

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA, IMUNOCITOQUÍMICA E
MOLECULAR DAS CITOLOGIAS CÉRVICO-VAGINAIS
COM ATÍPIAS DE SIGNIFICADO INDETERMINADO**

LOUISE DE BROT ANDRADE

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
da Fundação Antônio Prudente para obtenção
do título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Victor Piana de Andrade

**Co-Orientadora: Dra. Isabela Werneck da
Cunha**

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Andrade, Louise De Brot

Análise morfométrica, imunocitoquímica e molecular das citologias cérvico-vaginais com atipias de significado indeterminado / Louise De Brot Andrade - São Paulo, 2012.

87p.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Victor Piana de Andrade

Descritores: 1. PAPILLOMAVIRIDAE. 2. NEOPLASIAS DO COLO DO ÚTERO. 3. INFECÇÕES POR PAPILLOMAVIRUS. 4. NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL/virologia. 5. LESÕES PRÉ-CANCEROSAS. 6. IMUNOCITOQUÍMICA. 7. CITOLOGIA.

DEDICATÓRIA

À minha família, Adseu Álvares de
Andrade, Inez Elizabeth De Brot
Andrade e Marina De Brot
Andrade

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador, Dr. Victor Piana de Andrade, pelo exemplo de trabalho e pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional, tanto no período de residência médica, quanto no doutorado.

À minha mãe, Inez Elizabeth De Brot Andrade, por me mostrar, desde o nascimento, o que é ser profissional com ética e competência; ser mãe com amor, humildade e resignação; ser cientista com perseverança e superação. Quando lembro que em sua tese de mestrado você tinha que extrair RNA de parafina... Lembro-me do gel sem nenhuma bandinha pra contar história e sua carinha de decepção no momento da revelação... Momentos inesquecíveis de superação e luta que me impulsionam sempre adiante nessa trajetória científica. Você é e sempre será o meu exemplo.

Ao meu pai, Adseu Álvares de Andrade, pelo simples fato de estar presente, firme, forte e amoroso, em todos os momentos de minha vida.

À minha Sis, Marina De Brot Andrade, sintonia perfeita entre irmãs. Os seus passos patológicos são os meus...

Aos De Brot e Andrade, pelo apoio, torcida, pelos momentos de alegria e descontração. Em especial à minha madrinha, tia Kilita e sua família pela torcida constante.

Ao Dr. Fernando Augusto Soares, pelas oportunidades, pelo exemplo, apoio e orientação.

À minha co-orientadora e amiga, Isabela Werneck da Cunha, por vivenciar minhas vitórias, alegrias, derrotas e decepções neste percurso...sempre ao meu lado.

Aos colegas e amigos da equipe de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, pelo apoio irrestrito.

Aos meus queridos residentes do departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, pelos momentos de descontração e diversão garantidos.

Aos funcionários do departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo e do CIPE, em especial ao José Ivanildo Neves e Severino Ferreira, pela colaboração na realização deste projeto.

Ao departamento de Ginecologia do Hospital A.C. Camargo, pelo apoio e colaboração.

Ao departamento de Patologia Investigativa em nome da Dra. Dirce Maria Carraro, pela colaboração na realização deste projeto.

Aos alunos de pós-graduação Bruno Pellegrini, pela colaboração nos cálculos de morfometria e Rodrigo Crespo, por sua contribuição na realização da genotipagem.

Às equipes que compõem a pós-graduação e biblioteca do Hospital A.C. Camargo pelo apoio e colaboração.

À minha segunda mãe e amiga, Clara Josino, pelas orações e torcida!!

À minha querida protetora, Bia, pelas vibrações e bons pensamentos voltados para mim... Sempre. Muito obrigada, Bia!

A todos os professores e colegas do curso de Pós-graduação.

Finalmente, a todos aqueles que contribuíram e amenizaram, à sua maneira, minha trajetória.

RESUMO

Andrade LB. **Análises morfológica, imunocitoquímica e molecular das citologias cérvico-vaginais com atipias de significado indeterminado.** São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: o câncer de colo uterino é a terceira causa mais frequente de câncer em mulheres no mundo. O HPV é o agente etiológico envolvido nos casos de lesões cervicais, sendo detectado em 95 a 100% dos casos. Entretanto, a infecção pelo HPV é transitória e não, necessariamente, produz lesões neoplásicas. A situação onde o resultado do exame citológico é de significado indeterminado (ASC-US, ASC-H, ACG-US e ACG-H) é de especial interesse pelo potencial risco de abrigar lesão neoplásicas e pela dificuldade que causa na decisão clínica. **Objetivo:** avaliar a contribuição da complementação diagnóstica às citologias cérvico-vaginais com atipias de significado indeterminado pelas análises morfológica, imunocitoquímica e genotipagem viral do HPV. **Métodos:** 260 casos de citologia em meio líquido foram analisadas pelo parâmetros morfológico (ImageJ/NIH institute); imunocitoquímico, anticorpo CINtec Plus e genotipagem para HPV, pelo Linear Array®; incluindo casos positivos, negativos e indeterminados. **Resultados:** 260 casos: 64 ASC-US, 9 ASC-H, 5 ACG-US, 2 ACG-H, 83 LIBG, 41 LIAG, 6 de carcinomas, 50 negativos. 239 foram amostras genotipadas: 132 positivas para HPV AR, 20 positivas para HPV BR e 83 negativas. O teste de genotipagem de HPV, nos casos indeterminados, apresentou sensibilidade de 0,86; especificidade de 0,52; VPP de 0,21 e VPN de 0,96. Nos casos indeterminados, o teste morfológico não apresentou valor de p significativo para nenhum parâmetro avaliado. A ICQ, nos casos indeterminados, obteve sensibilidade de 0,67; especificidade de 0,61; VPP de 0,21 e VPN de 0,92. **Conclusões:** a genotipagem para HPV e a ICQ se mostraram bons métodos complementares ao exame citológico para rastreamento das citologias indeterminadas, auxiliando na identificação das pacientes que abrigam lesões clinicamente relevantes.

SUMMARY

Andrade LB. **[A morphometric, immunocytochemistry and molecular analysis of atypical cells of undetermined significance on cervicovaginal cytology]**. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: cervical cancer is the third most common cause of cancer in women worldwide. HPV is the etiological agent involved in almost all cases of cervical lesions, being detected in 95-100% of cases. However, HPV infection is transient and do not necessarily produces neoplastic lesions. The diagnosis of atypical cells of undetermined significance on cytology (ASC-US, ASC-H, ACG and ACG-US-H) is of particular interest because of the potential risk of harboring neoplastic lesion and the difficulty it causes in clinical decision. **Objective:** To evaluate the contribution of morphometric analysis, immunocytochemistry and viral genotyping of HPV the cervical-vaginal cytology with atypical cells of undetermined significance. **Methods:** 260 cases of liquid-based cytology were analyzed by morphometric parameter settings (ImageJ / NIH institute); immunocytochemistry, antibody CINtec® Plus and Linear Array® HPV genotyping test, including positive, negative and indeterminate cases. **Results:** 260 cases: 64 ASC-US, ASC 9-H, 5-US ACG, ACG-2 H, 83 LSIL, 41 HSIL, 6 carcinomas, 50 negative. 239 samples were genotyped: 132 HPV HR positive, 20 HPV LR positive and 83 negative. The sensitivity, specificity, PPV and NPV of HPV-DNA testing for detection of CIN 2 or worse in women with atypical cells of undetermined significance were 86%, 52%, 21% and 96%. In ASC cytology cases, the morphometric test showed no significant p value for any parameter evaluated. The sensitivity, specificity, PPV and NPV of CINtec®Plus for detection of CIN 2 or worse in women with atypical cells of undetermined significance were 67%%, 61%, 21% and 92%. **Conclusions:** HPV test and CINtec®Plus in patients with ASC may be a powerful ancillary tool for identifying women at a high risk of underlying significant cervical lesions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação das taxas brutas de incidência de câncer de colo uterino por 100.000 mulheres, para o ano de 2012.....	2
Figura 2	Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira para o ano de 2012, sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma.....	3
Figura 3	Diagrama simplificado ilustrando mecanismo de infecção viral celular nas células cervicais e a transformação do epitélio normal em neoplásico.....	11
Figura 4	Exemplos de citologias em meio líquido com atipias de significado indeterminado.....	15
Figura 5	Exemplo de citologia em meio líquido com diagnóstico de lesão intraepitelial cervical de baixo grau.....	16
Figura 6	Exemplo de citologia em meio líquido com diagnóstico de lesão intraepitelial cervical de alto grau.....	17
Figura 7	Condutas recomendadas pela Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical nos casos de ASC-US.....	19
Figura 8	Condutas recomendadas pela Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical nos casos de ASC-H.....	19
Figura 9	Condutas recomendadas pela Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical nos casos de LIBG.....	20

Figura 10	Conduitas recomendadas pela Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical nos casos de LIAG.....	21
Figura 11	Foto demonstrando como é o resultado do teste de HPV e como ele é interpretado. Este caso é positivo para os tipos 16, 35 e POOL de tipos de alto risco.....	34
Figura 12	As setas indicam os núcleos que serão analisados e as réguas para calibração.....	36
Figura 13	Representação da delimitação do núcleo feita manualmente. Parâmetros que foram analisados.....	36
Figura 14	Número e proporção de casos positivos e negativos para HPV de alto risco de acordo com o resultado da biópsia.....	47
Figura 15	Relação da coinfeccção por tipos de HPV com a idade.....	50
Figura 16	Frequência dos tipos de HPV na população selecionada neste estudo. Em cores estão destacados os tipos mais frequentes.....	51
Figura 17	Frequência dos tipos de HPV no grupo de pacientes com citologia indeterminada. Em cores estão destacados os tipos mais frequentes.....	52
Figura 18	Demonstra a distribuição dos tipos de HPV nos grupos de idade abaixo e acima dos 30 anos, na população selecionada neste estudo.....	53

Figura 19	Demonstra a proporção dos tipos de HPV de alto (HPV AR) e baixo risco (HPV BR), casos negativos (NEG) e inadequados (INAD) na população selecionada neste estudo.....	54
Figura 20	Demonstra a distribuição dos casos de morfometria combinada positiva e negativa, de acordo com o resultado da biópsia, na população total deste estudo.....	56
Figura 21	Gráficos das variações das médias dos parâmetros morfométricos, obtidas para cada núcleo dos casos de citologia indeterminada, comparadas com o diagnóstico da biópsia.....	58
Figura 22	Distribuição dos casos de imunocitoquímica (ICQ) positiva e negativa, de acordo com o resultado da biópsia, na população total deste estudo.....	60
Figura 23	Dupla marcação ICQ para p16/ki-67 nas células atípicas.....	62
Figura 24	À esquerda marcação para Ki-67 em células em proliferação e à direita, células negativas para os dois marcadores.....	62
Figura 25	Protocolo sugerido de métodos complementares para as citologias de significado indeterminado.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de casos por categoria diagnóstica citológica.....	42
Tabela 2	Categorias diagnósticas das biópsias correspondentes às citologias diagnosticadas como indeterminadas (ASC-US, ASC-H, ACG-US, ACG-H).....	43
Tabela 3	Número de casos, por categoria diagnóstica, das biópsias dos casos de citologia positiva.....	43
Tabela 4	Caracterização clínica da população selecionada para este estudo de acordo com a categoria do diagnóstico citológico.....	44
Tabela 5	Número de casos positivos e negativos para HPV de acordo com a categoria diagnóstica da citologia e biópsia.....	45
Tabela 6	Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do teste de HPV em pacientes acima e abaixo dos 30 anos.....	47
Tabela 7	Sensibilidade, especificidade, VPP, VPN do teste de HPV em casos de citologias indeterminadas dos subgrupos de pacientes acima e abaixo de 30 anos.....	48
Tabela 8	Comparação entre os resultados das biópsias e de genotipagem do HPV nos casos com resultado citológico indeterminado.....	49
Tabela 9	Número de casos positivos para um ou mais tipos de HPV (1, 2, 3, 4, 5 ou seis tipos) e média de idade em cada subgrupo.....	50

Tabela 10	Número de casos positivos para HPV 16 segundo diagnóstico citológico e resultado da biópsia.....	52
Tabela 11	Número de casos negativos e positivos para o teste de HPV, de acordo com o diagnóstico citológico.....	53
Tabela 12	Estabelecimento dos pontos de corte para cada parâmetro morfométrico, com melhor relação sensibilidade /especificidade.....	55
Tabela 13	Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN por cada parâmetro morfométrico para detecção de lesão intraepitelial de alto grau nas citologias indeterminadas.....	57
Tabela 14	Distribuição da positividade de p16/Ki-67 por diagnóstico citológico, histológico e categoria do HPV.....	60
Tabela 15	Distribuição dos resultados da imunocitoquímica para p16/Ki-67 por diagnóstico citológico e histológico.....	61
Tabela 16	Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da imunocitoquímica para detecção de lesão intraepitelial de alto grau, em pacientes acima e abaixo dos 30 anos, na população total do estudo e dividida por faixas etárias.....	61
Tabela 17	Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da imunocitoquímica para detecção de lesão intraepitelial de alto grau, em pacientes acima e abaixo dos 30 anos, nos casos de citologia indeterminada.....	63

Tabela 18	Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para detecção de lesão intraepitelial de alto grau da imunocitoquímica (ICQ), Linear Array, morfometria(M) e os testes combinados, na população total do estudo.....	63
Tabela 19	Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para detecção de lesão intraepitelial de alto grau da imunocitoquímica (ICQ), Linear Array e os testes combinados, no grupo de pacientes com citologia indeterminada.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACG-H	citologia com atipias em células glandulares de significado indeterminado em que não se pode afastar lesão de alto grau
ACG-US	citologia com atipias em células glandulares de significado indeterminado de provável origem não neoplásica
ACO	anticoncepcional oral
ASC	citologia com atipias em células escamosas de significado indeterminado
ASC-H	citologia com atipias em células escamosas de significado indeterminado em que não se pode afastar lesão de alto grau
ASC-US	citologia com atipias em células escamosas de significado indeterminado de provável origem não neoplásica
AUC	área abaixo da curva; do inglês área under the curve
CEC	carcinoma de células epiteliais escamosas
CI	intervalo de confiança
CUT-off	ponto de corte
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
E	early
Espec	especificidade do teste
EUA	Estados Unidos da América
HF	história familiar
HPV AR	Papiloma Vírus Humano de alto potencial oncogênico
HPV BR	Papiloma Vírus Humano de baixo potencial oncogênico
HPV	Papiloma Vírus Humano
ICQ	reação imunocitoquímica
INAD	casos inadequados para avaliação
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	kilodaltons
L	late

LCR	locus control region
LIAG	lesão intraepitelial cervical de alto grau
LIBG	lesão intraepitelial cervical de baixo grau
M	morfometria combinada
NEG	casos negativos
NIH	National Institutes of Health
ORFs	Open Reading Frames
PCR	reação em cadeia da polimerase
Sensib	sensibilidade do teste
SIL	lesão intraepitelial cervical
TMB	tetrametilbenzidina
VLPs	víriion like proteins
VPN	valor preditivo negativo
VPP	valor preditivo positivo

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia	1
1.2	Fatores de risco	4
1.3	Método de rastreamento, lesões intraepiteliais cervicais e condutas preconizadas	12
1.4	Estratégias de melhoria do rastreamento do câncer cervical e marcadores moleculares	21
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo geral	26
3.2	Objetivos específicos	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Amostras	27
4.2	Método de coleta e preservação das amostras	28
4.3	Classificação das citologias	29
4.4	Revisão citológica	29
4.5	Método de detecção e genotipagem do HPV	29
4.5.1	Preparação da amostra	30
4.5.2	Amplificação por PCR	30
4.5.3	Reação de hibridação	32
4.5.4	Reação de detecção	33
4.6	Análise morfométrica	34
4.7	Imunocitoquímica	37
4.8	Dados clínicos	38
4.9	Análise estatística	38

5	RESULTADOS	41
5.1	Caracterização da população selecionada.....	41
5.2	Avaliação dos métodos separadamente.....	45
5.2.1	Genotipagem de HPV.....	45
5.2.2	Morfometria.....	54
5.2.3	Imunocitoquímica.....	59
5.3	Correlação das três metodologias testadas.....	63
5.4	Protocolo sugerido de métodos complementares nas citologias de significado indeterminado.....	64
6	DISCUSSÃO	66
6.1	Genotipagem para HPV.....	66
6.2	Imunocitoquímica.....	71
6.3	Morfometria.....	74
6.4	Correlação das metodologias testadas.....	76
7	CONCLUSÕES	77
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

ANEXOS

- Anexo 1** Classificações citológicas / Sistema BETHESDA de 2001
- Anexo 2** Questionário Clínico
- Anexo 3** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- Anexo 4** Protocolo de imunocitoquímica
- Anexo 5** Protocolo LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test (Roche)
- Anexo 6** Protocolo de extração de DNA das amostras de citologia: QIAamp ® DNA Micro Kit/Qiagen
- Anexo 7** Produção científica relacionada á dissertação

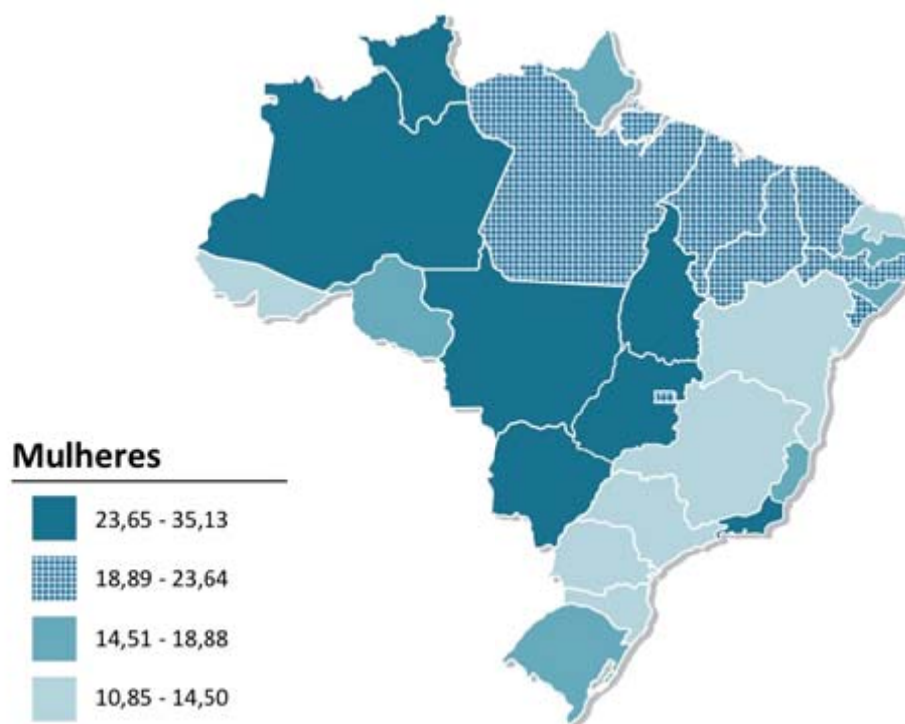
1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer de colo uterino é um tema de grande relevância por sua alta incidência e elevadas taxas de mortalidade, representando, no Brasil, a segunda causa mais frequente de câncer em mulheres e, no mundo, a terceira causa. Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são esperados 17.540 novos casos para o ano de 2012. Sem considerar os tumores da pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o mais incidente na região Norte (24/100 mil). Nas regiões Centro-Oeste (28/100 mil) e Nordeste (18/100 mil) ocupa a segunda posição mais frequente, na região Sudeste (15/100 mil), a terceira, e na região Sul (14/100 mil), a quarta posição. As mais recentes estimativas mundiais apontam que a razão mortalidade/incidência é de 52%, sendo responsável pelo óbito de 275 mil mulheres (Ministério da Saúde 2011).


Nos Estados Unidos, a incidência é de 12.170 novos casos por ano, com mortalidade de 4.220/ano (HOWLADER 2012). As taxas de incidência apresentam grande variação geográfica, o que é, parcialmente, explicado por diferenças nos sistemas de saúde, intensidade dos programas de rastreamento e exposição ao principal fator de risco, o HPV. O oeste da Ásia é a região de menor incidência, possuindo uma taxa de 4,9/100.000 mulheres, já o leste Africano é a região de maior incidência, perfazendo um

total de 35/100.000 mulheres. Os países africanos de maior incidência são Guiné e Zâmbia (BOYLE e LEVIN 2007). Essa neoplasia é, relativamente, incomum em países desenvolvidos, devido ao maior empenho e investimento nos programas de prevenção e manejo das lesões pré-neoplásicas (CASTLE et al. 2011; CUZICK et al. 2008).



Fonte: Ministério da Saúde (2011)

Figura 1 - Representação das taxas brutas de incidência de câncer de colo uterino por 100.000 mulheres, para o ano de 2012.

Localização primária					Localização primária		
casos novos	percentual		Homens	Mulheres	casos novos	percentual	
Próstata	60.180	30,8%		Mama Feminina	52.680	27,9%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%		Colo do Útero	17.540	9,3%	
Cólon e Reto	14.180	7,3%		Cólon e Reto	15.960	8,4%	
Estômago	12.670	6,5%		Glândula Tireoide	10.590	5,6%	
Cavidade Oral	9.990	5,1%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%	
Esôfago	7.770	4,0%		Estômago	7.420	3,9%	
Bexiga	6.210	3,2%		Ovário	6.190	3,3%	
Laringe	6.110	3,1%		Corpo do Útero	4.520	2,4%	
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%		Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%	
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%		Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%	

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Fonte: Ministério da Saúde (2011)

Figura 2 - Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira para o ano de 2012, sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma.

A incidência de câncer do colo do útero manifesta-se a partir dos 25 anos. O risco aumenta, rapidamente, até atingir seu pico na faixa etária de 40 a 60 anos (Ministério da Saúde 2007). Nos últimos anos, essa neoplasia tem sido diagnosticada em idades cada vez mais precoces. O pico de incidência de infecção pelo HPV ocorre aos 20 anos e o pico de incidência/detecção de lesões de alto grau ocorre aos 30 anos (CUZICK et al. 2008). O câncer de colo uterino representa uma neoplasia maligna com grande potencial de cura, quando diagnosticado e tratado precocemente, por isto, o foco no implemento de programas da detecção das lesões pré-malignas (Ministério da Saúde 2011).

As lesões pré-neoplásicas do colo uterino são denominadas Lesões Intraepiteliais Cervicais e representam uma doença comum nas mulheres em idade reprodutiva. O Colégio Americano de Patologistas sugere que mais de um milhão de mulheres são diagnosticadas a cada ano com Lesões Intraepiteliais Cervicais de Baixo Grau e, aproximadamente, quinhentos mil são diagnosticadas com lesões de alto grau (EVERSOLE et al. 2010). No

Brasil, o exame citológico cervical é a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde, prioritariamente, para mulheres de 25 a 59 anos de idade (Ministério da Saúde 2007). Com a implantação dos programas de rastreamento, a incidência de câncer cervical reduziu drasticamente, mas, em nenhuma população, esta estratégia foi capaz de eliminar o câncer do colo uterino. As causas descritas como responsáveis pelo controle inadequado dessa neoplasia envolvem falha no comparecimento para a coleta sistemática, coleta incorreta do material, diagnóstico e conduta inadequadas e programas de rastreamento baseado apenas na citologia, teste pouco sensível (COX 2002; WRIGHT et al. 2007).

1.2 FATORES DE RISCO

Dados laboratoriais e epidemiológicos suportam a conclusão de que o Papiloma Vírus Humano (HPV) é o agente etiológico envolvido na grande maioria dos casos de lesões epiteliais malignas e pré-malignas do colo uterino, sendo o DNA do vírus detectado em 95 a 100% dos casos (DEHN et al. 2007) Outros fatores devem estar envolvidos na transformação maligna da mucosa cervical. Dentre eles admite-se: tabagismo, multiplicidade de parceiros sexuais, iniciação sexual precoce, uso de contraceptivos orais, coinfeção com outras doenças sexualmente transmissíveis e fatores individuais. Entretanto, esses fatores são controversos na literatura e não foram comprovados como fatores causais e, sim, como cofatores (TINDLE 2002; BOYLE e LEVIN 2007).

Os Papiloma vírus são microorganismos icosaédricos de 52-55 nm de diâmetro, não envelopados, epiteliotrópicos. São vírus de DNA que se replicam no núcleo de células epiteliais escamosas e induzem proliferação. As partículas virais consistem em única molécula de DNA de dupla fita circular, de aproximadamente 8000 pares de bases, contida em estrutura esférica, o capsídeo, que é composto por 72 capsômeros (BOYLE e LEVIN 2007). A fita de DNA codificadora contém, aproximadamente, 8 *Open Reading Frames* (ORFs), as quais são transcritas de uma única fita de DNA e são subdivididas em três porções funcionais: região que codifica as proteínas precoces (E1-E7), proteínas tardias (L1-L2) e porção longa não codificadora(LCR). As proteínas precoces estão envolvidas na replicação do DNA e proliferação celular, as tardias estão envolvidas na formação do capsídeo viral e LCR contém elementos necessários para replicação e transcrição viral (DEHN et al. 2007). Segue abaixo a descrição das proteínas com suas funções mais relevantes.

Proteína E1: proteína viral de 73-kDa, necessária para replicação viral. E1 se liga a uma sequência de DNA específica, denominado sítio de ligação E1(E1BS). E1 forma estrutura hexamérica com a proteína E2, resultando em um complexo com atividade helicase, o qual promove a abertura da hélice de DNA, expondo a fita modelo para a síntese da nova fita de DNA (BOYLE e LEVIN 2007).

Proteína E2: proteína viral de 40-45 kDa (a depender do papiloma vírus), constituída por três porções. A primeira, na extremidade carboxiterminal, um domínio responsável pela dimerização, o qual forma

homodímeros que reconhecem e se ligam a sequências de DNA palindrômicas (ACCGNNNNCGGT) na região de LCR. A segunda, localizada na região central da proteína, tem função indefinida, embora tenha sido descrita como reguladora da estabilidade da molécula. A terceira, na porção aminoterminal, é essencial na regulação da transcrição e regulação da replicação viral devido a sua interação com E1. Estudos em culturas de células demonstraram que baixos níveis de E2 ativam a transcrição, enquanto que altos níveis de E2 reprimem a transcrição, promovendo bloqueio das oncoproteínas E6 e E7. O silenciamento do gene E2 leva a altos níveis de E6 e E7 observados nas células transformadas (BOYLE e LEVIN 2007).

Proteína E4: apesar da sua localização no genoma e do nome “E”, a proteína E4 é expressa nos estágios finais e é a mais abundante durante o ciclo de vida viral. E4 parece exercer papel fundamental em facilitar e dar suporte à amplificação do genoma viral, na regulação da expressão dos genes tardios, no controle da maturação dos vírus e na liberação das partículas virais. A expressão da proteína E4 induz a parada do ciclo celular na fase G2 nas células epiteliais escamosas. Ainda não está claro na literatura, o quão relevante é, esta função, na maturação e produção viral. Existem hipóteses que contemplam o fato de que células suprabasais que entraram na fase S, pela ação de E7, são mantidas nessa fase, pela ação de E4, afim de, maximizar a amplificação do genoma viral (BOYLE e LEVIN 2007).

Proteína E5: nem todos os tipos de HPV apresentam E5. Proteína de natureza hidrofóbica que apresenta peso variável de acordo com o tipo de HPV. É considerada uma proteína com poder de transformação das células, uma vez que, em culturas, essa proteína promove a transformação dos queratinócitos, potencializando a capacidade de imortalização das proteínas E6 e E7 (BOYLE e LEVIN 2007).

Proteína E6: sua principal função é inibir a atividade transcricional e pró-apoptótica da proteína produzida pelo gene supressor de tumor p53, pois a ligação E6-p53 leva à degradação de p53. E6 afeta, essencialmente, a capacidade do p53 de parar o ciclo celular e ativar apoptose em resposta a um dano no DNA. E6 também se liga a uma série de outras proteínas relacionadas a processos de transcrição, polaridade e motilidade celular, além de inibir outros genes supressores de tumor e moléculas pró-apoptóticas, como Myc e Bak. E6 contribui para imortalização da célula, mas o mecanismo pelo qual ela exerce essa função permanece controverso (BOYLE e LEVIN 2007).

Proteína E7: essa proteína se liga à proteína produzida pelo gene supressor de tumor pRb e a outras proteínas como p107 e p130. Funcionalmente, ocorre a perda da função inibitória do gene pRb, levando a ativação de moléculas mediadas por E2F e à progressão da célula para fase S e à proliferação celular (BOYLE e LEVIN 2007).

Proteínas L1 e L2: codificam a maior e menor proteína do capsídio viral, respectivamente. In vitro, L1 forma as VLPs (“vírion like proteins”) que possui a mesma morfologia e antigenicidade do vírus completo, informação

utilizada no desenvolvimento das vacinas contra o HPV (BOYLE e LEVIN 2007).

Foram descritos mais de 100 tipos de HPV, caracterizados por diferentes sequências de bases de nucleotídeos na porção L1. Um novo tipo é reconhecido, quando a sequência de DNA da região L1 difere mais de 10% dos tipos já existentes. Quando essas diferenças encontram-se entre 2 e 10%, define-se um subtipo e quando as diferenças são menores de 2%, define-se uma variante (BOYLE e LEVIN 2007). Sabe-se que mais de 40 tipos HPV infectam a mucosa cervical. Estes são divididos em vírus de baixo (tipos 6, 11, 40, 42, 54 e 57) e alto risco (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66 e 68) para progressão para câncer cervical. Os tipos de baixo risco estão envolvidos em lesões benignas (condilomas acuminados) e os de alto risco, correspondentes a 90% das infecções cervicais, resultam em lesões pré-neoplásicas e carcinomas invasivos (BOYLE e LEVIN 2007).

O ciclo de vida do Papiloma Vírus requer integridade da célula epitelial para que esteja apta a proliferar. Primeiramente, a partir do ruptura da integridade do epitélio, o vírus atinge e infecta as células da camada basal, as células de reserva ou as células tronco cervicais. Normalmente, quando a célula entra em divisão celular, a célula-filha perde o contato com a membrana basal e migra para o compartimento suprabasal, onde a célula perde o estímulo proliferativo e entra em processo de diferenciação celular. Entretanto, nas células epiteliais infectadas pelo HPV, este processo não ocorre e as células da porção suprabasal continuam sintetizando DNA e

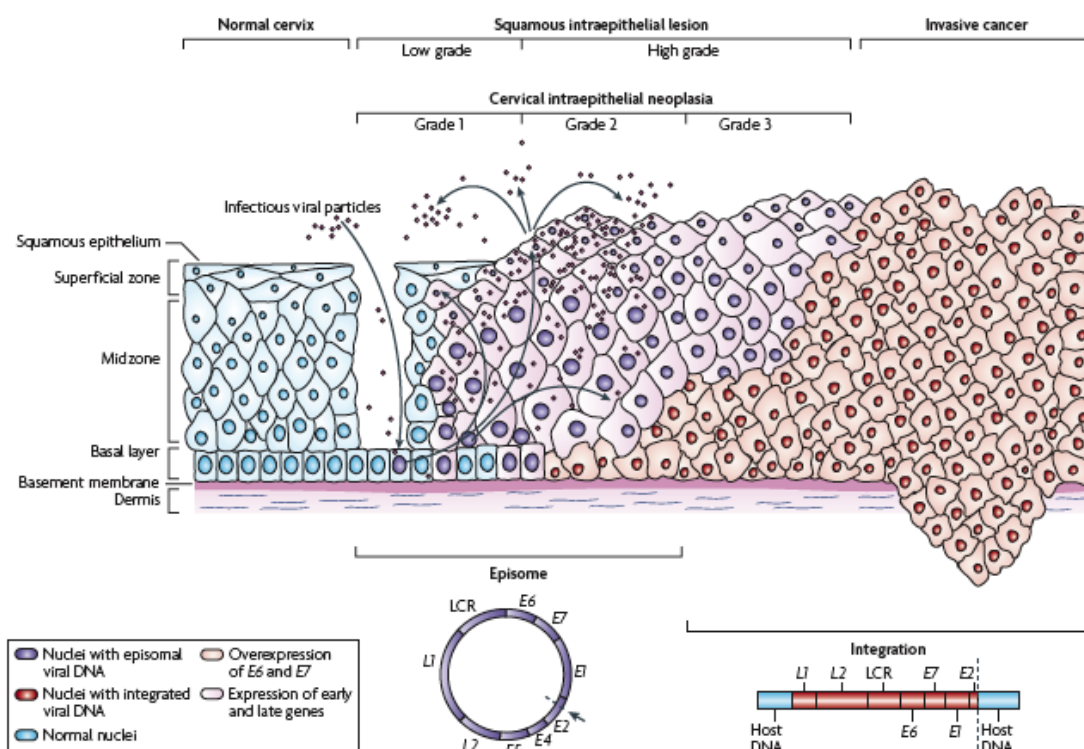
expressando marcadores de proliferação (JEON e LAMBERT 1995; FLORES et al. 1999). Desse modo, a célula propicia a amplificação do genoma viral, a expressão dos genes relacionados ao capsídeo e ascensão do vírus até as camadas superficiais do epitélio (ZUR HAUSEN 2002; WOODMAN et al. 2007). A depender de fatores do hospedeiro e de mecanismos celulares, as infecções por HPV de alto risco podem solucionar espontaneamente, são as infecções transitórias, evolução observada em 70% dos casos, em 1 ano. Os outros 30% irão desenvolver lesões pré-neoplásicas. Essas lesões também podem regredir após a resolução da infecção viral, dependendo do estado imunológico e do grau da lesão. 50% das lesões de baixo grau regredem após 1 ano, enquanto uma pequena porção das lesões de alto grau regredem (BOYLE e LEVIN 2007). Existem evidências de que o vírus pode permanecer em estado latente. A latência do HPV pode ser definida como um estado em que o DNA do vírus é mantido sem que haja produção de partículas virais. Algumas evidências sugerem a existência deste estado viral, são elas: (1) o DNA do HPV pode ser detectado em epitélios cervicais normais e inúmeros estudos têm mostrado que o risco das mulheres com HPV de alto risco e citologia normal de desenvolver lesões pré-neoplásicas, em 2 anos, aumenta substancialmente (KOUTSKY et al. 1992; HILDESHEIM et al. 1994; ROZENDAAL et al. 2000); (2) mulheres sem evidências clínicas ou citológicas de infecção pelo HPV desenvolvem lesões clínicas durante a gestação, momento de imunossupressão fisiológica e que essas lesões regredem no pós-parto (NOBBENHUIS et al. 2002); (3) mulheres em terapia imunossupressora e

aquelas com infecção pelo HIV têm maior incidência de câncer cervical (KLEIN e KORETZ 1994; CAPPIELLO et al. 1997; SUN et al. 1997; CUUVIN et al. 1999; ELLERBROCK et al. 2000). (4) pacientes tratadas por lesões relacionadas ao HPV, mas que apresentam teste de HPV positivo, apesar do exame citológico, colposcópico e histológico negativos, tem maior risco de desenvolver outras lesões comparadas com o grupo controle negativo (KOUTSKY et al. 1992; NOBBENHUIS et al. 2002).

O ciclo de vida viral pode seguir duas vias: produzir infecções produtivas ou não produtivas (abortivas). Uma infecção produtiva leva à produção de partículas virais completas, sem que haja integração do DNA viral ao DNA do hospedeiro. Quando a célula epitelial sofre maturação, o HPV utiliza a maquinaria metabólica da célula a fim de inativar os inibidores do ciclo celular p21 e p27. Nas infecções produtivas o DNA do HPV permanece em estado episomal e E1/E2 reprimem, em parte, a expressão de E6 e E7, as duas oncoproteínas mais importantes do HPV. Em condições ainda não explicadas, algumas infecções são abortivas desde o início e algumas infecções produtivas se tornam abortivas, podendo converter um processo infeccioso em neoplásico. Neste momento, a expressão dos genes tardios e a ascensão viral é inibida, o vírus se integra ao DNA da célula hospedeira. Essa integração resulta em superexpressão das oncoproteínas E6 e E7. E6 promove a degradação da proteína p53 e da proteína, pró-apoptótica, BAK, resultando em resistência à apoptose, aumento da instabilidade cromossômica e em ciclo celular não monitorado. Além disso, a ativação da telomerase e a inibição da degradação da família das SRC

Kinases pela oncoproteína E6, parece exercer importante função na proliferação celular (ZUR HAUSEN 2002). Já a oncoproteína E7 irá se ligar e promover a degradação do gene do retinoblastoma, levando à desregulação da via Rb-ciclinaD/p16 com consequente superexpressão do p16^{INK4a} nas células neoplásicas.

A proteína p16^{INK4a} exerce papel fundamental nos mecanismos de regulação do ciclo celular das células eucarióticas. Essa molécula faz parte do controle da transição do ciclo celular entre as fases G1-S, mediada pelo pRb. Quando expresso, o p16^{INK4a} tem efeito antiproliferativo.



Fonte: WOODMAN et al. (2007)

Figura 3 - Diagrama simplificado ilustrando mecanismo de infecção viral celular nas células cervicais e a transformação do epitélio normal em neoplásico.

Na maioria dos casos, a infecção pelo HPV é transitória e não, necessariamente, produz lesões clinicamente relevantes na mucosa cervical. A prevalência de câncer de colo uterino é baixa, comparado com a alta incidência de infecção pelo HPV. A evolução dessas infecções refletem as características virais(tipo), características do hospedeiro(estado imunológico, genética, etc), e o microambiente sobre o qual a infecção ocorre (TINDLE 2002; BOYLE e LEVIN 2007).

1.3 MÉTODO DE RASTREAMENTO, LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E CONDUTAS PRECONIZADAS

As lesões pré-neoplásicas do colo uterino são denominadas lesões intraepiteliais cervicais e representam uma doença comum nas mulheres em idade reprodutiva. No Brasil, o exame citológico cervical é a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde (2007). Com a implantação dos programas de rastreamento, a incidência de câncer cervical reduziu drasticamente, mas, em nenhuma população, esta estratégia foi capaz de eliminar o câncer do colo uterino (COX 2002; WRIGHT et al. 2007). A citologia cérvico-vaginal convencional tem limitações, especialmente, a baixa sensibilidade para detectar as lesões pré-malignas (50-75%) (RUNOWICZ 2007). Além disto, a citologia cérvico-vaginal não é capaz de prever quais lesões pré-cancerosas serão clinicamente significantes, essencialmente, nos casos diagnosticados como lesão de baixo grau (LSIL) e nos casos de atipias citológicas mínimas (ASC-US, ASC-

H, AGC). A classificação utilizada para reportar a citologia cervical é baseada no sistema de Bethesda 2001 (Anexo 1), a qual possui, de forma simplificada, as seguintes categorias diagnósticas:

1. Dentro dos limites da normalidade;
2. Alterações inflamatórias e reparativas;
3. Atipias celulares de significado indeterminado;
4. Lesões intraepiteliais de baixo grau;
5. Lesões intraepiteliais de alto grau;
6. Carcinomas invasivos.

Nos casos indeterminados (ASC-células escamosas atípicas) o patologista deve classificar como ASC-US (atipias de significado indeterminado) e ASC-H (atipias em que não se pode excluir lesão de alto grau). Os diagnósticos de ASC-US e ASC-H necessitam maior investigação, na tentativa de identificar as pacientes propensas a desenvolver lesão de alto grau. Atualmente, é bem conhecido que a infecção pelo HPV de alto risco (HR-HPV) é necessária, porém não suficiente para o desenvolvimento de câncer cervical. Em consequência, tem sido recomendado o teste para HPV em pacientes com ASC. A sensibilidade do teste é excelente, mas a alta prevalência de infecções transitórias, principalmente em pacientes abaixo de 30 anos, limita a especificidade desse método. Sendo assim, surgiu a necessidade de validação de novos métodos capazes de prever, com maior especificidade, a transição de ASC para LIAG.

A situação onde o resultado do exame citológico é de significado indeterminado (ASC-US ou ASC-H) é de especial interesse pelo risco de abrigar uma lesão clinicamente importante e pela dificuldade que causa na decisão clínica. Essas situações necessitam de outros métodos para identificar as pacientes que apresentam ou evoluirão com lesões pré-neoplásicas (SCHIFFMAN et al. 2000; SOLOMON et al. 2002b; VASSILAKOS et al. 2002; RUNOWICZ 2007).

Abaixo segue uma breve descrição das categorias diagnósticas citológicas.

- **Citologia com atipias de significado indeterminado:** é uma categoria intermediária em que não se pode afirmar, se as atipias observadas são decorrentes de processos inflamatórios ou neoplásicos. Nos casos de ASC-US, as atipias são vistas em células maduras e nos casos de ASC-H, as alterações são observadas em células imaturas. E quando ocorre em células endocervicais é denominado AGC. Na rotina, os diagnósticos de ASC-US e ASC-H surgem quando alterações celulares associadas à inflamação, metaplasia escamosa imatura, atrofia ou pós-radioterapia simulam as alterações citológicas observadas nas displasias de baixo grau ou alto grau (DEMAY 1996; KOSS e MELAMED 2006). É recomendado que o índice de citologias nesta categoria não deve ultrapassar 5% e que a razão ASC/SIL não deve exceder 3:1 (DAVEY et al. 1994; GERBER et al. 2001; JUSKEVICIUS et al. 2001; LEE et al. 2006). Em geral, essas atipias regridem em aproximadamente 68% dos casos; 7%

progridem para lesões de alto grau e 0,25% progridem para câncer invasivo (MELNIKOW et al. 1998).

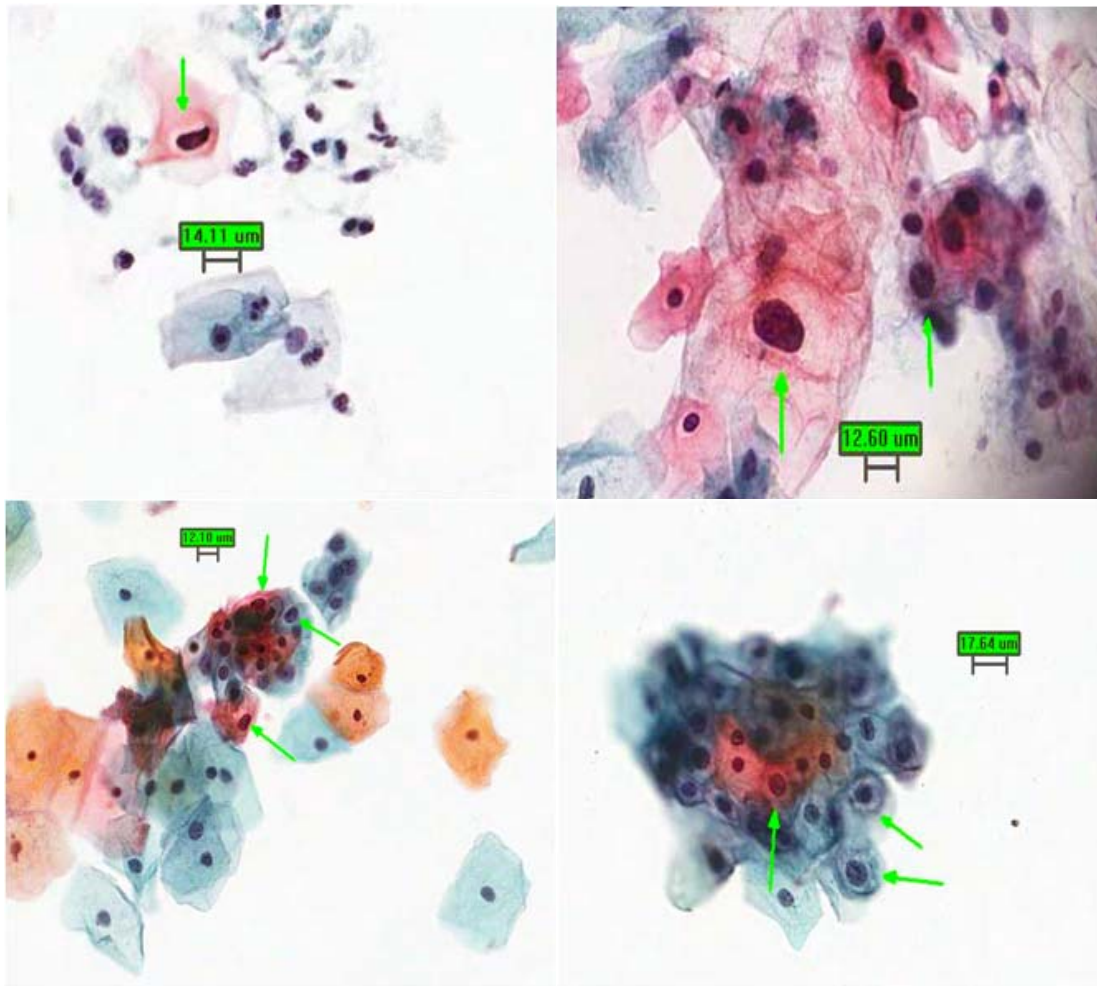


Figura 4 - Exemplos de citologias em meio líquido com atipias de significado indeterminado. Papanicolaou, 10x e 40x. Observam-se atipias nucleares tais como hiperchromasia, discreta irregularidade nuclear e halos claros perinucleares não conclusivos de infecção viral.

- **Lesão intraepitelial de baixo grau:** lesão que ocorre em células intermediárias e superficiais, em que observa-se aumento do tamanho nuclear, irregularidade no contorno e na forma nuclear, hiperchromasia e coilocitose. É encontrada em, aproximadamente, 2%

das citologias cervicais. É causada por tipos de HPV de alto e baixo risco e pode regredir, espontaneamente, em 43 a 47% dos casos. Em 21% dos casos observa-se progressão para lesões de alto grau. Menos de 0,15% dessas lesões evoluem para câncer invasivo (MELNIKOW et al. 1998; BOYLE e LEVIN 2007).



Figura 5 - Exemplo de citologia em meio líquido com diagnóstico de lesão intraepitelial cervical de baixo grau. Observa-se binucleação, irregularidade no contorno e na forma nuclear, hiperchromasia e coilocitose. Foto realizada no aumento de 40x.

- **Lesão intraepitelial de alto grau:** Observam-se atipias em células escamosas imaturas. Há aumento da relação núcleo-citoplasmática, hiperchromasia, distribuição irregular da cromatina e irregularidade do contorno nuclear. Lesão encontrada em 0,5% das citologias cervicais. Pode regredir em 35% dos casos e tem chance de 1,4% de progredir para câncer cervical (MELNIKOW et al. 1998; BOYLE e LEVIN 2007).

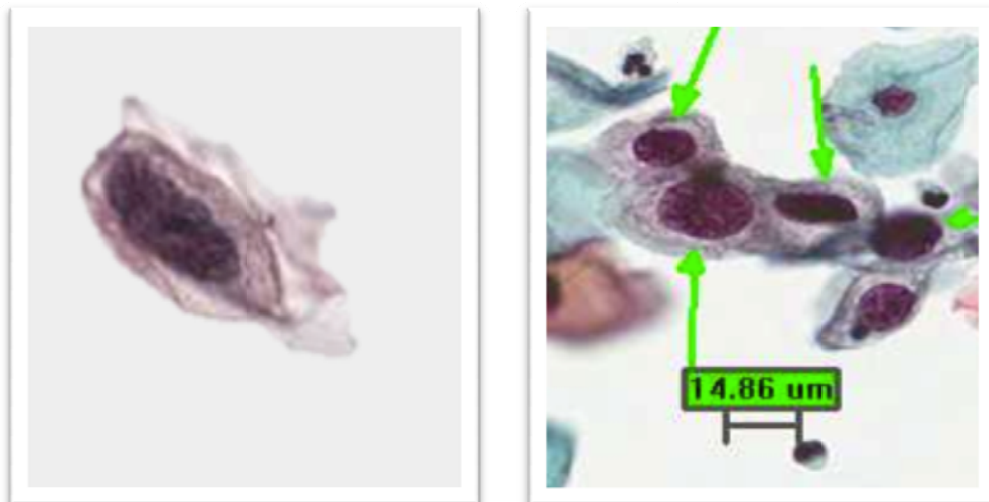


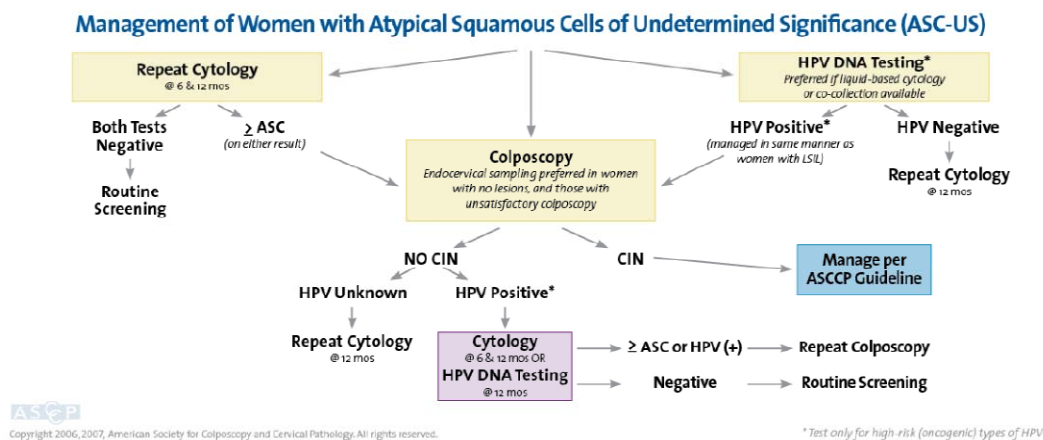
Figura 6 - Exemplo de citologia em meio líquido com diagnóstico de lesão intraepitelial cervical de alto grau. Observa-se aumento da relação núcleo/citoplasmática, irregularidade no contorno e na forma nuclear e hiperchromasia. Foto realizada no aumento de 100x.

Se por um lado, o manejo inadequado dessas lesões aumenta o risco de câncer cervical, por outro, o tratamento exagerado pode gerar complicações e aumentar a morbidade. Na tentativa de padronizar essas condutas, foram desenvolvidos os consensos internacionais para o manejo das citologias alteradas e das lesões cervicais. O manual mais recente é o de 2006, coordenado pela Sociedade Americana de Colposcopia e Patologias Cervicais.

- **Condutas preconizadas nos casos de citologias indeterminadas:** segundo o consenso de 2006, as pacientes diagnosticadas com atipias celulares de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas (ASC-US) podem ser seguidas de três maneiras:
 1. Repetir o exame citológico em seis meses;
 2. Realizar colposcopia;

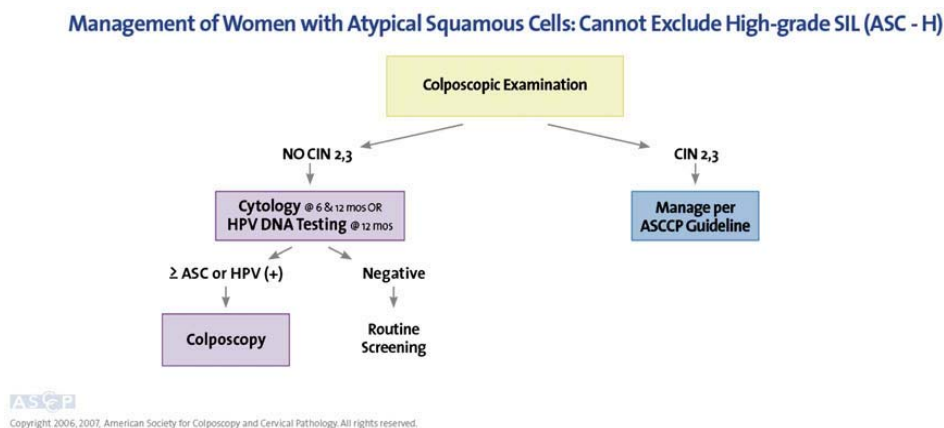
3. Fazer o teste para detectar HPV de alto risco.

As mulheres com ASC-US que tem o teste de HPV negativo, podem repetir o exame citológico em 12 meses. As mulheres com teste de HPV positivo são tratadas do mesmo modo que as LIBG. Se a paciente for seguida com a repetição da citologia em seis meses, a citologia deve ser repetida até que dois exames consecutivos sejam classificados como negativos. A colposcopia é recomendada nos casos em que a citologia for indeterminada ou positiva. Nos casos de ASC-H (atipias de significado indeterminado em que não se pode afastar lesão de alto grau), as pacientes devem ser encaminhadas para avaliação colposcópica. Caso não seja identificada lesão de alto grau, as pacientes devem ser acompanhadas com teste de HPV a cada 12 meses ou por exame citológico a cada 6 a 12 meses. Se o teste de HPV for positivo ou se o exame citológico for indeterminado ou positivo, a paciente deve ser encaminhada para colposcopia. Se o teste de HPV e/ou citologia forem negativos, a paciente deve retornar para o rastreamento habitual.



Fonte: WRIGHT et al. (2006)

Figura 7 - Conduas recomendadas pela Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical nos casos de ASC-US

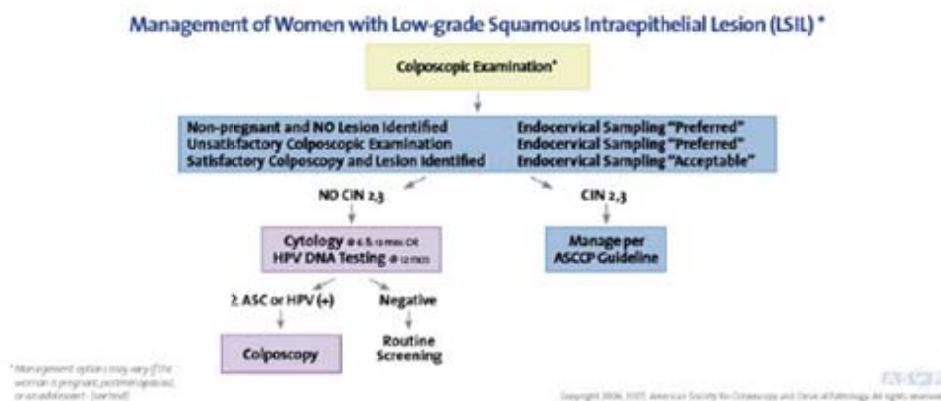


Fonte: WRIGHT et al. (2006)

Figura 8 - Conduas recomendadas pela Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical nos casos de ASC-H

- **Conduas preconizadas nas citologias com LIBG:** As pacientes devem ser encaminhadas para realização de colposcopia. Se não forem identificadas lesões de alto grau, deve ser feito o teste de HPV ou repetir a citologia em 6 a 12 meses. Se o teste de HPV e/ou

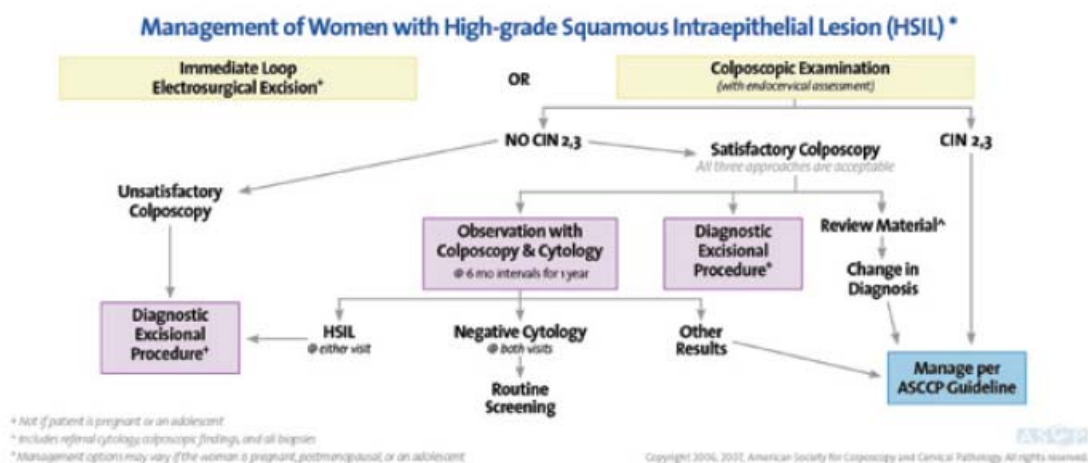
citologia negativos, a paciente deve retornar para o programa de rastreamento habitual. Se o teste de HPV for positivo ou se a citologia for indeterminada ou positiva, a paciente deve ser encaminhada para colposcopia.



Fonte: WRIGHT et al. (2006)

Figura 9 - Condutas recomendadas pela Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical nos casos de LIBG.

- **Condutas preconizadas nas citologias com LIAG:** Conização ou colposcopia são condutas aceitáveis para as pacientes com LIAG. Quando se opta pela colposcopia e não é identificada lesão de alto grau na biópsia, pode ser feita conização ou acompanhamento da paciente com colposcopia e citologia em 6 a 12 meses.



Fonte: WRIGHT et al. (2006)

Figura 10 - Conduas recomendadas pela Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical nos casos de LIAG

1.4 ESTRATÉGIAS DE MELHORIA DO RASTREAMENTO DO CÂNCER CERVICAL E MARCADORES MOLECULARES

Com todo o conhecimento da biologia viral do HPV e da cinética dos epitélios acumulada nas últimas décadas, o uso de marcadores de infecção viral ou desregulação do ciclo celular se apresentam como alternativas naturais às dúvidas morfológicas e à implementação de novas metodologias para o rastreamento do câncer cervical. Há, portanto, nítido significado clínico na utilização de novos métodos e marcadores moleculares para aumentarem a sensibilidade da citologia cérvico-vaginal na detecção das lesões pré-neoplásicas e diminuição dos exames falso negativos (DEHN et al. 2007).

O teste para HPV tem sido adotado para triagem de pacientes com ASCUS e para rastreamento primário em conjunto com a citologia cérvico-

vaginal em pacientes acima de 30 anos, na tentativa de aumentar a sensibilidade da citologia cérvico-vaginal (SCHIFFMAN et al. 2000; SOLOMON et al. 2002b; VASSILAKOS et al. 2002; RUNOWICZ 2007). Múltiplos estudos têm demonstrado que o teste para detecção do HPV pode ser usado como método primário de rastreamento, pois é mais sensível, reprodutível e tem maior valor preditivo que a citologia convencional isoladamente (STOLER et al. 2007). Entretanto, o teste para HPV é menos específico que o teste de Papanicolaou. Estudos demonstram que há perda de 2,7% em especificidade. A sensibilidade dos dois testes juntos chega a 100%, com especificidade de 92,5% (MAYRAND et al. 2007). A maioria dos estudos clínicos têm sido realizados utilizando a hibridação in situ como método de detecção do HPV, o qual categoriza as pacientes em portadoras de HPV de alto ou baixo risco. Embora esse teste tenha demonstrado sua utilidade para triagem das pacientes, ele não informa características específicas quanto ao tipo de HPV presente no espécime. Sabe-se que tipos específicos de HPV trazem maior risco para desenvolvimento de câncer cervical. Sendo assim, a detecção do tipo específico do HPV, através da genotipagem, poderia ajudar a estratificar melhor o risco das pacientes (HUBBARD 2003).

A expressão do p16^{INK4a} e sua importância clínica tem sido estudada amplamente em amostras de citologia e biópsia cervical. A pesquisa da superexpressão protéica de p16^{INK4a} tem sido demonstrada como um bom método de triagem para colposcopia das pacientes categorizadas como ASC-US e LIBG. A maioria dos estudos verificou alta sensibilidade para

detecção das lesões de alto grau que foram categorizadas como atípicas na citologia, com resultados comparáveis ao da detecção do vírus por métodos moleculares. Há, contudo, ganho significativo na especificidade do teste, comparado à pesquisa do HPV. Entretanto, a imunocitoquímica para p16^{INK4a} não foi padronizada e a possibilidade de marcação das células metaplásicas e endocervicais, gerou resultados inconsistentes e desuso na prática clínica (DONA et al. 2012). Recentemente, um novo método tem sido estudado, no qual é, simultaneamente, pesquisada a expressão de p16^{INK4a} e ki-67 na mesma célula. Em condições fisiológicas, a coexpressão dessas proteínas não ocorre, uma vez que induzem efeitos opostos na célula (SCHMIDT et al. 2011). Enquanto o p16^{INK4a} tem ação anti-proliferativa, inibindo o ciclo celular; o Ki-67 é detectado em células em proliferação. Sendo assim, a coexpressão de p16/ki-67 na mesma célula, indica um ciclo celular desregulado decorrente, possivelmente, de oncoproteínas virais (E6 e E7). Poucos estudos foram publicados, mas este marcador se mostrou promissor tanto para rastreamento primário, quanto para casos de citologias com atipias mínimas, uma vez que, se mostrou um teste sensível, sem decréscimo na especificidade (SCHMIDT et al. 2011; ATKINS 2011; PETRY et al. 2011; DONA et al. 2012).

Estudos clínicos estão em andamento nos EUA e Europa, os quais visam possíveis marcadores moleculares para melhor avaliação dos casos de ASC e melhoria dos programas de rastreamento do câncer cervical. Dentre eles, destacam-se ALTS (ASCUS/LSIL Triage Study for Cervical Cancer), PALMS (Primary ASC-US LSIL Marker Study) e ATHENA

(Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics). O PALMS é um estudo clínico prospectivo europeu, o qual avalia os marcadores p16/Ki-67 e teste de HPV de alto risco nos casos citológicos de ASC e LIBG, como possíveis discriminadores de risco para LIAG no exame histológico. O estudo clínico ATHENA, desenvolvido nos EUA, avaliou a performance do teste de HPV de alto risco na triagem dos casos de ASC-US e para o rastreamento primário do câncer cervical. E o ALTS avaliou a melhor maneira de conduzir os casos de atipias mínimas, se por colposcopia, repetição do exame citológico ou teste de HPV de alto risco. Diante disto, acredita-se que os métodos de rastreamento primário de câncer cervical e, especificamente, dos casos citológicos com atipias mínimas sofrerão mudanças e permitirão uma conduta médica mais adequada.

2 JUSTIFICATIVA

Frente ao fato de que não há uma conduta estabelecida na literatura diante da citologias cérvico-vaginais com atipias de significado indeterminado e de não haver um marcador específico capaz de prever o comportamento biológico dessas lesões, há espaço para a investigação de métodos complementares que possam contribuir para conduta médica mais adequada. Atualmente, há diversos métodos complementares à citologia cérvico-vaginal disponíveis para aumentar sua sensibilidade mas a melhor maneira de combinar seus benefícios não está bem estabelecida.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a contribuição da complementação diagnóstica das citologias cérvico-vaginais com atipias de significado indeterminado com as análises morfométrica, imunocitoquímica e genotipagem viral do HPV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de cada um dos testes complementares a serem aplicados;
- Correlacionar as características morfométricas, imunocitoquímicas e moleculares das citologias cérvico-vaginais com atipias de significado indeterminado com os achados histológicos;
- Sugerir protocolo de métodos complementares a ser utilizado no serviço de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo nas citologias cérvico-vaginais com atipias de significado indeterminado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Trata-se de estudo prospectivo em que as amostras foram obtidas de pacientes em acompanhamento no ambulatório de ginecologia do Hospital A.C. Camargo nos anos de 2009 a 2011. Foram selecionadas as pacientes com amostras satisfatórias para avaliação, com resultados citológicos de atipias de significado indeterminado e que apresentavam biópsias correspondentes. Além disso, foram selecionadas pacientes sem lesões clínicas, as quais foram utilizadas como grupo controle negativo. Pacientes portadoras de lesões intraepiteliais de baixo e alto grau/carcinoma, comprovadas por biópsia, representam o grupo controle positivo. Foram excluídas do estudo as pacientes que apresentarem amostras insuficientes pela paucicelularidade ou aqueles que não concordaram em participar do estudo. (Anexo 3).

Estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente através do parecer número 1197/09.

Os dados clínicos foram anotados em protocolo desenhado especificamente para este projeto. (Anexo 2).

4.2 MÉTODO DE COLETA E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras biológicas foram coletadas, durante a consulta ginecológica de rotina, com instrumento específico fornecido pelo fabricante. A espátula é usada para coleta de amostra ectocervical e a escova para amostrar conteúdo endocervical. As células coletadas foram transferidas para frasco específico de citologia em meio líquido, o qual continha solução a base de metanol (PreservCyt). As amostras foram processadas no aparelho de citologia em meio líquido ThinPrep® 2000 (Cytoc Corporation, Boxborough, Mass). A citologia de base líquida permite a melhor avaliação devido à redução de elementos que dificultam o diagnóstico, como presença de muco, sangue e células inflamatórias. Ao propiciar melhor padronização da fixação, a citologia em meio líquido permite a realização de testes complementares como reações imunocitoquímicas e estudos moleculares. O frasco contém 20 ml de conservante e apenas um quinto deste é utilizado para a preparação da lâmina para o estudo diagnóstico rotineiro. As lâminas foram coradas pelo método de Papanicolaou no corador automático Sakura modelo Tissue-Tek® Prisma.

O excedente da amostra foi encaminhado para a pesquisa de genotipagem do HPV e estudo imunocitoquímico das pacientes selecionadas. As citologias foram rastreadas pelos citotécnicos do departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo e revistas pela doutoranda sob supervisão do orientador, com treinamento prévio na metodologia de citologia de meio líquido.

4.3 CLASSIFICAÇÃO DAS CITOLOGIAS

Utilizou-se a classificação de Bethesda 2001 (Anexo 1), a qual possui as seguintes categorias diagnósticas: dentro dos limites da normalidade; alterações inflamatórias e reparativas; atipias celulares de significado indeterminado; lesões intraepiteliais de baixo grau; lesões intraepiteliais de alto grau e carcinomas invasivos.

4.4 REVISÃO CITOLÓGICA E HISTOLÓGICA

As lâminas originais coradas pelo método de Papanicolaou, referentes aos casos citológicos selecionados e as biópsias pareadas, coradas por hematoxilina-eosina, foram reavaliadas por dois patologistas (doutoranda e orientador), segundo a classificação de Bethesda 2001(Anexo 1), para os exames citológico e segundo a classificação preconizada pelo Colégio Americano de Patologistas, para as biópsias.

4.5 MÉTODO DE DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO HPV

Foi utilizado o teste LINEAR ARRAY HPV da empresa Roche. É um teste qualitativo in vitro para detecção do Vírus do Papiloma Humano. Há detecção de trinta e sete genótipos de HPV, incluindo tipos de alto e baixo risco [6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82(MM4), 83 (MM7),

84 (MM8), IS39 e CP6108]. Os HPVs 33, 35, 52 e 58 compõem a região da fita denominada POOL de HPV de alto risco.

O Teste de Genotipagem LINEAR ARRAY HPV baseia-se em quatro processos principais: preparação da amostra; amplificação por PCR do DNA alvo usando iniciadores para o HPV; hibridação dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas; e detecção dos produtos amplificados e ligados à sonda, por determinação colorimétrica.

4.5.1 Preparação da Amostra

O DNA do HPV é isolado por lise de amostras de células cervicais através de desnaturação à temperaturas elevadas. A lise é realizada na presença de proteinase K, agente caotrópico e detergente. Há isolamento e purificação do DNA numa coluna e eluição com água sigma. O gene da β -globina humana é isolado simultaneamente e avalia a adequação celular, extração e amplificação de cada amostra processada individualmente. Foi utilizado para este processo de extração o QIAamp® DNA Micro Kit/Qiagen (Anexo 6), segundo as instruções do fabricante.

4.5.2 Amplificação por PCR

a) Seleção do Alvo

O Teste de Genotipagem LINEAR ARRAY HPV usa iniciadores biotinilados para definir uma sequência de nucleotídeos dentro da região polimórfica de L1 do genoma do HPV, a qual possui, aproximadamente, 450 pares de base. Um grupo de iniciadores para HPV presente na Mistura

Principal é concebido para amplificar o DNA do HPV de 37 genótipos, incluindo 14 genótipos de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68). As sequências da sonda de captação estão localizadas em regiões polimórficas de L1 ligadas por estes iniciadores. Um par de iniciadores adicional visa o gene da β -globina humana para proporcionar um controle de adequação da célula, extração e amplificação.

b) Amplificação do Alvo

A DNA Polimerase AmpliTaq® Gold é utilizada para amplificação “hot start” do DNA alvo do HPV e do controle da β -globina. Primeiramente, a mistura de reação de PCR é aquecida para ativar a DNA Polimerase AmpliTaq® Gold, para desnaturar o DNA viral e o DNA genômico humano e para expor as sequências alvo ao iniciador. À medida que a mistura esfria, os iniciadores ligam-se ao DNA alvo. A DNA polimerase AmpliTaq Gold, na presença de Mg^{2+} e de dNTPs em excesso, alonga os iniciadores ligados ao longo dos modelos alvo para produzir uma molécula de DNA do HPV alvo, de dupla cadeia, de cerca de 450 pares de base ou uma molécula de DNA da β -globina, de 268 pares de base, denominada “amplicon”. Este processo é repetido durante um determinado número de ciclos. A amplificação ocorre apenas na região do genoma do HPV ou do gene da β -globina que se encontra entre o par de iniciadores. Não se amplifica todo o genoma.

No Teste de Genotipagem LINEAR ARRAY HPV, a amplificação seletiva do ácido nucléico alvo da amostra é conseguida pela utilização de

uma enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) e de trifosfato de deoxiuridina (dUTP). A enzima AmpErase reconhece e catalisa a destruição de cadeias de DNA que contém deoxiuridina¹⁵, mas não de cadeias de DNA contendo deoxitimidina. A deoxiuridina não se encontra no DNA da natureza, mas está sempre presente no amplicon, devido ao uso de trifosfato de deoxiuridina para além do trifosfato de deoxitimidina no reagente de Mistura Principal; por conseguinte, o amplicon é o único que contém deoxiuridina. A deoxiuridina torna o amplicon contaminante susceptível à destruição pela enzima AmpErase antes da amplificação do DNA alvo. A enzima AmpErase, que está no reagente de Mistura Principal, catalisa a clivagem de DNA contendo deoxiuridina em resíduos de deoxiuridina, ao abrir a cadeia de deoxiribose na posição C1. Quando aquecida, no primeiro passo de amplificação térmica, no pH alcalino da Mistura Principal, a cadeia de DNA do amplicon quebra-se na posição da deoxiuridina, tornando assim o DNA não amplificável. A enzima AmpErase é inativa à temperaturas acima dos 55°C, ou seja, durante os passos de amplificação térmica, não há destruição do amplicon alvo. Após a amplificação, qualquer enzima residual é desnaturada pela adição da Solução de Desnaturação, impedindo desta forma a degradação de qualquer amplicon alvo.

4.5.3 Reação de Hibridação

Após amplificação por PCR, os amplicons do HPV e da β -globina são desnaturados quimicamente para formar um DNA de cadeia simples, através da adição de Solução de Desnaturação. As alíquotas do amplicon

desnaturado são transferidas para o reservatório adequado da bandeja de tipagem, que contém tampão de hibridação e uma única Tira de Genotipagem LINEAR ARRAY HPV, a qual é revestida com bandas das sondas para os tipos de HPV e β -globina. O amplicon marcado com biotina só irá hibridar com as sondas oligonucleotídicas, se o amplicon contiver a sequência correspondente da sonda complementar.

4.5.4 Reação de Detecção

Após conclusão da reação de hibridação, a Tira de Genotipagem LINEAR ARRAY HPV é rigorosamente lavada, para remover qualquer material não ligado. É adicionado Conjugado Estreptavidina-Peroxidase de Rábano Silvestre à tira. O Conjugado Estreptavidina-Peroxidase de Rábano Silvestre liga-se ao amplicon marcado com biotina hibridado com as sondas oligonucleotídicas, que se encontram presentes na tira. A tira é lavada para remover o Conjugado Estreptavidina-Peroxidase de Rábano Silvestre não ligado e uma solução de substrato contendo peróxido de hidrogênio e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina(TMB) é adicionada a cada tira. Na presença de peróxido de hidrogênio, a estreptavidina-peroxidase de rábano silvestre catalisa a oxidação de TMB para formar um complexo de coloração azul, que precipita nas posições da sonda onde ocorre hibridação. A Tira de Genotipagem LINEAR ARRAY HPV é lida visualmente, comparando o padrão de bandas azuis com o Guia de Referência do Teste de Genotipagem LINEAR ARRAY HPV.

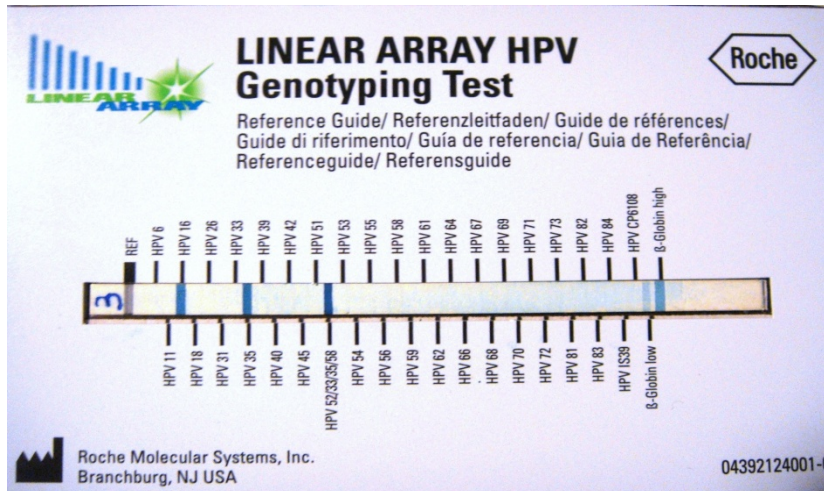


Figura 11 - Foto demonstrando como é o resultado do teste de HPV e como ele é interpretado. Este caso é positivo para os tipos 16, 35 e POOL de tipos de alto risco.

4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para a análise morfométrica as lâminas foram escaneadas no equipamento Scanscope XT (Aperio Technologies, Inc.). As células foram analisadas e os núcleos de interesse selecionados no programa Aperio ImageScope v10.2.2.2319 (Aperio Technologies, Inc. disponível em: <http://www.aperio.com/download-imagescope-viewer.asp>).

Foram selecionados os núcleos que não apresentavam sobreposição, em que fosse possível sua delimitação completa. Os cálculos morfométricos foram feitos com auxílio do programa Image J1.43d (Java 1.6.0_14 32-bit) (disponível em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>), desenvolvido pelo NIH (National Institutes of Health). Às imagens foram adicionadas régua de escala, sendo assim, a cada imagem analisada o programa foi calibrado, a fim de evitar possíveis erros na aferição.

Delimitou-se, manualmente, o núcleo da célula por 5 vezes e as médias foram usadas para a realização dos cálculos no programa Image J. Para cada parâmetro estudado, foi feita uma média de todos os valores encontrados nas células alteradas de cada caso do estudo. Sendo assim, chegamos a um valor único para cada caso, de cada um dos parâmetros avaliados. Para efeito de dicotomização das variáveis estudadas, calculamos o ponto de corte através da curva R.O.C., considerando o melhor conjunto de sensibilidade e especificidade. As variáveis com área sobre a curva igual ou superior a 0.75 com $p < 0.05$, foram dicotomizadas em positiva e negativa pelo ponto de corte estabelecido. Denominamos “morfometria combinada” positiva, quando as variáveis área, cilindridade e solidez estavam acima do CUT-off estabelecido, uma vez que o tamanho(área), irregularidade(cilindridade) e hiper cromasia(solidez) são os achados morfológicos mais relevantes para definir um caso como alto grau.

A partir destas medidas, seguiu-se uma avaliação da amplitude da variação, dos parâmetros morfométricos, nos casos indeterminados com biópsia e molecular negativos e indeterminados com biópsia e/ou molecular positivos e comparamos com os casos citologicamente benignos e citologicamente positivos (comprovados por biópsia ou molecular), afim de verificar se há sobreposição nos valores ou se a morfometria pode ser útil na discriminação dos casos indeterminados. A análise morfométrica foi realizada sem o conhecimento do resultado da análise histológica ou molecular, o que evita a introdução de um possível viés.

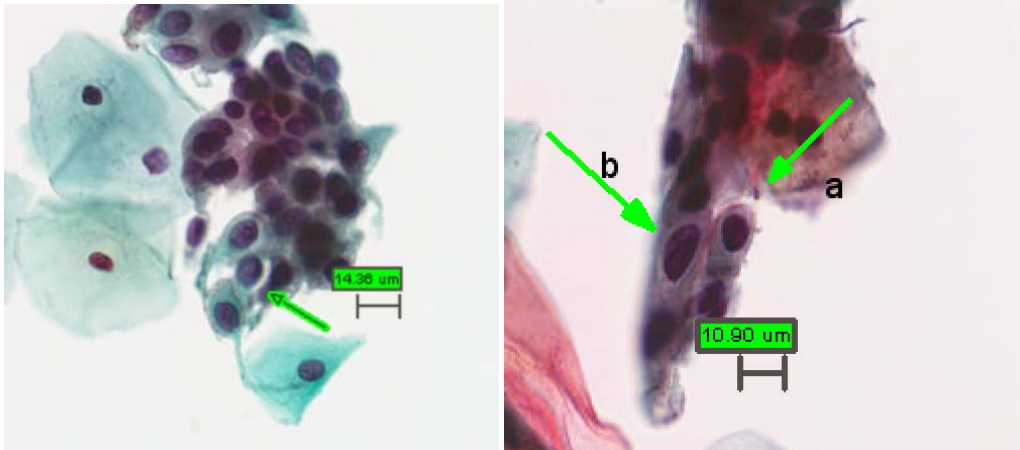


Figura 12 - As setas indicam os núcleos que serão analisados e as régua para calibração.

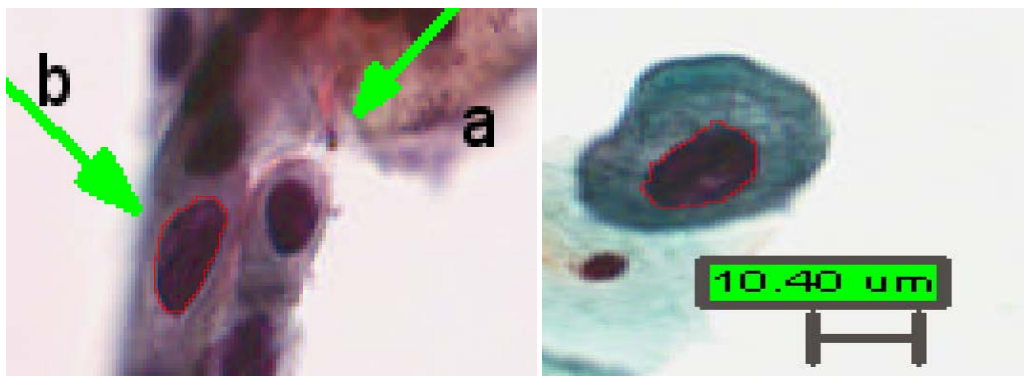


Figura 13 - Representação da delimitação do núcleo feita manualmente. Parâmetros que foram analisados:

- Área nuclear: calculada em μm^2 ;
- Perímetro nuclear: que é o limite mais externo do polígono obtido com a delimitação do núcleo;
- Circularidade nuclear: foi obtido usando a fórmula $4\pi \times \text{Área} / (\text{Perímetro})^2$. Os valores de Circ. variam de 0 a 1, sendo que, se o valor for 1, o polígono é um círculo perfeito e, se for próximo de zero, o polígono é alongado;

- Razão dos diâmetros nucleares: é a relação entre a menor largura (menor eixo) pela maior largura (maior eixo) do polígono;
- Cilindricidade nuclear: calculado usando a fórmula $4 \times \text{área} / \pi \times (\text{maior eixo})^2$ Quantifica a variação do menor diâmetro em diferentes planos do núcleo, considerando que um cilindro perfeito esta variação é nula;
- Solidez nuclear: é calculado usando a fórmula $\text{área} / \text{área convexa}$. Avalia a homogeneidade da distribuição da cromatina nuclear.

4.7 IMUNOCITOQUÍMICA

A seguir, as amostras foram encaminhadas para realização de imunocitoquímica para a dupla marcação de p16/ki-67. Utilizamos o anticorpo CINtec® Plus Kit, da empresa Roche, segundo as instruções do fabricante (Anexo 4). As lâminas foram preparadas no equipamento ThinPrep® 2000, sendo imediatamente fixadas em álcool 99% por 10 minutos a 1 hora e secas, ao ar, por 20 minutos a 16 horas. O kit contempla a realização da imunocitoquímica através de um coquetel de anticorpos primários prontos para o uso. São eles: anticorpo monoclonal de camundongo (clone E6H4) contra a proteína P16^{INK4a} humana e anticorpo monoclonal de coelho (clone 274-11 AC3) contra a proteína Ki-67. O p16 apresenta marcação nuclear e citoplasmática, de cor marrom(DAB) e o Ki-67, marcação nuclear, de coloração vermelha(*fast red*).

Foram consideradas positivas as citologias que apresentaram pelo menos 1 célula com dupla marcação para p16/ki-67 e negativas aquelas que

apresentaram marcação para apenas um dos marcadores ou que eram completamente negativas (SCHMIDT et al. 2011).

Foram excluídas da análise as lâminas que não continham o mínimo de células escamosas especificadas no sistema de Bethesda 2001, os quais definem como satisfatória, a citologia com, no mínimo, 5000 células epiteliais preservadas. A estimativa de 5000 células é realizada contando um mínimo de 10 campos, passando pela porção central da lâmina. O número mínimo de células que devem ser vistas por campo depende da área da ocular do microscópio que foi utilizado. Usa-se a fórmula para estimar: número de células por campo = $5000 / (\text{área do círculo} / \text{área da ocular})$ (SOLOMON et al. 2002a).

4.8 DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos neste estudo foram obtidos a partir dos prontuários das pacientes arquivados no Hospital A.C. Camargo. Foram obtidos os seguintes dados: nome da paciente, registro geral, idade, data de nascimento, estado civil, cor da pele, história gestacional, uso de anticoncepcional oral, história familiar de câncer e história de tabagismo.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis categóricas foram dispostas em Tabelas de contingência (2x2 ou 3x2) e analisadas pelo teste do qui quadrado ou teste exato de

Fisher. Para o cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) utilizamos Tabelas de contingência contendo variáveis categóricas dicotômicas. O padrão ouro para estes cálculos foi sempre a biópsia do colo uterino.

A citologia foi categorizada em Negativa, Indeterminada, Positivo – Baixo Grau, e Positiva – Alto Grau. Para as análises dicotômicas foi considerada Alto Grau versus Não Alto Grau.

O teste molecular para HPV foi descrito como Negativo ou Positivo para cada tipo específico e agrupado em Negativo, Positivo – Alto Risco, Positivo – Baixo Risco, Positivo – Alto e Baixo Risco. Para as Análises dicotômicas casos contendo pelo menos um tipo de alto risco foi considerado Alto Risco (AR) e os demais Negativos para HPV-AR. Dos 37 tipos testados, foram considerados os seguintes tipos como de Alto Risco os 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 66 e 68. Os casos foram também analisados e agrupados segundo o número de tipos co-existentes em uma amostra: Negativo, 01 tipo ou 2 ou mais tipos.

Os resultados da imunocitoquímica (ICQ) foram analisados como negativo ou positivo (qualquer célula marcada) para o anticorpo testado. Para as análises estatísticas os casos foram agrupados em ICQ positiva quando havia dupla marcação para p16/Ki-67 e negativo quando um ou nenhum marcador foi positivo.

As medidas de morfometria foram avaliadas como variáveis contínuas pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós teste de Bonferroni para comparação dos grupos dois a dois. Para efeito de dicotomização das

variáveis Área Nuclear, Perímetro Nuclear, Circularidade, Razão dos Diâmetros Nucleares, Cilindricidade e Solidez, calculamos o ponto de corte através da curva R.O.C., considerando a melhor correlação sensibilidade e especificidade. As variáveis com área sobre a curva igual ou superior a 0.75 com $p < 0.05$, foram dicotomizadas em positiva e negativa pelo ponto de corte estabelecido. Denominamos “morfometria positiva” casos com positividade concomitante para as variáveis dicotomizadas.

Os cálculos estatísticos e gráficos foram feitos no programa Graph Prism v.4, com o erro alfa de 5% para a significância estatística ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Os casos indeterminados pelo exame citológico são os de interesse para o presente estudo e foram avaliados pelos três métodos propostos. Foi considerado grupo controle negativo os casos negativos para dois métodos em estudo: exame citológico e teste de genotipagem e confirmados com biópsia. Como grupo controle positivo, os casos positivos para LIAG no exame citológico e positivos para tipos de HPV AR na genotipagem e confirmados com biópsia. Foi considerado como padrão ouro o exame anatomopatológico (biópsia).

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO SELECIONADA

Foram selecionados 260 casos de citologias cérvico-vaginais, com biópsias pareadas, sendo 80 casos com diagnóstico citológico indeterminado (ASC-US, ASC-H, ACG-US, ACG-H), 130 casos positivos (LIBG, LIAG, carcinoma) e 50 casos negativos (Tabela 1). Dos 80 casos indeterminados, 64 foram categorizados como ASC-US, 9 como ASC-H, 5 como ACG-US e 2 como ACG-H. Dos 130 casos positivos, 83 foram categorizados como lesões intraepiteliais de baixo grau (LIBG), 41 como lesões intraepiteliais de alto grau (LIAG), 4 casos como adenocarcinoma e 2 casos como carcinoma epidermóide.

Tabela 1 - Número de casos por categoria diagnóstica citológica

Diagnóstico citológico	Número de casos	TOTAL
Indeterminadas		80
ASC-US	64(80,00%)	
ASC-H	9 (11,25%)	
ACG-US	5 (6,25%)	
ACG-H	2 (2,50%)	
Positivas		130
LIBG	83(63,84%)	
LIAG	41(31,53%)	
Carcinomas	6 (4,61%)	
Negativas		50
TOTAL		260

*ASC-US indica atipias de células escamosas de significado indeterminado de provável origem não neoplásica; ASC-H indica atipias de células escamosas de significado indeterminado e não se pode afastar lesão de alto grau; ASG-US indica atipias em células glandulares de significado indeterminado; ACG-H indica atipias em células glandulares em que não se pode afastar lesão de alto grau. LIBG indica lesão intraepitelial cervical de baixo grau; LIAG indica lesão intraepitelial cervical de alto grau; CEC indica carcinoma epidermóide.

As categorias diagnósticas das biópsias correspondentes às citologias indeterminadas seguem na Tabela 2.

Tabela 2 - Categorias diagnósticas das biópsias correspondentes às citologias diagnosticadas como indeterminadas (ASC-US, ASC-H, ACG-US, ACG-H).

Biópsia \ Citologia	ASC-US (n=64)	ASC-H (n=9)	ACG-US (n=5)	ACG-H (n=2)	TOTAL
Negativo para lesão cervical	45(70,31%)	5(55,5%)	4(80,0%)	0	54
LIBG(NIC 1)	14(21,87%)	1(11,1%)	0	0	15
LIAG(NIC 2/3)	5(7,81%)	2(22,2%)	0	0	7
Adenocar. <i>in situ</i>	0	1(11,1%)	0	1(50,0%)	2
Adenocarcinoma	0	0	1(20,0%)	1(50,0%)	2

*ASC-US indica atipias de células escamosas de significado indeterminado de provável origem não neoplásica; ASC-H indica atipias de células escamosas de significado indeterminado e não se pode afastar lesão de alto grau; ACG-US indica atipias em células glandulares de significado indeterminado; ACG-H indica atipias em células glandulares em que não se pode afastar lesão de alto grau. LIBG indica lesão intraepitelial de baixo grau; LIAG indica lesão intraepitelial de alto grau; Adenocar. Indica adenocarcinoma.

Categorias diagnósticas das biópsias correspondentes às citologias positivas seguem na Tabela 3.

Tabela 3 - Número de casos, por categoria diagnóstica, das biópsias dos casos de citologia positiva

Biópsia \ Citologia	LIBG (n=83)	LIAG (n=41)	Adenocarcinoma (n=4)	CEC (n=2)	TOTAL (n=130)
Negativo para lesão cervical	36(43,4%)	4(9,8%)	0	0	40
LIBG(NIC 1)	34(41,0%)	2(4,9%)	0	0	36
LIAG(NIC 2/3)	12(14,5%)	32(78,0%)	0	0	44
CEC	0	3(7,3%)	0	2(100,0%)	5
Adenocarcinoma	1(1,2%)	0	4(100,0%)	0	5

*LIBG indica lesão intraepitelial de baixo grau; LIAG indica lesão intraepitelial de alto grau; CEC indica carcinoma epidermóide.

Segue na Tabela 4 a caracterização dos dados clínicos da população selecionada para este estudo. Observa-se um predomínio de pacientes acima de 30 anos, solteiras, nuligestas ou com 1-3 gestações, não fumantes e uma proporção discretamente maior de não usuárias de anticoncepcionais.

Tabela 4 - Caracterização clínica da população selecionada para este estudo de acordo com a categoria do diagnóstico citológico.

Citologia	NEGATIVA (n=50)	INDETERMINADA (n=80)	LIBG (n=83)	LIAG (n=47)
Características clínicas				
IDADE				
≤30	12	22	34	16
>30	38	58	49	31
EST CIV				
CASADA	23	24	23	9
SOLTEIRA	25	47	54	30
DIVOR	0	7	4	4
VIÚVA	2	2	2	4
GESTAÇÕES				
0	12	22	38	13
1-3	23	35	26	15
4-6	4	3	5	10
>6	0	0	1	1
NI	11	20	13	8
FUMANTE				
SIM	2	7	15	15
NÃO	27	26	26	14
NI	21	47	42	18
HF CÂNCER				
SIM	24	34	21	15
NÃO	16	19	29	17
NI	10	27	33	15
ACO				
SIM	19	20	42	16
NÃO	16	33	23	17
NI	15	27	18	14

*G CIT NOR: grupo de pacientes com citologia normal; GRUPO IND: grupo de pacientes com citologia normal; GRUPO LIBG: grupo de pacientes com lesão intraepitelial de baixo grau; GRUPO LIAG: grupo de pacientes com lesão intraepitelial de alto grau; EST CIV: estado civil; DIVOR: divorciada; HF CÂNCER: história familiar de câncer; ACO: anticoncepcional oral; NI: não informado

5.2 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS SEPARADAMENTE

5.2.1 Genotipagem de HPV

Dos 260 casos selecionados, foram genotipadas 239 amostras. 21 amostras não foram genotipadas e consideradas como inadequadas, devido a material insuficiente para realização do teste, danificação do frasco ou retirada do material do laboratório de anatomia patológica do Hospital A.C. Camargo. Dos casos genotipados, 4 não funcionaram, 152 foram positivos para algum tipo de HPV e 83 casos foram negativos. Os resultados de acordo com os diagnósticos citológico e histológico seguem na Tabela 5.

Tabela 5 - Número de casos positivos e negativos para HPV de acordo com a categoria diagnóstica da citologia e biópsia.

CIT/HPV	BIÓPSIA			Total
	Negativa	LIBG(NIC 1)	LIAG(NIC 2/3)	
Negativa				48
HPV AR	5	0	1	
HPV BR	4	1	0	
Negativa	37	0	0	
Indeterminada				66
HPV AR	24	8	6	
HPV BR	3	0	0	
Negativa	19	5	1	
LIBG				78
HPV AR	21	24	6	
HPV BR	5	4	2	
Negativa	8	4	4	
LIAG				43
HPV AR	4	2	31	
HPV BR	0	0	1	
Negativa				
TOTAL	0	0	5	235

*CIT: citologia; LIBG: lesão intraepitelial de baixo grau; LIAG: lesão intraepitelial de alto grau; HPV AR: infecção por pelo menos um tipo de HPV de alto risco; HPV BR: infecção por somente tipos de HPV de baixo risco;

Primeiramente, analisamos a contribuição do teste de HPV como método isolado de análise, na população total do estudo, incluindo casos e controles. O resultado da biópsia foi considerado como método padrão ouro. Consideramos os casos HPV positivos, quando havia infecção por algum tipo de alto risco e como HPV negativos, os verdadeiramente negativos e os casos positivos para tipos de baixo risco. E foi considerado como padrão ouro, o resultado da biópsia, sendo considerada positiva apenas as lesões de alto grau, as lesões de baixo grau foram excluídas da análise. As estatísticas mostraram um risco relativo de 1,829 de se detectar LIAG, quando o teste de HPV é positivo para tipos de alto risco; com valor de $p < 0,0001$; sensibilidade de 0,81(81%); especificidade de 0,55(55%); valor preditivo positivo (VPP) de 0,46(46%) e valor preditivo negativo (VPN) de 0,86(86%).

A Figura 14 demonstra número e proporção de casos com biópsia negativa e positiva que foram positivas e negativas para o teste de HPV, sendo observada grande redução na proporção de casos de biópsia positiva com teste de HPV negativo.

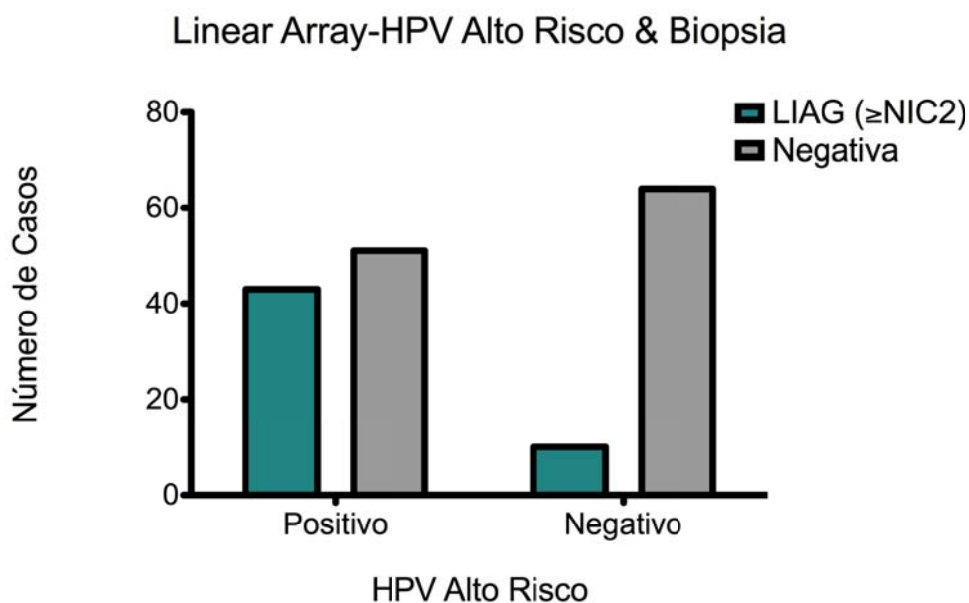


Figura 14 - Número e proporção de casos positivos e negativos para HPV de alto risco de acordo com o resultado da biópsia.

Quando analisamos os mesmos dados dividindo por idades abaixo e acima dos 30 anos, observa-se manutenção da sensibilidade e aumento da especificidade do teste, sem alterações relevantes nos VPP e VPN, nas pacientes acima de 30 anos.

Tabela 6 - Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do teste de HPV em pacientes acima e abaixo dos 30 anos

	p	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
≤ 30 anos	<0,1163	0.82	0.41	0.43	0.81
> 30 anos	<0,0001	0.81	0.61	0.47	0.88

*VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

A seguir, foram correlacionados os dados nas citologias com atipias de significado indeterminado. Observou-se que a maior contribuição está no VPN, o qual demonstra que nos casos indeterminados em que o teste de HPV resultou negativo, a chance de ser verdadeiramente negativo é de 96%.

Comparou-se os valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do teste de HPV nas citologias indeterminadas subdivididas por idades abaixo e acima de 30 anos. Não observou-se a mesma tendência da população total de aumento da especificidade, no subgrupo acima de 30 anos. E as diferenças não foram estatisticamente significativas entre os dois grupos.

Tabela 7 - Sensibilidade, especificidade, VPP, VPN do teste de HPV em casos de citologias indeterminadas dos subgrupos de pacientes acima e abaixo de 30 anos

	p	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Todas	0,1041	0,86	0,52	0,21	0,96
≤ 30 anos	0,2088	1,00	0,55	0,38	1,0
> 30 anos	0,6050	0,75	0,51	0,15	0,95

*VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

Tabela 8 - Comparação entre os resultados das biópsias e de genotipagem do HPV nos casos com resultado citológico indeterminado

Biópsia Genotip.	LIAG(NIC2/3)	LIBG(NIC 1)	NEGATIVA	TOTAL
HPV AR	6	8	24	38
HPV BR	0	0	3	3
NEG	1	5	19	25
INAD	3	2	9	14
TOTAL	10	15	55	80

*HPV+ significa casos positivos para pelo menos um tipo de HPV de alto risco; HPV+ BR significa positivo exclusivamente pelos tipos de HPV de baixo risco; NEG: casos negativos para qualquer tipo de HPV; INAD. corresponde a amostra inadequada para realização do teste de HPV; LIBG significa lesão intraepitelial cervical de baixo grau; LIAG se refere a lesão intraepitelial cervical de alto grau.

Analizamos a distribuição das idades de acordo com a coinfeção por 2 ou mais tipos de HPV. Observa-se uma tendência a diminuição da média das idades com o aumento do número de tipos encontrados de HPV, até a infecção por 4 tipos. Não se observa essa tendência na infecção por cinco ou mais tipos. Entretanto, acredita-se que essa tendência se manteria, uma vez que existem poucos casos de infecção com 5 ou mais tipos e as variações das idades neste subgrupo são grandes, resultando em grandes variações nos intervalos de confiança. Esses dados são demonstrados na Tabela 9 e Figura 15.

Tabela 9 - Número de casos positivos para um ou mais tipos de HPV (1,2, 3, 4, 5 ou seis tipos) e mediana de idade em cada subgrupo.

Idade \ Coinfecção	Coinfecção						
	Nenhum	1	2	3	4	5	6+
Número de casos	83	48	49	19	16	9	11
Mínimo	23,00	22,00	16,00	23,00	18,00	19,00	19,00
Mediana	46,00	42,50	36,00	33,00	28,50	49,00	42,00
Máximo	80,00	70,00	81,00	82,00	49,00	85,00	73,00
95% CI	40,69-	37,37-	35,68-	28,62-	25,97-	29,73-	28,62-
	46,65	44,67	44,61	42,86	34,90	59,61	52,83

*CI: intervalo de confiança

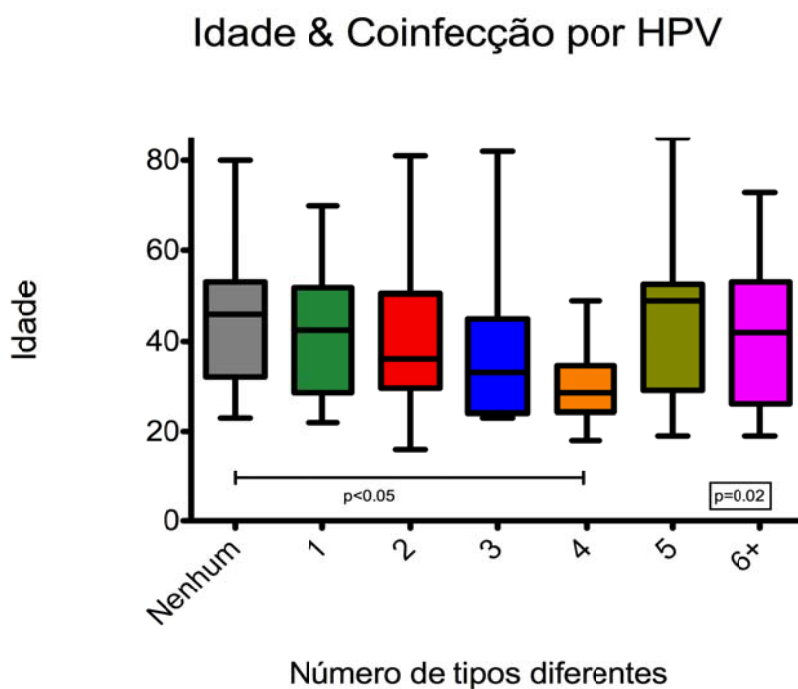


Figura 15 - Relação da coinfecção de HPV com a idade

Os tipos de HPV mais frequentes na população selecionada para este estudo foram: 16, 61, 53 e 51. Proporção que se mantém na população de casos de citologia indeterminada, população de interesse deste estudo. Figura 16 demonstra número de casos por tipo de HPV, em destaque os tipos mais frequentes.

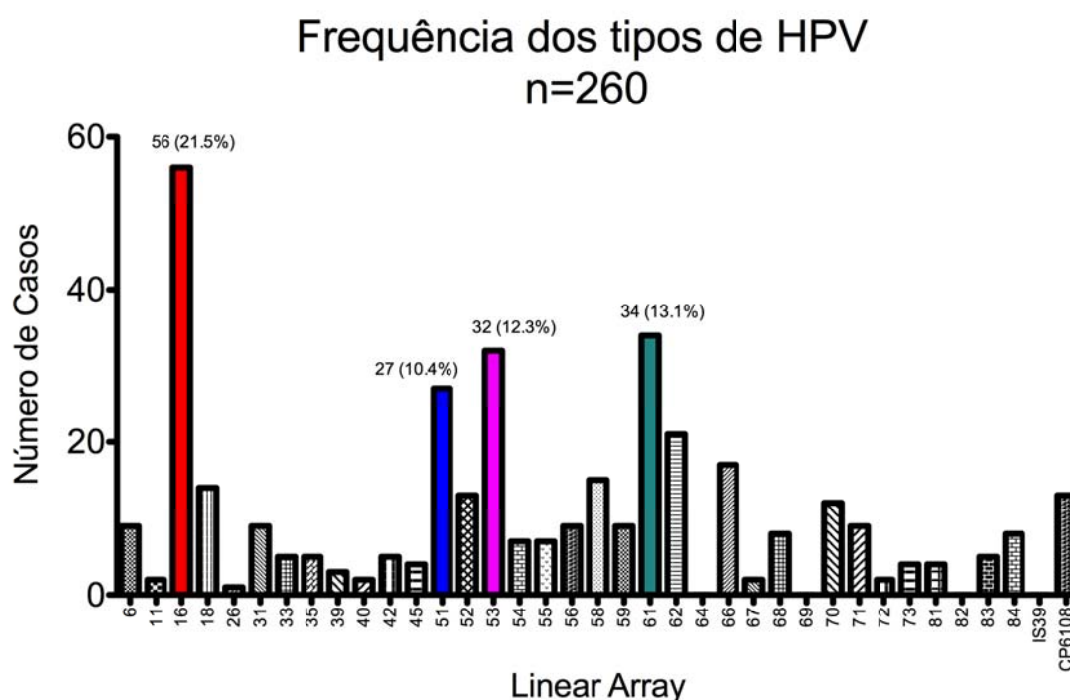


Figura 16 - Frequência dos tipos de HPV na população selecionada neste estudo. Em cores estão destacados os tipos mais frequentes

O HPV 16 foi o tipo mais frequentemente encontrado, sendo positivo em 56 casos, em 12 casos como único tipo infectante e em 44 casos como coinfeção.

Tabela 10 - Número de casos positivos para HPV 16 segundo diagnóstico citológico e resultado da biópsia

Citologia \ Biópsia	Biópsia			Total
	Negativa	LIBG(NIC 1)	LIAG(NIC 2/3)	
Indeterminada	8	4	2	14
Negativa	1	0	1	2
LIBG	5	14	2	21
LIAG	0	0	19	19
Total	14	18	24	56

* LIBG significa lesão intraepitelial de baixo grau; LIAG se refere a lesão intraepitelial de alto grau.

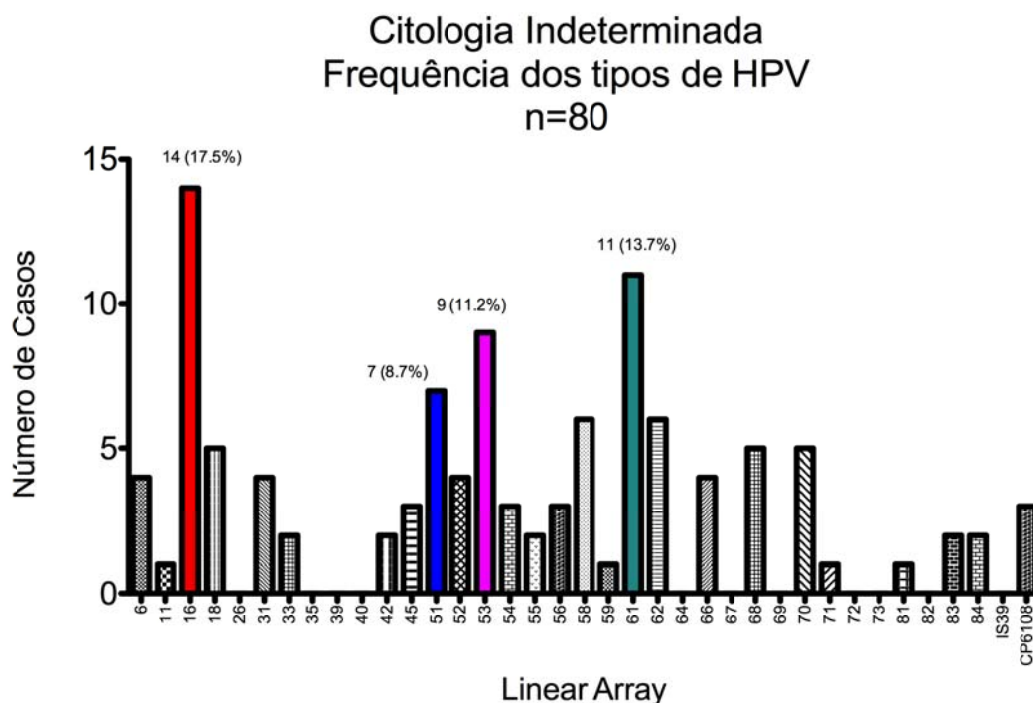


Figura 17 - Frequência dos tipos de HPV no grupo de pacientes com citologia indeterminada. Em cores estão destacados os tipos mais frequentes.

Observa-se na Figura 18 a distribuição dos tipos de HPV nos grupos de idade abaixo e acima dos 30 anos, na população selecionada neste estudo.

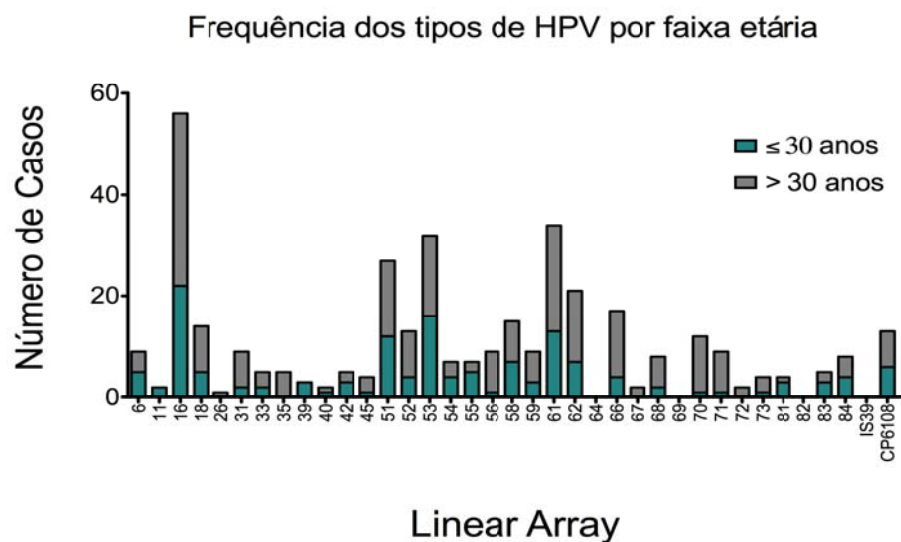


Figura 18 - Demonstra a distribuição dos tipos de HPV nos grupos de idade abaixo e acima dos 30 anos, na população selecionada neste estudo.

A seguir detalhamos a frequência de coinfeção do HPV segundo os diagnósticos citológicos.

Tabela 11 - Número de casos negativos e positivos para um ou mais tipos de HPV, de acordo com o diagnóstico citológico

Citologia \ Coinfeção	Coinfeção			Total
	Negativa	Positiva 1 tipo	Positiva vários tipos	
Negativa	37	8	3	48
Indeterminada	25	13	28	66
LIBG	16	14	48	78
LIAG	5	12	26	43
Total	83	47	105	235

* LIBG significa lesão intraepitelial de baixo grau; LIAG se refere a lesão intraepitelial de alto grau.

A seguir foram analisadas as frequências e distribuição dos casos subdividindo os tipos de HPV em alto e baixo risco (potencial oncogênico viral). Foram considerados tipos de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68.

PROPORÇÃO DOS TIPOS DE HPV DE ALTO E BAIXO RISCO

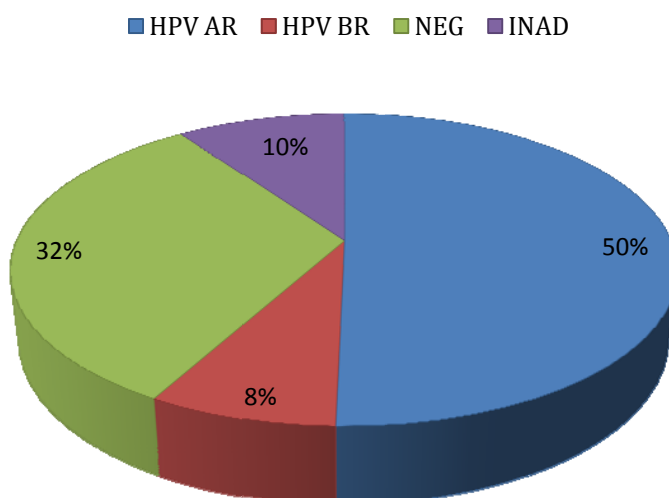


Figura 19 - Demonstra a proporção dos tipos de HPV de alto (HPV AR) e baixo risco (HPV BR), casos negativos (NEG) e inadequados (INAD) na população selecionada neste estudo.

5.2.2 Morfometria

Realizada em 150 amostras de citologia, incluindo 60 casos indeterminados, 77 positivos (27 LIAG e 50 LIBG) e 13 negativos, cujos resultados seguem abaixo.

Os parâmetros morfométricos foram avaliados a partir da média das 5 medidas feitas em cada núcleo. Foram fotografadas todas as células atípicas disponíveis, o que varia de um caso para outro. A partir destas

medidas foi feita uma avaliação da amplitude da variação desses parâmetros nos casos indeterminados com biópsia e teste molecular negativos e indeterminados com biópsia e/ou teste molecular positivos. Para efeito de dicotomização das variáveis estudadas, calculamos o ponto de corte através da curva R.O.C., considerando melhor conjunto de sensibilidade e especificidade. As variáveis com área sobre a curva igual ou superior a 0.75 com $p < 0.05$, foram dicotomizadas em positiva e negativa pelo ponto de corte estabelecido.

Tabela 12 - Estabelecimento dos pontos de corte para cada parâmetro morfométrico, com melhor relação sensibilidade/especificidade

	AUC	p	Ponto de Corte	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)
Area Nuclear	0,8708	0,0008	>101,3	90 (55-99)	83 (62-95)
Perímetro	0,9000	0,0003	>39,79	90 (55-98)	83 (62-95)
Circularidade	0,7958	0,0073	<0,88	80 (44-97)	75 (53-90)
Razão Diâmetros	0,7750	0,0126	>1,35	70 (34-93)	79 (57-92)
Cilindricidade	0,7600	0,0173	<0,7518	70 (34-93)	79 (57-93)
Solidez	0,5958	0,3847	-	-	-

*AUC: área abaixo da curva

Utilizando os pontos de corte estabelecidos na Tabela 12 para cada uma das variáveis morfométricas, calculamos a sensibilidade e especificidade, VPP e VPN na população total e nos casos indeterminados. Avaliamos ainda se a combinação de parâmetros resultaria em melhor predição dos casos indeterminados. Consideramos “morfometria combinada positiva”, quando as variáveis área e cilindridade estavam acima do ponto de corte, uma vez que o tamanho (área), irregularidade (cilindridade) e hiperchromasia (solidez) são os achados morfológicos mais relevantes para

definir um caso como alto grau. Como a solidez não obteve um valor de p significativo pela sobreposição dos valores nas diversas categorias de diagnóstico citológico, nós não consideramos este parâmetro morfométrico na análise combinada. A sensibilidade do teste morfométrico, na população total, foi de 55% (0,55), especificidade de 67% (0,67), VPP de 47% (0,47) e VPN de 75% (0,75); com valor de $p=0,025$.

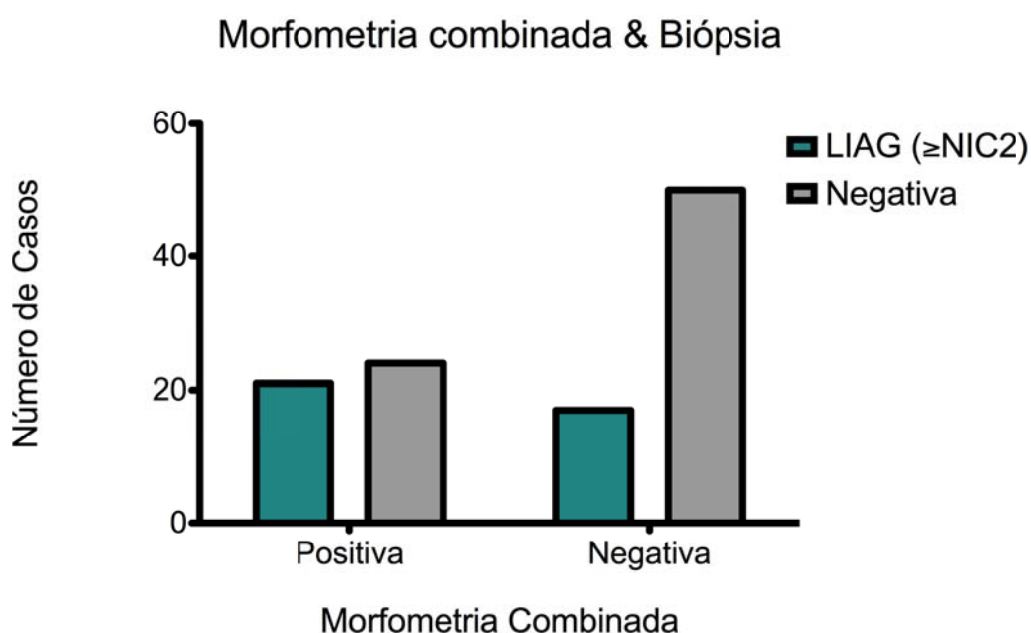


Figura 20 - Demonstra a distribuição dos casos de morfometria combinada positiva e negativa, de acordo com o resultado da biópsia, na população total deste estudo.

Nos casos indeterminados, o teste morfométrico não se mostrou estatisticamente significativo em nenhum dos parâmetros morfométricos analisados e os valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN seguem na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para cada parâmetro morfométrico para detecção de LIAG nas citologias indeterminadas.

	p	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Área	1,00	0,50	0,56	0,14	0,88
Perímetro	1,00	0,33	0,59	0,11	0,86
Circularidade	0,31	1,00	0,27	0,17	1,00
Razão dos diâmetros	0,32	1,00	0,24	0,16	1,00
Cilindricidade	0,58	1,00	0,22	0,16	1,00

*VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

A morfometria como teste isolado, não foi capaz de separar os casos indeterminados que foram positivos ou negativos na biópsia. Esse teste foi capaz de determinar de uma maneira objetiva o que é visto de forma subjetiva pelo patologista. Ao analisarmos a Figura 21, observamos que o padrão de morfometria dos casos que tiveram a citologia indeterminada, com biópsia de lesão de alto grau é, aproximadamente, o oposto do padrão morfométrico das lesões de alto grau na citologia confirmadas por biópsia. Ou seja, é um padrão morfológico que foge ao habitual e que não poderá ser percebido pelo patologista, uma vez que os critérios são essencialmente estabelecidos pelo padrão nuclear.

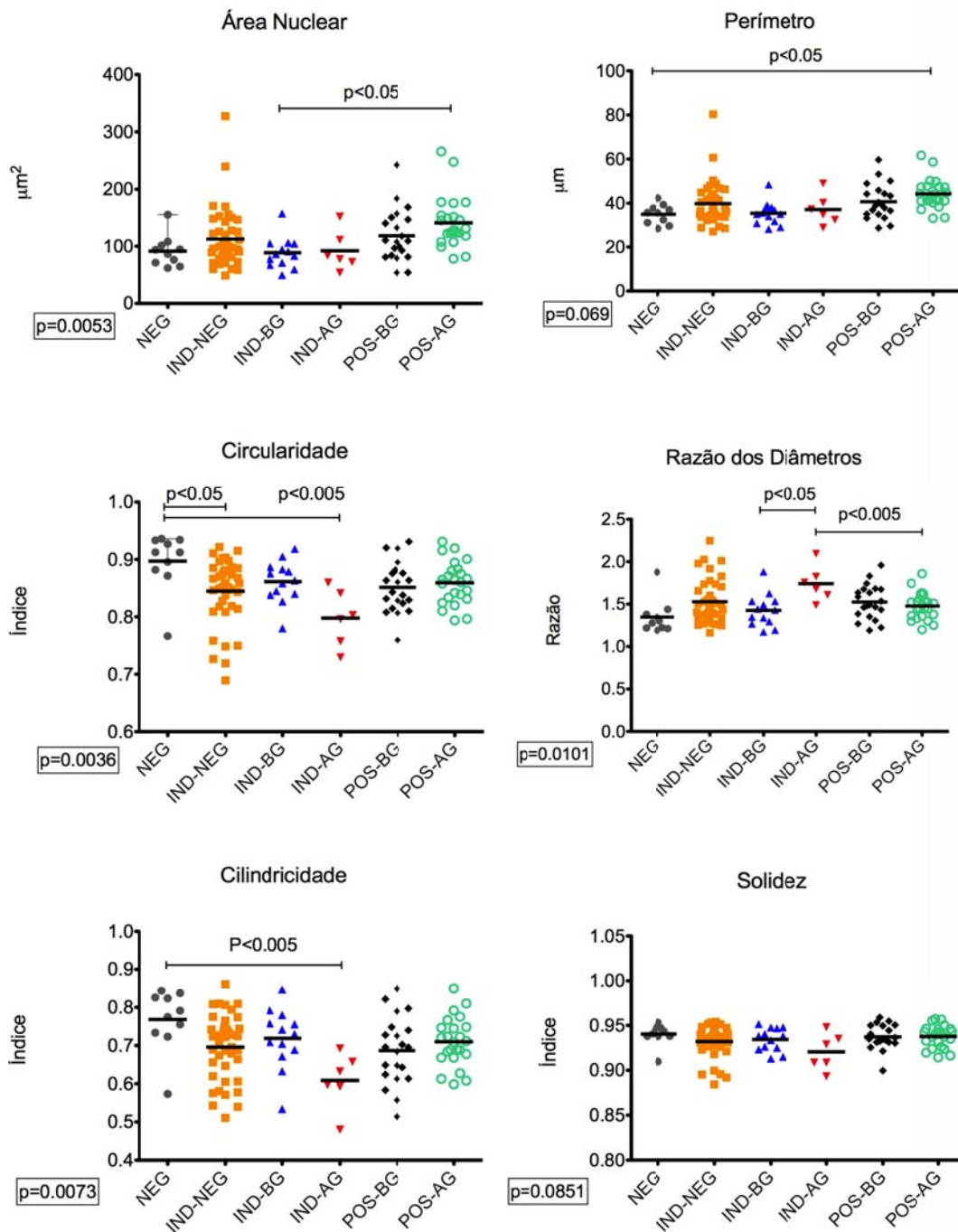


Figura 21 - Gráficos das variações das médias dos parâmetros morfométricos, obtidas para cada núcleo dos casos de citologia indeterminada, comparadas com o diagnóstico da biópsia. No eixo x encontram-se os resultados da citologia confirmados com biópsia, sendo: NEG citologia negativa com biópsia negativa, IND-NEG citologia com atipias de significado indeterminado com biópsia negativa, IND-BG citologia com atipias de significado indeterminado com biópsia de lesão de baixo grau, IND-AG citologia com atipias de significado indeterminado com biópsia de lesão de alto grau, POS-BG casos com citologia positiva e biópsia correspondentes de lesão de baixo grau e POS-AG os casos com citologia positiva e biópsia de Lesão de alto grau. No eixo y encontram-se os valores dos parâmetros morfométricos analisados.

5.2.3 Imunocitoquímica

A imunocitoquímica (ICQ) foi realizada em todos os casos, destes, 80 foram inadequados para avaliação, uma vez que não haviam células suficientes para considerá-lo satisfatório. Foram considerados os critérios utilizados no sistema de Bethesda 2001, os quais definem como satisfatória, a citologia com, no mínimo, 5000 células epiteliais preservadas. Das 180 amostras satisfatórias para avaliação, 71 resultaram positivas e 109 negativas. Para os cálculos estatísticos foram consideradas biópsias positivas somente as lesões de alto grau, foram excluídos os casos de baixo grau, resultando em um total de 148 amostras.

Ao avaliar o teste ICQ isoladamente como método de diagnóstico, ele se mostrou um bom método de triagem combinado com o exame citológico, com sensibilidade de 85%(0,85), especificidade de 77%(0,77), VPP de 63%(0,63), VPN de 92%(0,92) e um valor de $p < 0,0001$.

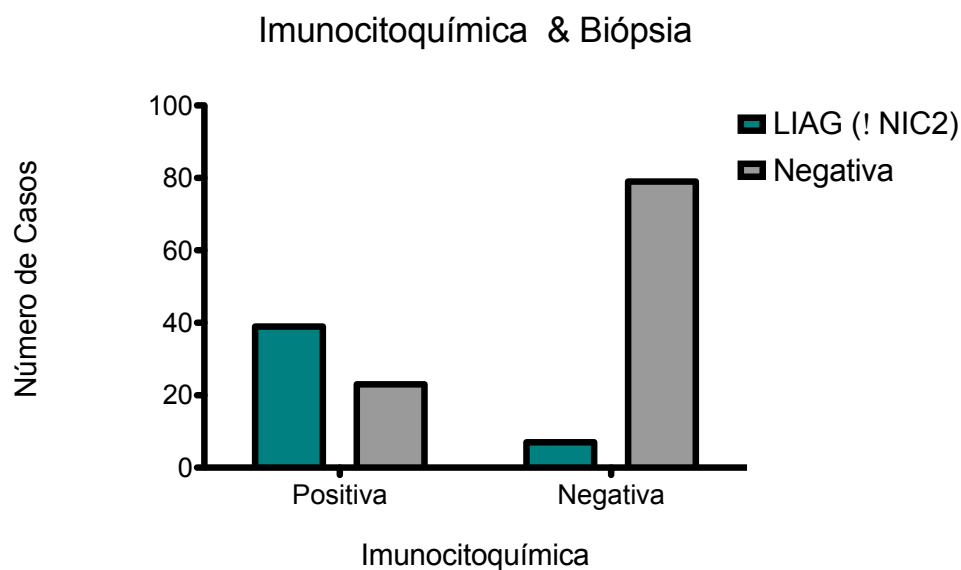


Figura 22 - Distribuição dos casos de imunocitoquímica (ICQ) positiva e negativa, de acordo com o resultado da biópsia, na população total deste estudo.

Tabela 14 - Distribuição da positividade de p16/Ki-67 por diagnóstico citológico, histológico e categoria do HPV.

Biópsia/HPV	Positividade p16/Ki-67(n=71)			
	CIT Negativa	CIT Indeterminada	LIBG	LIAG
Negativa				
HPV AR				
HPV BR	1	7	3	2
NEG	0	1	1	0
INAD	0	5	1	0
	0	2	0	0
LIBG(NIC 1)				
HPV AR				
HPV BR	0	0	4	1
NEG	0	0	0	0
INAD	0	2	0	0
	0	1	1	0
LIAG(NIC 2/3)				
HPV AR				
HPV BR	1	4	3	21
NEG	0	0	1	1
INAD	0	0	2	4
	0	0	0	2
Total	2	22	16	31

*CIT: citologia; LIBG: lesão intraepitelial de baixo grau; LIAG: lesão intraepitelial de alto grau; HPV AR: infecção por pelo menos um tipo de HPV de alto risco; HPV BR: infecção por somente tipos de HPV de baixo risco; NEG: negativo para qualquer tipo de HPV; INAD: amostra inadequada para avaliação do HPV.

Tabela 15 - Distribuição dos resultados da imunocitoquímica para p16/Ki-67 por diagnóstico citológico e histológico.

CIT/ICQ	BIÓPSIA			TOTAL
	Negativa	LIBG(NIC 1)	LIAG(NIC 2/3)	
NEGATIVA				39
ICQ -	36	1	0	37
ICQ +	1	0	1	2
INDETERMINADA				53
ICQ -	15	3	4	22
ICQ +	23	6	2	31
LIBG				52
ICQ -	5	5	6	16
ICQ +	18	16	2	36
LIAG				36
ICQ -	2	0	3	5
ICQ +	2	1	28	31
TOTAL	102	32	46	180

*CIT NEG: citologia negativa; CIT INDET: citologia com atipias de significado indeterminado; CIT LIBG: citologia com diagnóstico de lesão intraepitelial de baixo grau; CIT LIAG: citologia com diagnóstico de lesão intraepitelial de alto grau; ICQ: imunocitoquímica para p16/Ki-67.

Tabela 16 - Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da imunocitoquímica para detecção de lesão intraepitelial de alto grau, na população total do estudo e dividida por faixas etárias.

	p	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Todas	<0,0001	0,85	0,77	0,63	0,92
≤ 30 anos	0,0057	0,83	0,67	0,53	0,90
> 30 anos	<0,0001	0,67	0,92	0,85	0,81

*VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

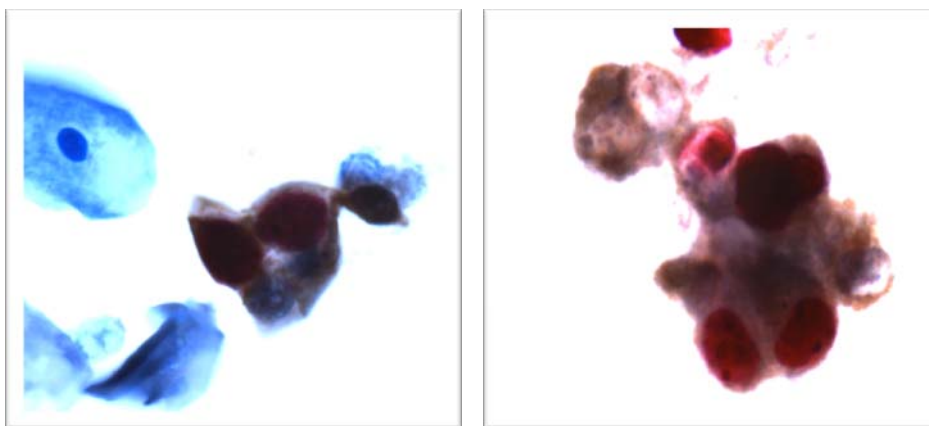


Figura 23 - Dupla marcação ICQ para p16/ki-67 nas células atípicas. Fotos realizadas no aumento de 100x.

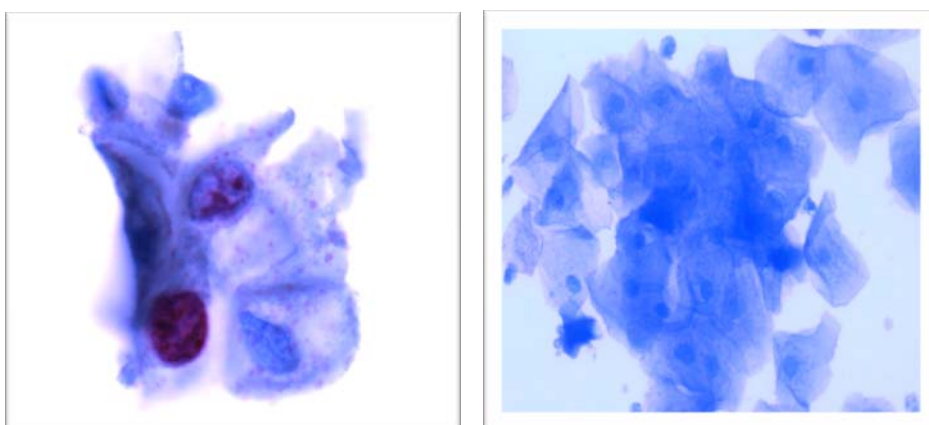


Figura 24 - À esquerda marcação para Ki-67 em células em proliferação e à direita, células negativas para os dois marcadores. Fotos realizadas no aumento de 100x e 10x.

A seguir avaliamos a população de interesse do estudo (casos indeterminados) com os achados da imunocitoquímica e biópsia. Nos casos indeterminados a imunocitoquímica teve sensibilidade de 67%(0,67), especificidade de 61%(0,61), VPP de 21%(0,21), VPN de 92%(0,92), com $p=0,38$.

Tabela 17 - Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da imunocitoquímica para detecção de lesão intraepitelial de alto grau, na população total do estudo e dividida por faixas etárias, nos casos de citologia indeterminada.

	p	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Todas	0,38	0,67	0,61	0,21	0,92
≤ 30 anos	1,00	0,50	0,30	0,12	0,75
> 30 anos	0,10	0,75	0,71	0,27	0,95

*VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

5.3 CORRELAÇÃO DAS TRÊS METODOLOGIAS TESTADAS

A correlação entre imunocitoquímica (ICQ), teste molecular de HPV e morfometria foi avaliada na população total do estudo e na população de interesse de citologias de significado indeterminado.

Avaliamos também se a combinação das metodologias é capaz de prever melhor a presença de lesão de alto grau na biópsia do que as metodologias separadamente. Os resultados seguem na Tabela 18.

Tabela 18 - Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para detecção de lesão intraepitelial de alto grau da imunocitoquímica (ICQ), Linear Array, morfometria(M) e os testes combinados, na população total do estudo

	p	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
ICQ	<0,0001	0,85	0,77	0,63	0,92
Morfometria	0,0255	0,55	0,68	0,47	0,75
HPV	<0,0001	0,81	0,55	0,46	0,86
ICQ+M	<0,0001	0,57	0,89	0,72	0,80
HPV+M	0,0182	0,38	0,85	0,55	0,74
ICQ+HPV	<0,0001	0,69	0,86	0,69	0,86
ICQ+HPV+M	0,0001	0,41	0,98	0,90	0,77

*VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; ICQ: imunocitoquímica para p16/Ki-67; M: morfometria combinada(área e cilindridade)

Observa-se redução na sensibilidade quando os dois testes são combinados, mas com relevante aumento na especificidade, com um valor de p estatisticamente significativo. Característica observada também, quando os três métodos são combinados.

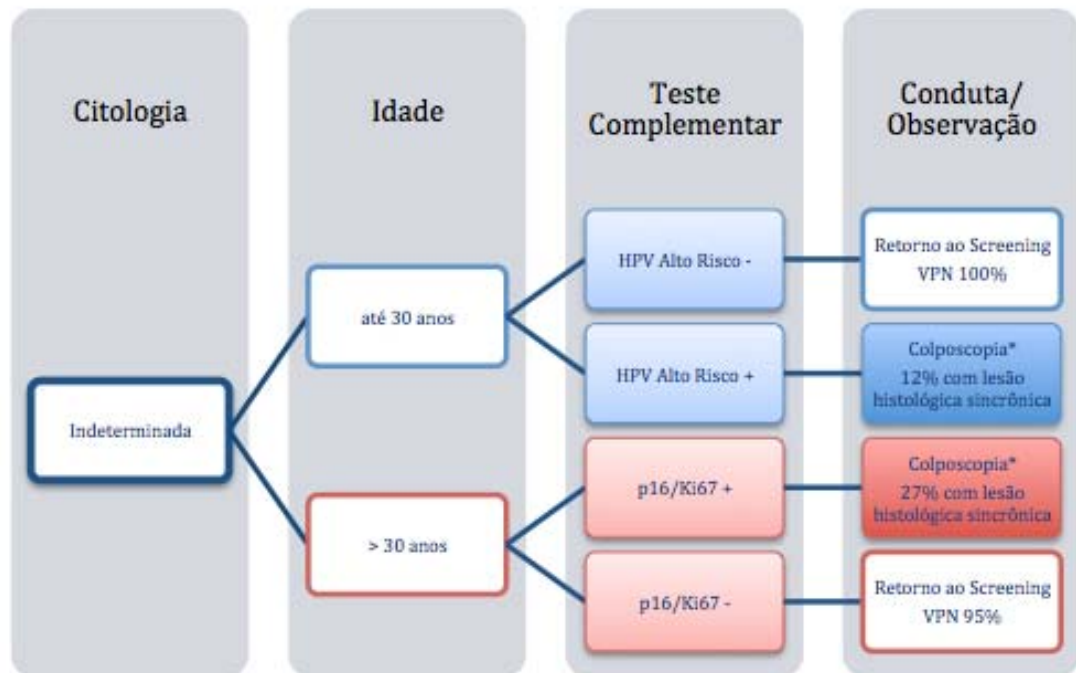
Tabela 19 - Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para detecção de lesão intraepitelial de alto grau da imunocitoquímica (ICQ), Linear Array e os testes combinados, no grupo de pacientes com citologia indeterminada

	p	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
ICQ	0,3778	0,67	0,61	0,21	0,92
HPV	0,1041	0,86	0,52	0,21	0,96
ICQ+M	0,4335	0,33	0,85	0,20	0,92
HPV+M	0,3200	1,00	0,71	0,13	1,00
ICQ+HPV	0,0423	0,67	0,79	0,36	0,93
ICQ+HPV+M	-	-	-	-	-

*ICQ: imunocitoquímica para p16/Ki-67; M: morfometria combinada; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo. Não foi possível a análise da combinação dos três métodos (ICQ, HPV e morfometria) nos casos indeterminados devido à pequena quantidade de casos que possuíam os três métodos positivos. Não foi possível correlacionar as três metodologias nos casos indeterminados devido ao reduzido número de casos.

5.4 PROTOCOLO SUGERIDO DE MÉTODOS COMPLEMENTARES NAS CITOLOGIAS DE SIGNIFICADO INDETERMINADO

Baseado em nossos resultados e nos protocolos de conduta internacionais (BRISMAR-WENDEL et al. 2009), propusemos protocolo a ser adotado no serviço de anatomia patológica do Hospital A. C. Camargo nas citologias cérvico-vaginais com ASC-US. Os protocolos diferem de acordo com faixa etária acima ou abaixo de 30 anos. A morfometria pode ser usada nos casos que necessitam confirmação objetiva dos achados morfológicos.



* Se negativa, fazer biópsias as cegas e repetir o teste molecular em 12 meses para avaliar persistência viral/aspectos imunocitoquímicos.

Figura 25 - Protocolo sugerido de métodos complementares nos casos de ASC-US.

6 DISCUSSÃO

Os casos indeterminados pelo exame citológico são os de interesse para o presente estudo, visto que é uma das alterações citológicas mais frequentemente diagnosticadas, perfazendo um total de 4-5% de todos os exames citológicos interpretados nos Estados Unidos e, sobretudo, devido à sua natureza inespecífica. O diagnóstico de um exame citológico como indeterminado, pode levar a condutas clínicas equivocadas, pois compreende uma variabilidade de alterações citológicas que variam desde condições reativas e inflamatórias até carcinomas invasivos (STOLER et al. 2007). A fim de, aperfeiçoar as condutas nos casos de citologias com atipias de significado indeterminado, informações adicionais são necessárias para melhor estratificar as pacientes em risco de desenvolver lesões de alto grau ou câncer cervical.

6.1 GENOTIPAGEM PARA HPV

A introdução do teste de detecção do HPV de alto risco, para triagem de mulheres com ASC, se mostrou válido na distinção de alterações benignas, daquelas com lesões de alto grau ou carcinoma invasivo. Entretanto, a alta prevalência de positividade para HPV de alto risco, comparado com a baixa prevalência de lesões de alto grau limitou o uso desse teste e o tornou alvo de muitos estudos, nessa população específica

(Anonymous 2000; SOLOMON et al. 2002b; MONK e BREWSTER 2003; SCHIFFMAN e SOLOMON 2003; ZUNA et al. 2005; FERRIS et al. 2006; WALKER et al. 2006; STOLER 2007). O presente estudo verificou o teste de HPV, como uma das alternativas para estratificação de risco das pacientes com exame citológico indeterminado. No presente estudo, observou-se alta incidência de HPV AR em mulheres com ASC (38/66-58%), sendo que 67%(12/18) das mulheres abaixo de 30 anos foram positivas para HPV AR e 54%(26/48) das mulheres acima de 30 anos foram positivas para HPV AR, Este resultado é similar aos estudos mais recentes publicados na literatura, nos Estados Unidos e Europa, os quais descrevem uma positividade aproximada de 53% para HPV de alto risco (KENDALL et al. 2005; BERGERON et al. 2006; SELVAGGI 2006; STOLER et al. 2012) Observa-se declínio de detecção de infecção no subgrupo acima de 30 anos, dado, similarmente encontrado por outros estudos (KENDALL et al. 2005; BERGERON et al. 2006; SELVAGGI 2006; STOLER et al. 2012). A sensibilidade do teste nos casos indeterminados foi de 86%, especificidade de 52%, com VPP de 21% e VPN de 96%. Observa-se que a maior contribuição do teste de HPV neste estudo está no VPN, ou seja, nos casos indeterminados em que o teste de HPV resultou negativo, a chance dele ser verdadeiramente negativo é de 96%. Na população total, observa-se manutenção da sensibilidade do teste, mas com aumento significativo de sua especificidade em mulheres acima de 30 anos. Já no grupo de pacientes com resultado citológico indeterminado ocorreu diminuição da sensibilidade e especificidade nas mulheres acima de 30 anos, entretanto

valor de p não foi estatisticamente significativo. Com relação à população total do estudo, há concordância com a literatura mundial, demonstrando o fato de que as infecções transitórias, em mulheres abaixo de 30 anos, são mais frequentes e reduzem a especificidade do teste. Há, também, o relato de redução na sensibilidade, especialmente na população acima de 40 anos (KENDALL et al. 2005; BERGERON et al. 2006; SELVAGGI 2006; STOLER et al. 2012). Uma das possíveis explicações para este fato seria a possibilidade das lesões de alto grau, nessa faixa etária, serem causadas por tipos de HPV não pesquisados pelas metodologias mais utilizadas na maioria dos trabalhos, dentre elas o Cobas 4800 e a captura híbrida. Nosso estudo torna essa possibilidade pouco provável, visto que encontramos semelhante redução na sensibilidade do teste, nesta faixa etária, mas utilizamos o método Linear Array HPV Test, o qual detecta e genotipa 37 tipos de HPV. As outras possíveis explicações seriam: aumento do número de resultados falso-negativos e diagnósticos incorretos de lesões não neoplásicas como lesões de alto grau, apesar da revisão pela comissão de patologistas. É descrito na literatura, que atrofia do epitélio escamoso pode simular lesões de alto grau (STOLER et al. 2007) (ASC-US/LSIL Triage Study organizado pelo National Cancer Institute dos Estados Unidos) Encontrou-se positividade de 60%(50/84), para tipos de alto risco, na faixa etária de 30 anos ou menos, comparado com positividade de 47%(82/176) em mulheres acima de 30 anos. Neste estudo observou-se que a redução da positividade para HPV com o aumento da idade é acompanhado pela redução das lesões de alto grau. Apenas 13% das mulheres maiores de 40

anos, que foram diagnosticadas com ASC-US, tinham lesão de alto grau na biópsia. Existem poucos estudos até o momento, descrevendo qual o impacto da faixa etária na prevalência de tipos específicos em mulheres com citologias indeterminadas (Anonymous 2000; SOLOMON et al. 2002b; MONK e BREWSTER 2003; SCHIFFMAN e SOLOMON 2003; ZUNA et al. 2005; FERRIS et al. 2006; WALKER et al. 2006; STOLER 2007).

O grupo de pacientes abaixo de 30 anos é de particular interesse, no que se refere à estratificação de risco. Nessa faixa etária, o número de pacientes com infecção pelo HPV AR foi elevado (50/84-60%) e observou-se alta incidência de LIAG (23/84-27%). Nessas pacientes com LIAG, 70%(16/23) delas foram positivas para HPV de alto risco, enfatizando o status de alto risco de desenvolvimento de lesões de alto grau, mesmo nesse grupo de pacientes. Ao contrário, infecções pelos outros tipos indicam baixa tendência de evolução para LIAG, permitindo um tratamento mais conservador nesses casos. Confirmamos o fato de que citologia indeterminada em mulheres abaixo de trinta anos são mais correlacionadas com a existência de lesão de alto grau (18% contra 10% em pacientes acima de 30 anos) (Anonymous 2000; SOLOMON et al. 2002b; MONK e BREWSTER 2003; SCHIFFMAN e SOLOMON 2003; ZUNA et al. 2005; FERRIS et al. 2006; WALKER et al. 2006; STOLER 2007).

A avaliação dos casos de citologias indeterminadas, no contexto da idade e status de HPV, promove um refinamento na estratificação de risco das pacientes, propiciando informação valiosa para decisão clínica.

O real efeito das infecções, por múltiplos tipos de HPV, no desenvolvimento do câncer e lesões pré-neoplásicas, permanece obscuro. Algumas publicações sugerem que algumas coinfeções confeririam risco similar à infecção pelo HPV16 isoladamente. A presença de infecções múltiplas, aumenta a probabilidade de ser encontrado ao menos um tipo de HPV de alto risco. Ainda não está elucidado na literatura, se as coinfeções, por determinados tipos, exerceriam efeito sinérgico para a transformação maligna (BRISMAR-WENDEL et al. 2009). Nos 152 casos positivos foram detectados 33 tipos de HPV. Uma variabilidade de tipos raramente reportada na literatura. Sendo que em 47 casos foi detectados apenas 1 tipo e em 105, dois ou mais tipos. Nos 66 casos de citologia com atipias de significado indeterminado, 28 apresentavam coinfeção por mais de um tipo de HPV (CUSCHIERI et al. 2004; BRISMAR-WENDEL et al. 2009; FERNANDES et al. 2009). A maioria da população apresenta infecção por, pelo menos um tipo de alto risco(133 dos 152 casos da população total e 38 dos 66 casos de citologia indeterminada). Os tipos mais frequentes foram: 16, 61, 53, POOL de tipos de alto risco(52,33,35,58), 51. Na literatura, o tipo mais frequentemente encontrado nos casos de ASC é o HPV16, seguido por tipos que variam nas casuísticas mundiais. Em série da região nordeste do Brasil, o tipo 16 foi seguido por: 58 e 45 (FERNANDES et al. 2009). Em estudo europeu, foi seguido pelos tipos 51, 52, 56 e 31. No mundo, os tipos relacionados ao maior risco de desenvolver câncer cervical são: 16 (Razão de Verossimilhança: 435,5), 59 (Razão de Verossimilhança: 419,5) e 33 (Razão de Verossimilhança: 373,5) (BRISMAR-WENDEL et al. 2009). Na

população diagnosticada com ASC, os tipos mais frequentes foram os mesmos da população total. Observa-se uma tendência à diminuição da média das idades com o aumento do número de tipos encontrados de HPV, fato similarmente observado em outros estudos (BRISMAR-WENDEL et al. 2009).

A infecção persistente pelo HPV é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do câncer cervical. Entretanto, essa afirmação só se aplica a alguns tipos de HPV. Ou seja, para que se verifique a persistência de infecção e estratificação do risco, é necessário que se faça genotipagem de HPV e não, simplesmente, sua detecção (BRISMAR-WENDEL et al. 2009).

A genotipagem será ainda mais relevante para o monitoramento dos efeitos da vacinação para HPV, após a implantação dos programas de vacinação; realidade distante da população brasileira e de outros países em desenvolvimento.

6.2 IMUNOCITOQUÍMICA

A detecção do HPV tem sido amplamente estudada como estratégia de rastreamento para o câncer cervical, uma vez que é um teste mais sensível que a citologia cervical. Entretanto, o teste, para a detecção deste agente, não é capaz de distinguir as infecções clinicamente relevantes, daquelas que são transitórias e que irão solucionar espontaneamente. Outros marcadores são necessários para fazer essa discriminação. A dupla

marcação para detecção do p16, e do marcador de proliferação celular, Ki-67, pode ser usado para esse propósito (DONA et al. 2012). No presente estudo, foi realizada imunocitoquímica para p16/Ki-67 nos casos selecionados, que incluem todos os graus de anormalidades citológicas cervicais. Nossos resultados mostraram que essa metodologia é tecnicamente factível e eficiente em produzir resultados válidos, sendo um teste sensível e específico.

A dupla marcação imunocitoquímica para p16 e Ki-67 tem sido amplamente estudada para estratificação de risco das pacientes com atipias citológicas mínimas. Esse marcador se mostrou promissor, visto que não depende de interpretação morfológica, corando as células com ciclo celular desregulado. Na maioria dos trabalhos, a imunocitoquímica se mostrou com sensibilidade comparável ao teste de HPV, mas com ganho significativo na especificidade. Esse ganho se mostrou ainda maior nas pacientes abaixo de 30 anos, uma vez que, nesta faixa etária, as infecções transitórias são mais frequentes (SCHMIDT et al. 2011; ATKINS 2011) No presente estudo demonstramos esses achados na população total selecionada, em que observou-se, ao correlacionar o teste de HPV com ICQ, aumento significativo da especificidade, com manutenção da sensibilidade. Entretanto, no grupo de citologias indeterminadas, essa tendência não foi observada. Nesse subgrupo de pacientes o teste de HPV se mostrou superior nas pacientes abaixo de 30 anos, mas o valor de p não foi estatisticamente significativo. A imunocitoquímica identifica a mesma proporção de casos de alto grau que o teste de HPV, mas com possibilidade

de redução significativa do número de pacientes que devem ser encaminhadas para colposcopia, uma vez que é mais específico. Outros estudos, com acompanhamento a longo prazo das pacientes, serão necessários para confirmar o valor prognóstico da imunocitoquímica para p16/ki-67. Os resultados deste estudo e de outros na literatura, reforçam o potencial desse marcador como estratificador de risco das pacientes com atipias citológicas mínimas (SCHMIDT et al. 2011; ATKINS 2011; DONA et al. 2012). Verificou-se, neste estudo, que a positividade para p16/Ki-67 está significativamente associado com a presença de algum tipo de HPV de alto risco ($p < 0,0001$). E em pacientes maiores de 30 anos, quando a ICQ é positiva, a chance de ter um HPV de alto risco é quatro vezes maior ($p < 0,0001$). Nas pacientes abaixo de 30 anos, o valor de p não foi estatisticamente significativo.

A imunomarcção para p16/Ki-67 tem sido avaliada como teste para rastreamento primário, assim como para triagem dos casos com atipias mínimas na citologia. Assim sendo, a avaliação da positividade deste marcador em séries selecionadas, que incluem todos os tipos de anormalidades citológicas, é o primeiro passo para estabelecer o potencial desta metodologia para rastreamento do câncer cervical. No presente estudo, correlacionamos a positividade de p16/Ki-67 com o diagnóstico citológico e histológico. A comparação desses dados evidenciou que a positividade para p16/Ki-67 aumenta com a severidade da lesão cervical. Apenas um caso negativo na citologia e biópsia foi positivo para p16/Ki-67, o qual também era positivo para HPV de alto risco. Ficam as perguntas: a

biópsia foi representativa da lesão cervical? As células positivas para p16/Ki-67 foram interpretadas como normais pelo patologista? Apenas o acompanhamento dessa paciente e estudos maiores prospectivos e com acompanhamento a longo prazo das pacientes poderão trazer respostas a estes questionamentos (DONA et al. 2012). Sete casos com diagnóstico histológico de lesão de alto grau foram negativas para p16/Ki-67. Tal fato pode representar casos de lesão de alto grau que irão regredir espontaneamente (MCCREDIE et al. 2008; DONA et al. 2012). Entretanto, essa hipótese não é plausível de ser verificada, uma vez que, detectada lesão de alto grau, esta será tratada adequadamente.

A detecção do HPV tende a ser um teste superior para estratificação de risco, a longo prazo, das pacientes, uma vez que é detectado em uma fase mais precoce no processo de carcinogênese cervical. Enquanto que a imunocitoquímica é, particularmente, importante para predizer lesão em um momento específico, já que para que a célula tenha seu ciclo celular desregulado, o vírus deve estar incorporado ao DNA da célula hospedeira (SCHMIDT et al. 2011; ATKINS 2011).

6.3 MORFOMETRIA

Não existem estudos na literatura correlacionando os aspectos morfométricos com os achados citológicos, imunocitoquímicos e moleculares.

CENCI et al. (2000) demonstrou que a morfometria pode ajudar a

caracterizar melhor as células glandulares com atipias de significado indeterminado. SWARTZ et al. (2003), demonstrou características morfológicas diferentes entre células glandulares normais e alteradas no corte histológico, em casos que impuseram dúvidas diagnósticas ao patologista. YACOUB et al. (1994) estudaram os parâmetros morfológicos como preditores de resposta à quimioterapia e radioterapia neoadjuvante em casos localmente avançados de câncer cervical. Estudos semelhantes também foram realizados em tumores prostáticos, de cabeça e pescoço e de bexiga (BLOMJOUS et al. 1989; HELLIWELL et al. 1989; SHAEFFER et al. 1992; ZHENG et al. 1992).

O presente estudo demonstrou que a morfometria possui baixa sensibilidade(55%) e especificidade (67%), como método isolado, em detectar lesões cervicais. Nos casos de citologia com atipias de significado indeterminado, os parâmetros morfológicos não obtiveram um valor de p significativo. A morfometria não se mostrou um método eficiente para discriminar os casos citológicos indeterminados que abrigavam lesões de alto grau. O teste se mostrou importante no que diz respeito ao elevado valor preditivo negativo. Ou seja, quando a morfometria é negativa há grande probabilidade de ser realmente um caso negativo para lesões pré-malignas. Além disso, foi um método importante para comprovar, de maneira objetiva, o que é visto, de forma subjetiva, pelo patologista. Os padrões morfológicos dos casos que tiveram a citologia indeterminada, com biópsia de lesão de alto grau se mostraram o oposto dos padrões morfológicos das lesões de alto grau na citologia, confirmadas por biópsia. Ou seja, são

padrões morfológicos que fogem ao habitual e que não poderão ser percebidos pelo patologista, uma vez que os critérios são, essencialmente, estabelecidos pelos padrões nucleares.

6.4 ASSOCIAÇÃO DAS METODOLOGIAS TESTADAS

Quando combinamos os métodos avaliados, observamos um aumento significativo da especificidade, mas com diminuição importante da sensibilidade. A melhor correlação sensibilidade/especificidade, na população total do estudo, foi observada entre os testes de HPV e ICQ, em que atingiu-se 67% de sensibilidade e 86% de especificidade. No grupo de pacientes com ASC a melhor correlação encontrada ocorreu entre os testes de HPV e morfometria, mas o valor de p não foi significativo.

7 CONCLUSÕES

1. A genotipagem viral para HPV se mostrou com elevada sensibilidade (81%) em detectar lesões clinicamente relevantes, mas com especificidade (55%), relativamente, baixa;
2. Ocorreu aumento da especificidade da genotipagem viral para HPV em mulheres acima de 30 anos (61%), quando comparado às mulheres abaixo de 30 anos (41%), sem alterações relevantes na sensibilidade do teste;
3. A genotipagem viral para HPV nos casos de citologias indeterminadas obteve elevada sensibilidade (86%) em detectar lesões clinicamente relevantes, mas com especificidade (52%), relativamente, baixa. Valor de p não significativo;
4. Nos casos citológicos com atipias de significado indeterminado não houve alteração da especificidade do teste Linear Array em mulheres abaixo e acima de 30 anos;
5. A ICQ se mostrou um teste com elevada sensibilidade(85%) e especificidade (77%) em detectar lesões clinicamente relevantes;
6. Ocorreu aumento da especificidade da ICQ em mulheres acima de 30 anos (92%), quando comparadas com o grupo abaixo de 30 anos (67%). Observou-se diminuição da sensibilidade da ICQ em mulheres acima de 30 anos (67%), quando comparadas com o grupo abaixo de 30 anos (83%);

7. Nos casos de ASC em pacientes acima de 30 anos, a ICQ se mostrou o melhor método de rastreamento com sensibilidade de 75% e especificidade de 71%;
8. A morfometria não se mostrou um bom método para detectar lesões clinicamente relevantes, tanto na população total, quanto na população de ASC, sendo pouco sensível e específico;
9. A combinação entre testes não foi superior em detectar lesões de alto grau do que os testes isoladamente na população total do estudo;
10. A combinação entre os testes HPV e ICQ no grupo de citologias indeterminadas proporcionou um aumento da sensibilidade, especificidade e VPP em relação à ICQ isoladamente, com valor de p estatisticamente significativo;
11. Sugerimos protocolo de condutas frente ao diagnóstico citológico de ASC-US. Em pacientes abaixo de 30 anos sugere-se o teste de genotipagem de HPV. Se negativo, retorno ao rastreamento habitual (VPN 100%). Se positivo, encaminhamento para colposcopia (12% de chance de conter lesão histológica sincrônica). Em pacientes acima de 30 anos, sugere-se realização da ICQ. Se negativa, retorno ao rastreamento habitual (VPN 95%). Se positivo, encaminhamento para colposcopia (27% de chance de conter lesão histológica sincrônica).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[Anonymous]. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:397-402.

Atkins K. p16/Ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: p16/Ki-67 in cervical papanicolaou Tests. **Cancer Cytopathol** 2011; 119:145-7.

Bergeron C, Cas F, Fagnani F, Didaiiller-Lambert F, Poveda JD. Human papillomavirus testing with a liquid-based system: feasibility and comparison with reference diagnoses. **Acta Cytol** 2006; 50:16-22.

Blomjous EC, Schipper NW, Baak JP, Vos W, De Voogt HJ, Meijer CJ. The value of morphometry and DNA flow cytometry in addition to classic prognosticators in superficial urinary bladder carcinoma. **Am J Clin Pathol** 1989; 91:243-8.

Boyle P, Levin B. **World Cancer Report 2008**. Lyon France: IARC; 2007.

Brismar-Wendel S, Froberg M, Hjerpe A, Andersson S, Johansson B. Age-specific prevalence of HPV genotypes in cervical cytology samples with equivocal or low-grade lesions. **Br J Cancer** 2009; 101:511-7.

Cappiello G, Garbuglia AR, Salvi R, et al. HIV infection increases the risk of squamous intra-epithelial lesions in women with HPV infection: an analysis of HPV genotypes. DIANAIDS Collaborative Study Group. **Int J Cancer** 1997; 72:982-6.

Castle PE, Stoler MH, Wright TC Jr, Sharma A, Wright TL, Behrens CM. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. **Lancet Oncol** 2011; 12:880-90.

Cenci M, Mancini R, Nofroni I, Vecchione A. Endocervical atypical glandular cells of undetermined significance. I. Morphometric and cytologic characterization of cases that "cannot rule out adenocarcinoma in situ". **Acta Cytol** 2000; 44:319-26.

Cox JT. Management of women with cervical cancer precursor lesions. **Obstet Gynecol Clin North Am** 2002; 29:787-816.

Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, et al. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. **J Clin Pathol** 2004; 57:68-72.

Cu-Uvin S, Hogan JW, Warren D, et al. Prevalence of lower genital tract infections among human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. HIV Epidemiology Research Study Group. **Clin Infect Dis** 1999; 29:1145-50.

Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. **Vaccine** 2008; 26(Suppl 10):K29-41.

Davey DD, Naryshkin S, Nielsen ML, Kline TS. Atypical squamous cells of undetermined significance: interlaboratory comparison and quality assurance monitors. **Diagn Cytopathol** 1994; 11:390-6.

Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. **Cancer** 2007; 111:1-14.

DeMay RM. **The art and science of cytopathology**. Chicago: American Society of Clinical; 1996. The pap smear; p.1638-89.

Dona MG, Vocaturo A, Giuliani M, et al. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. **Gynecol Oncol** 2012; 126:198-202.

Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. **JAMA** 2000; 283:1031-7.

Eversole GM, Moriarty AT, Schwartz MR, et al. Practices of participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology, 2006. **Arch Pathol Lab Med** 2010; 134:331-5.

Fernandes JV, Meissner Rde V, de Carvalho MG, Fernandes TA, de Azevedo PR, Villa LL. Prevalence of HPV infection by cervical cytologic status in Brazil. **Int J Gynaecol Obstet** 2009; 105:21-4.

Ferris DG, Litaker MS, ALTS Group. Prediction of cervical histologic results using an abbreviated Reid Colposcopic Index during ALTS. **Am J Obstet Gynecol** 2006; 194:704-10.

Flores ER, Allen-Hoffmann BL, Lee D, Sattler CA, Lambert PF. Establishment of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) life cycle in an immortalized human foreskin keratinocyte cell line. **Virology** 1999; 262:344-54.

Gerber S, De Grandi P, Petignat P, Mihaescu A, Delaloye JF. Colposcopic evaluation after a repeat atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) smear. **Int J Gynaecol Obstet** 2001; 75:251-5.

Helliwell TR, Atkinson MW, Cooke TG, Cooke LD, Stell PM. Morphometric analysis, ploidy and response to chemotherapy in squamous carcinomas of the head and neck. **Pathol Res Pract** 1989; 185:755-9.

Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. **J Infect Dis** 1994; 169:235-40.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations)**. Available from: <URL:http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/> [2012 set 12

Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. **Arch Pathol Lab Med** 2003; 127:940-5.

Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1995; 92:1654-8.

Juskevicius R, Zou KH, Cibas ES. An analysis of factors that influence the ASCUS/SIL ratio of pathologists. **Am J Clin Pathol** 2001; 116:331-5.

Kendall BS, Bush AC, Olsen CH, Zahn CM. Reflex high-risk human papillomavirus testing for women with atypical squamous cells of undetermined significance in cytologic smears: effects since implementation in a large clinical practice. **Am J Clin Pathol** 2005; 123:524-8.

Klein S, Koretz RL. Nutrition support in patients with cancer: what do the data really show? **Nutr Clin Pract** 1994; 9:91-100.

Koss LG, Melamed MR. **Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases**. 5th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. Squamous carcinoma of the uterine cervix and its precursors; p.282-394.

Koutsky LA, Holmes KK, Crichtlow CW, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. **N Engl J Med** 1992; 327:1272-8.

Lee SJ, Jung KL, Lee JW, et al. Analyses of atypical squamous cells refined by the 2001 Bethesda System: the distribution and clinical significance of follow-up management. **Int J Gynecol Cancer** 2006; 16:664-9.

Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. **N Engl J Med** 2007; 357:1579-88.

McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. **Lancet Oncol** 2008; 9:425-34.

Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BK, Howell LP. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. **Obstet Gynecol** 1998; 92(Pt 2):727-35.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas/2008: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2012: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Monk BJ, Brewster WR. Does the ALTS trial apply to the community-based practitioner? **Am J Obstet Gynecol** 2003; 188:1381-2.

Nobbenhuis MA, Helmerhorst TJ, van den Brule AJ, et al. High-risk human papillomavirus clearance in pregnant women: trends for lower clearance during pregnancy with a catch-up postpartum. **Br J Cancer** 2002; 87:75-80.

Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, et al. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. **Gynecol Oncol** 2011; 121:505-9.

Rozendaal L, Westerga J, van der Linden JC, et al. PCR based high risk HPV testing is superior to neural network based screening for predicting incident CIN III in women with normal cytology and borderline changes. **J Clin Pathol** 2000; 53:606-11.

Runowicz CD. Molecular screening for cervical cancer--time to give up Pap tests? **N Engl J Med** 2007; 357:1650-3.

Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. **JAMA** 2000; 283:87-93.

Schiffman M, Solomon D. Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). **Arch Pathol Lab Med** 2003; 127:946-9.

Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, et al. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. **Cancer Cytopathol** 2011; 119:158-66.

Selvaggi SM. ASC-US and high-risk HPV testing: performance in daily clinical practice. **Diagn Cytopathol** 2006; 34:731-3.

Shaeffer J, Tegeler JA, Kuban DA, Philput CB, el-Mahdi AM. Nuclear roundness factor and local failure from definitive radiation therapy for prostatic carcinoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1992; 24:431-4.

Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA** 2002a; 287:2114-9.

Solomon D, Schiffman M, Tarone R. ASCUS LSIL Triage Study (ALTS) conclusions reaffirmed: response to a November 2001 commentary. **Obstet Gynecol** 2002b; 99:671-4.

Stoler MH. ASC, TBS, and the power of ALTS. **Am J Clin Pathol** 2007; 127:489-91.

Stoler MH, Castle PE, Solomon D, Schiffman M, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. The expanded use of HPV testing in gynecologic practice per ASCCP-guided management requires the use of well-validated assays. **Am J Clin Pathol** 2007; 127:335-7.

Stoler MH, Wright TC Jr, Sharma A, et al. The interplay of age stratification and HPV testing on the predictive value of ASC-US cytology. Results from the ATHENA HPV study. **Am J Clin Pathol** 2012; 137:295-303.

Sun XW, Kuhn L, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Wright TC Jr. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. **N Engl J Med** 1997; 337:1343-9.

Swartz R, West L, Boiko I, et al. Use of nuclear morphometry characteristics to distinguish between normal and abnormal cervical glandular histologies. **Anal Cell Pathol** 2003; 25:193-200.

Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:59-65.

Vassilakos P, Petignat P, Boulvain M, Campana A. Primary screening for cervical cancer precursors by the combined use of liquid-based cytology, computer-assisted cytology and HPV DNA testing. **Br J Cancer** 2002; 86:382-8.

Walker JL, Wang SS, Schiffman M, Solomon D, ASCUS LSIL Triage Study Group. Predicting absolute risk of CIN3 during post-colposcopic follow-up: results from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). **Am J Obstet Gynecol** 2006; 195:341-8.

Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:11-22.

Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, et al. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. **Am J Obstet Gynecol** 2007; 197:346-55.

Yacoub SF, Shaeffer J, el-Mahdi AM, Faris L, Zhu A. Nuclear morphometry as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy plus radiotherapy in locally advanced cervical cancer. **Gynecol Oncol** 1994; 54:327-32.

Zheng H, Lin DC, Hong BT, Yao XY. Nuclear morphometry and its prognostic significance in laryngeal squamous cell carcinomas. **Chin Med J (Engl)** 1992; 105:410-4.

Zuna RE, Wang SS, Rosenthal DL, et al. Determinants of human papillomavirus-negative, low-grade squamous intraepithelial lesions in the atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesions triage study (ALTS). **Cancer** 2005; 105:253-62.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:342-50.

Anexo 1 - Classificações citológicas / SISTEMA BETHESDA DE 2001

TIPO DE AMOSTRA

- Esfregaço convencional (Papanicolaou)
- Citologia em meio líquido
- Outros

ADEQUAÇÃO DA AMOSTRA

- Satisfatória para avaliação
- Insatisfatório para avaliação... (especificar o motivo)
- Amostra rejeitada/não processada (especificar o motivo)
 - Amostra processada e avaliada, mas insatisfatória para avaliação de anormalidade epitelial porque (especificar o motivo)

INTERPRETAÇÃO/RESULTADO

NEGATIVO PARA LESÃO INTRA-EPITELIAL OU MALIGNIDADE,

-ORGANISMOS:

- * *Trichomonas vaginalis*
- * Organismos fúngicos morfológicamente consistentes com *Candida* spp.
- * Substituição na flora sugestiva de vaginose bacteriana
- * Bactérias morfológicamente consistentes com *Actinomyces* spp.
- * Alterações celulares consistentes com o vírus herpes simples

-OUTROS ACHADOS NÃO-NEOPLÁSICOS (descrição opcional; relação não inclusiva):

- * Alterações celulares reativas associadas à
 - inflamação (incluindo reparo típico)
 - radiação
 - dispositivo intra-uterino (DIU)
- * Estado das células glandulares pós-histerectomia
- * Atrofia

OUTROS

- Células endometriais (em mulher acima 40 anos de idade)

ALTERAÇÕES DAS CÉLULAS EPITELIAIS

- CÉLULAS ESCAMOSAS

* Células escamosas atípicas

- de significado indeterminado
- não é possível excluir lesão intra-epitelial escamosa de alto grau

* Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (abrangendo HPV/displasia leve/NIC 1)

* Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (abrangendo: displasia moderada e acentuada, CIS; NIC 2 e NIC 3)

- com características suspeitas de invasão (se houver suspeita de invasão)

* Carcinoma de células escamosas

- CÉLULAS GLANDULARES

* Atípicas

- células endocervicais (sem outras especificações (SOE) ou especificar nos comentários),
- células endometriais (SOE ou especificar nos comentários),
- células glandulares (SOE ou especificar nos comentários)

* Atípicas

- células endocervicais, possivelmente neoplásicas,
- células glandulares, possivelmente neoplásicas,

* Adenocarcinoma endocervical in situ

* Adenocarcinoma:

- endocervical
- endometrial
- extra-uterino
- sem outras especificações (SOE)

OUTRAS NEOPLASIAS MALIGNAS (especificar)

REVISÃO AUTOMATIZADA

Se o caso for avaliado com equipamento automatizado, especificar o equipamento e o resultado.

NOTAS E SUGESTÕES (opcionais)

As sugestões devem ser concisas e consistentes com orientações do acompanhamento clínico publicadas por organizações profissionais (referências quanto as publicações relevantes podem ser incluídas).

Anexo 2 - Questionário Clínico

RGH:

Nome:

Sexo:

Idade:

Etnia:

Estado Civil:

História gestacional:

Uso de ACO:

História pregressa de neoplasia:

.....

História familiar de neoplasia

.....

Tabagismo () Sim () Não

Exposição à radiação () Sim () Não

Anexo 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto: “Análise morfológica, imunocitoquímica e molecular das citologias cérvico-vaginais com atipias de significado indeterminado”

Para obter um maior conhecimento sobre câncer, o Corpo Clínico deste hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica e científica, permitindo melhor conhecimento dos mecanismos da doença e, portanto, buscar oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. O presente estudo tem a finalidade de identificar métodos adicionais para diagnóstico nos casos em que o exame de Papanicolaou não permite o diagnóstico conclusivo. Para isto estudaremos 3 métodos modernos diferentes, abrangendo a análise em microscópios especiais e análise molecular da presença do vírus HPV. Estas informações são úteis não só para o diagnóstico, mas também para o melhor planejamento do tratamento e acompanhamento. A partir desta pesquisa se pretende estabelecer a rotina do hospital para a investigação do câncer do colo uterino utilizando o que há de mais moderno para isto. Não haverá nenhum procedimento adicional durante a sua consulta médica. A coleta da amostra é semelhante e não haverá prejuízo do diagnóstico. O excedente do material será encaminhado para a pesquisa dos testes adicionais. Os resultados dos testes serão informados ao seu médico para compor o planejamento de eventual tratamento que se fizer necessário.

Estamos solicitando a sua permissão para guardar e utilizar o resto de tecidos e/ou fluidos retirados de você, que não são mais necessários para o seu diagnóstico.

As amostras obtidas pelo escovado do colo uterino serão encaminhadas ao laboratório do departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo onde serão analisadas e armazenadas. O depositário dos

fragmentos de tecido obtidos da peça cirúrgica será este departamento do Hospital do Câncer (A.C. Camargo). Este material poderá ser usado em pesquisas futuras. Os projetos de pesquisa propostos que vierem a utilizar este material serão previamente apresentados à apreciação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital. Sua privacidade e identidade serão sempre preservadas na pesquisa.

A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita sempre de modo a manter o seu anonimato. Caso sejam realizadas pesquisas genéticas utilizando seu material armazenado conosco, e estas pesquisas indiquem alterações que envolvam riscos futuros para seus familiares, as mesmas podem ser informadas a você, se esse for o seu desejo.

Não existem quaisquer benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes de pesquisas realizadas nesta instituição.

Sua decisão não influenciará, de nenhum modo, o seu tratamento.

Caso haja questões a esclarecer sobre este Termo de Consentimento, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética em Pesquisa deste hospital pelo telefone 2189-5000 ramal 5020 ou com os idealizadores deste estudo (Dr. Victor Piana ramal: ou Dra. Louise De Brot ramal 1122). Você receberá cópia deste documento.

Somente assine este documento, se consentir integralmente com os termos deste.

Declaro estar ciente das informações ora prestadas, tendo lido atentamente o texto:

1. Eu (escrever Sim ou Não)..... concordo que tecidos e outros fluidos corporais, quando não necessários para o meu diagnóstico, possam ser

coletados, guardados e usados pelo banco de tumores, médicos, pesquisadores e colaboradores do Hospital A.C.Camargo para pesquisas sobre prevenção, tratamento, diagnóstico ou cura do câncer ou outras doenças e problemas de saúde, bem como dados de idade, sexo, fatores epidemiológicos relacionados, outras informações do meu prontuário médico, diagnóstico, tratamento e história familiar.

Por expressão de verdade firmo o presente Termo.

São Paulo, de de 2009.

.....

RG:

CPF:

Anexo 4 – Protocolo de imunocitoquímica

Antes de iniciar a imunocitoquímica, as lâminas devem ser re-hidratadas em água destilada por 10 minutos. Imediatamente após preparação as lâminas deverão ser fixadas em etanol 99% por 10 minutos a 1 hora. E secas ao ar por 20 minutos a 16 horas (overnight). Antes de começar o procedimento de imunocitoquímica, todas as lâminas deverão ser re-hidratadas em água destilada por 10 minutos

Recuperação antigênica:

- Incubar com solução recuperação (frasco 9) 1:10, por 10 minutos: 95 -99° C
- Resfriar à temperatura ambiente por 20 minutos
- Lavar com tampão de lavagem por 5 minutos
- Bloqueio peroxidase com Água Oxigenada 10V 5 minutos
- Lavar com tampão de lavagem por 5 minutos
- Anticorpo primário por 30 minutos
- Lavagem com tampão de lavagem por 5 minutos (2x 5')
- Reagente visualização HRP – 15 minutos
- 4 trocas do tampão de lavagem – 5 minutos cada
- Reagente visualização AP – 15 minutos
- 4 trocas tampão de lavagem – 5 minutos
- Desprezar
- Substrato DAB – 10 minutos
- Lavar em água destilada
- Lavar com tampão de lavagem
- Substrato : Fast-red – 15 minutos
- Lavar tampão de lavagem
- Lavar com água destilada
- Desprezar
- Contra-coloração – Hematoxilina livre de álcool – 15 minutos
- Lavar em água corrente para retirar excesso (3 a 5 x)
- Lavar brevemente em água destilada

- Montagem 4 gotas CINtec PLUS mount
- Secar 1 hora estufa 60°C
- Colocar banho Xilol
- Montagem em equipamento Tissue-Tek film

Preparação DAB (Estável por até 8 horas após o preparo)

1 ml de DAB Substrate Solution (frasco 5)

Adicionar uma gota DAB cromógeno (25 a 30 microlitros) (frasco 6) e misturar gentilmente, invertendo o tubo.

Preparação Fast Red (preparo antes do uso)

1 ml de Naphthol Phosphate Substrate Solution (frasco 7)

Adicionar uma gota (40-45 microlitros) de Fast Red Chromogen (Frasco 8) e misturar gentilmente, invertendo o tubo

Anexo 5 - Protocolo LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test (Roche)

1. Deixe todos os reagentes se equilibrarem a TA (15 e 30°C) antes de serem utilizados.
2. Realizar os testes em múltiplos de 12 amostras.
3. Preparação dos reagentes:
 - a. Coloque os tubos de **0,2mL** (strip sem tampa) em um suporte.
 - b. Prepare o Mix de trabalho adicionando **125µL** de **HPV Mg²⁺** (coloração rosa) ao conteúdo total de um frasco de **HPV MMX** (580µL) invertendo o tubo de 10 a 15 vezes (**não utilizar vórtex**). Confirmar a adição ao mix pela coloração rosa do **Mg²⁺**. Descartar o restante de **HPV Mg²⁺**.
 - c. Distribua **50µL** do Mix em cada tubo de reação (12 tubos).
 - d. Adicione **50µL** das amostras e controles em cada tubo da reação e tampe-os ou, para armazenar, coloque os strips contendo o Mix a temperatura de **2-8°C** (por até 6 horas) em ambiente fechado.
4. Preparação dos controles (**Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit**):
 - a. Deixe os reagentes e controles se equilibrarem a TA (15 e 30°C) pelo menos 15min antes de serem utilizados. Ligue dois banhos secos, um a **55°C** e outro a **70°C**.
 - b. Distribua **200uL** dos controles igualmente em tubos de **1,5mL** (3 tubos para o controle [+]) e 3 para o [-]).
 - 1.c Para meio líquido centrifugue 1ml do líquido e ressuspender em **200uL** de PBS.
 - c. Adicione **20uL de Proteinase K** em cada tubo de reação. Agite no vórtex e incube por **30min** a **55°C** no banho seco.
 - d. Adicione **200uL de Buffer AL**. Aagite no vórtex (15 segundos) e incube por **10min** a **70°C** no banho seco. Centrifugue por **30seg** a **6.000g**.
 - e. Adicione **200uL de etanol 100%** e agitar em vórtex (15 segundos). Centrifugar por **30seg** a **6.000g** e incube por **5min** a **TA**.

- f. Transfira a amostra para uma **coluna** posicionada sobre um tubo coletor de **2mL**, incube por **1min** a **TA** e centrifugue por mais **1min** a **6.000g**. Descarte o conteúdo do tubo coletor.
- g. Adicionar **500uL** de **Buffer AW1** (acrescido de etanol 100%). Incube por **1min** a **TA** e centrifugue por mais **1min** a **6.000g**. Descarte o conteúdo do tubo coletor.
- h. Adicione **500ul** de **Etanol 100%**, incube por **1min** a **TA** e centrifugue por **3min** a **20.000g**. Descarte o tubo coletor e transfira a coluna em um novo tubo de **1,5mL**.
- i. Adicione **120ul de água milli-Q estéril (70°C)** no centro da membrana da coluna. Incube por **1min** a **TA** e centrifugue por mais **1min** a **6.000g**.
- j. Combine o conteúdo dos 3 tubos para um **volume final** de **360ul**.
- k. Secar em speedvac por aproximadamente **1h30 (Volume de 120uL)** e quantificar no nanodrop.

5. Amplificação:

- a. Coloque os strips no termo GeneAmp PCR System 9700.
- b. Programação – **HPV Test** (3h e 15min):
 - HOLD **2 min 50°C**;
 - HOLD **9 min 95°C**;
 - CYCLE (40 ciclos) **30 seg 95°C, 1 min 55°C, 1min 72°C** (ramp rate = 50%);
 - HOLD **5 min 72°C**;
 - HOLD **72°C** indefinidamente (máximo de 30min).
- c. Em METHOD, defina a **RAMP SPEED** para **MAX** e o **REACTION VOLUME** para **100µL**.
- d. Ao final da reação, remover cuidadosamente a tampa dos tubos (área reservada para produto amplificado) e adicione imediatamente **100µL** de **DN** em cada tudo de reação.
- e. O produto amplificado já desnaturado pode ser armazenado em geladeira em até 7 dias.

6. Detecção dos genótipos de HPV:

- a. Deixe os reagentes a TA (15 e 30°C) e pré-aqueça um banho-maria a **53°C ± 2°C** e um outro banho com agitação a **53°C ± 2°C** a **60rpm** (ou agitação manual).
- b. Deixe a água em contato com aproximadamente $\frac{1}{4}$ da profundidade exterior do reservatório ou 0,5cm da bandeja de 24 reservatórios.
- c. Prepare o **tampão de hibridação** (100 tiras): Adicione **100mL** de **SSPE** a **388mL** de **Água destilada** ou **milli-Q**. Adicione **13,3mL** de **SDS** e misture bem. Caso um dos reagentes esteja precipitado, aqueça no banho de **53°C**. Esse tampão pode ser armazenado à **TA** por **30 dias**.
- d. Prepare o **tampão de lavagem ambiente**: Adicione **133mL** de **SSPE** a **2520mL** de **Água destilada** ou **milli-Q**. Adicione **13,3mL** de **SDS** e misture bem. Caso um dos reagentes esteja precipitado, aqueça no banho de **53°C**. Esse tampão pode ser armazenado à **TA** por **30 dias**.
- e. Prepare o **tampão de lavagem estrito**: Para cada tira de genotipagem que será utilizada, retire **5mL** do **tampão de lavagem ambiente** e adicione-os a um frasco de cultura limpo (Pode colocar as tiras juntas no mesmo frasco). Esse tampão deve ser preparado no momento da sua utilização (**12 tiras = 65mL**).
- f. Aqueça o **tampão de hibridação** e o **tampão de lavagem estrito** no banho-maria a **53°C ± 2°C** durante pelo menos **15min** até o momento da sua utilização.
- g. Prepare o **tampão de citrato** (100 tiras): Adicione **25mL** de **CIT** a **475mL** de **Água destilada** ou **milli-Q** e misture bem. Caso um dos reagentes esteja precipitado, aqueça no banho de **53°C**. Esse tampão pode ser armazenado à **TA** por **30 dias**.
- h. Retire o número necessário de tiras de genotipagem da embalagem **HPV strip** com uma pinça limpa e numere cada tira com o nome da amostra com caneta permanente.

- i. Coloque cada tira com as bandas da sonda viradas para cima na bandeja de 24 reservatórios e adicione **4mL** do **tampão de hibridação** pré-aquecido a cada reservatório com as tiras.
- j. Pipete **75µL** de amplicon desnaturado no reservatório. Agite a bandeja suavemente entre cada adição. Tampe a bandeja e coloque-a no banho-maria com agitação por **30min**, com um peso sobre ela.
- k. Durante a hibridação, prepare o **conjugado de trabalho**: Adicione **15µL** de **SA-HRP** a **5mL** de **tampão de lavagem ambiente** para cada tira a ser utilizada e misture bem (**12 tiras = 195 µL e 65mL**). Caso um dos reagentes esteja precipitado, aqueça no banho de **53°C**. Esse tampão pode ser armazenado à **TA** por **3h**.
- l. Retire a bandeja do banho e remova o **tampão de hibridação** dos reservatórios por aspiração à vácuo ou pipeta de vidro (4mL).
- m. Adicione **4mL** de **tampão de lavagem ambiente** a cada reservatório contendo a tira. Agite suavemente a bandeja 3 a 4 vezes para lavar as tiras e aspire imediatamente à vácuo ou pipeta de vidro (4mL).
- n. Adicione **4mL** de **tampão de lavagem estrito** a cada reservatório contendo a tira e tampe a bandeja (limpe a tampa com um papel limpo caso haja condensação). Coloque a bandeja de volta no banho-maria **53°C ± 2°C** com agitação de **60rpm** por **15min**, com um peso sobre ela.
- o. Retire a bandeja do banho e remova o **tampão de lavagem estrito** dos reservatórios por aspiração à vácuo ou pipeta de vidro (4mL).
- p. Adicione **4mL** do **conjugado de trabalho** a cada reservatório contendo a tira e tampe a bandeja (limpe a tampa com um papel limpo caso haja condensação). Coloque a bandeja no agitador orbitário a **TA (entre 15 e 30°C)** com agitação aproximada de **60rpm** por **15min**.
- q. Retire a bandeja do banho e remova o **conjugado de trabalho** dos reservatórios por aspiração à vácuo ou pipeta de vidro (4mL).
- r. Adicione **4mL** de **tampão de lavagem ambiente** a cada reservatório contendo a tira e tampe a bandeja (limpe a tampa com um papel limpo

- caso haja condensação). Coloque a bandeja no agitador orbitário a **TA (entre 15 e 30°C)** com agitação aproximada de **60rpm** por **10min**.
- s.** Retire a bandeja do banho e remova o **tampão de lavagem ambiente** dos reservatórios por aspiração à vácuo ou pipeta de vidro (4mL).
 - t.** Repita o procedimento **r** e **s**.
 - u.** Adicione **4mL** do **tampão de citrato** a cada reservatório contendo a tira e tampe a bandeja (limpe a tampa com um papel limpo caso haja condensação). Coloque a bandeja no agitador orbitário a **TA (entre 15 e 30°C)** com agitação aproximada de **60rpm** por **5min**.
 - v.** Prepare o **substrato de trabalho**: Adicione **4mL** de **SUB A** a **1mL** de **SUB B** por tira a ser testada (**12 tiras = 52mL e 13mL**). Misture bem. Esse tampão pode ser armazenado à **TA**, protegido da luz direta por **3 h**.
 - w.** Retire a bandeja do banho e remova o **tampão de citrato** dos reservatórios por aspiração à vácuo ou pipeta de vidro (4mL).
 - x.** Adicione **4mL** do **substrato de trabalho** a cada reservatório contendo a tira e tampe a bandeja (limpe a tampa com um papel limpo caso haja condensação). Coloque a bandeja no agitador orbitário a **TA (entre 15 e 30°C)** com agitação aproximada de **60rpm** por **5min**.
 - y.** Retire a bandeja do banho e remova o **substrato de trabalho** dos reservatórios por aspiração à vácuo ou pipeta de vidro (4mL).
 - z.** Adicione **4mL** de **Água destilado** ou **milli-Q** a cada reservatório contendo a tira e remova as tiras da bandeja com uma pinça limpa. Coloque as tiras em uma superfície limpa e seca e deixe-as secar de **1h a 72h** antes da interpretação.

Anexo 6 - Protocolo de extração de DNA das amostras de citologia: QIAamp
® DNA Micro Kit/Qiagen

1. Transfere-se 1 ml de amostra citológica cervical para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e centrifuga-se a 6000 xg (8000 rpm) durante 2 min.
2. Retirar o sobrenadante, adicionar 500 ul de Tampão AE, e vortex durante 5 s.
3. Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 2 min.
4. Retirar o sobrenadante, adicionar 300 ul de tampão ATL e 20 ul de proteinase K e misturar com vortex durante 10 s.
5. Colocar o tubo de 1,5 ml em Thermomixer e incubar a 56 ° C, com agitação a 900 rpm, durante 1 h.
6. Centrifugar brevemente o tubo de 1,5 ml para remover gotas de dentro da tampa.
7. Adicionar 300 ul tampão AL e 50 ul de etanol (96-100%), próximo a tampa, e misture por vórtex por 10 s.
8. Centrifugar brevemente o tubo de 1,5 ml para remover gotas de dentro da tampa.
9. Transferir cuidadosamente o sobrenadante do passo 8 para a coluna QIAamp MinElute (num tubo de recolha de 2 ml), sem molhar a tampa. Fechar a tampa, e centrifugar a 6000 xg (8000 rpm) durante 1 min. Coloque a coluna MinElute QIAamp em um tubo limpo coleção de 2 ml, e descartar o tubo de coleta
10. Abrir cuidadosamente a coluna MinElute QIAamp e adicionar 500 ul de tampão AW1 sem molhar a borda. Fechar a tampa e centrifugar a 6000 xg (8000 rpm) durante 1 min. Coloque a coluna MinElute QIAamp em um tubo limpo coleção de 2 ml, e descartar o tubo de coleta
11. Abra cuidadosamente a coluna MinElute QIAamp e adicione 500 ul de tampão AW2 sem molhar a borda. Fechar a tampa, e centrifuga-se a 6000

xg (8000 rpm) durante 1 min. Coloque a coluna MinElute QIAamp em um tubo limpo coleção de 2 ml, e descartar o tubo de coleta

12. Centrifugar em velocidade máxima (20.000 xg; 14000 rpm) durante 3 minutos para secar a membrana completamente.

13. Coloque a coluna MinElute QIAamp em um tubo limpo de microcentrífuga de 1,5 ml e descartar o tubo. Cuidadosamente abra a tampa da coluna de MinElute QIAamp e aplicar 20-50 de água destilada para o centro da membrana.

14. Fechar a tampa e incubar à temperatura ambiente (15-25 ° C) durante 1 min. Centrifugar a velocidade total (20.000 xg; 14.000 rpm) durante 1 min.

Anexo 7 - Produção Científica Relacionada á Dissertação

Pôster selecionado para apresentação no AMP 2012 Annual Meeting (Association for Molecular Pathology), publicado abstract **J Mol Diagnostics** 2012; 14(6):678.

***Prevalence of co-infection of HPV subtypes in women treated at A.C. Camargo Hospital in Sao Paulo, Brazil**

L.D. Andrade, B Pellegrini, M.P. Macedo, G. Baiocchi Neto, D.M. Carraro, I.W. Cunha, V.P. Andrade

ID43. Prevalence of Co-Infection of HPV Subtypes in Women Treated at A.C. Camargo Hospital in Sao Paulo, Brazil

L.D. Andrade, B. Pellegrini, M.P. Macedo, G. Baiocchi Neto, D.M. Carraro, I.W. Cunha, V.P. Andrade

A.C. Camargo Hospital, Sao Paulo, Brazil.

Introduction: Human papillomavirus (HPV) is a large group of epitheliotropic viruses with variable risk to development of cervical cancer. Patients with persistent HPV infections with specific subtypes are at higher risk of cancer development and the role of co-infection remains unclear. Studies linking HPV-subtypes with and without co-infection to morphology are few in the literature. We aimed to analyze the prevalence of type specific HPV infection and co-infections in women with cervical carcinomas and intra-epithelial neoplasia. **Methods:** 256 women underwent gynecologic examination with liquid-based cytology and biopsy sampling between June 2009 and October 2011 at AC Camargo Cancer Hospital, Brazil. None of the woman received HPV vaccine in the past. Cytology was classified according to 2001 Bethesda System into normal/inflammatory (NL; n=52), atypia of undeterminate significance (AUS, n=74), intraepithelial neoplasia (low-grade=LSIL, n=84; high-grade=HSIL, n=40) or carcinoma (CA, n=6). DNA was successfully extracted and amplified from cytologic specimen in 248 cases and HPV detection was performed using Linear Array HPV Genotyping HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 and CP6108 subtypes). **Results:** HPV was detected in 63% of the samples including 36 different virus subtypes. Detection of a single HPV subtype occurred in 21% of NL samples, 17% of AUS, 18% of LSIL, 23% of HSIL and 50% of CA. HPV-16 was the most prevalent subtype in all abnormal groups followed by HPV-61 in AUS/LSIL and HPV-66 in HSIL and HPV-31/53 in CA. Co-infection was detected in all groups [NL=8%, AUS=43%, LSIL=61%, HSIL=64%, CA=33%]. At least one high-risk subtype was present in 139 samples (56%) including all groups [NL=8 (15%); AUS=39 (57%), LSIL=55 (67%), HSIL=37 (82%), CA=5 (83%)]. No high-risk subtype was detected in 12% of LSIL, 2,5% of HSIL and 0% of CA, and co-infection with low-risk subtypes only was seen in 6%, 2,5% and 0%, respectively. **Conclusions:** In Sao Paulo, Brazil, high-risk HPV subtype is common across the spectrum of cervical lesions with a stepwise increase until carcinoma, supporting the high-risk concept. Co-infection was more common than single subtype infection in LSIL/HSIL/CA. A proportion of HSIL/CA developed without a high-risk subtype, suggesting that persistent infection/low-risk co-infection also carries a relevant risk to cancer development.