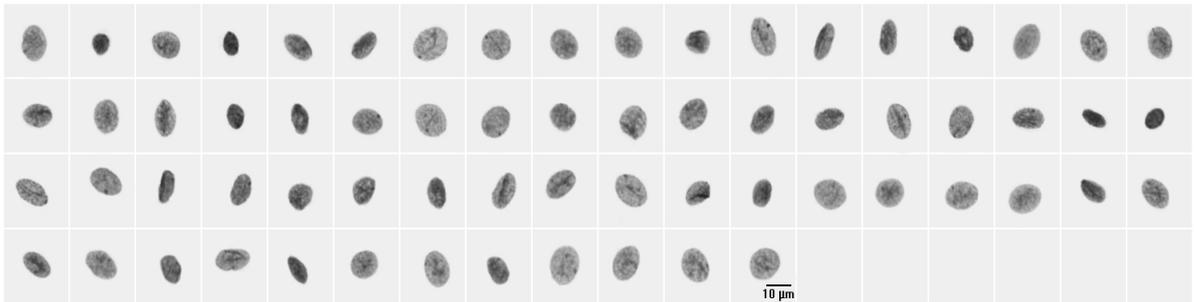
5 RESULTADOS

5.1 BIBLIOTECA DE IMAGENS

As metodologias desenvolvidas para a fixação, hidrólise e coloração estequiométrica do DNA pela reação de Feulgen proporcionaram a obtenção de núcleos de células epiteliais bem preservadas, com coloração considerada adequada para a realização das medidas e determinação dos valores de DOI (Figuras 8-12).

A coloração com Feulgen considerada adequada foi obtida em lâminas hidrolisadas por 60 minutos e coradas durante 12 horas. Períodos inferiores e superiores de hidrólise resultaram em lâminas com núcleos fracamente corados ou de difícil visualização.

Epitélio Bucal



Epitélio Cervical (caso Pil_02)

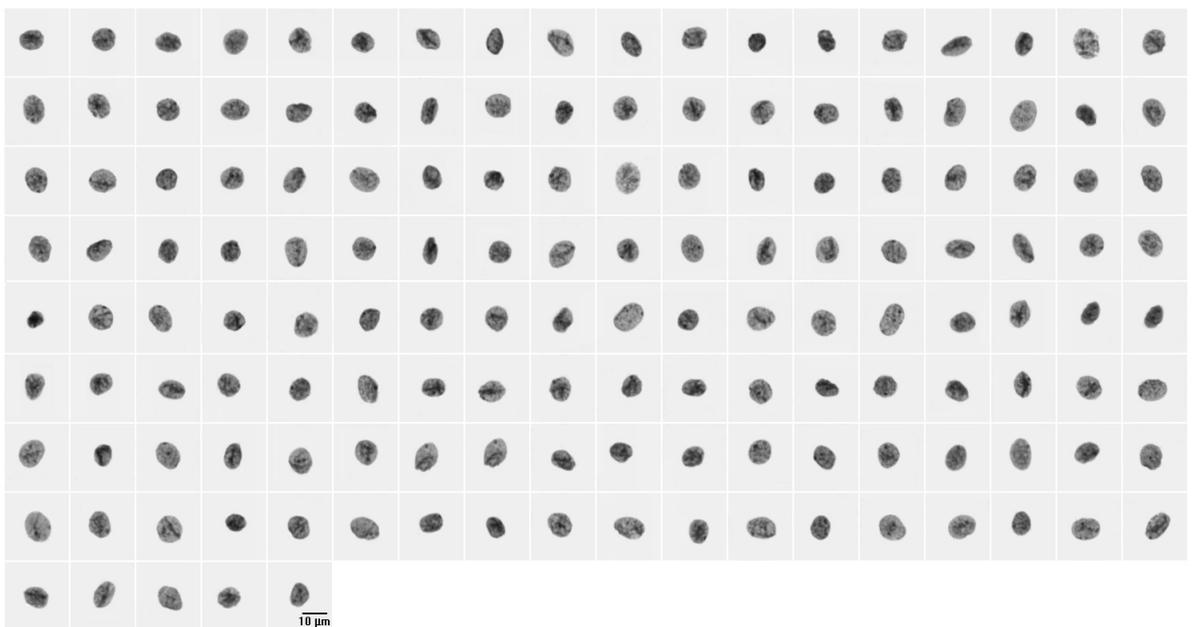
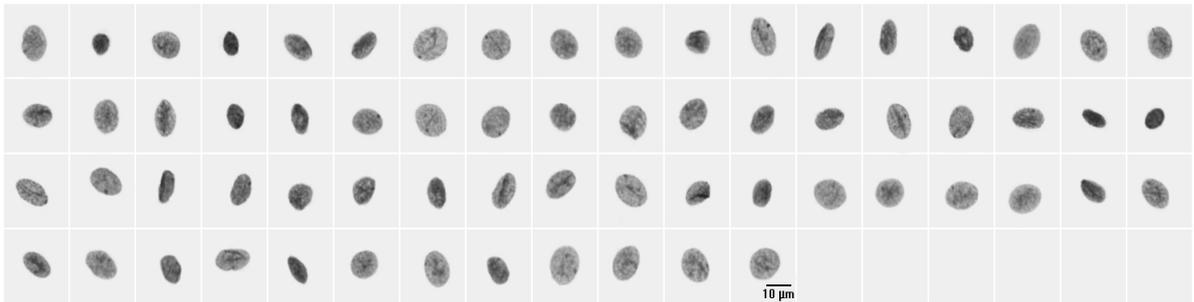


Figura 8. Amostra do conjunto de imagens capturadas de núcleos de células epiteliais da cérvix (caso **Pil_02**) e do padrão epitélio bucal, utilizada para fazer a medida da densidade óptica integrada. Barra 10 μm.

Epitélio Bucal



Epitélio Cervical (caso Pil_05)

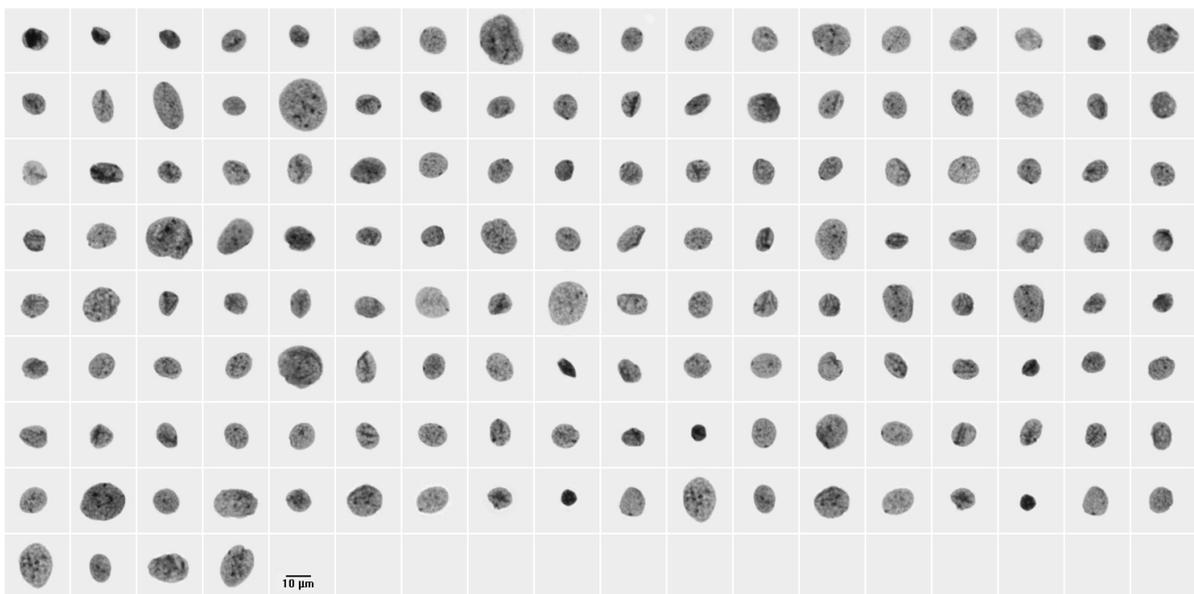


Figura 9. Amostra do conjunto de imagens capturadas de núcleos de células epiteliais da cérvix (caso **Pil_05**) e do padrão epitélio bucal, utilizada para fazer a medida da densidade óptica integrada. Barra 10 μm.

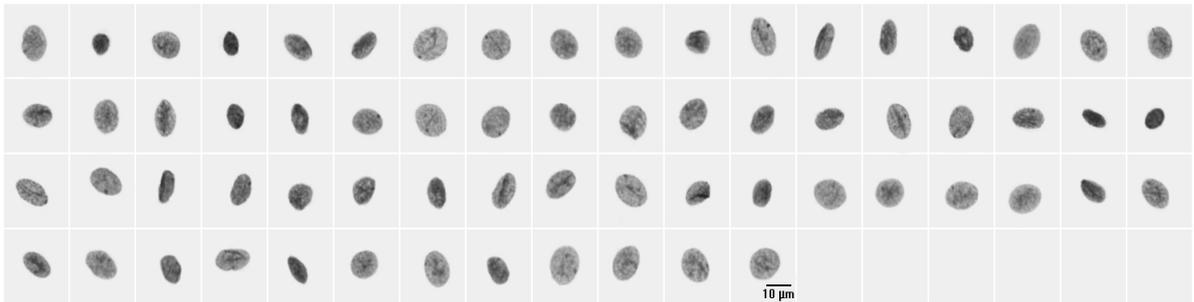
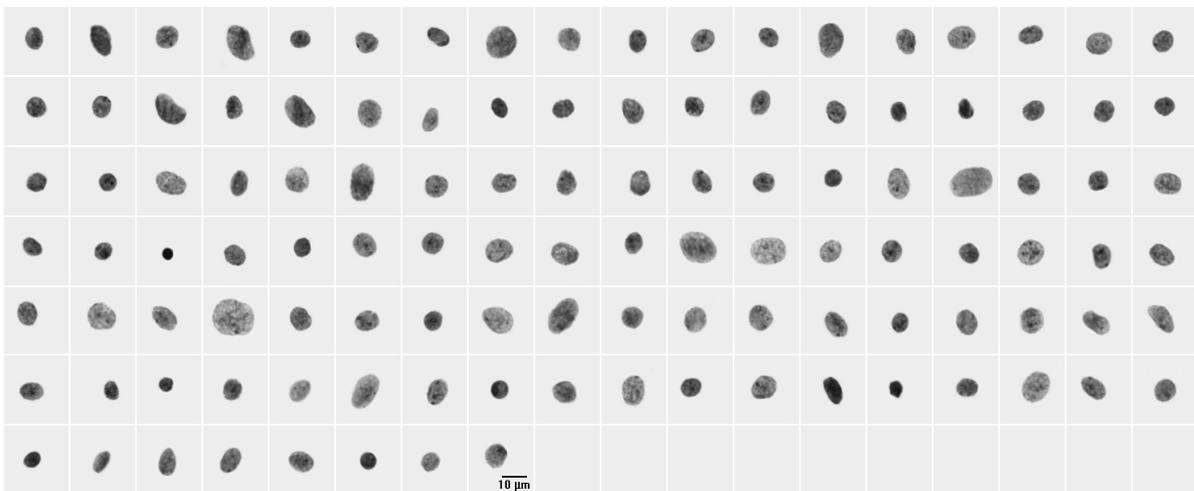
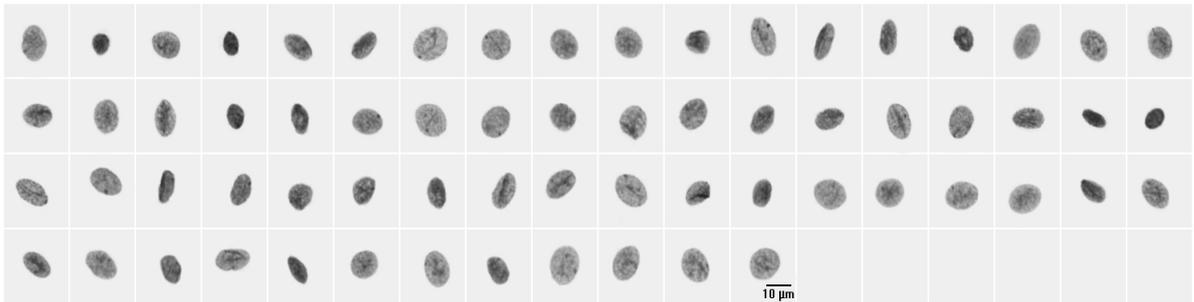
Epitélio Bucal**Epitélio Cervical (caso T_06)**

Figura 10. Amostra do conjunto de imagens capturadas de núcleos de células epiteliais da cérvix (caso **T_06**) e do padrão epitélio bucal, utilizada para fazer a medida da densidade óptica integrada. Barra 10 μm .

Epitélio Bucal



Epitélio Cervical (caso T_13)

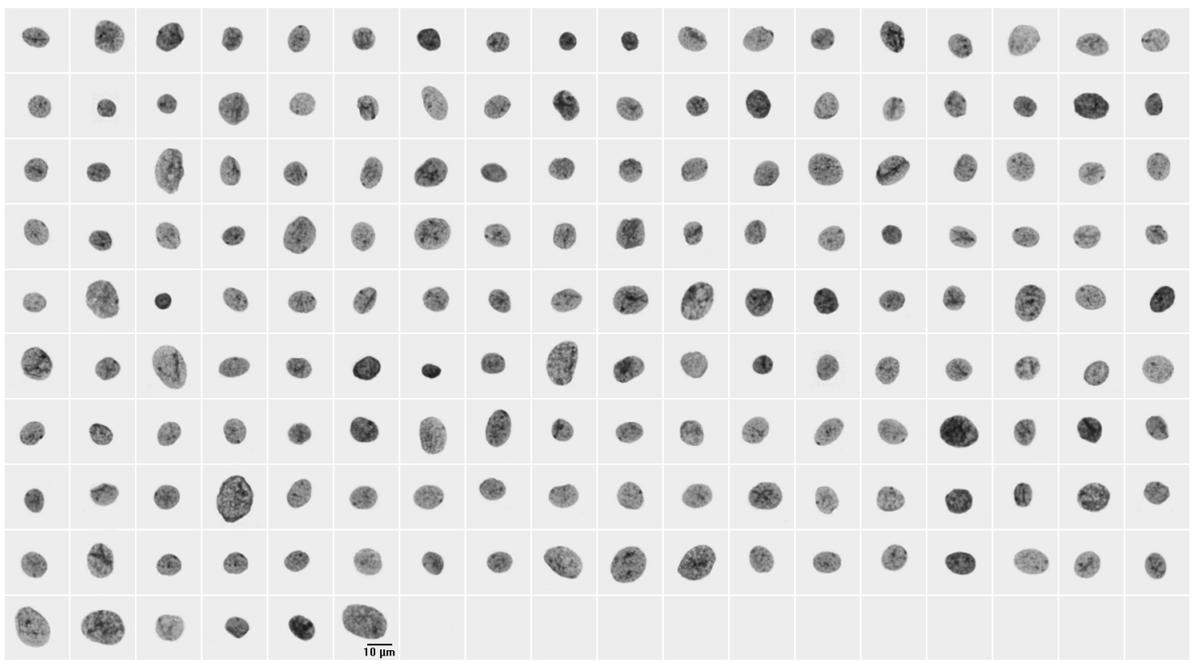
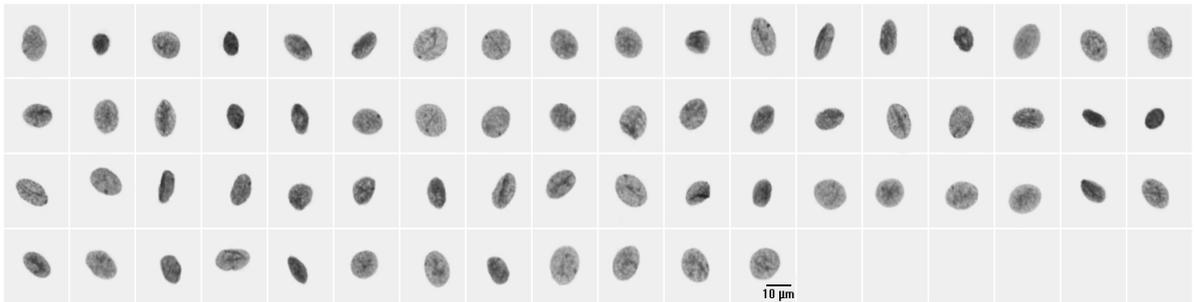


Figura 11. Amostra do conjunto de imagens capturadas de núcleos de células epiteliais da cérvix (caso **T_13**) e do padrão epitélio bucal, utilizada para fazer a medida da densidade óptica integrada. Barra 10 μm .

Epitélio Bucal



Epitélio Cervical (caso Pil_04)

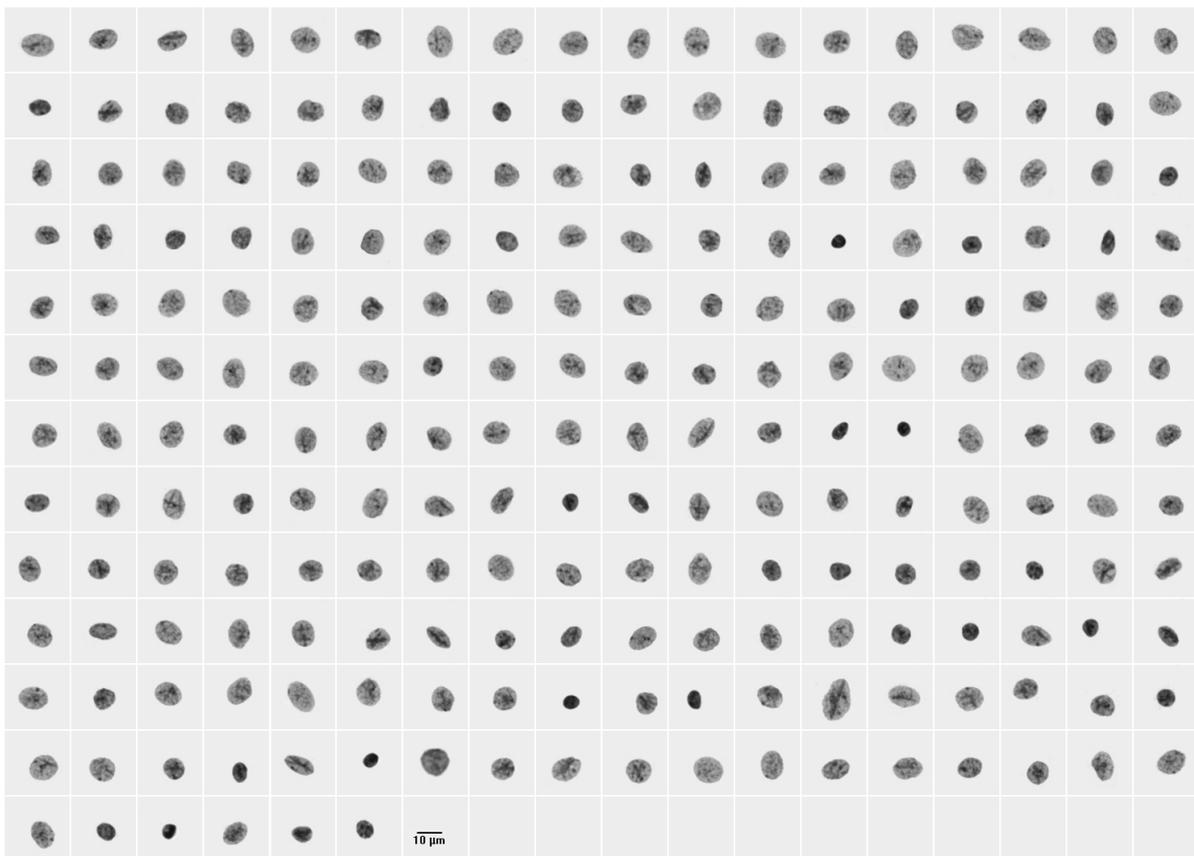


Figura 12. Amostra do conjunto de imagens capturadas de núcleos de células epiteliais da cérvix (caso **Pil_04**) e do padrão epitélio bucal, utilizada para fazer a medida da densidade óptica integrada. Barra 10 μm.

5.2 RESOLUÇÃO DO SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGEM

Tabela 6. Comparação entre o número de núcleos do epitélio bucal (padrão de referência), número de núcleos do epitélio cervical (anteriormente diagnosticados pelo Papanicolaou como NILM, ASC-US, LSIL ou HSIL) em relação a MODA da DOI por lâmina.

Pap	Número de Repetições	Número de Núcleos EB	MODA da DOI	Número de Núcleos EC	MODA da DOI
NILM (caso Pil_02)	L1	60	22,91	33	22,62
	L2	74	23,17	69	23,03
	L3	69	21,18	81	21,71
	L4*	66	21,54	149	21,53
	Total de núcleos	269	-	332	-
NILM (caso T_07)	L1	65	19,31	129	20,63
	L2*	75	20,27	174	20,23
	L3	56	21,25	132	22,85
	L4	93	19,87	156	21,51
	Total de núcleos	289	-	591	-
ASC-US (caso Pil_05)	L1	54	22,32	104	22,21
	L2	64	20,48	92	22,99
	L3	61	21,15	95	22,01
	L4*	85	22,24	148	22,54
	Total de núcleos	264	-	439	-
ASC-US (caso T_06)	L1	77	19,72	89	20,85
	L2*	73	20,21	116	20,34
	L3	65	22,23	69	22,79
	L4	79	22,19	115	23,68
	Total de núcleos	294	-	389	-
LSIL (caso T_01)	L1	68	21,69	32	24,89
	L2	46	21,78	38	23,98
	L3	60	21,04	17	19,34
	L4*	133	21,01	102	22,36
	Total de núcleos	307	-	189	-

Pap	Número de Repetições	Número de Núcleos EB	MODA da DOI	Número de Núcleos EC	MODA da DOI
LSIL (caso T_02)	L1	87	21,99	99	21,66
	L2	87	20,98	94	19,72
	L3	78	22,12	57	22,98
	L4*	81	22,31	146	20,43
	L5	85	21,76	99	23,61
	Total de núcleos	418	-	495	-
LSIL (caso T_03)	L1	76	22,31	40	22,49
	L2	80	22,22	33	23,54
	L3*	83	20,11	90	22,32
	Total de núcleos	239	-	163	-
LSIL (caso T_12)	L1	76	22,97	41	22,48
	L2	59	19,41	51	18,85
	L3*	56	21,62	52	22,18
	L4	62	25,34	36	24,71
	L5	64	17,76	42	18,13
	Total de núcleos	317	-	222	-
LSIL (caso T_13)	L1	65	21,23	104	21,65
	L2*	68	21,18	168	20,22
	L3	54	20,63	136	21,33
	L4	70	19,58	78	20,85
	Total de núcleos	257	-	486	-
HSIL (caso Pii_03)	L1	87	24,42	179	24,26
	L2	89	23,07	151	23,44
	L3*	64	20,79	183	20,81
	L4	74	21,02	23	21,33
	Total de núcleos	314	-	536	-
HSIL (caso Pii_04)	L1	64	22,28	159	22,39
	L2	69	19,74	141	19,95
	L3*	57	19,23	221	19,91
	L4	72	21,34	202	21,59
	Total de núcleos	262	-	723	-

Pap = Exame de Papanicolaou; L = lâmina; EB = Epitélio bucal; EC = Epitélio cervical; DOI = Densidade óptica integrada; *Repetição escolhida para elaboração dos histogramas de DNA;

O CV da razão entre a MODA da DOI das células de referência e das células não-patológicas G0/G1, observado no presente estudo, foi igual a 4,1%.

5.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA DAS AMOSTRAS

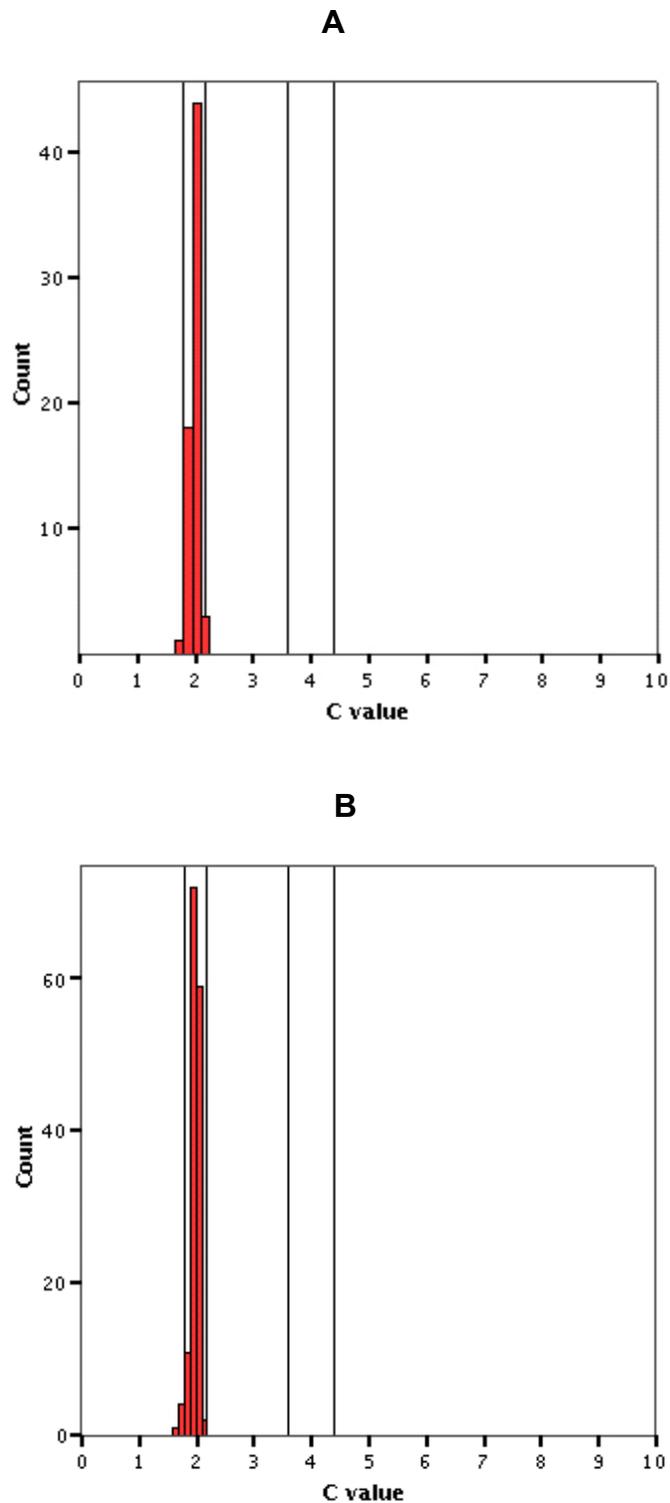


Figura 13. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **Pil_02**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide (normal), *Stemline* em 2c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B).

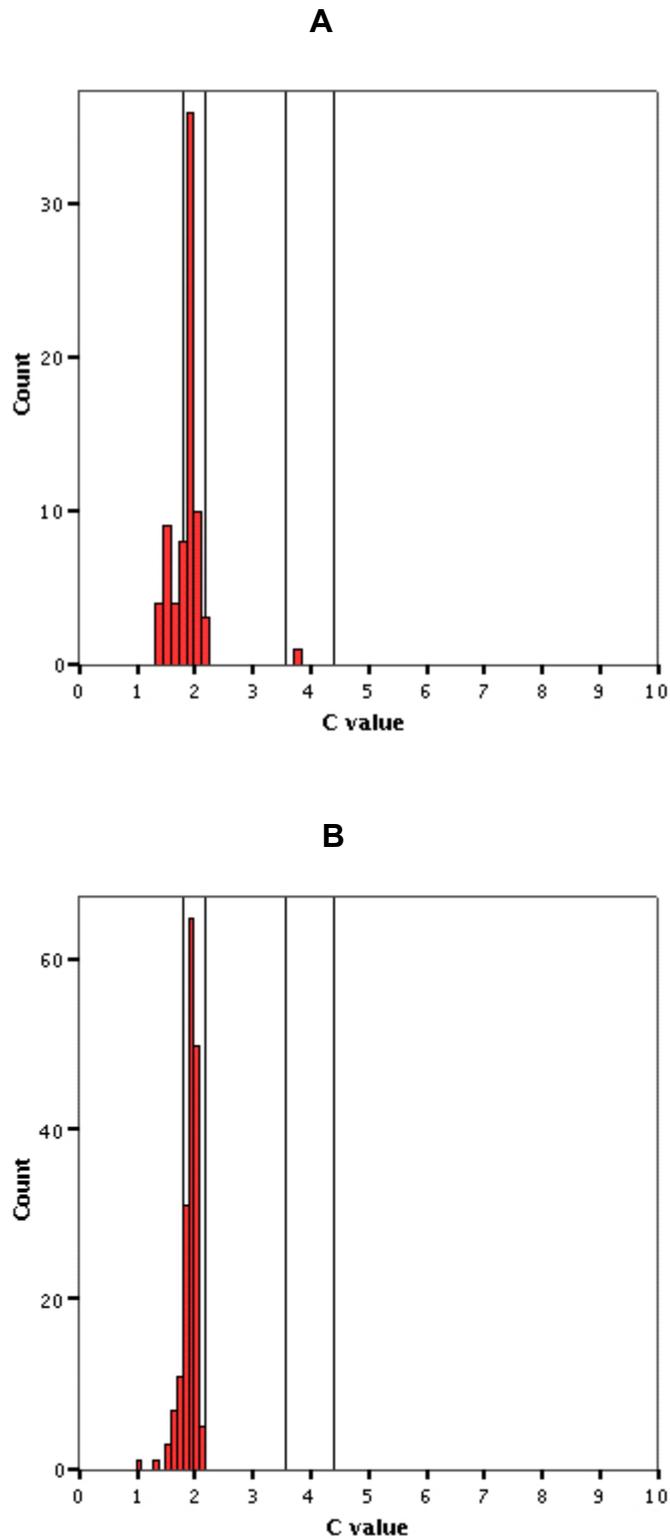


Figura 14. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **T_07**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide (normal), *Stemline* em 2c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B).

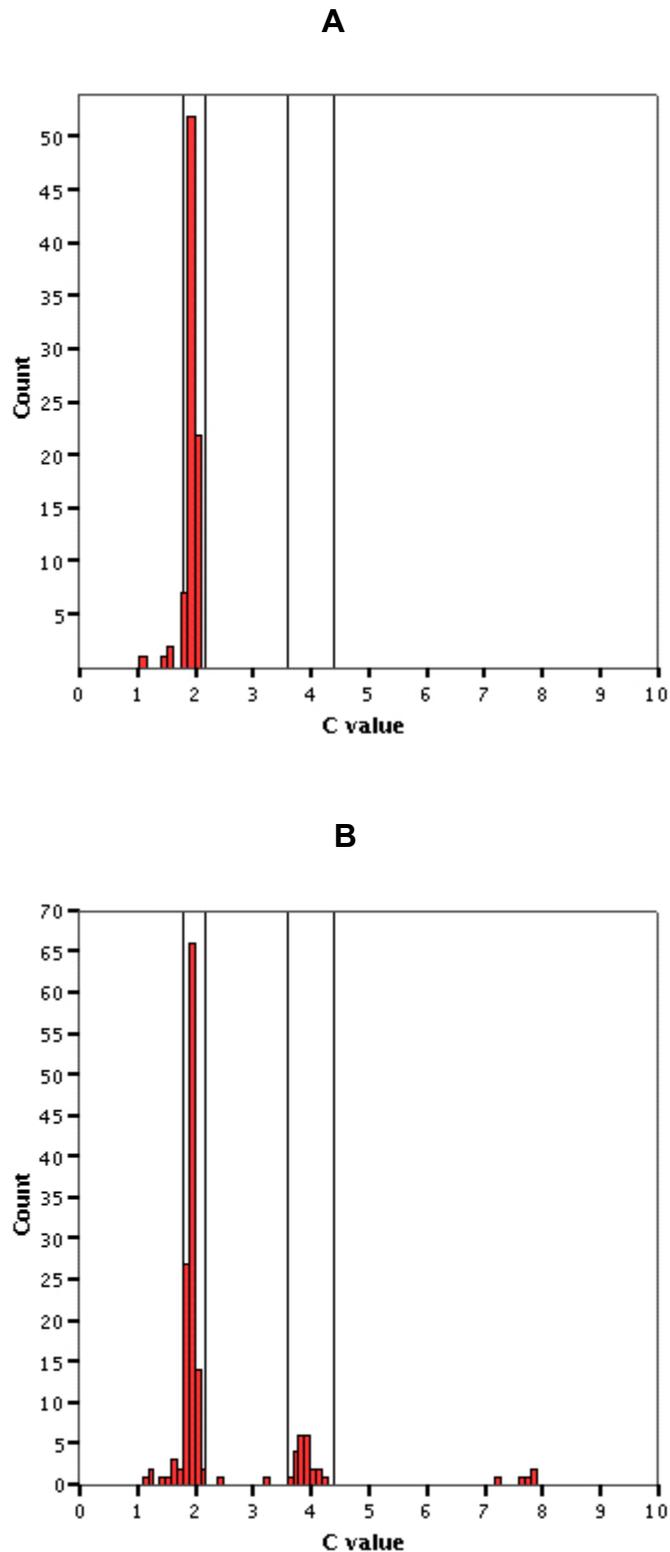


Figura 15. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **Pil_05**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA poliplóide, *Stemline* em 2c e picos menores em 4c e 8c; 5cEE > 0 e 9cEE = 0 (B).

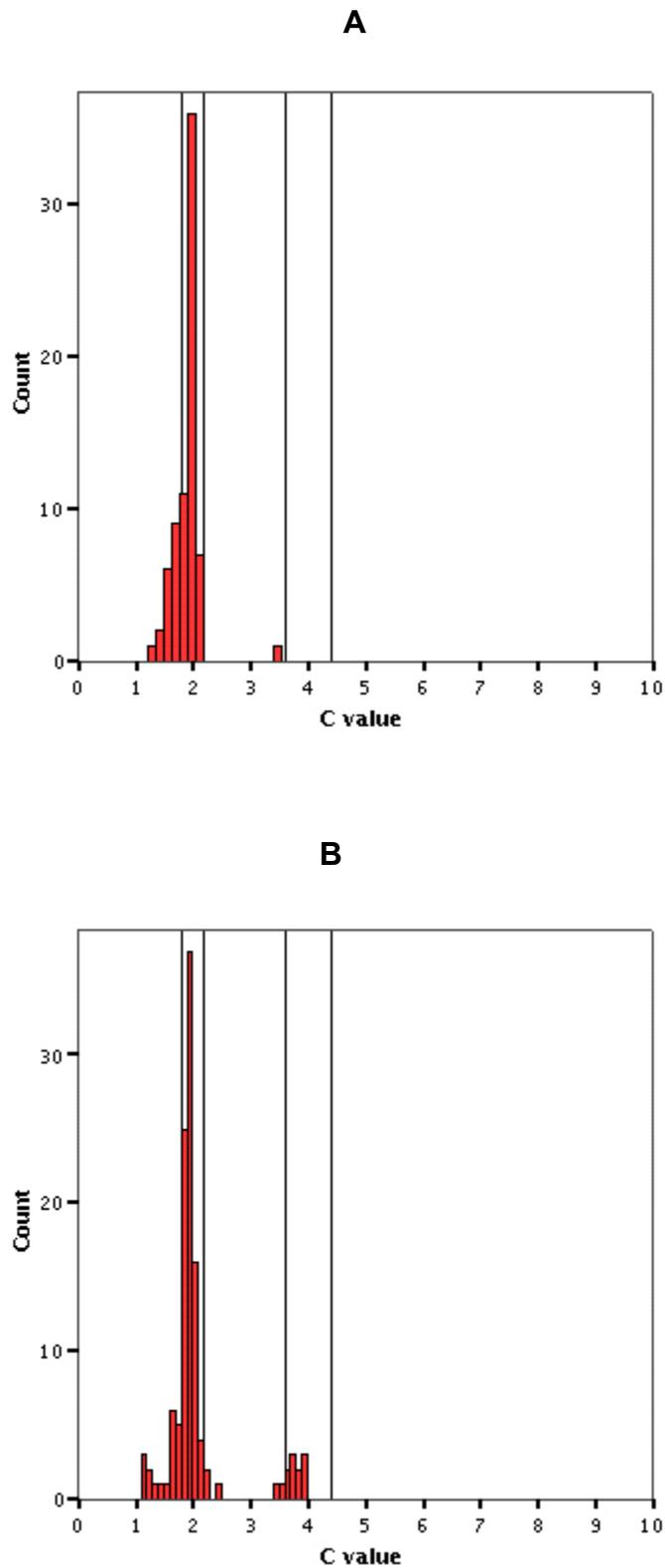


Figura 16. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **T_06**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide, *Stemline* em 2c e pico menor em 4c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B).

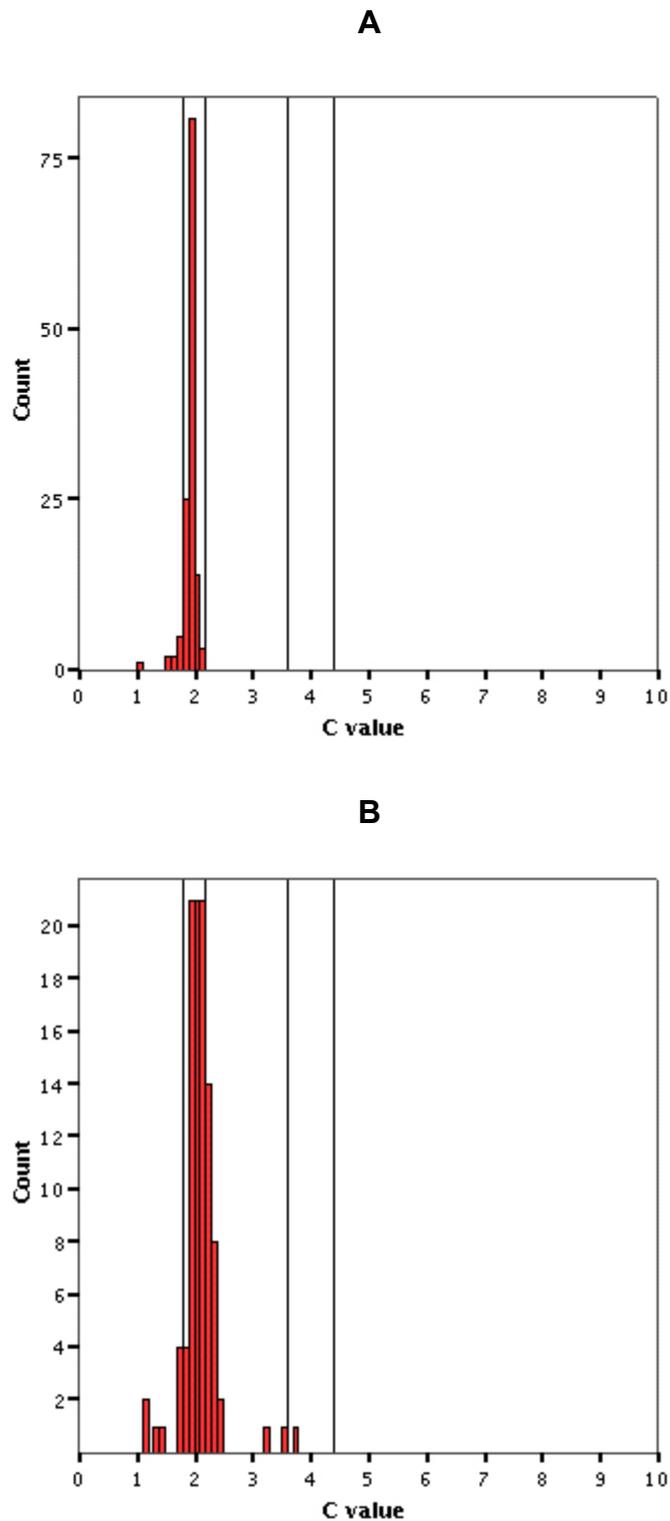


Figura 17. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **T_01**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide, *Stemline* em 2c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B).

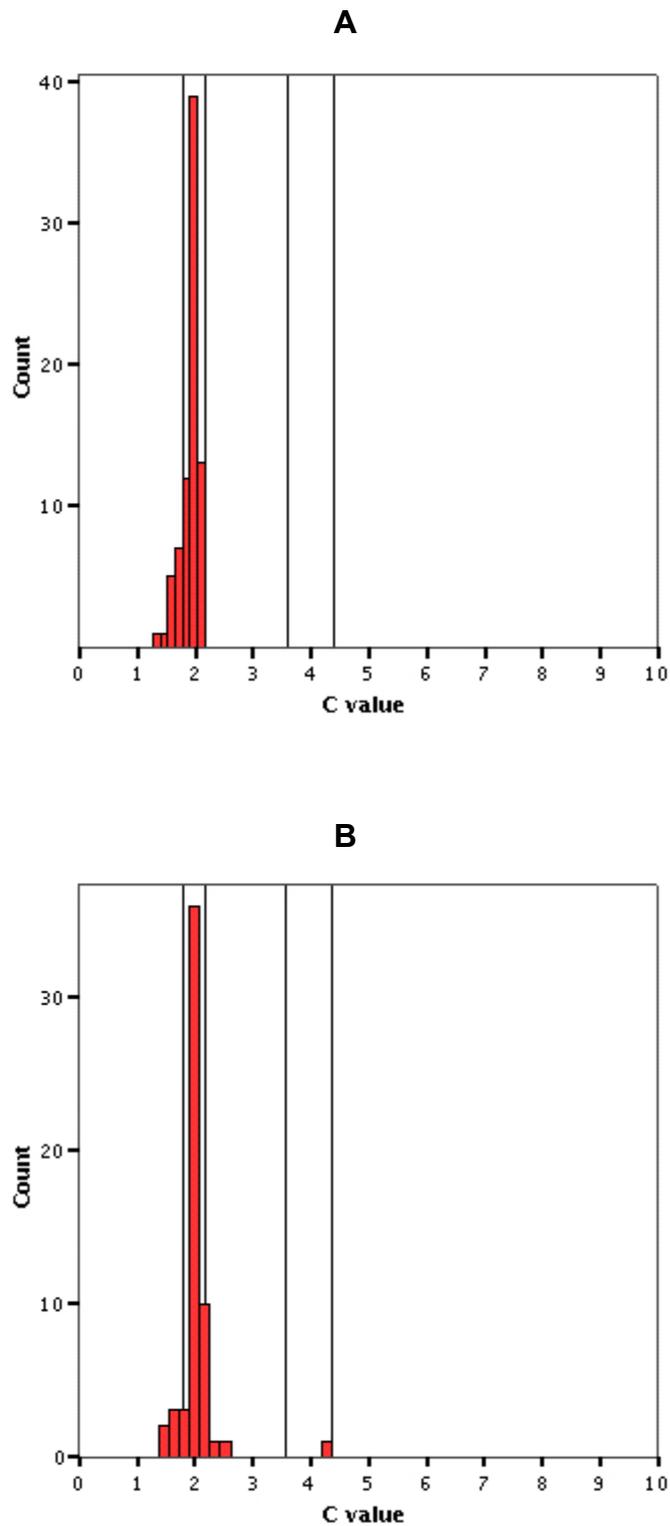


Figura 18. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **T_02**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide, *Stemline* em 2c e pico menor em 4c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B).

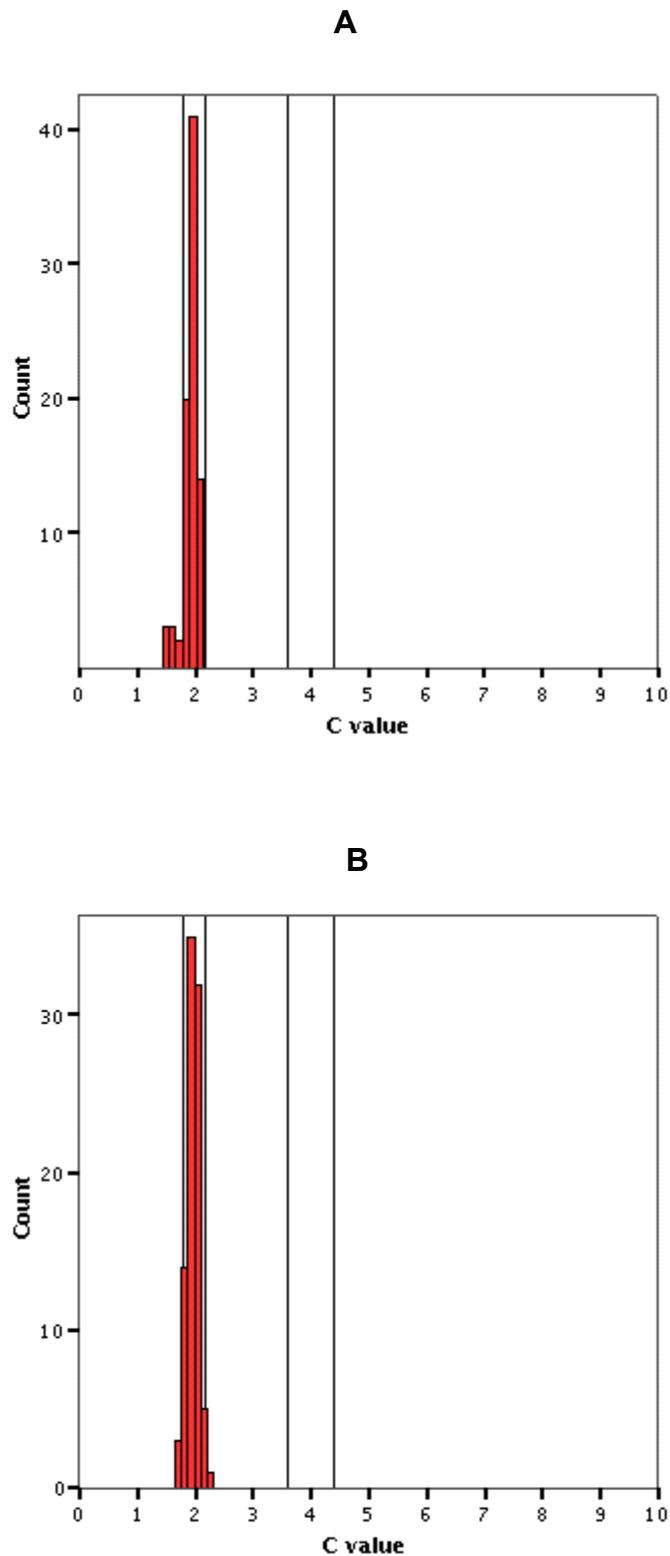


Figura 19. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **T_03**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide, *Stemline* em 2c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B).

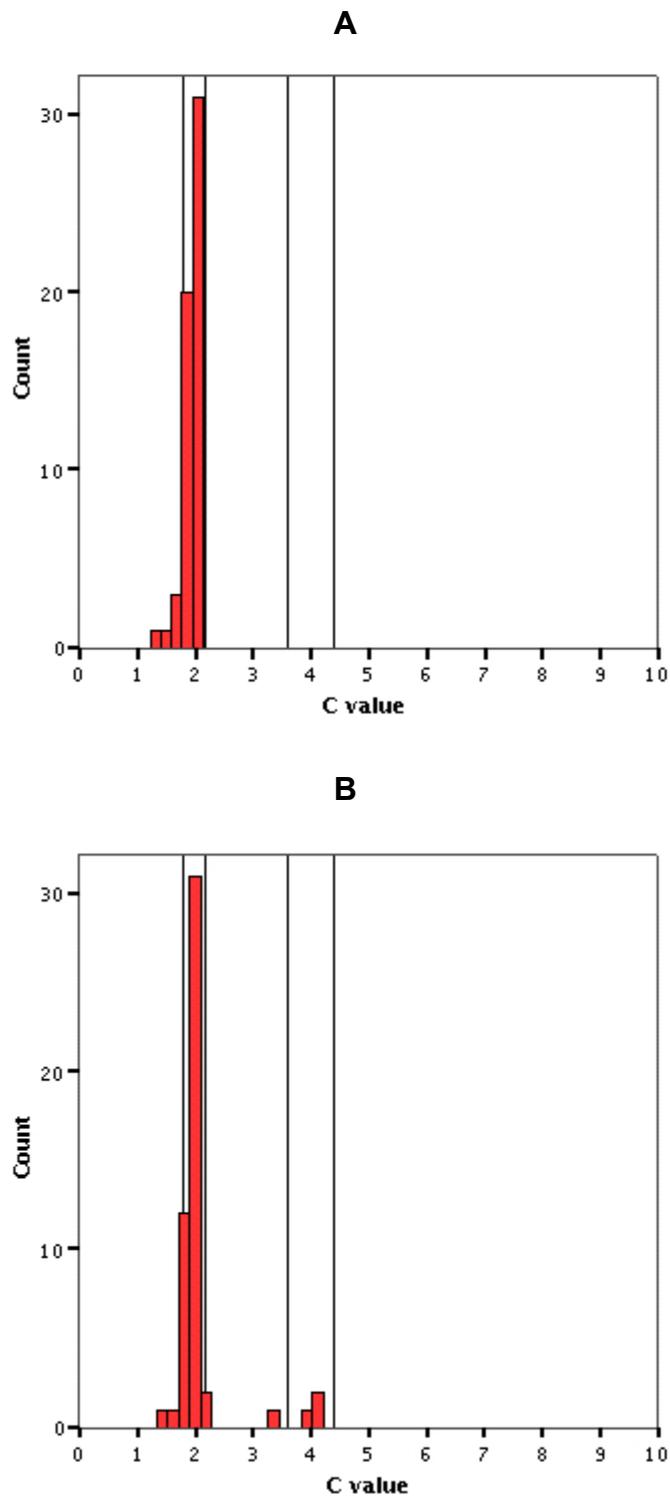


Figura 20. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **T_12**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide, *Stemline* em 2c e pico menor em 4c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B).

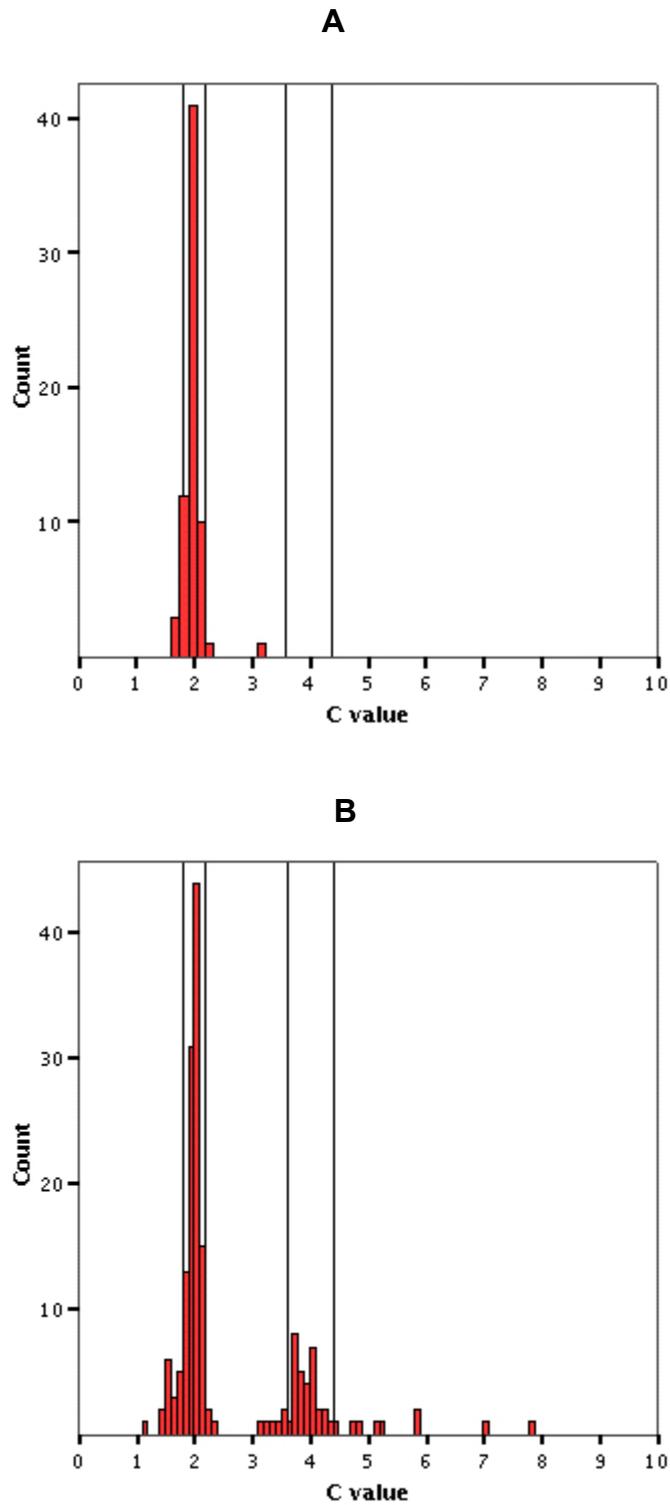


Figura 21. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso T_13) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA poliplóide, *Stemline* em 2c e picos menores em 4c e 8c; 5cEE > 0 e 9cEE = 0 (B).

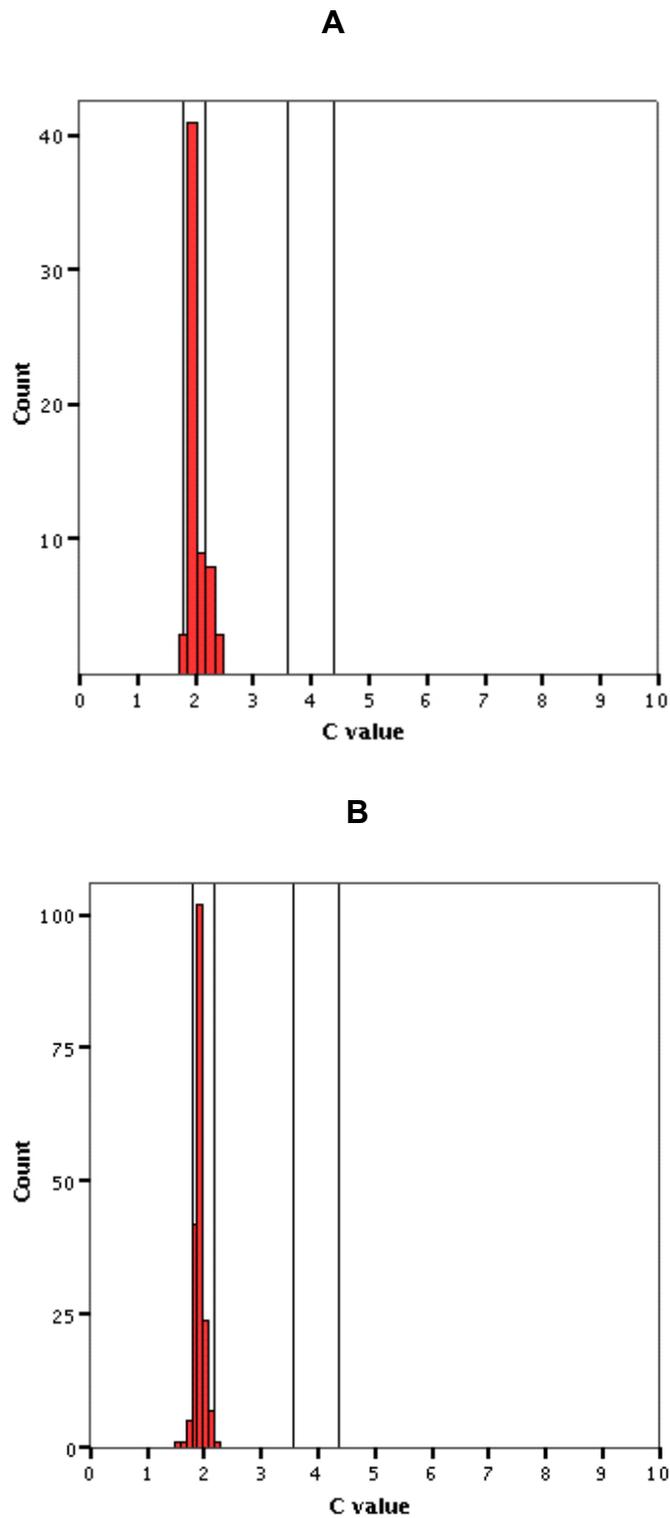


Figura 22. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **PiI_03**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide, *Stemline* em 2c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B).

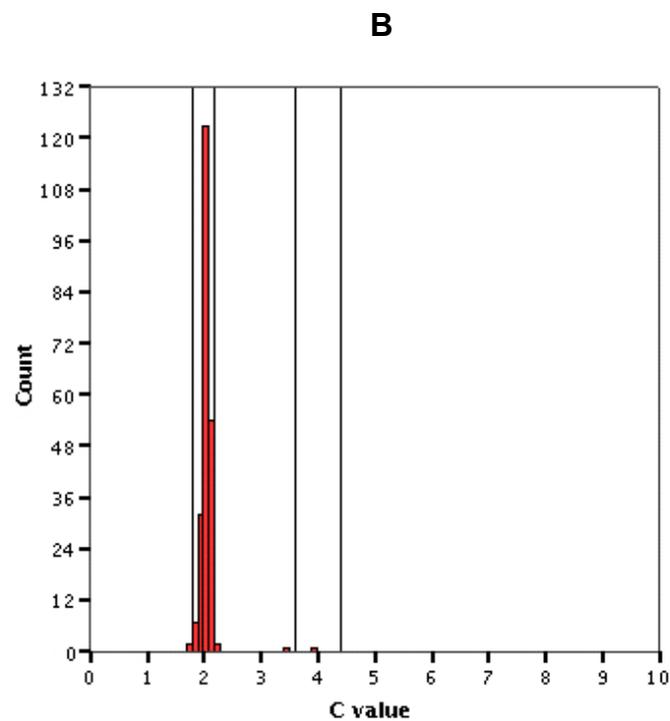
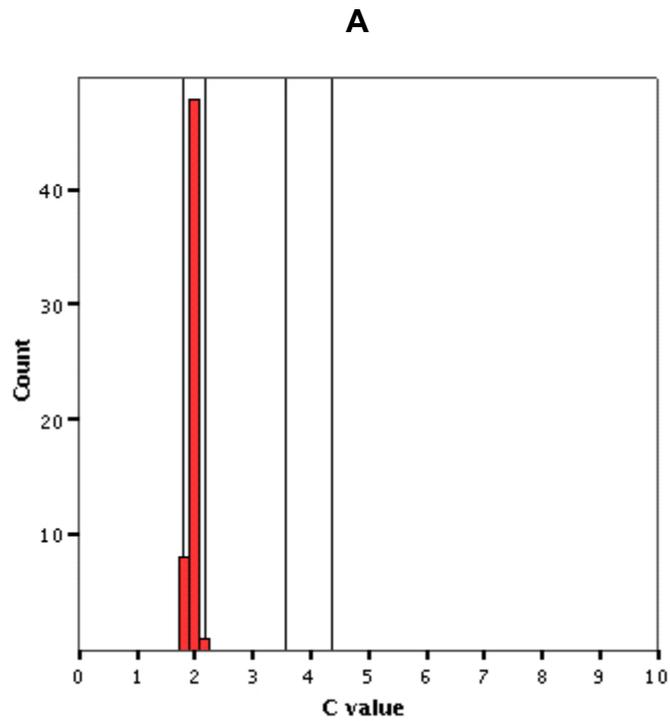


Figura 23. Histogramas de DNA de uma amostra do padrão epitélio bucal (A) e de uma amostra de epitélio cervical (caso **Pil_04**) (B), mostrando o número de células medidas e seu correspondente conteúdo do valor-C de DNA. DNA diplóide, *Stemline* em 2c; 5cEE = 0 e 9cEE = 0 (B).

Tabela 7. Distribuição da ploidia nas amostras citológicas.

Citologia	Diploidia	Poliploidia
NILM (caso Pil_02)	D	-
NILM (caso T_07)	D	-
ASC-US (caso Pil_05)	-	D
ASC-US (caso T_06)	D	-
LSIL (caso T_01)	D	-
LSIL (caso T_02)	D	-
LSIL (caso T_03)	D	-
LSIL (caso T_12)	D	-
LSIL (caso T_13)	-	D
HSIL (caso Pil_03)	D	-
HSIL (caso Pil_04)	D	-

D = detectada pela citometria de imagem;

6 DISCUSSÃO

O controle de qualidade da instrumentação usada no sistema de análise de imagem é o primeiro passo para a padronização da análise de imagem do DNA (PUECH & GIROUD, 1999). A maior parte dos trabalhos internacionais envolvendo citometria de imagem não apresenta nenhuma menção a controle de qualidade do sistema óptico e digital antes da execução das análises, no entanto, o presente estudo apresentou um controle de qualidade prévio realizado por MENDONÇA, 2006. Este controle de qualidade da instrumentação, dentro das nossas condições laboratoriais, juntamente com a preparação das amostras citológicas representa um grande avanço na padronização da citometria de imagem em nosso meio.

LORENZATO *et al.*, 2001, em estudo utilizando citologia clássica, citometria de imagem e tipagem do HPV, observaram que o emprego do método convencional impedia a análise da mesma amostra nos três testes. Neste mesmo estudo, os autores concluíram que o problema da reprodutibilidade entre amostras de citologia, citometria de imagem e tipagem do HPV seria superado pelo uso da citologia em base líquida.

No corrente estudo foi utilizado preparado de base líquida, para coleta das amostras, por apresentar uma série de vantagens em relação ao método convencional (esfregaço em lâmina), entre elas: maior amostragem de células, redução do número de hemácias, exsudato inflamatório e muco (PEREIRA *et al.*, 2003), que podem interferir na captura dos núcleos alterados na citometria de imagem.

Segundo BOCKING & NGUYEN, 2004, as propostas de diagnóstico e prognóstico pela citometria de imagem se apresentam inadequadas quando realizada diretamente em secção de tecido. As medidas do seccionado não indicam a real quantidade de DNA, logo o procedimento proposto é a preparação dos esfregaços em monocamada por separação enzimática celular (BOCKING, 1995).

A técnica de gotejamento empregada neste trabalho proporcionou lâminas com qualidade adequada para citometria de imagem, em que os

núcleos apresentaram-se espalhados, com densidade de núcleos por campo constante, poucas sobreposições e no mesmo plano de foco. Esses fatores possibilitaram a distribuição homogênea do cromóforo no núcleo. Caso o cromóforo apresentasse distribuição não homogênea, a medida de absorvância obtida em determinado ponto poderia não estar correlacionada com o conteúdo de DNA nuclear (CHIECO & DERENZINI, 1999). A coloração estequiométrica do DNA pela reação de Feulgen, observada neste estudo, proporcionou a obtenção de núcleos de células epiteliais bem preservadas como observado nas Figuras 8-12.

A hidrólise é o passo crítico, mais conhecido, da reação de Feulgen (CHIECO & DERENZINI, 1999; GREILHUBER, 2005). O tempo de hidrólise deve ser determinado para cada material, a fim de evitar que haja interferência na coloração do DNA pela reação de Feulgen (CHIECO & DERENZINI, 1999). Durante a hidrólise ocorre formação de radicais aldeídos nas desoxirriboses, por meio da depurinação, essenciais por se associarem aos cromóforos presentes no reativo de Schiff (HARDIE *et al.*, 2002).

Neste estudo, a coloração considerada adequada foi obtida em lâminas de células epiteliais expostas ao reativo de Schiff por 12 horas e hidrolisadas por 60 minutos. Períodos inferiores e superiores de hidrólise resultaram lâminas em que os núcleos estavam fracamente corados ou não puderam ser visualizados.

A seleção dos núcleos, nesta pesquisa, a terem as imagens capturadas seguiu um procedimento semi-interativo, o qual descartou núcleos cuja morfologia não se apresentava íntegra ou que não pertencia ao epitélio escamoso. Em avaliações realizadas por NGUYEN *et al.*, 2004, as imagens capturadas seguiram, um procedimento interativo randomizado, no qual somente núcleos alterados foram capturados. BOCKING, 1995, afirmou que a sensibilidade da citometria de imagem interativa para predizer malignidade em amostras displásicas é de 96,7%.

Entretanto, BOLLMANN *et al.*, 2001, utilizam um procedimento interativo não randomizado na captura das imagens. Este procedimento inclui núcleos que não pertencem ao epitélio escamoso.

A resolução da citometria de imagem é definida por sua precisão, que permite a diferenciação de dois picos separados, e sua acurácia em reconhecer um pico em uma posição anormal usando o limiar de precisão mínima de medidas do consenso ESACP 2001. Segundo este consenso, o CV da razão entre valor modal de DOI das células de referência e das células não-patológicas G0/G1 capacita o reconhecimento de *stemline* de DNA como aneuplóide se elas desviarem mais que 10% do domínio 2c ou domínio 4c, ou seja, $2c \pm 0,2c$ ou $4c \pm 0,4c$ (BOCKING & NGUYEN, 2004).

O CV da razão entre a MODA da DOI das células de referência e das células não-patológicas G0/G1, observado no presente estudo, foi igual a 4,1% (Tabela 6), indicando a adequação das metodologias de calibração do sistema óptico e digital, coloração e análise adotadas. Além disso, o CV das medidas de DOI, apresentado neste trabalho, foi inferior a 5%, seguindo os padrões recomendados para esse tipo de estudo (BOCKING *et al.*, 1995; HAROSKE *et al.*, 1998; HAROSKE *et al.*, 2001).

As células de referência são necessárias para o escalonamento das medidas densitométricas de DNA. Linfócitos, granulócitos, células epiteliais normais ou células do estroma são usualmente empregados como padrão interno. E como padrão externo, muitas vezes é utilizado hepatócitos de rato (BOCKING, 1995).

O padrão externo caracteriza-se por ser processado e analisado separadamente da amostra teste. Já no padrão interno, a amostra teste e o padrão são processados e analisados em conjunto (MOTLEY *et al.*, 2000). No presente estudo foi utilizado células da mucosa oral como padrão interno, sendo preparadas e fixadas nas mesmas condições das células em estudo.

BOLLMANN *et al.*, 2001, utilizaram leucócitos e linfócitos como células de referência. NGUYEN *et al.*, 2004, utilizaram células escamosas normais de colo uterino. MULTHAUP *et al.*, 1993, utilizaram linfócitos e células escamosas normais da cérvix uterina. SHIRATA *et al.*, 2001 e LORENZATO *et al.*, 2001, utilizaram hepatócitos de rato.

As desvantagens de se utilizar o padrão externo podem ser atribuídas a flutuações na calibragem do equipamento entre as análises (MOTLEY *et al.*,

2000). Esse tipo de problema tem sido evitado com o uso do padrão interno. Quando o processamento desse e da amostra é realizado em conjunto, ambos são afetados pelas perturbações que ocorrem durante a preparação e coloração (DOLEZEL, 1997; MOTLEY *et al.*, 2000; NOIROT *et al.*, 2000; NOIROT *et al.*, 2003).

Segundo DOLEZEL, 1997, a seleção do padrão apropriado é crucial para a estimativa do tamanho do genoma nuclear. Esse padrão deve apresentar estabilidade genética, tamanho de genoma constante, ser facilmente manipulado e estar disponível em quantidades suficientes para análise (VILHAR *et al.*, 2001; DOLEZEL & BARTOS, 2005; GREILHUBER, 2005).

Entretanto, ao se utilizar células escamosas da cérvix uterina como padrão interno, deve-se levar em consideração a latência do HPV, pois a infecção leva a um conteúdo de DNA periplóide. Além disso, a infecção viral latente aumenta o coeficiente de variação das células de referência (GROTE *et al.*, 2004).

Segundo KISS *et al.*, 1992, a escolha de células de referência diplóide pode influenciar o nível de ploidia do câncer a ser analisado. DRESSLER & BARTOW, 1989, sustentam que as diferenças na intensidade fluorescente podem existir entre padrões de referência e tumor, ou seja, duas populações de células diplóides podem apresentar dois picos G0/G1 completamente separados no mesmo histograma de DNA. Este segundo pico diplóide pode ser falsamente interpretado como um pico aneuplóide por pessoas inexperientes descobrindo o campo de medida quantitativa de DNA (DRESSLER & BARTOW, 1989).

Um estudo realizado por KISS *et al.*, 1992, com câncer de mama, demonstrou que o tecido escolhido como padrão de referência diplóide notadamente influenciou a posição do pico diplóide G0/G1 de ambos os tecidos normal e neoplásico no histograma de DNA.

Um importante problema já identificado em estudos de tamanho de genoma é a presença de diferentes valores de conteúdo de DNA atribuídos a um mesmo padrão (MENDONÇA, 2006). Segundo DOLEZEL *et al.*, 1998, há necessidade de uma padronização dos valores de referência para

quantificação, uma vez que o uso de diferentes padrões pode conduzir a estimativas do conteúdo de DNA divergentes, numa mesma espécie.

No presente estudo foi utilizado o Sistema de Bethesda, como já mencionado, por ser uma terminologia que permite a comparação das estatísticas a nível internacional e também por oferecer superior reprodutibilidade em relação às outras classificações, uma vez que apresenta uma divisão binária simplificada e correlação direta com a ploidia (BOLLMANN *et al.*, 2001).

Na Europa, alguns países, como a Bulgária, têm adotado o Sistema Bethesda, enquanto outros, como a Alemanha requerem o uso de mais de um sistema (BOLLMANN *et al.*, 2001). No Brasil, os citopatologistas, geralmente mencionam classificações anteriores ao Sistema Bethesda (displasias ou NIC) nos laudos, pois as freqüentes mudanças dos modos de classificação podem criar, nos clínicos, um sentimento de confusão ou imprecisão (GOMPEL & KOSS, 1997).

A ploidia de DNA é geralmente aceita como um confiável marcador de prospectiva malignidade (BOCKING & CHATELAIN, 1989; BIBBO *et al.*, 1988). Usando a citometria de imagem, a aneuploidia tem sido demonstrada em todos os tipos de SIL, mas a freqüência de casos de aneuploidia é maior em NIC III, alcançando 88% de todos os casos (HANSELAAR *et al.*, 1998). Em geral, poliploidia está mais correlacionada com lesões cervicais benignas do que a aneuploidia, a qual está associada a procedimentos mais agressivos (BIBBO *et al.*, 1988).

Em estudo realizado por SHIRATA *et al.*, 2001, foi observado forte associação de diploidia e NIC I, bem como de diploidia e NIC II. Entretanto, NIC III apresentou baixo percentual de associação com diploidia e alto percentual com aneuploidia (SHIRATA *et al.*, 2001).

No presente estudo foi possível observar a mesma característica, pois as amostras de LSIL (NIC I) (Figuras 17-20) e igualmente de ASC-US (Figura 16) apresentaram conteúdo de DNA diplóide. O mesmo ocorreu com as amostras de HSIL (Figuras 22 e 23), que pela classificação de Richart, observada nos

resultados da citologia, apresentaram-se como NIC II e associadas à DNA diplóide.

Nossos resultados, assim como os de SHIRATA *et al.*, 2001 demonstram claramente que NIC II (HSIL) tem um conteúdo de DNA similar ao de NIC I (LSIL) e ASC-US, que pode refletir um baixo potencial de progressão para malignidade.

MONSONEGO *et al.*, 1997, encontraram associação de diploidia e NIC II em 46% dos casos e passaram a considerar diploidia e NIC I/II como uma lesão de baixo grau, enquanto aneuploidia e NIC I/II como uma lesão de alto grau, sendo que todos os NIC III foram considerados de alto grau em decorrência de sua associação com aneuploidia.

Segundo BOLLMANN *et al.*, 2003, lesões aneuplóides estão associadas com HSIL e com a integração do HPV. Entretanto, poliploidização em células escamosas de lesões exofíticas (condiloma) é também um fenômeno citopático bem descrito que ocorre devido à infecção pelo HPV de baixo risco oncogênico (CHATELAIN *et al.*, 1989).

A infecção pelo HPV é necessária, mas não suficiente para desenvolver HSIL. Um importante fator para progressão é a persistência da infecção e expressão contínua de genes virais por um longo período de tempo (LORENZATO *et al.*, 2001). Cerca de 80% das infecções HPV são transientes (NOBBENHUIS *et al.*, 1999), entretanto, é bem estabelecido que somente mulheres com persistência de infecções pelo HPV de alto risco em qualquer amostra citologicamente anormal ou normal mostram lesões cervicais progressivas (LORENZATO *et al.*, 2001).

Além disso, a persistência da infecção pelo HPV pode levar a expressão de oncogenes virais, que eventualmente induziu a mudanças cromossômicas no cariótipo do hospedeiro, resultando em poliploidização (ZUR HAUSEN, 1994; ALTMANN *et al.*, 1994) seguida por aneuploidia (BOCKING *et al.*, 1994). Logo, o aumento do conteúdo de DNA nuclear para 4c e 8c não podem ser simplesmente interpretados como um achado desfavorável com potencial oncogênico (BOLLMANN *et al.*, 2003).

Em nosso estudo falta esta informação, mas fazendo uma analogia a estudos prévios pode-se reforçar a tendência de lesões intra-epiteliais escamosas estarem associadas com HPV oncogênico. Como observado, dos cinco casos de LSIL apenas um caso (Figura 21) apresentou conteúdo de DNA poliplóide. Este achado, bem como o de ASC-US (Figura 15), pode estar associado com a infecção pelo HPV oncogênico. Segundo MULTHAAPT *et al.*, 1993, a infecção pelo HPV gera um histograma de DNA anormal, em que as *stemline* estão fora da região euplóide (diplóide, tetraplóide ou octaplóide) em um nível definido de significância estatística (BOCKING & NGUYEN, 2004). A detecção de núcleos com um conteúdo de DNA $> 5c$ (5cEE) incluindo $8c \pm 12,5\%$ (CHATELAIN *et al.*, 1989), como observado nesta pesquisa, caracteriza uma poliploidia euplóide, que pode estar associada à infecção pelo HPV (BOCKING & NGUYEN, 2004).

Outro importante achado obtido por MULTHAAPT *et al.*, 1993, foi a presença de histogramas diplóides em quatro casos de infecção pelo HPV, sugerindo que os subtipos de HPV de baixo risco não estão somente associados à poliploidia de DNA.

O aspecto discriminatório da técnica de citometria de imagem, observado na Tabela 7, sugere uma reavaliação dos casos de ASC-US, LSIL e HSIL pela citopatologia, uma vez que os resultados encontrados são discordantes entre os dois métodos.

Segundo BOCKING *et al.* 1986, tem sido proposto que pacientes com um histograma de DNA normal podem ser acompanhadas em programas de *screening* geral, enquanto pacientes com um perfil de DNA anormal devem automaticamente passar por exame adicional, minimizando, com isso, os procedimentos cirúrgicos e os gastos com repetidos e desnecessários controles citológico, histológico e clínico em pacientes com ASC-US e LSIL DNA euplóide. No entanto, quando aneuploidia de DNA é detectada, uma intervenção cirúrgica deve ser realizada, a fim de evitar os custos que ocorrem quando carcinomas avançados requerem tratamento (BOCKING & NGUYEN, 2004).

Os resultados obtidos neste estudo também nos permitem inferir que o *screening* de rotina para câncer cervical pode ser aprimorado pela seguinte seqüência: se o *screening* citomorfológico detecta ASC-US ou LSIL, a combinação de tipagem de HPV e medida de DNA podem ser realizadas para determinar o risco de progressão para HSIL. Se a tipagem de HPV é usada em *screening* primário, em amostras dentro dos limites normais e com infecção pelo HPV de alto risco, a medida de DNA pode ser subsequentemente realizada para estimar o risco de evolução para HSIL (LORENZATO *et al.*, 2001). Em ambas as seqüências, a citometria de imagem pode assegurar uma estratégia de acompanhamento que é razoável para os órgãos de saúde e para a paciente.

7 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- Nos procedimentos utilizados para quantificação de DNA nuclear por citometria de imagem foi essencial o controle de todos os passos dos experimentos, da fixação aos procedimentos de determinação da DOI. Dada a não existência de critérios bem padronizados para estudos de citometria de imagem em amostras de Papanicolaou no Brasil;
- As metodologias descritas por MENDONÇA, 2006, para avaliação do sistema de análise de imagem, que incluíram os testes de estabilidade, linearidade e uniformidade das medidas de DOI dos núcleos, asseguraram a adequação do sistema de análise de imagem utilizado para a realização de medidas densitométricas em amostras da cérvix uterina;
- Os procedimentos metodológicos adotados na citometria de imagem, envolvendo o preparo do material citogenético, a fixação, a reação de hidrólise, a etapa de coloração do DNA pela reação de Feulgen, foram apropriados para obtenção dos valores de densidade óptica integrada (DOI), que foram reescalados em termos de valor-C relativo à ploidia do DNA;
- O CV da razão entre a MODA da DOI das células de referência e das células não-patológicas G0/G1, observado no presente estudo, foi igual a 4,1%, indicando adequada calibração dos equipamentos de microscopia e de análise de imagem, o que permitiu verificar diferenças de conteúdo de DNA entre células epiteliais normais de colo uterino, ASC-US, LSIL e HSIL.
- A análise do DNA de lesões cervicais revelou resultados diplóides e poliplóides, confirmando a utilidade da citometria de imagem como um método adjuvante adequado para diagnóstico e prognóstico de lesões intra-epiteliais cervicais e carcinoma cervical invasivo;
- As lesões diplóides ou poliplóides regridem por estarem associadas a subtipos de HPV de baixo risco oncogênico, enquanto lesões

aneuplóides persistem ou progridem para câncer por estarem associadas a subtipos de HPV de alto risco oncogênico;

- O Sistema Bethesda, por ser um sistema binário, é biologicamente correto e clinicamente útil, entretanto, a falta de consenso quanto ao seu uso pode gerar desconfiças em relação aos resultados do Papanicolaou, quando comparado aos resultados da citometria de imagem;
- A utilização de um fotomicroscópio OlympusTM BX 60 associado com um sistema de captura e análise de imagem, e um programa estatístico (SPSS 11.4 versão MacintoshTM), empregado neste estudo, permitiu a realização das análises dos epitélios por citometria de imagem, com custos relativamente baixos, quando comparado aos sistemas de citometria utilizados nos Países de primeiro mundo;
- A implementação do sistema de captura e análise de imagem, que se mostrou adequado e eficiente na presente análise, pode facilitar o seu uso na rotina laboratorial em diversos centros de prevenção e controle de câncer de colo uterino.

8 PERSPECTIVAS

- Utilizar a citometria de imagem em um número maior de amostras a fim de se estabelecer um comparativo com os achados obtidos em países desenvolvidos, que utilizam a citometria de imagem na rotina laboratorial;
- Realizar a citometria de imagem e observar variáveis epidemiológicas como idade, tabagismo, sedentarismo, alimentação inadequada, promiscuidade sexual e nível sócio-econômico das pacientes;
- Empregar a citometria de imagem em associação com técnicas de tipagem de HPV, a fim de se obter uma correlação entre a ploidia de DNA e o grau de oncogenicidade do HPV nas amostras analisadas;
- Reexaminar resultados citológicos, onde houve diagnóstico de ASCUS e LSIL, corando as lâminas novamente com Feulgen e analisando por citometria de imagem;
- Aplicar a citometria de imagem no monitoramento do tratamento de pacientes com carcinoma cervical invasivo a fim de se observar o efeito terapêutico;
- Avaliar parâmetros prognósticos pela citometria de imagem e minimizar a realização de procedimento diagnóstico invasivo como a biópsia orientada pela colposcopia em mulheres;

REFERÊNCIAS

ABNORMAL PAP SMEARS. Disponível em www.ircm.qc.ca/textes/lifecycle.png. Acesso em: 05 de abril de 2005.

AC CAMARGO - CENTRO DE TRATAMENTO E PESQUISA HOSPITAL DO CÂNCER. Disponível em <http://hcanc.org.br>. Acesso em: 20 de março de 2003.

ALBERTS, B., *et al.* **Molecular biology of the cell**. 3 ed. New York .Garland, 1994.

ALTMANN, A.; JOCHMUS, I.; ROSL, F. Intra and extracellular control mechanisms of human papillomavirus infection. *Intervirology*. v. 37, p. 180-188, 1994.

ALVES, V.A.F., *et al.* Condilomas do colo uterino correlação de dados colposcópicos, histológicos e imuno-histoquímicos. *J Bras Gynec*. v. 98, p. 257-261, 1988.

AMANDA, H.; JOHNSON, J. Personal view. Is it reality or an illusion that liquid-based cytology is better than conventional cervical smears? *Cytopathol*. v.12, p. 382-9, 2001.

AMES, B.N.; GOLD, L.S. Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction. *Mutat Research*. v. 447, p. 3-13, 2000.

ANDERSON, G.H., *et al.* A comprehensive internal quality control system for a large cytology laboratory. *Acta Cytol*. v. 31, p. 895-9, 1987.

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

ASC. AMERICAN SOCIETY OF CYTOPATHOLOGY - Cervical Cytology Practice Guidelines. *Acta Cytol*. v. 45, p. 201-6, 2001.

ATTWOOD, M.E. *et al.* Previous cytology in patients with invasive carcinoma of the cervix. *Acta Cytol*. v. 29, p.108-10, 1985.

BAKER, J. J. Conventional and liquid-based cervicovaginal cytology: A comparison study with clinical and histologic follow-up. *Diagn Cytopathol*. v. 27, p. 185-8, 2002.

BASEMAN, J.G.; KOUTSKY, L.A. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virology*. v. 32, p.16-24, 2005.

- BENEDET, J.L. A quality control program for colposcopic practice. *Obstet Gynecol.* v. 78, p. 872-875, 1991.
- BERNSTEIN, S. J.; SANCHEZ-RAMOS, L.; NDUBISI, B. Liquid-based cervical cytologic smear study and conventional Papanicolaou smears: A metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. *Am J Obstet Gynecol.* v. 185, p. 308-317, 2001.
- 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. *Am J Clin Pathol.* v. 154, p. 261-265, 1988.
- BIESTERFELD, S., *et al.* DNA image cytometry in the differential diagnosis of endocervical adenocarcinoma. *Cancer Cytopathology.* v. 93, n. 2, p. 160-164, 2001.
- BISHOP, J.M. Molecular themes in oncogenesis. *Cell.* v. 64, p. 235-248, 1991.
- BOCKING, A., *et al.* DNA-cytometric diagnosis of prospective malignancy in borderline lesions of the uterine cervix. *Acta Cytologica.* v. 30, n. 6, p. 608-615, 1986.
- BOCKING, A.; CHATELAIN, R. Diagnostic and prognostic value of DNA cytometry in gynecology. *Analyt Quant Cytol Histol.* v. 11, p.177-186, 1989.
- BOCKING, A., *et al.* Static DNA cytometry. Biological background, technique and diagnostic interpretation. In.: WIED, G.L.; BARTELS, P.H.; ROSENTHAL, D.L.; SCHENCK, U. Compendium on the Computerized Cytology and Histology Laboratory. *Tutorial of Cytology.* Chicago, USA. 1994.
- BOCKING, A. DNA measurement: When and why? In.: **Compendium on Quality Assurance, Proficiency Testing and Workload Limitations in Clinical Cytology.** Chicago. 1995.
- BOCKING, A., MOTHERBY, H. Assessment of cervical dysplasia with DNA image cytometry. *Pathology.* v. 20, p. 25-33, 1999.
- BOCKING, A., NGUYEN, V.Q.H. Diagnostic and prognostic use of DNA image cytometry in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma. *Cancer Cytopathology.* v. 102, n. 1, p. 41-54, 2004.
- BOCKING, A., STOCKHAUSEN, J.; MEYER-EBRECHT, D. Towards a single cell cancer diagnosis. Multimodal and Monocellular Measurement of Markers and Morphology (5 M). *Cell Oncol.* v. 26 , p. 73-79, 2004.

- BOLLMANN, R., *et al.* DNA cytometry confirms the utility of the Bethesda System for the classification of Papanicolaou smears. *Cancer Cytopathology*. v. 93, n. 3, p. 222-228, 2001.
- BOLLMANN, R., *et al.* Human Papillomavirus typing and DNA ploidy determination of squamous intraepithelial lesions in liquid-based cytologic samples. *Cancer Cytopathology*. v. 99, n. 1, p. 57-62, 2003.
- BOLLMANN, R., *et al.* Aberrant, highly hyperdiploid cells in human papillomavirus-positive, abnormal cytologic samples are associated with progressive lesions of the uterine cervix. *Cancer*. v. 105, n. 2, p. 96-100, 2005.
- BOSCH, M.M.C.; RIETVELD, S.P.E.M.; BOON, M.E. Characteristics of false negative smears. *Acta Cytol.* v. 36, p. 711-6, 1992.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Controle do Câncer: uma proposta de integração ensino-serviço**. 3 ed. Rio de Janeiro. INCA, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer - INCA. **Estimativas da incidência e mortalidade por cancer**. Rio de Janeiro. INCA, 2003.
- BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 3 ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 2004.
- BRAUNWALD, E., *et al.* **Harrison Medicina Interna**. 15 ed. Rio de Janeiro. McGraw-Hill, 2002.
- BRESCHIA, R., *et al.* The prognostic significance of nuclear DNA content in malignant epithelial tumors of the ovary. *Cancer*. v. 65, p. 141-147, 1990.
- BUCKLEY, C.H.; BUTLER, E. B.; FOX, H. Cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol.* v. 35, p. 1-13, 1982.
- BUNTINX, F.; BROUWERS, M. Relation between sampling device and detection of abnormality in cervical smears: a meta-analysis of randomized and quasi-randomized studies. *Br Med J*. v. 313, p. 1285-90, 1996.
- CAMARA, P.A.D. Papilomavírus Humano. Agente causal ou causal do carcinoma do colo uterino? *GO*. v. 2, n. 5, 1993.
- CAREY, F.A. Measurement of nuclear DNA content in histological and cytological specimens principles and applications. *The Journal of Pathology*. v. 172, p. 307-312, 1994.
- CARRERA, J.M.; DEXEUS, S.; COPES, F. **Tratado y atlas de colposcopia**. 3 ed, Salvat Editores, 1974.

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

CARVALHO, N. S., *et al.* New connection between sexually transmitted disease (STD) and cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Acta Obstet Gynecol Scand*. v. 76, p. 82, 1997.

CAVALIERE, M.J., *et al.* Alterações coilocitóticas em esfregaços cérvico-vaginais: inter-relação entre os aspectos citológicos, imunocitoquímico para papilomavírus e morfométrico. *J Bras Ginec*. v. 100, p.275-279, 1990.

CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL - Regulations for Implementing the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: A Summary. *M M W R*, 1992, 17p.

CHATELAIN, R., *et al.* Diagnosis of Prospective Malignancy in Koilocytic Dysplasias of the Cervix with DNA cytometry. *The Journal of Reproductive Medicine*. v. 34, n.8, p.505-510, 1989.

CHIECO, P.; DERENZINI, M. The Feulgen reaction 75 yaers on. *Histochemistry and Cellular Biology*. v. 111, p. 345-358, 1999.

CLARINDO, W. R. **Avaliação de agregados celulares de café (*Coffea spp*) por técnicas citométricas e citogenéticas**. 2004. 83 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

COEN, H.; PAUWELS, M.; ROELS, F. The rat liver cell nuclear imprinting as a standard for DNA measurements. *Analytical Cellular Pathology*. v. 4, p. 273-285, 1992.

COHEN, C. Image cytometric analysis in pathology. *Human Pathology*. v. 27, p. 482-493, 1996

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

COPELAND, L. J. **Tratado de Ginecologia**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1996.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000.

CRUM, P.C.; NUOVO, G.J. **Genital papillomaviruses and related neoplasms**. New York. Raven Press, 1991.

DA SILVEIRA, M.D.P., *et al.* Panorama dos resultados de casos de HPV notificados na rede pública do Estado de Santa Catarina. In.: **Anais do XXXI Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e IV Congresso Brasileiro de Citologia Clínica**. Salvador, 2004.

DAVEY, D.D., *et al.* Atypical epithelial cells and specimen adequacy. Current laboratory practices of participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. *Arch Pathol Lab Med*. v. 124, n. 2, p. 203-211, 2000.

DI LORETO, C., *et al.* Fatores interferentes da Correlação Cito-histológica em Papillomavirus. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*. n. 28, 1992.

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

DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*. v. 38, n.3, p. 285-302, 1997.

DOLEZEL, J., *et al.* Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*. v. 82, p. 17-26, 1998.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*. v. 95, p. 99-110, 2005.

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, 1999.

DOUDKINE, A., *et al.* Nuclear texture measurements in image cytometry. *Pathologica*. v. 87, p. 286-299, 1995.

DRESSLER, L.G.; BARTOW, S.A. DNA flow cytometry in solid tumors: practical aspects and clinical application. *Sem Diag Pathol*. v. 6, p.55, 1989.

ELEUTÉRIO Jr., J. **Noções Básicas de Citologia Ginecológica**. São Paulo Santos, 2003.

ELIAS, J.M. Immunohistochemical methods. In.: ELIAS, J.M. Immunopathology: A practical approach to diagnosis. *ASCP Press*. Chicago. 1990.

ELLERBROOK, T., *et al.* Incidência de NICs em Mulheres Infectadas pelo HIV. *JAMA*. v. 283, p. 1031, 2000.

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

FERENCZY, A. HPV-associated lesions in pregnancy and their clinical implications. *Clin Obstet Gynecol.* v.32, n. 1, p.191-198, 1989.

FIGGE, D.C.; BENNINGTON, J.L.; SCHWEID, A.I. Cervical cancer after initial negative and atypical vaginal cytology. *Am J Obst Gynecol.* v. 108, p. 422-8, 1970.

FILIPPIN, C. – **Estudo citomorfológico de lesões do colo uterino – análise comparativa de diversas metodologias.** 2004. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

FIOCRUZ. Controle da infecção por HPV pode prevenir cancer de colo de útero. Disponível em http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/dez03/hpv_raqp.htm. Acesso em: 20 de março de 2005.

FONTES, B.P.D. **Citogenética, citometria de fluxo e citometria de imagem em *Coffea spp.*** 2003. 130 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

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.

FRANQUEMONT, D.W., *et al.* Prediction of High-Risk Cervical Papillomavirus Infection by Biopsy Morphology. *Am J Clin Pathol.* v. 92, n. 5, p. 577-582, 1989.

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

GAY, J.D.; DONALDSON, L.D.; GOELLNER, J.R. False-negative results in cervical cytology studies. *Acta Cytol.* v. 29, p. 1043-6, 1985.

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

GONÇALVES, S., *et al.* Panorama da Colpocitologia Oncótica na rede pública do Estado de Santa Catarina. In.: **Anais do 39º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial.** São Paulo, 2005.

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

GREILHUBER, J. Intraspecific variation in genome size in angiosperms – identifying its existence. *Annals of Botany.* v. 95, p. 91-98, 2005.

GROTE, H.J., *et al.* Identification of Progressive Cervical Epithelial Cell Abnormalities using DNA image cytometry. *Cancer Cytopathology*. v. 102, n. 6, p. 373-379, 2004.

GUIMARÃES, E.M.; SILVA, A.M. Erros em citopatologia ginecológica: por que ocorrem? *J Bras Ginec*. v. 105, p. 397-404, 1995.

GUPTA, J.W., *et al.* Detection of human papillomavirus in cervical smears: a comparison of *in situ* hibridization, immunocytochemistry and cytopathology. *Acta Cytol*. v. 31, p. 387-396, 1987.

GUPTA, P.K., *et al.* Processing liquid-based gynecologic specimens; comparison of the available techniques. *Acta Cytol*. v. 45, p. 995-998, 2001.

HAFIZ, M.A., *et al.* Cytophotometric determination of DNA in mesotheliomas and reactive mesothelial cells. *Analyt Quant Cytol Histol*. v. 10, p. 120-126, 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.

HANSELAAR, A. G. M.; BOCKING, A.; MARKOVIC, N. Summary statement on quantitative cytochemistry (DNA and Molecular Biology). *Acta Cytol*. v. 45, n. 4, p. 499-501, 2001.

HARDIE, D. C.; GREGORY, T.R.; HEBERT, P.D.N. From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. v. 50, n. 6, p. 735-749, 2002.

HAROSKE, G., *et al.* DNA histogram interpretation based on statistical approaches. *Analytical Cellular Pathology*. v. 15, p. 157-173, 1997.

HAROSKE, G., *et al.* 1997 ESACP consensus report on diagnostic image cytometry. Part I: Basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. *Analytical Cellular Pathology*. v. 17, p. 189-200, 1998.

HAROSKE, G., *et al.* Competence on demand in DNA image cytometry. *Pathol Res Pract*. v. 196, p. 285-291, 2000.

HAROSKE, G., *et al.* Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Analytical Cellular Pathology*. v. 23, p. 89-95, 2001.

HATEM, F.; WILBUR, D.C. High Grade Squamous Cervical Lesions Following Negative Papanicolaou Smears: False-Negative Cervical Cytology or Rapid Progression. *Diag Cytopathol*. v. 12, p. 135-41, 1995.

HASTREITER, A.A., *et al.* Avaliação da prevalência dos casos de HPV e Neoplasias Intra-Epiteliais Cervicais notificados nos Estados da Região Sul. In.: **Anais do I Congresso Sul-Sudeste de Análises Clínicas**. Campos do Jordão, 2005.

HEINZ, L.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.

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

HOWELL, S., *et al.* Quality assurance in cytology. rescreening of previously negative smears from high grade squamous intraepithelial lesions. *Acta Cytol.* v. 41, p. 1085-90, 1997.

HOWLEY, P. Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res.* v. 51, p. 5019-5022, 1991.

IARC - MONOGRAPH ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. **Human Papillomaviruses**. 64 ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2002.

IARC - SCREENING GROUP. International Agency for Research on Cancer. Disponível em <http://screening.iarc.fr/atlashisto.php>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2006.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2000. Disponível em <http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa2000/estimativas.html>. Acesso em: 12 de março de 2001.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Câncer de Colo de Útero. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 20 de dezembro de 2005.

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.

JARMULOWICZ, M.R.; JENKINS, D.; BARTON, S.E. Cytological status and lesion size: a further dimension in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynecol.* v. 96, p. 1061-6, 1989.

JENSON, A.B.; ROSENTHAL, J.R.; OLSON, C. Immunological relatedness of papillomavirus from different species. *J Natl Cancer Inst.* v. 64, p. 495-500, 1980.

KIMBAL, R.E., *et al.* Flow cytometric analysis of lymph node metastases in advanced ovarian cancer: clinical and biologic significance. *American Journal Obstetric and Gynecologic.* v. 176, p. 1319-1327, 1996.

KISS, R., *et al.* Modification of tumor ploidy level via the choice of tissue taken as diploid reference in the digital cell image analysis of Feulgen-stained nuclei. *Methods in Pathology.* v. 5, n. 6. p. 655-660, 1992.

KOSS, L. G. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A Triumph and a Tragedy. *JAMA.* v. 261, n.5, p.737-743,1989.

KUBOTA, T., *et al.* Prevalence of human papillomavirus infection in women attending a sexually transmitted disease clinic. *Kansenshogaku Zasshi.* v. 73, p. 233-238, 1999.

KUHN, L., *et al.* Human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening in low-resource settings. *J Natl Cancer Inst.* v. 92, p. 818-825, 2000.

KURMAN, R. J.; SOLOMON, D. **O Sistema Bethesda para o relato de diagnóstico citológico cervicovaginal.** Rio de Janeiro. Revinter, 1997.

LAGE, J.M., *et al.* Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in ovarian tumors: association of ploidy with tumor type, histologic grade and clinical stage. *Cancer.* v. 69, p. 2668-2675, 1992.

LEVI, J. E. HPV: Por que e quando diagnosticar. *NewsLab.* v.14, p. 66-72, 1996.

LINDSEY, C. J., *et al.* Vírus do Papiloma: Vias de transmissão, risco oncogênico e co- fatores ambientais. *Laes & Haes.* v. 25, n. 146, p. 84-96, 2004.

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

LONGATTO FILHO, A.; ALVES, V.A.F. Métodos de detecção laboratorial dos papilomavírus humanos. Método Imunocitoquímico. In.: BIBBO, M.; MORAES FILHO, A. **Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital.** Rio de Janeiro. Revinter, 1998.

LONGATTO FILHO, A.; ALVES, V.A.F. Métodos de detecção laboratorial dos papilomavírus humanos. Hibridização Molecular de Ácidos Nucléicos. Reação de Polimerização em Cadeia. In.: BIBBO, M.; MORAES FILHO, A. **Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital.** Rio de Janeiro. Revinter, 1998.

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

LUZZATTO, R., *et al.* Contribuição da escova endocervical para a acuidade do teste de Papanicolaou: estudo em 26.519 pacientes. *Rev AMRIGS*. v. 37, p. 3-6, 1993.

MARX, J. Learning how to suppress cancer. *Science*. v. 261, p. 1385-1387, 1993.

McCORD, M.L., *et al.* Cervical cytology: a randomized comparison of four sampling methods. *Am J Obstet Gynecol*. v. 166, p. 1772-9, 1993.

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

McKEE, G. T. **Citopatologia**. São Paulo. Artes Médicas, 2001.

MÉHES, G., *et al.* Chromosomal aberrations accumulate in polyploid cells of high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL). *Pathology Oncology Research*. v. 10, n. 3, p. 142-148, 2004.

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

MENDONÇA, M. A. C. **Determinação do conteúdo de DNA em Pimentão (*Capsicum annuum L.*) por citometria de Plantas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

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

MITCHELL, H.; MEDLEY, G. Differences between Papanicolaou smears with correct and incorrect diagnoses. *Cytopathol*. v. 6, p. 368-75, 1995.

MODY, D. R., *et al.* Quality Assurance and Risk Reduction Guidelines. *Acta Cytol*. v. 44, p. 496-507, 2000.

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

MORRISON, E.A., *et al.* Human papillomavirus infection and other risk factor for cervical neoplasia: a case control study. *Int J Cancer*. v. 49, p. 6-13, 1991.

MOSELEY, R.P.; PAGET, S. Liquid-based cytology: is this the way forward for cervical screening? *Citopathol.* v.13, p. 71-82, 2002.

MOTLEY, J.; YOKOYA, K.; ROBERTS, A.V. "D-Flowering" – The Flow Cytometry of plant DNA. In.: DIAMOND, R.A.; DEMAGGIO, S. (Eds). *In Living Color – Protocols in flow cytometry and cell sorting.* [S.I.]: Springer Lab Manual, 2000.

MOTTI, E., *et al.* Câncer de colo do útero. Boletim Informativo Brasil 2003; 5:4. Disponível em <http://www.eurotrials.com/publicacoes/bolbrpt5.pdf>. Acesso em: 05 de setembro de 2005.

MULTHAUPT, H., *et al.* Combined analysis of cervical smears. *Acta Cytologica.* v. 37, n. 3, p. 373-378, 1993.

NADJARI, B., *et al.* Cytologic and DNA cytometric diagnosis and therapy monitoring of squamous cell carcinoma in situ and malignant melanoma of the cornea and conjunctiva. *Analyt Quant Cytol Histol.* v. 21, p. 387-396, 1999.

NADJARI, B., *et al.* DNA-aneuploidy as a specific marker of neoplastic cells em FNAB of the thyroid. *Anal Quant Cytol Histol.* v. 21, p. 481-488, 1999.

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. *Obstetritcs and Gynecology.* v. 61, p. 609-614, 1983.

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

NGUYEN, V. Q. H., *et al.* Interobserver reproducibility of DNA-image-cytometry in ASCUS or higher cervical cytology. *Cellular Oncology.* v. 26, p. 143-150, 2004.

NICOLAU, S. M. HPV na Mulher e o Câncer de Colo Uterino. Disponível em <http://www.ipog.com.br/epidemiologia.htm>. Acesso em: 15 de março de 2003.

NOBBENHUIS, M.A.E., *et al.* Relation of human papilloma status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet.* v. 354, p. 20-25, 1999.

- NOIROT, M., *et al.* Nucleus cytosol interactions – a source of stoichiometric error in flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Annals of Botany*. v. 86, p. 309-316, 2000.
- NOIROT, M., *et al.* Effects of caffeine and chlorogenic acid on propidium iodide accessibility to DNA: consequences on genome size evaluation in coffee tree. *Annals of Botany*. v. 92, p. 259-264, 2003.
- 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.
- NUOVO, J.; MELNIKOW, J.; HOWELL, L.P. New tests for cervical cancer screening. *American Family Physician*. v. 64, n. 5, p. 780-786, 2001.
- ONOFRE, A.S.C.; LIMA, C.E.Q.; BAMBIRRA, E.A. Citometria estática nas neoplasias intra-epiteliais cervicais. *Jornal da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas*. n. 3, p. 12-13, 2003.
- PARELLADA, C.I.; PEREYRA, E.A.G.; GUERRA, D.M.M. Papilomavírus Humano. In: BELDA Jr, W. **Doenças Sexualmente Transmissíveis**. São Paulo. Atheneu. 1999.
- PEREIRA, S.M.M., *et al.* Avaliação da celularidade citológica em preparados de base líquida. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. v. 62, n. 1, p. 35-39, 2003.
- PLANZ, B., *et al.* Diagnosis of bladder cancer with urinary cytology, immunocytology and DNA-image cytometry. *Anal Cell Pathol*. v. 22, p. 103-109, 2001.
- PLESSIS, J. M.D., *et al.* Aylesbury and cervitula spatulas. A comparative study to assess the adequacy of cervical smears. *Acta Cytol*. v. 45, p. 675-8, 2001.
- PUECH, M.; GIROUD, F. Standardisation of DNA quantitation by image analysis: quality control of instrumentation. *Cytometry*. v. 36, p. 11-17, 1999.
- PUING-TINTORÉ, L.M., *et al.* Colposcopia digital em la neoplasia cervical intraepithelial, correlation histológica e utilidad clinic. *Prog Obstet Ginecol*. v. 44, p. 490-496, 2001.
- RABELO, S. HPV: uma estatística preocupante. *Jornal da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas*. v.12, p. 2, 2002.
- RAKOCZY, P., *et al.* Time trends in the prevalence of human papillomavirus infections in archival Papanicolaou smears: analysis by cytology, DNA hybridization and polymerase chain reaction. *J Med Virol*. v. 32, p. 10-17, 1990.

REMMERBACH, T.W., *et al.* Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal Cell Pathol.* v. 22, p. 211-221, 2001.

REUTER, B.; SCHENCK, U. Investigation of the visual cytoscreening of conventional gynecologic smears. *Anal Quant Cytol Histol.* v. 8, p. 210-8, 1986.

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.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In.: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental.** Canoas, RS. ULBRA, 2003.

RICE, D.P.; HODGSON, T.A. Incidences sociales et economiques du câncer aux États-Unids d'Amérique. *Wordl Health Stat.* 1980. Apud **Controle do Câncer: uma proposta de integração ensino-serviço.** 3 ed. Rio de Janeiro. INCA, 1999.

RIVOIRE, W. A., *et al.* Bases Biomoleculares da Oncogênese Cervical. *Revista Brasileira de Cancerologia.* v. 47, n. 2, p. 179-84, 2001.

ROHR, R. L. Quality Assurance en Gynecologic Cytology. What is practical? *Am J Clin Pathol.* v. 94, p. 754-7, 1990.

ROSADO, T.B. **Análise citogenética de cromossomos B de milho (*Zea mays L.*) associada às citometrias de fluxo e de imagem.** 2004. 71 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

ROTELI-MARTINS, C.M., *et al.* Cigarette smoking and high-risk HPV DNA as predisposing factors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in young brazilian women. *Acta Obstet Gyn Scan.* v. 77, p. 678-82, 1998.

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.

SBOC – SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA – Projeto câncer no Brasil, [s.l.], 2000. 267 p.

SCHIFFMAN, M.H. Validation of hybridization assays: correlation of filter *in situ*, dot blot and PCR with *southern blot*. In.: MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; SHAH, K.V.; MEHEUS, A. **The epidemiology of cervical câncer and human papillomavirus.** Lyon. IARC, 1992.

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

SERRANO, T.R.G. – **Avaliação do programa Estadual de controle do câncer de colo uterino e de mama em Santa Catarina**. 2002. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

SES. Governo de Santa Catarina. Secretaria da Saúde. 2000. Disponível em <http://www.2000.19.222.2/>. Acesso em: 05 de julho de 2004.

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

SHIH, L.W.S., *et al.* Papilomavírus na área metropolitana de São Paulo: aspectos citológicos e imunocitoquímicos. *Acta Oncol Bras*. v. 8, p.59-64, 1988.

SHIRATA, N.K., *et 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.

SHIRATA, N.K., *et al.* Nuclear DNA content analysis by static cytometry in cervical intraepithelial lesions using retrospective series of previously stained Pap smears. *Adv Clin Path*. v. 5, p.87-91, 2001.

SILVA FILHO, A.M; BIBBO, M. Prognóstico e Prevenção. In.: BIBBO, M.; MORAES FILHO, A. **Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital**. Rio de Janeiro. Revinter, 1998.

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

SOLOMON, D., *et al.* The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. v. 287, p. 2114-2119, 2002.

SOLOMON, D., NAYAR, R. **Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal**. 2 ed. Rio de Janeiro. Revinter, 2005.

STOLER, M.H., *et al.* Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol*. v. 23, p. 117-128, 1992.

SUDBØ, J., *et al.* DNA content as a prognostic marker in patients with oral leukoplakia. *New Engl Med*. v. 344, p. 1270-1278, 2001.

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

TAKAHASHI, M.; NAITO, M. Application of the cytorich monolayer preparation system for cervical cytology: a prelude to automated primary screening. *Acta Cytol*. v. 41, p. 1785-1789, 1997.

THE ALTS GROUP: Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol.* v. 183, p. 1383-1392, 2003.

VELASCO, J. Citologia Líquida. *VPH Hoje.* v. 1, p. 8-9, 2001.

VILHAR, B., *et al.* Plant genome size measurement with DNA image cytometry. *Annals of Botany.* v. 87, p. 719-728, 2001.

VILHAR, B.; DERMASTIA, M. Standardization of instrumentation in plant DNA image cytometry. *Acta Botânica Croatica.* v. 61, n. 1, p. 11-26, 2002.

VIVA MULHER. INCA – Instituto Nacional de Câncer, 2001. Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo Uterino. Rio de Janeiro: 2002. Disponível em <http://www.inca.gov.br/prevencao/programas/viva-mulher.pdf>. Acesso em: 02 de outubro de 2003.

VOLGMAYR, H.; GREILHUBER, J. Genome size determination in Peronosporales (Oomycota) by Feulgen image analysis. *Fungal Genetics and Biology.* v. 25, p. 181-195, 1998.

WALBOOMERS, J. M., *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* v. 189, n. 1, p. 1-3, 1999.

WALDMAN, F.M., *et al.* Molecular cytometric of cancer. *Human Pathology.* v. 27, n. 5, p. 441-449, 1996.

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.

WANG, N., *et al.* Histologic follow-up of atypical endocervical cells. Liquid-based, thin-layer preparation vs. conventional Pap smear. *Acta Cytol.* v. 46, p. 453-7, 2002.

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.

WILBUR, D.C. False negatives in focused rescreening of Papanicolaou smears: how frequently are “abnormal” cells detected in retrospective review of smears preceding cancer or high-grade intraepithelial neoplasia? *Arch Pathol Lab Méd.* v. 121, p. 273-6, 1997.

YAMAMOTO, C. T., *et al.* Citofotometria do DNA de células do colo do útero infectadas e não infectadas pelo Papiloma Vírus Humano. *Rev Med Parana.* v. 60, n. 1, p. 1- 52, 2002.

ZEFERINO, L.C., *et al.* Desempenho das amostras do canal endocervical e do fundo de saco no diagnóstico da neoplasia do colo uterino. *Rev Bras Ginecol Obstet.* v. 22, p. 129-34, 2000.

ZUR HAUSEN, H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol.* v. 186, p. 131-156, 1994.

ANEXO 1

**COMPROVANTES DA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA NO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS**

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)