

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado da aluna CECÍLIA MARIA ROTELI MARTINS, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da FCM/UNICAMP, para obtenção do Título de Doutor em Medicina, área de Tocoginecologia.

Campinas, 08 de julho de 1999.

Profa. Dra. Sophie F. M. Derchain

ORIENTADOR

Sop - Der

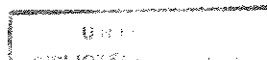
**ANÁLISE DOS CRITÉRIOS HISTOLÓGICOS UTILIZADOS
PARA DIAGNÓSTICO DE LESÃO INDUZIDA POR HPV E
SUA RELAÇÃO COM A REATIVIDADE DO DNA-HPV POR
CAPTURA DE HÍBRIDOS E POR HIBRIDIZAÇÃO *in situ***

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina, área de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Medicina, na área de Tocoginecologia

ORIENTADORA: Profa. Dra. SOPHIE F. MAURICETTE DERCHAIN
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. VENÂNCIO AVANCINI F. ALVES

UNICAMP
1999

9916014



UNIDADE	BC
N.º ORÇAMENTAL	
N.º DEPARTAMENTO	
N.º CURSO	
V.º	Ex.
TÍTULO	BO/38452
DATA	229/99
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	24/08/99
N.º GPD	

CM-001255B6-B

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

M366a

Martins, Cecília Maria Roteli

Análise dos critérios histológicos utilizados para diagnóstico de lesão induzida por HPV e sua relação com a reatividade do DNA-HPV por captura de híbridos e por hibridização *in situ* / Cecília Maria Roteli Martins. Campinas, S.P.: [s.n.], 1999.

Orientador: Sophie Françoise Mauricette Derchain,
Venâncio Avancini Ferreira Alves
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Colo uterino - Doenças - Diagnóstico. 2. Carcinogênese.
I. Sophie Françoise Mauricette Derchain. II. Venâncio
Avancini Ferreira Alves. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: CECÍLIA MARIA ROTELI MARTINS

Orientadora: Profa. Dra. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN

Co-Orientador: Prof. Dr. VENÂNCIO AVANCINI FERREIRA ALVES

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

Sop - Der
Mauricette
F. Avancini
L. Ferreira
Ferreira Alves

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 08/07/99

Dedico este trabalho...

... ao Bruno, Carlo e Lúgia,
pelo apoio e compreensão dos momentos subtraídos do nosso convívio.

... aos meus pais,
pelo amor, dedicação e confiança.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain e ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, pelo apoio e orientação.

À Dra. Sheila A. Coelho Siqueira, pelo grande auxílio e amizade.

Ao Prof Dr José Guilherme Cecatti, ao Prof. Dr. Luís Carlos Teixeira e ao Prof. Dr. José Antonio Simões, pelas valiosas sugestões.

Ao Edson Z. Martinez, pela valiosa ajuda e paciência na realização da estatística deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gustavo Antonio de Sousa, Professor Titular em Ginecologia; Prof. Dr. Anibal Faúndes, Professor Titular em Obstetrícia; Prof. Dr. Aarão Mendes Pinto Neto, Diretor do Departamento de Tocoginecologia; Prof. Dr. Luis Guillermo Bahamondes, coordenador da Pós-Graduação; Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino, Diretor Executivo do CAISM e Profa. Dra. Kazue Panetta, chefe da Área de Oncologia.

Aos diretores do “Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros”: Dr. Coríntio Mariani Netto, Dr. Temístocles Pie de Lima e Dr. Valdir Tadini, pela confiança e amizade.

Ao amigo Dr. Maurício Sena Martins, pela amizade e incentivo.

Aos médicos, funcionários e residentes do “Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros”, pela ajuda e amizade.

Aos pesquisadores do “Instituto Adolfo Lutz”, Prof. Dr Adhemar Longatto Filho, Dra. Raimunda Telma dos Santos, pela contribuição, paciência e amizade.

Aos pesquisadores e funcionários da Divisão de Imuno-histoquímica do “Instituto Adolfo Lutz”, pela amizade e carinho.

À Assessoria Técnica do CAISM: Sueli Chaves, Cylene Camargo, Maria do Rosário Zullo, William Alexandre de Oliveira, Neder Piagentini, Sueli Regina Silveira, Marisa Damasceno de Almeida e Fernanda Atibaia, pela ajuda e carinho.

À Nilvana Gomes F. Carmo e Margarete Amado S. Donadon, pelo incentivo, atenção e auxílio.

Este estudo foi
financiado pela FAPESP
(processo 1996/1750-3)

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Resumo

1. Introdução	1
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. Casuística e Métodos.....	17
3.1. Tipo de estudo.....	17
3.2. Critérios e procedimentos para seleção dos sujeitos	17
3.3. Procedimentos utilizados para coleta de dados.....	18
3.4. Processamento de dados e análise estatística	29
3.5. Aspectos éticos.....	30
4. Resultados.....	31
4.1. Avaliação da taxa de concordância dos diagnósticos histológicos.....	31
4.2. Relação entre os critérios histológicos individuais e o diagnóstico histológico final	33
4.3. Distribuição da reatividade para DNA-HPV por captura de híbridos e por hibridização in situ e a gravidade da lesão cervical	38
4.4. Relação entre os critérios histológicos individuais utilizados para o diagnóstico da lesão induzida por HPV e a reatividade da captura de híbridos e da hibridização in situ	41
5. Discussão.....	51
5.1. Aspectos gerais	51
5.2. Valor do diagnóstico histológico	53
5.3. Análise dos critérios histológicos individuais.....	54
5.4. Relações de marcadores de lesão e de infecção	55
6. Conclusões.....	63
7. Summary.....	65
8. Referências Bibliográficas.....	67
9. Bibliografia de Normatizações.....	81
10. Anexos	83

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CH	captura de híbridos
CSA	amplificação do sinal catalisado
DNA	ácido desoxirribonucléico
et al.	e outro, e outras
HE	hematoxilina-eosina
HIS	hibridização <i>in situ</i>
HMLMB	Hospital Maternidade “Leonor Mendes de Barros”
HPV	vírus do papiloma humano
IAL	Instituto “Adolfo Lutz”
NIC	neoplasia intra-epitelial cervical
RLU	unidade relativa de luz
P	prevalência
PCR	reação em cadeia de polimerase
RP	razão de prevalência
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Resumo

Com o objetivo de analisar os critérios histológicos associados à lesão induzida por HPV e sua relação com a reatividade do DNA-HPV por captura de híbridos (CH) e hibridização *in situ* (HIS), foi realizado este estudo em 138 mulheres encaminhadas para colposcopia nos Serviços de Patologia Cervical do Hospital Maternidade Leonor Mendes de Barros, em São Paulo, e do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas. Analisou-se a taxa de concordância do diagnóstico histológico através da comparação do resultado da lâmina histológica avaliada por dois observadores visando a atingir o *diagnóstico de consenso*. Avaliou-se a relação entre cada critério histológico individual utilizado para o diagnóstico da lesão induzida por HPV; a distribuição da reatividade para DNA-HPV estimada por CH e por HIS e a relação entre cada critério histológico individual com a reatividade do DNA-HPV por CH e HIS. Na análise histológica foram descritas as presenças de binucleação; multinucleação; células com atipia nuclear mínima (esboço de coilocitose); coilocitose; coilócito fusiforme; mitose aberrante; disqueratose e paraceratose. Cada um destes critérios foi classificado em duas categorias: presente e ausente. Foi emitido diagnóstico

histológico final e classificado em três categorias: ausência de lesão induzida por HPV, NIC 1 e NIC 2 ou 3. Para análise estatística foram estimadas a prevalência e a razão de prevalência (RP), com intervalo de confiança de 95%, o teste de Cochran-Armitage e o coeficiente kappa. Concluiu-se que houve concordância elevada interobservadores na histologia, reforçando sua validade como padrão-ouro das lesões do colo uterino. Dentre os critérios histológicos individuais, a mitose aberrante e a multinucleação, além da disqueratose e paraqueratose, foram importantes marcadores para lesões mais graves (NIC 2 ou 3). Células exibindo *esboço de coilocitose* propostas anteriormente como critérios *sugestivos de infecção por HPV*, não se mostraram associadas à infecção nem aos padrões histológicos de lesão epitelial. Houve uma associação significativa entre a reatividade para DNA-HPV *de alto risco oncológico* por CH e por HIS com o diagnóstico histológico de NIC 2 ou 3. Entre os casos que foram reativos para DNA-HPV de amplo espectro pela HIS, o tipo específico mais freqüente foi o tipo 16. Na maioria dos casos cujo tipo viral foi identificado, o tipo viral detectado foi compatível com o diagnóstico histológico. Dentre os critérios morfológicos, a multinucleação apresentou a mais significativa associação com a detecção de DNA viral por CH e por HIS. A coilocitose e o coilócito fusiforme apresentaram prevalência semelhante entre si. A binucleação, a paraceratose e a disqueratose apresentaram uma prevalência menor que a multinucleação e as *células com atipia nuclear mínima, com vacúolos* foram muito freqüentes tanto nos casos positivos como

nos negativos para DNA viral. A ausência de associação do encontro das células com *esboço de coilocitose*, com o diagnóstico histológico, bem como com a detecção de DNA-HPV, seja por CH, seja por HIS, torna fundamental sua exclusão dentre os critérios diagnósticos em biópsias de colo uterino.

Introdução

1. Introdução

Há mais de 50 anos sabe-se que o câncer invasor do colo do útero é precedido por lesões precursoras (BRODERS, 1932) que, se detectadas através de rastreamento adequado, resultam na prevenção e redução efetiva da prevalência desta doença (PAPANICOLAOU & TRAUT, 1941; HAKAMA, MILLER, DAY, 1986; SYRJÄNEN et al., 1990). Nas duas últimas décadas, estudos citológicos, histológicos, epidemiológicos e moleculares identificaram o papilomavírus humano (HPV) como o agente transmissor responsável pelas neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC) e cânceres invasores do colo uterino (MEISELS, FORTIN, ROY, 1977; SYRJÄNEN et al., 1988; ZUR HAUSEN, 1990; BOSCH et al., 1993; SCHIFFMAN et al., 1993; BECKER et al., 1994; ELUF-NETO et al., 1994; REMINK et al., 1995; MUÑOZ & BOSCH, 1997; RICHART et al., 1998).

A distribuição geográfica dos diferentes tipos virais, classificados de alto e baixo risco oncológico, não é uniforme e esta variabilidade pode explicar as diferentes taxas de incidência de câncer cervical nas várias regiões (BOSCH et al., 1995). Mesmo sendo difícil estimar a prevalência de infecção por HPV,

dados atuais sugerem que, nos Estados Unidos, verrugas genitais clinicamente visíveis estão presentes em aproximadamente 1% dos adultos sexualmente ativos e ainda que 15% têm infecção subclínica (KOUTSKY, 1997). Esta infecção é muito comum em mulheres jovens sexualmente ativas, porém, muitas vezes é transitória e a persistência e evolução desta infecção são os principais fatores causais da carcinogênese do colo uterino (HILDESHEIM et al., 1994; HO et al., 1995; REMINK et al., 1995; LONDESBOROUGH et al., 1996). Entretanto, fatores de risco para infecção por HPV, sua incidência e duração continuam a ser investigados sendo que fatores como idade precoce ao início da atividade sexual, tabagismo, uso de anticoncepcional hormonal e multiparidade são apontados como cofatores na evolução da infecção viral para a neoplasia intra-epitelial cervical (BRINTON et al., 1986; KOUTSKY et al., 1992; MUÑOZ et al., 1993; SCHNEIDER, 1993; CUZICK et al., 1994; HO et al., 1998; ROTELI-MARTINS et al., 1998).

A maioria das infecções por HPV de alto risco oncológico, no epitélio escamoso cervical, parece regredir espontaneamente sem nenhuma intervenção terapêutica, provavelmente como resultado da interação entre o vírus e o hospedeiro (ÖSTÖR, 1993; HILDESHEIM et al., 1994; HO et al., 1995; HERRINGTON & WELLS, 1997). Entretanto, não está claro porque algumas mulheres apresentam lesões que regredem espontaneamente, enquanto outras têm persistência da infecção ou progridem para um processo neoplásico (ÖSTÖR, 1993; SYRJÄNEN, 1997).

O HPV é um DNA-vírus que, para se estabelecer no epitélio, infecta células em mitose ativa, explicando porque a maioria dos carcinomas, tanto escamosos quanto glandulares do colo uterino, iniciam-se na zona de junção escamo-colunar, junto à zona de transformação imatura. Neste ponto, o HPV alcança as células das camadas mais profundas, basal e parabasal, do epitélio metaplásico. Quando o vírus infecta uma célula epitelial em processo de divisão celular, pode resultar em uma infecção latente e a replicação do vírus irá acompanhar o ciclo celular (SCHNEIDER & KOUTSKY, 1992). Durante uma infecção produtiva encontram-se pequenas quantidades de vírus nas camadas basais e parabasais das células, mas esse número de partículas aumenta progressivamente conforme a maturação celular se processa, até que, na superfície do epitélio, o núcleo possa estar completamente substituído pelas partículas virais (RICHART et al., 1998).

Essas células, infectadas de forma latente, têm uma morfologia normal e o vírus parece não interferir na divisão celular. Entretanto na infecção replicativa, esse processo é acompanhado de alterações morfológicas (RICHART et al., 1998) caracterizadas por alterações celulares, que são conhecidas como *efeitos citopáticos* do HPV em células epiteliais escamosas, como a coilocitose, o aumento nuclear, a disqueratose, a multinucleação e até alterações mais acentuadas (KADISH et al., 1992; HERRINGTON, 1994).

As alterações celulares provocadas pelo HPV foram inicialmente descritas em estudos de citologia cervical e, mais tarde, correlacionadas com

achados histopatológicos compatíveis com replicação viral ativa (KOSS & DURFEE, 1956; CREAGH et al., 1995; DIAS, GOUVÊA, EYER, 1997). As lesões morfológicas relacionadas às alterações citopáticas provocadas por HPV são freqüentemente diagnosticadas e identificadas em lesões com diferentes estágios de evolução (COTRAM, KUMER, ROBBINS, 1989; FU & REAGAN, 1989; MAEDA et al., 1997; ABADI et al., 1998).

Fundamental para a atual compreensão do significado da coilocitose foi a publicação de MEISELS & FORTIN (1976) que relacionaram os achados de amostras citológicas com as respectivas biópsias de lesões condilomatosas visíveis à colposcopia. Nesse estudo foram destacados os parâmetros atualmente considerados como *critérios clássicos* para diagnóstico citológico de infecção por HPV: células disqueratóticas, halo perinuclear, núcleos aumentados com bi ou multinucleação e hipercromasia. Entretanto, outros autores descreveram a presença de binucleação ou multinucleação como característica secundária (NAIB & MASUKAWA, 1961) ou como um sinal não-clássico (SCHNEIDER et al., 1987).

Estudos realizados com microscopia eletrônica descreveram partículas virais com forma e tamanho compatíveis com HPV em células coilocitóticas e disqueratóticas. Tais achados sugeriram que essas células poderiam ser consideradas como marcadores para HPV (COLEMAN et al., 1977; DELLA TORRE et al., 1978).

Uma infecção latente pode ser convertida em uma infecção replicativa, entretanto, o fator iniciador desta conversão não é conhecido (HATCH, 1994). Indivíduos fisiologicamente imunodeprimidos, como em uma gestação, ou patologicamente, como na síndrome da imunodeficiência adquirida, apresentam um maior risco de infecções replicativas. Quando o estado imunossupressor cessa, como no pós-parto, a infecção torna-se novamente latente (VERNON, HOLMES, REEVES, 1995).

Quando uma lesão progride de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) grau 1 para NIC 2 e 3, esse processo é acompanhado por alterações na interação entre o vírus e o hospedeiro, que são os fatores críticos na formação da neoplasia. Apesar de controversa, estas alterações são comumente precedidas pela integração do DNA-vírus no cromossoma do hospedeiro (CULLEN et al., 1991).

O acesso do vírus às células da camada basal do epitélio cervical ainda não está definitivamente esclarecida. Acredita-se que a abrasão do epitélio ou microlesões da mucosa, causadas por outros processos inflamatórios, que não o HPV, possam ser as vias preferenciais de entrada. As células basais e parabasais, cujos núcleos contêm o DNA do vírus HPV, não permitem a multiplicação virótica. A replicação do HPV e a expressão dos genes com a conseqüente síntese protéica estão intimamente relacionadas com diferenciação e posterior queratinização da célula epitelial infectada. Somente certos tipos de células podem manter a produção viral vegetativa. Células que não mantêm o vírus vegetativo, são denominadas *não permissivas*, ou *não transformantes*

(HERRINGTON, 1994). Ao longo de sua diferenciação, as células epiteliais tornam-se *permissivas* à multiplicação do DNA virótico (ZUR HAUSEN, 1994).

As infecções transitórias não levam a integração do DNA viral ao genoma humano e, conseqüentemente, não causam dano celular. Ao contrário, a persistência e a alta carga viral acarretam a ruptura do sistema de vigilância imunológica, levando à imortalização e ao dano celular do hospedeiro. A falha dos mecanismos celulares levaria a uma proliferação descontrolada das células, acarretando o aparecimento da NIC grau 2 e 3 e do câncer invasor (HILDESHEIM et al., 1994; ZUR HAUSEN, 1994; ODUNSI et al., 1995).

A infecção genital por HPV e sua interação com o hospedeiro apresenta duas principais conseqüências biológicas que são: a) Todos os tipos virais que infectam o trato anogenital podem induzir a lesões de baixo grau, as quais são morfologicamente correlacionadas com infecção produtiva, e b) Raramente induzem a lesões proliferativas de alto grau, que são as mais próximas citohistologicamente do câncer invasor (RICHART et al., 1998).

Baseado em dados clínicos, epidemiológicos e de biologia molecular, um conjunto de HPV é considerado como agente etiológico do câncer cervical e seus precursores (NIC). Entretanto, o potencial neoplásico apresenta variações dependendo do tipo viral, e a grande maioria do HPV que infecta o colo uterino tem potencial oncogênico (SYRJÄNEN, 1997; RICHART et al., 1998). Atualmente sabe-se que 5% a 20% das mulheres sexualmente ativas mostram positividade para alguns dos testes mais sensíveis de detecção de infecção pelo HPV.

Apesar da associação entre câncer invasor do colo do útero e esta infecção, a grande maioria das mulheres infectadas pelo HPV não vai evoluir para doença invasora: cerca de 60% daquelas com NIC 1 irão apresentar regressão espontânea, 30% podem apresentar persistência da lesão como tal e, das demais, menos de 10% irão evoluir para NIC 3, sendo a progressão para câncer invasor estimada em 1% (ÖSTÖR, 1993).

As infecções persistentes e com alta carga viral, principalmente pelos vírus de alto risco oncológico, tais como os tipos 16, 18, 45 e 56, além do 31, 33, 35, 39, 51 e 52, parecem estar relacionadas ao aparecimento de NIC 2 e 3 e câncer invasor (LORINCZ et al., 1992). Já os vírus do tipo de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44) apresentam uma maior prevalência em condilomas e NIC 1, com altas taxas de regressão (LORINCZ et al., 1992; HERRINGTON et al., 1995).

Apesar desta diferenciação em alto e baixo risco, estudos de hibridizações cruzadas, detectaram a presença de ambos os tipos, tanto em lesões consideradas de baixo grau, quanto nas de alto grau (PLUMMER et al., 1998; SOUTHERN, GRAHAM, HERRINGTON, 1998). Isto indica que não é suficiente a demonstração da infecção por HPV e nem a diferenciação do tipo viral para a caracterização do grau da lesão intra-epitelial cervical. Entretanto, a integração do vírus está associada com NIC 2 e 3 e câncer invasor do colo uterino, sugerindo que a demonstração da integração viral pode contribuir para prever quais as lesões que irão progredir para a malignidade (HERRINGTON & WELLS, 1997; LIZARD et al., 1998).

As alterações histológicas associadas com uma infecção produtiva por HPV são classificadas como NIC 1 ou NIC 2 ou 3. Colposcopicamente, essas lesões se manifestam na forma de condilomas acuminados ou como condiloma plano (lesões esbranquiçadas planas), particularmente no colo e na vagina, após aplicação de ácido acético (MOSCICKI et al., 1992; SCHNEIDER & KOUTSKY 1992; RICHART et al., 1998).

Por outro lado, a maior limitação da colpocitologia oncológica, mesmo associada à biópsia para observação dos achados histológicos, é que os critérios morfológicos são incapazes de prever a progressão para câncer invasor na paciente com neoplasia intra-epitelial, sendo que provavelmente pelo menos 10% de todas as mulheres com NIC 2 ou 3 desenvolverão câncer invasor, se não forem adequadamente tratadas (KOSS, 1989). Conseqüentemente, são realizados tratamentos exagerados em mulheres com exames colpocitológicos e histológicos alterados. Existe, portanto, grande interesse na procura de marcadores que possam definir a história natural da neoplasia intra-epitelial cervical e detectar a verdadeira lesão da doença maligna (HILDESHEIM et al., 1994; HO et al., 1995; REMMINK et al., 1995; LONDESBOROUGH et al., 1996).

As técnicas de patologia molecular, desenvolvidas a partir dos anos 80, estabeleceram padrões mais objetivos para validar os critérios citomorfológicos de infecção por HPV. ZUR HAUSEN et al. (1974) foram os primeiros a utilizar a hibridização molecular para detectar seqüências de DNA viral em tumores humanos e sugeriram a existência de diferentes tipos dentro do grupo de HPV. GISSMANN & ZUR HAUSEN (1976) demonstraram a pluralidade dos vírus

existentes, através do mapeamento genético, que poderiam permitir a caracterização tipo-específico. As mulheres nas quais se detecta DNA-HPV de alto risco oncológico apresentam 70% de chance de ter seu esfregaço cervical anormal nos dois anos subseqüentes (MUÑOZ, BOSCH, KALDOR, 1988; SYRJÄNEN et al., 1988; ZUR HAUSEN, 1990; BOSCH et al., 1993; SCHIFFMAN et al., 1993; BECKER et al., 1994; ELUF-NETO et al., 1994; REMINK et al., 1995).

Sabe-se que proteínas específicas, codificadas por áreas conhecidas de genes virais, podem ser detectadas através de técnicas imuno-histoquímicas. Os métodos de imuno-histoquímica podem ser realizados tanto em esfregaços celulares quanto em cortes histológicos, sendo a peroxidase e antiperoxidase os mais utilizados (STERNBERGER et al., 1970). Entretanto, os próprios ácidos nucléicos do gen viral podem ser identificados mediante hibridização molecular, seja pelo método de Southern (SOUTHERN, 1975), por hibridização *in situ* (NUOVO, FRIDMAN, RICHART, 1990), pela reação em cadeia de polimerase (DE VILLIERS et al., 1992), ou ainda mais recentemente, pela captura de híbridos (LÖRINCZ et al., 1992).

As reações de hibridização molecular de ácidos nucléicos baseiam-se na especificidade das ligações químicas entre as seqüências conhecidas de ácidos nucléicos (sondas) e da amostra em teste. As sondas confeccionadas para pesquisa são fitas simples de seqüências de bases nitrogenadas, constituídas à semelhança de um determinado fragmento de DNA-alvo. Esta ligação, de seqüência de nucleotídeos que exibem bases homólogas (C-G e A-T em

ligações DNA-DNA ou A-U em ligações DNA-RNA), é exatamente a formação de dupla fita híbrida (uma fita de ácido nucléico-alvo que passa a se ligar com a fita-sonda introduzida na reação). Daí o termo hibridização molecular (ALBERTS et al., 1989; ALVES, 1996).

A captura de híbridos (*Digene Diagnostics Inc.*), método desenvolvido por LÖRINCZ et al. (1992), tem como virtudes laboratoriais a acuidade diagnóstica, com bons índices de sensibilidade e especificidade, o tempo reduzido (cinco a seis horas) de realização das provas e a relação custo-benefício (ALVES, 1996). Apresenta ainda a vantagem de estar disponível na forma de *kits* padrões e mostra utilidade prática na avaliação das mulheres com alterações colpocitológicas sugestivas de NIC (LÖRINCZ, 1997).

O método baseia-se em uma hibridização molecular convencional, onde diferentes tipos de soluções de sondas não radioativas de ácidos ribonucleicos ou desoxirribonucleicos são colocados a reagir com amostras desnaturadas que contêm o DNA pesquisado em dois tubos: um com sondas homólogas a genótipos de HPV de baixo risco oncogênico (6, 11, 42, 43 e 44), e outro com sondas homólogas aos tipos de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 e 56) (FERENCZY, 1995). Atualmente, os exames realizados por captura de híbridos são realizados em microplacas semelhantes às reações imunoenzimáticas tipo Elisa, de procedimento rápido e leitura confiável, antecipando uma estratégica possibilidade de estudo de HPV em grandes amostras. Apresentam uma significativa diminuição do tempo de preparo, em torno de três horas, uma expressiva melhoria da sensibilidade das reações e

são aplicáveis em aparelhos usualmente utilizados na rotina dos laboratórios de patologia clínica (FERRIS et al., 1998).

Estudos clínicos correlacionam a proliferação protéica exagerada com a pior evolução das neoplasias intra-epiteliais cervicais (COOPER et al., 1991), tornando importante a detecção da integração do HPV na neoplasia cervical. A integração viral pode ser demonstrada de diversas maneiras no material histológico, sendo que todas requerem a destruição da morfologia do tecido e, além disso, são de técnica difícil e requer longo tempo de estudo (COOPER et al., 1991). Entretanto, a evidência morfológica da integração viral é alcançada através da técnica de hibridização *in situ* (HERRINGTON et al., 1995).

A técnica de hibridização *in situ* é, dentre as hibridizações moleculares, a única que permite a localização tecidual e até intracelular de seqüências nucleotídicas de vírus. Esta propriedade possibilitou a correlação da positividade das reações com as alterações citopáticas virais, ajudando na compreensão dessas atipias. Contribuiu, igualmente, para melhorar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico morfológico, redimensionando a sua importância no estudo da história natural da infecção pelo HPV, e na evolução do processo, que pode partir desde discretas atipias até neoplasias invasoras (WAGNER et al., 1984; JOURDAN et al., 1995). O refinamento metodológico pode permitir, também, a análise diferencial do genoma viral em condição episomal ou em integração ao genoma celular (STOLER et al., 1992).

A capacidade da hibridização *in situ* em determinar a integração do DNA-HPV mesmo em biópsias parafinizadas, pode permitir investigações da regressão ou persistência deste vírus. A hibridização molecular *in situ* oferece a perspectiva de estudo de grandes séries de casos, retrospectivamente. Novos cortes de parafina de uma biópsia de interesse, ou mesmo um esfregaço citológico, previamente corados com colorações de rotina podem ser usados, desde que a amostra tenha sido disposta em lâmina com adesivo potente tipo os orgão silanizados (CHOI, 1991).

Recentemente tem sido observado, pela hibridização *in situ*, que o DNA-HPV encontra-se presente em três formas diferentes nos núcleos das neoplasias cervicais (COOPER et al., 1991; McNICOL & FARQUHARSON, 1997). Estas formas são referidas como sinais indicativos de vírus epissomal, vírus integrado ou a combinação de ambos (COOPER et al., 1991; PLUMMER et al., 1998; SOUTHERN et al., 1998).

O valor potencial da análise da infecção por HPV depende da situação em que é usada e as considerações são diferentes para a citologia e histologia, que devem ser avaliadas separadamente (HERRINGTON & WELLS, 1997). Os métodos diagnósticos das lesões induzidas por HPV são morfológicos e incluem o exame clínico, a colposcopia, a citologia oncológica e a histologia. Já a identificação da infecção por HPV propriamente dita inclui os métodos biológicos, como as hibridizações moleculares de ácidos nucléicos, tipo *Southern Blot*, captura de híbridos, hibridização *in situ* e reação em cadeia de polimerase (PCR) (ALVES, 1996).

Apesar dos critérios histopatológicos para o diagnóstico de infecção por HPV estarem bem definidos, sua aplicação pode resultar em diagnósticos e tratamentos superdimensionados com importantes implicações clínicas e custos em saúde pública (ABADI et al., 1998). Assim, a análise dos critérios para o diagnóstico histológico e sua relação com o DNA-HPV por captura de híbridos e hibridização *in situ* pretende contribuir para uma adequada compreensão da associação entre o HPV e as lesões por ele induzidas. Estes aspectos são essenciais para o desenvolvimento de estratégias efetivas para a intervenção nos programas de controle e prevenção do carcinoma do colo uterino.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Analisar os critérios histológicos associados à gravidade da lesão cervical induzida por HPV e sua relação com a reatividade do DNA-HPV através da captura de híbridos e da hibridização *in situ*.

2.2. Objetivos Específicos

1. Analisar a taxa de concordância do diagnóstico histológico através da comparação dos resultados das lâminas avaliadas por dois observadores.
2. Avaliar a relação entre cada critério histológico individual utilizado para o diagnóstico da lesão induzida por HPV e o diagnóstico histológico final da lesão cervical, com a intenção de selecionar os critérios mais úteis na prática diagnóstica de infecção e grau de lesão.

3. Avaliar a distribuição da reatividade para DNA-HPV estimada pela captura de híbridos segundo o diagnóstico histológico da lesão cervical.
4. Avaliar a distribuição da reatividade para DNA-HPV por hibridização molecular *in situ* segundo o diagnóstico histológico da lesão cervical.
5. Avaliar a relação entre cada critério histológico individual utilizado para o diagnóstico da lesão induzida por HPV com a reatividade do DNA-HPV por captura de híbridos e hibridização *in situ*.

Casutística e Métodos

3. Casuística e Métodos

3.1. Tipo de estudo

Estudo de corte transversal

3.2. Critérios e procedimentos para seleção dos sujeitos

Os sujeitos deste estudo foram selecionados entre as mulheres de 19 a 36 anos, encaminhadas para colposcopia nos Serviços de Patologia Cervical e Colposcopia do Hospital Maternidade “Leonor Mendes de Barros” (HMLMB) na cidade de São Paulo, e do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Foram excluídas as mulheres grávidas ou com término da gestação há menos de 40 dias e câncer invasor do trato genital inferior. Das 163 mulheres examinadas no período de setembro de 1995 a junho de 1997, 150 apresentavam alterações sugestivas de lesões HPV induzidas na colposcopia e foram submetidas à biópsia cervical. O projeto de pesquisa foi aprovado pelas Comissões de Pesquisa e de Ética de ambos os hospitais, e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do

Estado de São Paulo (FAPESP- nº 1750-3). Todas as mulheres aceitaram participar do estudo, após consentimento livre e informado.

3.3. Procedimentos utilizados para coleta de dados

As mulheres foram submetidas a um exame clínico cuidadoso, com inspeção dos genitais externos e região perianal para avaliação de lesões induzidas por HPV. Todas as lesões diagnosticadas foram tratadas conforme protocolo do serviço. A sequência dos exames foi realizada pela autora e obedeceu a ordem descrita a seguir.

3.3.1. Captura de híbridos

O material para captura de híbridos foi obtido com um cotonete estéril de Dacron, fornecido pela Digene Diagnostic do Brasil, usado para coleta de células do orifício externo do colo, da zona de transformação e do fundo de saco vaginal para análise de DNA-HPV. O material foi transportado em meio adequado para evitar contaminação e processado pela Digene Diagnostic do Brasil conforme protocolo do teste de primeira geração, segundo as instruções da *Digene Diagnostics Inc.* (EUA).

Consiste em uma hibridização molecular do tipo sanduíche, que usa um método de detecção por quimioluminescência. As amostras coletadas que podem conter o DNA são hibridizadas com sondas específicas de ácido ribonucleico. O híbrido resultante é capturado até a superfície de um tubo coberto por um anticorpo

anti-híbrido ácido ribonucléico/DNA. Este híbrido imobilizado reage com um anticorpo anti-híbrido conjugado com fosfatase alcalina e detectado com uma substância quimioluminescente. À medida que o substrato é separado pela fosfatase alcalina, a luz é emitida proporcionalmente à carga de DNA no material coletado e medida em unidades - *Relative Light Unit* (RLU) em um quimioluminômetro, sendo que a intensidade da luz emitida é proporcional à carga de DNA-HPV.

Para classificar o resultado da captura de híbridos e quantificar a carga viral, utiliza-se um valor de corte diário (*cut off*), sendo que as amostras com emissão de luz maior que o ponto de corte são consideradas positivas e aquelas com emissão de luz menor são consideradas negativas (SUN et al., 1995; WRIGHT et al., 1995). Neste estudo, utilizou-se sondas contendo DNA-HPV alto risco oncológico – tipo 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 e 56.

Os resultados são expressos como:

- **Negativo:** RLU abaixo do limiar *cut-off* definido para a reação do dia.
- **Positivo:** para papilomavírus de alto risco com quantificação viral acima do *cut-off* definido para a reação do dia. RLU maior ou igual a 1.

Dentre os casos positivos para alto risco oncológico, foram divididos como portadores de baixa carga viral ($1 < \text{RLU} < 20$) ou de alta carga viral ($\text{RLU} \geq 20$) (LÖRINCZ et al., 1992; COX et al., 1995).

3.3.2. Colposcopia e coleta de material para biópsia

O exame colposcópico foi realizado com aparelho da marca DF-Vascocelos, modelo CP-M7 e obedeceu às seguintes etapas:

- Limpeza das estruturas com soro fisiológico com observação do colo uterino e vagina;
- Estudo da vascularização com filtro verde;
- Embrocação do colo e da vagina com solução de ácido acético a 3%, seguida de avaliação das imagens;
- Teste de Schiller, pela aplicação de solução iodo-ioduretada;
- Biópsia com pinça Gaylor-Medina das lesões mais acentuadas, que foram submetidas à avaliação histológica e hibridização *in situ*.

Os aspectos colposcópicos encontrados foram classificados de acordo com a Nomenclatura Internacional dos Achados Colposcópicos (IFCPC) (DE PALO, 1996).

3.3.3. Avaliação histopatológica

A biópsia foi realizada sob a visão colposcópica, sendo retiradas as amostras das regiões mais alteradas. O material obtido foi fixado em solução de formol a 10% e encaminhado para o Laboratório de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, sendo então desidratado em álcool etílico, diafanizado em xilol e impregnado em parafina, à temperatura de 59°C. Após o banho, o material foi

incluído em parafina. Os 150 blocos foram cortados com micrótomo, corando-se as lâminas pelo método de hematoxilina-eosina. A análise histológica foi realizada por dois observadores, ambos patologistas experimentados, sem prévio informe de qualquer outro dado colposcópico ou virológico. Esta análise foi realizada em duas etapas, sendo que o primeiro corte do bloco foi submetido à análise do primeiro observador. Em seguida foram mais dois cortes no bloco fixado em parafina sendo um utilizado para hibridização *in situ* e o último corte para análise histológica do segundo observador. Para os casos discordantes foi estabelecido um diagnóstico de consenso através da revisão das lâminas de ambos os cortes, para se estabelecer um diagnóstico definitivo de cada caso. Dos 150 casos inicialmente selecionados para o estudo, 138 blocos foram adequados para avaliação dos três cortes, sendo incluídos no estudo.

Adotou-se a classificação da Organização Mundial da Saúde para catalogar os resultados (SCULLY et al., 1994) em: colo normal, cervicite, agrupados na categoria sem lesão induzida por HPV; condiloma acuminado e NIC 1, agrupados na categoria NIC 1; NIC 2 e NIC 3 agrupados na categoria NIC 2 ou 3.

3.3.3.1 Critérios morfológicos avaliados em cada caso

Além do diagnóstico histopatológico, as 138 amostras foram consideradas para descrição dos critérios histológicos individuais, por um dos observadores (VAFA). Foi assim avaliada a relação entre cada alteração individualmente com

a presença (ou não) da infecção viral e a gravidade da lesão cervical histológica (Figuras de 1 a 6). Foram descritas as presenças de:

- Binucleação;
- Multinucleação;
- Células com atipia nuclear mínima: esboço de coilocitose;
- Coilocitose: sinal clássico de infecção por HPV;
- Coilocito fusiforme;
- Mitose aberrante;
- Disqueratose;
- Paraceratose.

Cada um destes critérios foi pontuado em ausente (0), presença leve (1), moderada (2) e acentuada (3) (ANEXO 1). Com finalidade de análise estatística, foram reclassificados em duas categorias: presente e ausente.

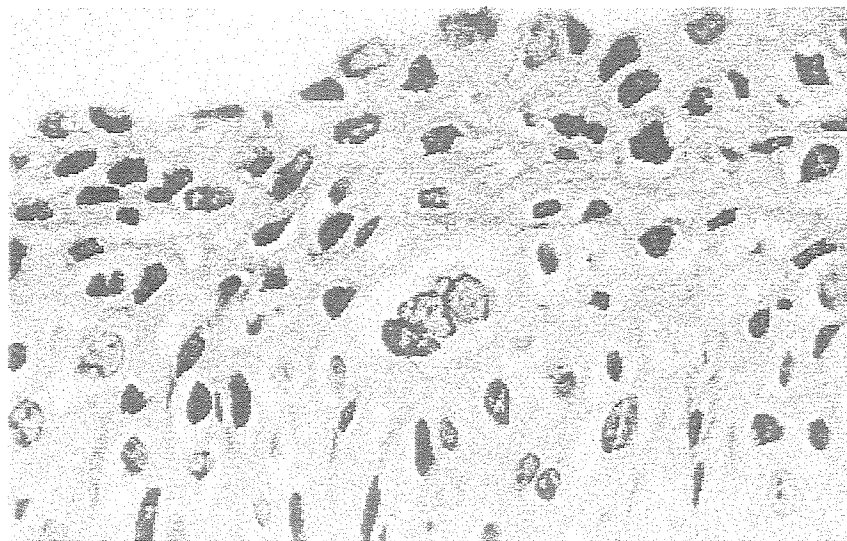


Figura 1. Fotomicrografia de lesão induzida por HPV (NIC 2): área com células exibindo multinucleação e binucleação (H/E x 600)

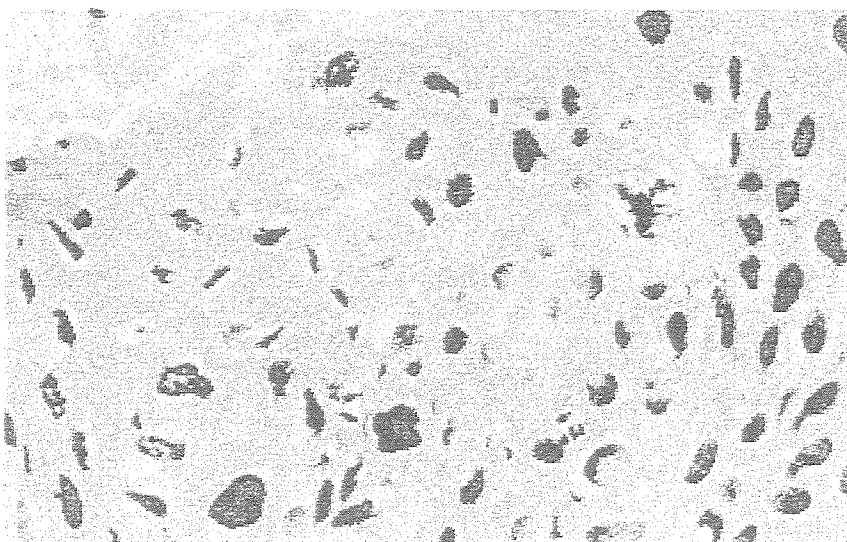


Figura 2. Fotomicrografia de lesão induzida por HPV (NIC 3): área com células exibindo mitoses aberrantes (H/E x 600)

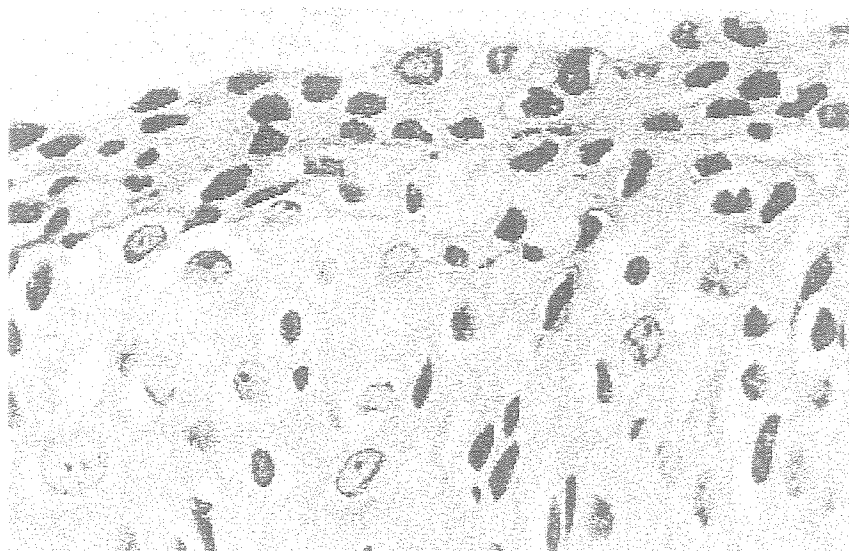


Figura 3. Fotomicrografia de lesão induzida por HPV (NIC 2): área com células exibindo coilócitos fusiformes e paraqueratose (H/E x 600)

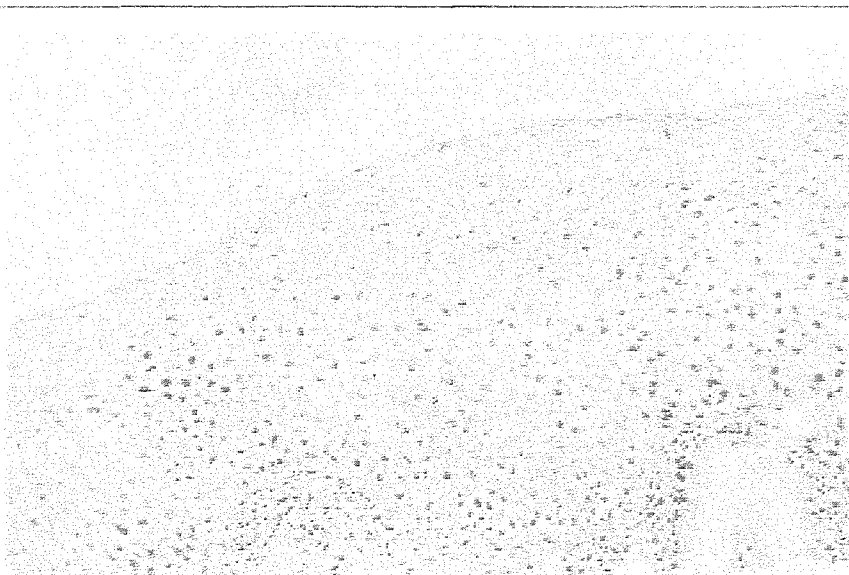


Figura 4. Fotomicrografia de lesão induzida por HPV (NIC 1): área com células exibindo coilocitose (H/E x 150)

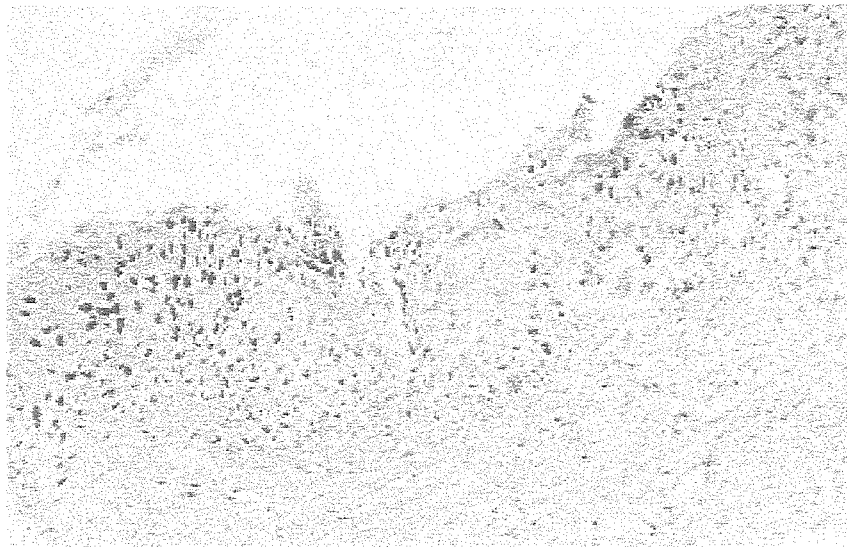


Figura 5. Fotomicrografia de lesão induzida por HPV (NIC 2): área com células exibindo disqueratose e mitoses aberrantes (H/E x 150)

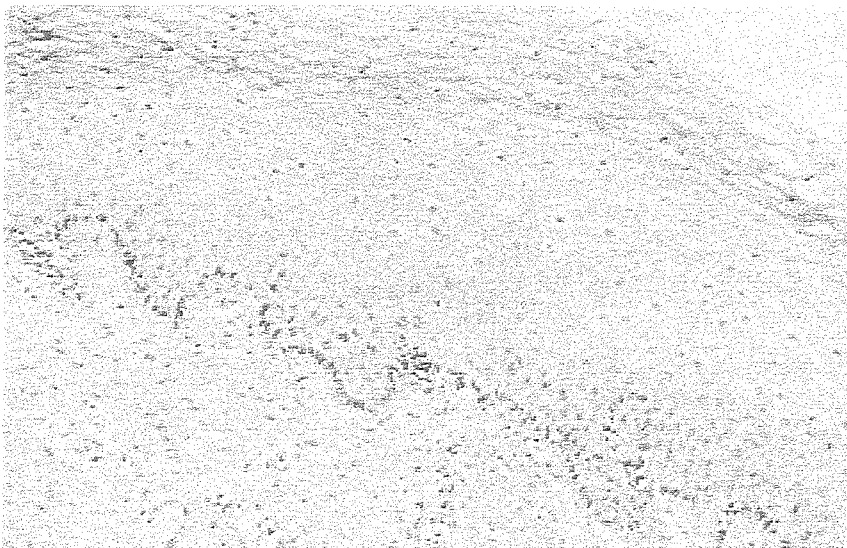


Figura 6. Fotomicrografia de lesão não induzida por HPV (cervicite): área com células exibindo paraqueratose (H/E x 150)

3.3.4. Hibridização *in situ*

3.3.4.1 Padronização de Reação e Seleção dos Sistemas de Amplificação

A técnica empregada de hibridização *in situ* compreendeu o sistema de detecção de HPV *genérico* (de largo espectro) (DAKO) com amplificação pelo sistema de catalisação da biotinil-tiramida (CSA-DAKO). O amplo espectro deste teste detecta tipos 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51 e 52. A metodologia usada foi a padronizada no Instituto Adolfo Lutz, conforme publicado por SANTOS et al. (1995).

A partir dos blocos de parafina contendo tecido das biópsias, foram efetuados cortes de três micrômetros, distribuídos em lâminas pré-incubadas com adesivo organo-silano. O conjunto de lâminas foi submetido às seguintes etapas:

- A) Desparafinização.
- B) Digestão do tecido.
- C) Denaturação e hibridização.
- D) Lavagem rigorosa.
- E) Desidratação e montagem das lâminas.

O estudo de hibridização molecular para DNA-HPV de amplo espectro foi considerado positivo quando do encontro de núcleos de queratinócitos inequivocamente marcados, contrastando com fundo suficientemente limpo, sem marcação do citoplasma de queratinócitos ou de qualquer das demais estruturas teciduais. A reação foi considerada negativa na ausência de núcleos

de queratinócitos marcados, estando o fundo suficientemente limpo no citoplasma de queratinócitos e em todas as demais estruturas teciduais e estando adequadamente corado o núcleo dos queratinócitos das lâminas- controle de reação.

3.3.4.2 Tipagem viral

Os casos positivos para o sistema de detecção de amplo espectro, foram submetidos a nova bateria de testes com sondas específicas para detectar DNA-HPV de baixo risco (6/11), intermediário (31/33) e alto risco (16, 18). As provas foram realizadas sob condições de alta estrigência e obedeceram ao protocolo fornecido pelo fabricante (*DAKO Corporation, USA*).

O uso deste sistema permitiu a detecção de reatividade em núcleos de colócitos, mas também em vários queratinócitos de camadas intermediárias (Figuras 7 e 8). As reações foram classificadas em reativas para o tipo específico (6/11, 31/33, 16 e 18) e não-reativas para o tipo específico, porém positivas para o amplo espectro (0) (ANEXO 1).

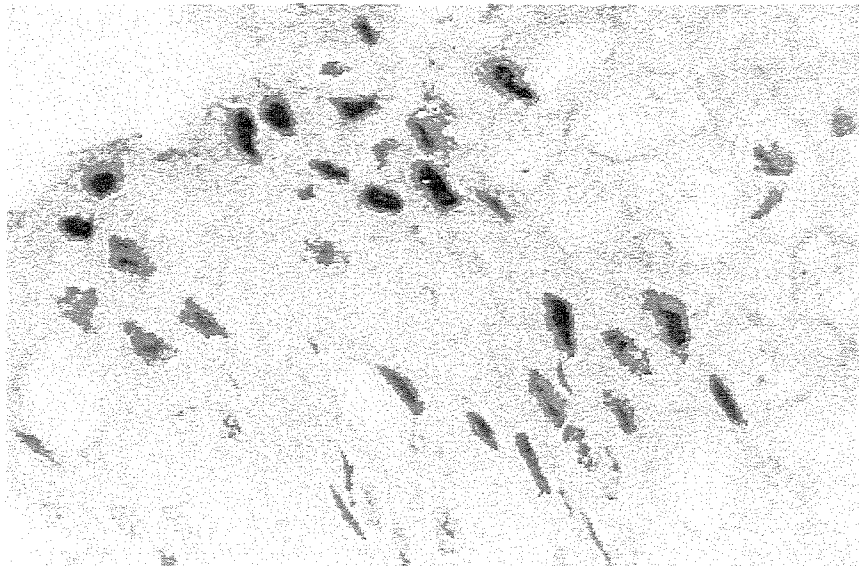


Figura 7. Fotomicrografia de diversos queratinócitos, vários dos quais com coilocitos fusiformes, mostram positividade nuclear, em castanho, para DNA-HPV tipo 16 (HIS/CSA x 600)

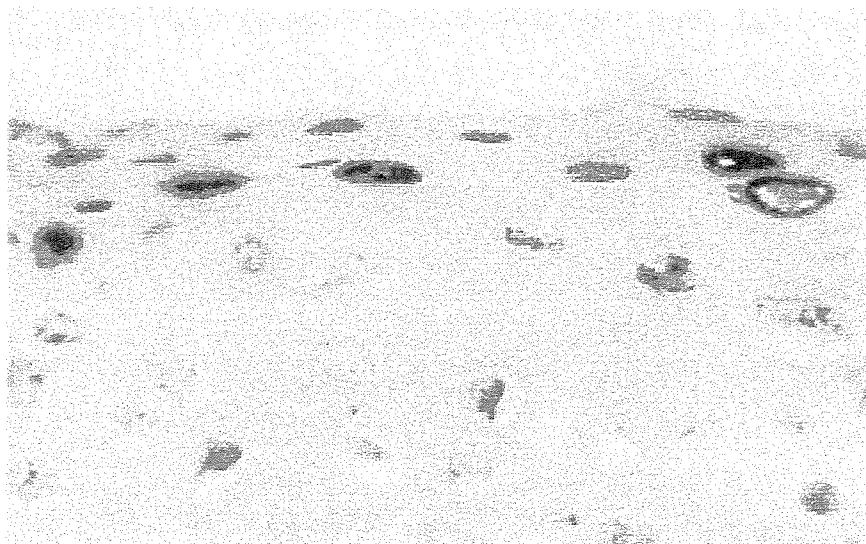


Figura 8. Fotomicrografia de diversos queratinócitos, vários dos quais com células com coilocitose, mostram positividade nuclear, em castanho, para DNA-HPV tipo 18 (HIS/CSA x 600)

3.4. Processamento de dados e análise estatística

Com a finalidade de registrar em meio eletrônico todas as variáveis envolvidas neste estudo, utilizou-se o gerenciador de banco de dados DBASE IV. Em seguida, o arquivo gerado foi transportado para o programa SAS versão 6.12 (*SAS Institute Inc.*, Cary, NC) para a realização da análise estatística. Para estudar as diferenças entre os critérios histológicos foram estimadas a prevalência e a razão de prevalência (RP), com intervalo de confiança de 95% ajustado por série de Taylor (KLEINBAUM, KUPPER, MORGENSTERN, 1982.). Nos casos em que a frequência de mulheres com determinada característica foi igual a zero na amostra, não sendo possível a estimativa da razão de prevalência, foi estimada somente a prevalência de cada um dos outros níveis da variável em questão. Para avaliar o comportamento (em tendências lineares) das frequências relativas da captura de híbridos e da hibridização *in situ*, também foi utilizado o teste de Cochran-Armitage. Para comparar a análise dos observadores e os dois testes foram realizados os testes de pares concordantes e discordantes de McNemar para avaliar a concordância e o coeficiente kappa, para quantificar esta concordância (LANDIS & KOCH, 1977).

3.5. Aspectos éticos

As mulheres convidadas a participar do estudo foram esclarecidas sobre a sua participação, conforme consta no Termo de Consentimento Informado (ANEXO 2). Foram respeitados os princípios para pesquisa humana enunciados pela DECLARAÇÃO DE HELSINK, 1990. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas (DTG/FCM) da Universidade Estadual de Campinas e pela Comissão de Ética do Hospital Leonor Mendes de Barros.

4. Resultados

4.1. Avaliação da taxa de concordância dos diagnósticos histológicos

A concordância absoluta ocorreu em 98 casos (71%), sendo a variação de mais ou menos um grau detectada em 34 casos (25%) e a divergência superior a um grau em seis casos (4%). Pode-se observar na diagonal representada pelas caselas azul da TABELA 1 a concordância absoluta entre o diagnóstico dado pelos dois observadores em diferentes cortes. As caselas verde, vizinhas desta diagonal, representam os casos com apenas um grau de discordância. Através da interpretação das caselas amarelas verificou-se que dos 25 casos classificados como NIC 2 na lâmina avaliada pelo observador 1, dois foram classificados como ausência de lesão induzida por HPV na lâmina avaliada pelo observador 2.

Apenas um caso, representado pela casela laranja, mostrou uma imensa discordância entre as lâminas avaliadas pelos dois observadores, tendo sido classificado como NIC 3 pelo observador 1 e ausência de lesão induzida por HPV pelo observador 2 (TABELA 1). Para os casos discordantes, a revisão dos

dois cortes das lâminas, em conjunto, pelos dois observadores, estabeleceu um diagnóstico histológico de cada caso, apresentado individualmente no ANEXO 1. Assim, para as demais análises o diagnóstico definitivo foi: ausência de lesão induzida por HPV - 32 casos; NIC 1 - 62 casos; NIC 2 - 27 casos e NIC 3 - 17 casos.

TABELA 1
COMPARAÇÃO DO DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

Observador 2	Observador 1				Total
	Sem lesão induzida por HPV	NIC 1	NIC 2	NIC 3	
Sem lesão induzida por HPV	19	10	2	1	32
NIC 1	6	54	2	0	62
NIC 2	2	9	15	1	27
NIC 3	0	1	6	10	17
TOTAL	27	74	25	12	138

Coeficiente kappa=0,638 IC 95 % (0,533 - 0,743) (Landis & Koch, 1977)

Resultados

4.2. Relação entre os critérios histológicos individuais e o diagnóstico histológico final

Observou-se na TABELA 2 e Figura 9 que a mitose aberrante e a multinucleação são achados exclusivos da NIC, não sendo encontradas em biópsias com ausência de lesão induzida por HPV. Verificou-se que, entre as biópsias com NIC, a mitose aberrante foi um achado freqüente em mulheres com NIC 2 ou 3, sendo encontrada em 35/44 casos e a multinucleação em apenas 23/44 casos. Estes achados foram menos freqüentes na NIC 1; 2/62 casos de NIC 1 apresentaram mitose aberrante e 1/62 caso de NIC 1, multinucleação. Nenhum caso de NIC 1 apresentou mitose aberrante e multinucleação juntos e, mitose aberrante e multinucleação isoladas apareceram apenas em dois e em um caso de NIC 1, respectivamente. Nos casos diagnosticados como NIC 2 ou 3, os dois aspectos morfológicos estiveram presentes concomitantes em quase 50%. Porém, sete casos (16%) com NIC 2 ou 3 não apresentaram nem mitose aberrante nem multinucleação (Figura 9). Mesmo assim, a prevalência da mitose aberrante e da multinucleação apresentaram um risco consistente, sendo importantes marcadores para lesões mais acentuadas.

Na TABELA 2 verificou-se também que vacúolos celulares com atipia nuclear mínima, estiveram presentes na maioria das biópsias avaliadas. Não foi, portanto, um critério importante para diferenciar mulheres sem lesão induzida por HPV daquelas com NIC 1, NIC 2 ou 3, assim como também não diferenciou a gravidade da neoplasia intra-epitelial.

TABELA 2

ESTIMATIVA DE RISCO SEGUNDO A PRESENÇA DE BINUCLEAÇÃO, MULTINUCLEAÇÃO, MITOSES ABERRANTES E ATIPIA NUCLEAR MÍNIMA EM RELAÇÃO AO DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO FINAL

Diagnóstico histológico	Binucleação			Multinucleação			Mitose aberrante			Atipia mínima		
	+/-	RP	IC (95%)	+/-	P	IC (95%)	+/-	P	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)
Sem lesão	4/28	ref	ref	0/32	ref	ref	0/32	ref	ref	24/8	ref	ref
NIC 1	40/22	5,2	(2,0-13,1)	1/61	0,0*	*	2/60	0,0*	*	61/1	1,3	(1,0-1,6)
NIC 2 ou 3	41/3	7,4	(2,9-18,7)	23/21	0,5*	*	35/9	0,8*	*	43/1	1,3	(1,0-1,6)
TOTAL	85/53			24/114			37/101			128/10		

- Como a prevalência no grupo de referência foi zero, não foi possível calcular a RP portanto, foi mantida nestes casos, uma estimativa da prevalência (P).

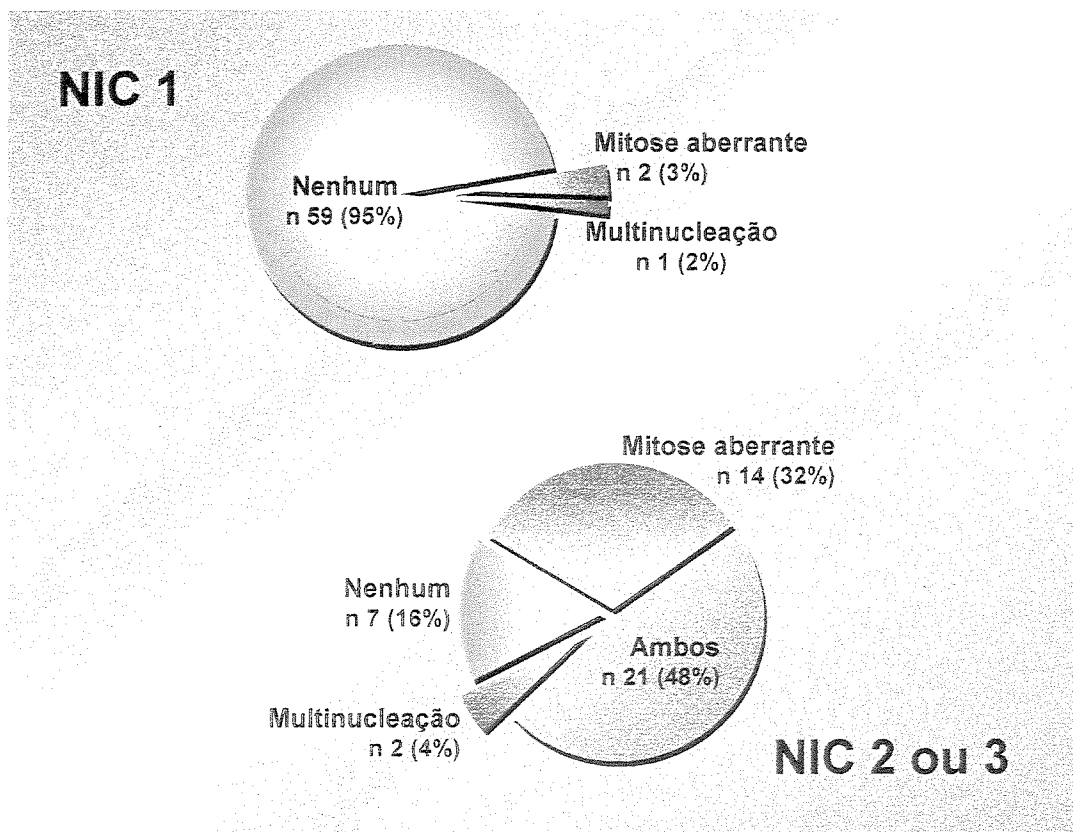


Figura 9. Relação entre as mitoses aberrantes e a multinucleação com o diagnóstico histológico final

Na TABELA 3, observou-se que a colicitose e o colócito fusiforme apresentaram risco significativo em relação à presença de lesão induzida por HPV, diferenciando bem as mulheres sem lesão daquelas com NIC. A ausência de significância da colicitose nos diversos graus de NIC demonstrou ser, a colicitose, um marcador genérico de efeito citopático de HPV. Já a disqueratose apresentou-se como um excelente marcador para diferenciar as mulheres sem lesão das com lesão mais grave. Também a paraceratose, presente apenas em 3/32 casos sem lesão induzida por HPV, apresentou-se como melhor indicador para diferenciar as mulheres sem lesão das com NIC 2 ou 3, do que das mulheres com NIC 1.

TABELA 3

ESTIMATIVA DE RISCO SEGUNDO A PRESENÇA DE COILOCITOSE, COILÓCITO FUSIFORME, DISQUERATOSE, PARACERATOSE EM RELAÇÃO AO DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO FINAL

Diagnóstico histológico	Coilocitose			Coilocito fusiforme			Disqueratose			Paraceratose		
	+/-	RP	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)
Sem lesão	2/30	ref	ref	1/31	ref	ref	4/28	ref	ref	3/29	ref	ref
NIC 1	56/6	14,6	(3,8-56,3)	37/25	19,0	(2,7-132,8)	25/37	3,2	(1,2-8,5)	29/33	4,9	(1,6-15,1)
NIC 2 ou 3	43/1	15,6	(4,0-59,9)	39/5	28,3	(4,1-195,8)	40/4	7,2	(2,9-18,3)	27/17	6,5	(2,2-19,7)
TOTAL	101/37			77/61			69/69			59/79		

A Figura 10 oferece aspecto visual do conjunto dos critérios e demonstra que a multinucleação e as mitoses aberrantes são marcadores de lesão de alto grau, mostrando-se raras em casos menos graves. A binucleação, a coilocitose e o coilocito fusiforme são achados muito mais freqüentes nas amostras com diagnóstico de NIC que naquelas sem lesão. Por outro lado, os vacúolos celulares com atipia nuclear mínima foram encontrados com muita freqüência tanto em espécimes classificados como ausência de lesão induzida por HPV como naqueles com NIC. A disqueratose e a paraceratose não foram marcadores que discriminaram as mulheres sem lesão das com NIC, mas dentro da NIC apresentaram-se consideravelmente mais freqüentes nas lesões mais graves.

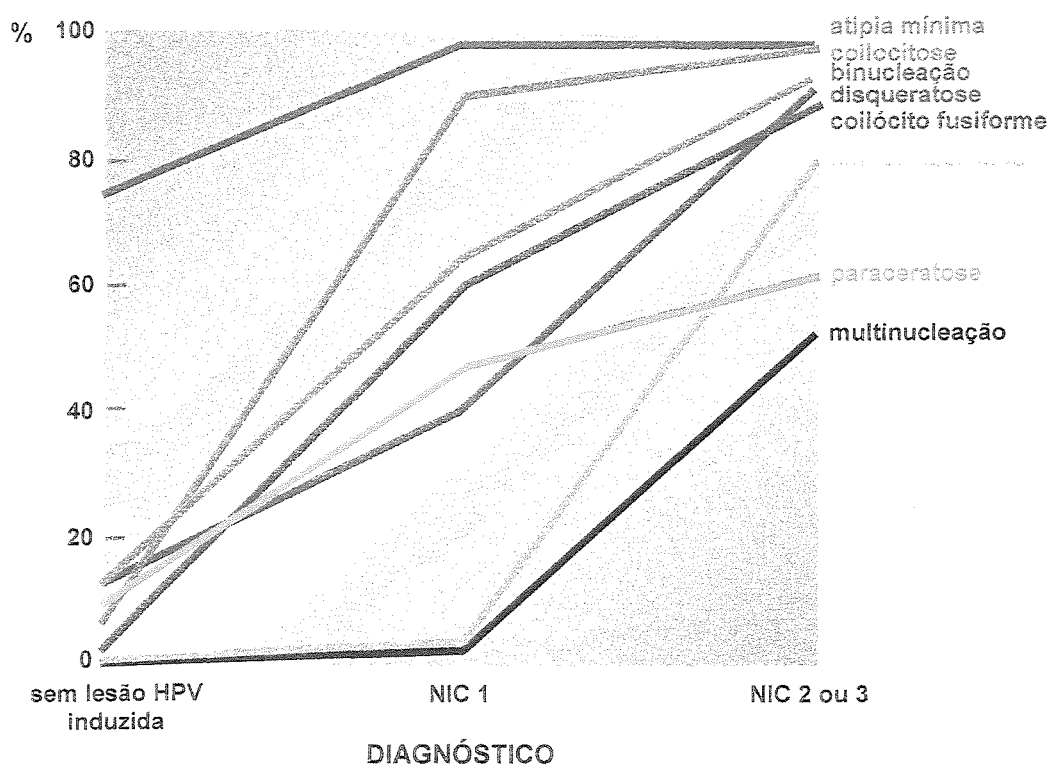


Figura 10. Distribuição dos aspectos morfológicos segundo a gravidade da lesão cervical

4.3. Distribuição da reatividade para DNA-HPV por captura de híbridos e por hibridização *in situ* e a gravidade da lesão cervical

A captura de híbridos foi reativa em 11/32 mulheres sem lesão induzida por HPV, em 24/62 mulheres com NIC 1 e em 31/44 mulheres com NIC 2 ou 3. A prevalência de reativos foi de 48%. A frequência de mulheres com captura de híbridos reativa cresceu linearmente à medida que aumentou a gravidade da lesão cervical (Teste de Cochran – Armitage), apesar da razão de prevalência não ter sido significativa para NIC1 (TABELA 4).

TABELA 4

REATIVIDADE DO DNA-HPV POR CAPTURA DE HÍBRIDOS SEGUNDO O DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

Diagnóstico histológico	Captura		RP (IC 95%)
	Reativo	Não reativo	
Sem lesão HPV induzida	11	21	Ref
NIC 1	24	38	1,1 (0,6-1,9)
NIC 2 e 3	31	13	2,0 (1,2-3,4)
TOTAL	66	72	

Teste de Cochran – Armitage $p < 0,01$

A prevalência de reatividade do DNA-HPV por HIS de amplo espectro foi de 37%. Na TABELA 5 observou-se que a reatividade por HIS foi progressiva e significativamente associada à gravidade da lesão cervical.

TABELA 5

REATIVIDADE DO DNA-HPV PELA HIS DE AMPLO ESPECTRO SEGUNDO O DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

Diagnóstico histológico	HIS de amplo espectro		RP (IC 95%)
	Reativo	Não reativo	
Sem lesão HPV induzida	4	28	Ref
NIC 1	21	41	2,7 (1,0-7,2)
NIC 2 e 3	26	18	4,7 (1,8-12,2)
TOTAL	51	87	

Teste de Cochran - Armitage $p < 0,01$

Entre os casos que foram reativos para DNA-HPV de amplo espectro pela HIS o tipo de DNA-HPV específico foi detectado em 26/51 casos. Entre estes, o mais freqüente foi o tipo 16, encontrado em dois casos sem lesão induzida por HPV, três NIC 1 e sete NIC 2 ou 3. O tipo 6/11 foi encontrado em seis casos de NIC 1 e dois casos de NIC 2 ou 3. O tipo 31/33 esteve presente

nas três categorias de biópsia e o tipo 18 foi encontrado apenas em dois casos, ambos com NIC (TABELA 6).

TABELA 6

REATIVIDADE DOS DIVERSOS TIPOS VIRAIS PELA HIS SEGUNDO
O DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

Tipo viral	BIÓPSIA		
	Sem lesão HPV- induzida	NIC 1	NIC 2 e 3
6/11	0	6	2
16	2	3	7
18	0	1	1
31/33	1	1	2
Tipo não detectado	1	10	14
Sub total	4	21	26
HIS não reativo	28	41	18
TOTAL	32	62	44

Na TABELA 7 observou-se que a reatividade do DNA-HPV por captura de híbridos e por HIS não apresentaram uma boa concordância, quando contempladas independentemente do diagnóstico histológico (coef. Kappa=0,164). Entretanto, coeficientes kappa parciais, estratificados em cada nível do diagnóstico histológico sugeriram que a concordância entre tais reatividades é radicalmente influenciada pelo diagnóstico histológico. Nas mulheres com NIC 1, o coeficiente kappa estimado foi negativo, situação que caracteriza uma completa discordância entre os fatores que foram comparados.

Nas mulheres com NIC 2 ou 3, a concordância foi desprezível (coeficiente kappa=0,067). Entretanto, na categoria das mulheres sem lesão induzida por HPV, verificou-se uma suave concordância entre as reatividades. Neste caso, o coeficiente kappa foi estimado em 0,265.

TABELA 7

COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE DO DNA-HPV POR CAPTURA DE HÍBRIDOS E POR HIS

Diagnóstico histológico	Reatividade do DNA-HPV				Coef kappa
	Captura não-reativa	Captura reativa	HIS não-reativo	HIS reativo	
Sem lesão HPV-induzida	21	11	28	4	0,265
NIC 1	38	24	41	21	-0,009
NIC 2 ou 3	13	31	18	26	0,067
TOTAL	72	66	87	51	0,164

4.4. Relação entre os critérios histológicos individuais utilizados para o diagnóstico da lesão induzida por HPV e a reatividade da captura de híbridos e da hibridização *in situ*

Nas TABELAS 8 e 9 observou-se que de todos os critérios analisados, a multinucleação (RP=4,1) assim como a mitose aberrante (RP=2,9) apresentaram maior associação com captura de híbridos positiva. Os outros critérios apresentaram uma pequena associação com a reatividade por captura de híbridos.

TABELA 8

ESTIMATIVA DE RISCO SEGUNDO A PRESENÇA DE BINUCLEAÇÃO, MULTINUCLEAÇÃO, MITOSES ABERRANTES E ATIPIA NUCLEAR MÍNIMA EM RELAÇÃO À REATIVIDADE DA CAPTURA DE HÍBRIDOS

HPV-DNA por captura de híbridos	Binucleação			Multinucleação			Mitose aberrante			Atipia mínima		
	+/-	RP	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)
Não-Reativo	38/34	ref	ref	5/67	ref	ref	10/62	ref	ref	65/7	ref	ref
Reativo	47/19	1,3	(1,0-1,8)	19/47	4,1	(1,6-10,4)	27/39	2,9	(1,5-5,6)	63/3	1,0	(0,9-1,1)
TOTAL	85/53			24/114			37/101			128/10		

TABELA 9

ESTIMATIVA DE RISCO SEGUNDO A PRESENÇA DE COILOCITOSE, COILÓCITO FUSIFORME, DISQUERATOSE E PARACERATOSE EM RELAÇÃO À REATIVIDADE DA CAPTURA DE HÍBRIDOS

HPV-DNA por captura de híbridos	Coilocitose			Coilocito fusiforme			Disqueratose			Paraceratose		
	+/-	RP	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)
Não-Reativo	47/25	ref	ref	29/43	ref	ref	26/46	ref	ref	22/50	ref	ref
Reativo	54/12	1,2	(1,0-1,5)	48/18	1,8	(1,3-2,5)	43/23	1,8	(1,3-2,6)	37/29	1,8	(1,2-2,8)
TOTAL	101/37			77/61			69/69			59/79		

À exceção da atipia nuclear mínima, todos os demais critérios histológicos mostram tendência a associação à reatividade para DNA-HPV por captura de híbridos (Figura 11).

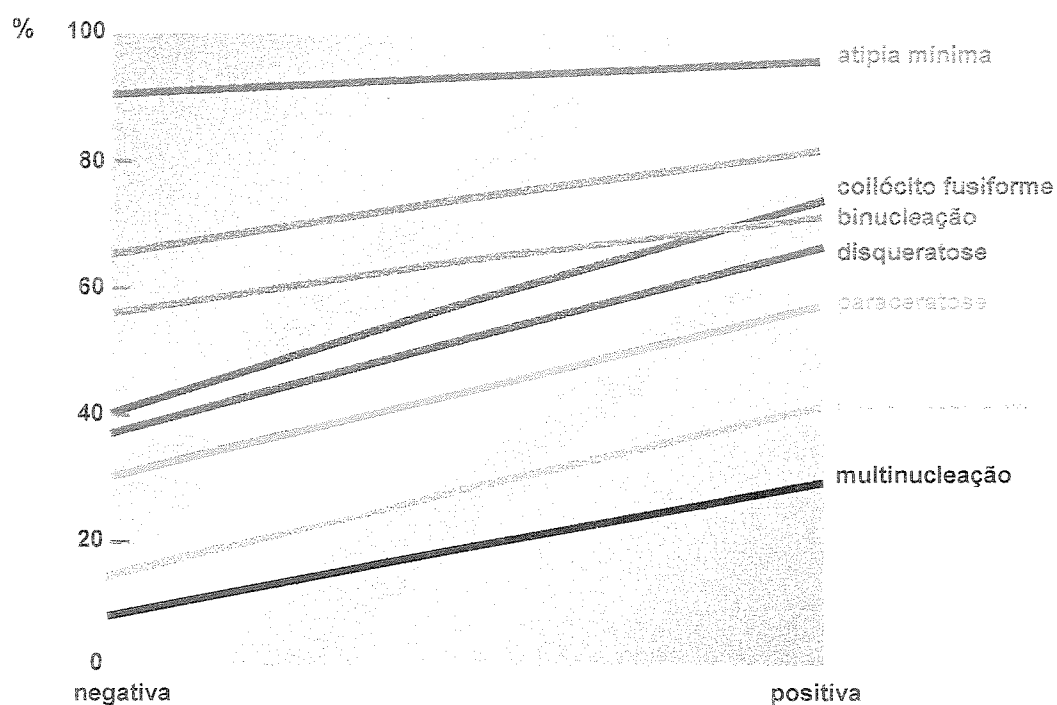


Figura 11. Distribuição dos aspectos morfológicos segundo a reatividade da captura de híbridos

Observou-se nas TABELAS 10 e 11, que a multinucleação apresentou a mais significativa associação com a reatividade da HIS de amplo espectro (RP=7,3). A mitose aberrante (RP=2,5) também apresentou uma associação importante, apesar de menor que o da multinucleação. O coilócito fusiforme, a paraceratose e a binucleação apresentaram riscos semelhantes entre si (RP=1,7; 1,8 e 1,7, respectivamente). A disqueratose e a coilocitose apresentaram um risco menor que os critérios anteriores (RP=1,5 e 1,3, respectivamente). Os vacúolos celulares com atipia nuclear mínima não apresentaram associação com a reatividade da HIS de amplo espectro (RP=1,0).

TABELA 10

ESTIMATIVA DE RISCO SEGUNDO A PRESENÇA DE BINUCLEAÇÃO, MULTINUCLEAÇÃO, MITOSES ABERRANTES E ATIPIA NUCLEAR MÍNIMA EM RELAÇÃO À REATIVIDADE DA HIS

HPV-DNA por HIS	Binucleação			Multinucleação			Mitose aberrante			Atipia mínima		
	+/-	RP	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)
Não Reativo	42/45	ref	ref	6/81	ref	ref	15/72	ref	ref	80/7	ref	ref
Reativo	43/8	1,7	(1,3-2,2)	18/33	5,1	(2,1-12,0)	22/29	2,5	(1,4-4,3)	48/3	1,0	(0,9-1,1)
TOTAL	85/53			24/114			37/101			128/10		

TABELA 11

ESTIMATIVA DE RISCO SEGUNDO A PRESENÇA DE COILOCITOSE, COILÓCITO FUSIFORME, DISQUERATOSE E PARACERATOSE EM RELAÇÃO À REATIVIDADE DA HIS

HPV-DNA por HIS	Coilocitose			Coilocito fusiforme			Disqueratose			Paraceratose		
	+/-	RP	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)	+/-	RP	IC (95%)
Não Reativo	56/31	ref	ref	38/49	ref	ref	36/51	ref	ref	28/59	ref	ref
Reativo	45/6	1,3	(1,1-1,6)	39/12	1,7	(1,3-2,3)	33/18	1,5	(1,1-2,1)	31/20	1,8	(1,2-2,7)
TOTAL	101/37			77/61			69/69			59/79		

Visualizando na Figura 12, a maior parte dos critérios apresentou-se associada à reatividade para DNA-HPV mediante hibridização *in situ*. Entretanto, os vacúolos celulares com atipia nuclear mínima não conseguem diferenciar a reatividade da HIS de amplo espectro. A multinucleação e a mitose aberrante são os critérios que melhor conseguem prever a positividade deste teste.

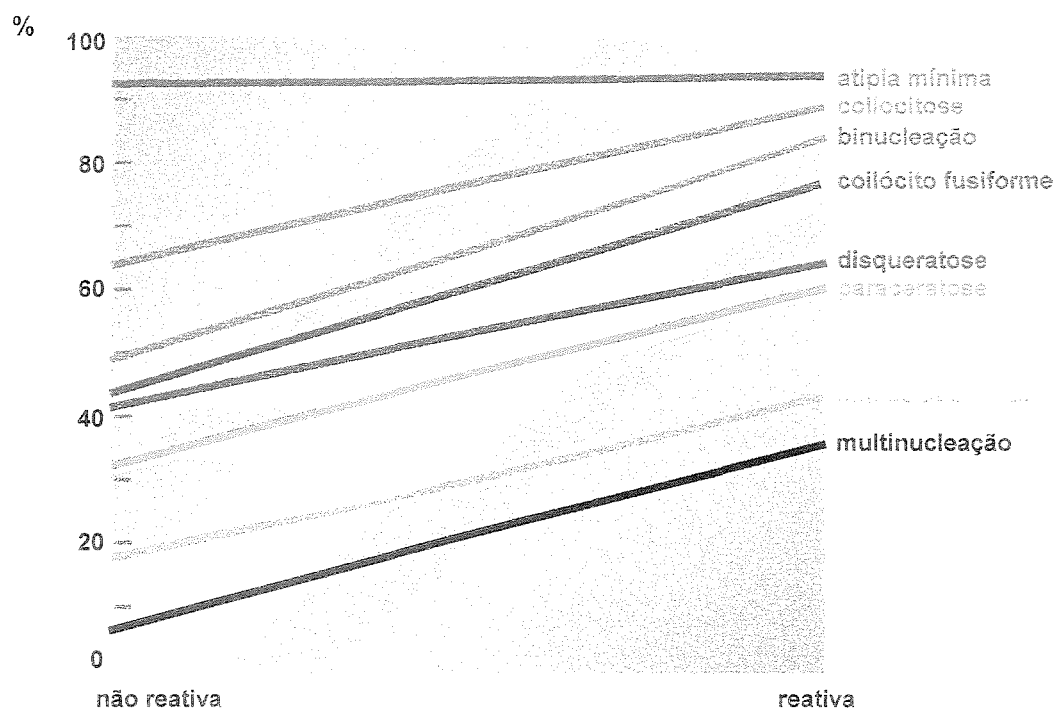


Figura 12. Distribuição dos aspectos morfológicos segundo a reatividade da HIS

Ainda que a sequência de estratificações tenha ocasionado o surgimento de classes com número pequeno de casos para a análise da relação entre tipo de DNA-HPV e cada critério histológico, a TABELA 12 mostra que todos os tipos virais detectados pela HIS foram avaliados quanto à presença de alterações histológicas. A coilocitose, coilócito fusiforme e atipia nuclear foram mais frequentes no tipo 16, apesar de presentes nas quatro categorias. Por outro lado, alterações nucleares como mitose aberrante, multinucleação e disqueratose não foram identificadas nos casos tipados especificamente.

TABELA 12

**CRITÉRIOS HISTOPATOLÓGICOS EM RELAÇÃO AO TIPO DNA-HPV
DETECTADO POR HIS**

Critério	Tipo de DNA-HPV			
	6/11	16	18	31/33
Binucleação	2	2	-	-
Multinucleação	-	-	-	-
Atipia nuclea mínimar	2	5	1	1
Mitose aberrante	-			
Coilocitose	7	11	2	4
Coilocito fusiforme	2	9	1	3
Disqueratose	-	-	-	-
Paraceratose	-	2	1	-
*TOTAL (n)	(8)	(12)	(2)	(4)

*Cada caso pode apresentar mais de 1 critério

Discussão

5. Discussão

5.1. Aspectos gerais

Desde a década de 80, o número de mulheres encaminhadas para os ambulatorios de colposcopia e patologia cervical devido a lesões induzidas por HPV, vem aumentando continuamente. Os métodos utilizados para o diagnóstico destas lesões têm atraído a atenção de pesquisadores do mundo inteiro, no sentido de encontrar marcadores adicionais, que norteiam o tratamento e o seguimento destas mulheres (HILDESHEIM et al., 1994; HO et al., 1995; REMMINK et al., 1995). Duas questões fundamentais estão envolvidas no diagnóstico destas lesões: 1) a especificidade dos critérios histológicos para reconhecimento do grau de lesão provocado pelo HPV; 2) a utilização adequada das novas técnicas de detecção do DNA viral no material cervical. Dentro destas linhas de pesquisa, o presente trabalho visou a analisar os critérios histológicos associados à gravidade da lesão induzida por HPV e sua relação com a presença do DNA-HPV detectado por captura de híbridos e também por hibridização *in situ*.

Baseado no conceito de progressão tumoral e perda da diferenciação celular, depreende-se que alguns casos diagnosticados como NIC 1 poderão eventualmente progredir para NIC 2 ou 3 e daí para neoplasia invasora (STOLER, 1996). Entretanto, sabemos que a maior prevalência de carcinoma invasor do colo do útero ocorre em mulheres na quarta década da vida. Por outro lado, o pico de detecção das lesões de baixo grau, incluindo nesta categoria as alterações citopáticas simples induzidas por HPV e os NIC 1, encontra-se nas jovens que iniciam sua atividade sexual e decresce, acentuadamente, nas mulheres mais próximas da menopausa (KOUTSKY et al., 1992; KAINZ et al., 1995; LONDESBOROUGH et al., 1996; FRANCO, ROHAN, VILLA, 1999).

Os testes virológicos têm permitido identificar cerca de 10% a 30% de mulheres assintomáticas como portadoras de infecção por HPV (WARD et al., 1990). Por outro lado, se estas mulheres têm um maior risco de desenvolver lesões cervicais induzidas por este vírus, estas somente serão identificadas através da citologia, colposcopia e biópsia (STOLER, 1996). Assim, vários autores têm discutido o papel de cada teste no rastreamento, diagnóstico e seguimento das lesões pré-neoplásicas do trato genital inferior (MOSCICKI et al., 1992; MAEDA et al, 1997; McNICOL & FARQUHARSON 1997).

5.2. Valor do diagnóstico histológico

Apesar de tradicionalmente reconhecidos como padrão-ouro para diagnóstico de neoplasias, os diagnósticos histológicos recentemente têm sido desafiados, especialmente em estudos virológicos, que descrevem os critérios histológicos como subjetivos, sem padrões precisos, sujeitos a interpretações equivocadas e com baixa taxa de reprodutibilidade (ISMAIL et al., 1989; CREAGH et al., 1995; DUGGAN, 1999). No presente trabalho verificamos uma grande concordância entre os dois observadores no diagnóstico das lesões induzidas por HPV. A concordância foi absoluta em 71% dos casos e a discordância superior a um grau foi encontrada em apenas 4% dos casos, mesmo considerando o viés de leitura de lâminas diferentes do mesmo bloco. Dos 25 casos classificados como NIC 2 pelo observador 1, apenas dois casos foram subavaliados, ou seja, houve discrepância superior a um grau, pelo observador 2, sendo classificados como ausência de lesão induzida por HPV. Verificamos ainda que apenas um caso foi superavaliado, apresentando discrepância superior a um grau, tendo sido considerado NIC 3 pelo observador 1 e sem lesão pelo observador 2 (ALVES et al., 1991). Assim, foi obtido um critério de consenso a servir de padrão-ouro para as análises subseqüentes.

Nossos dados reforçam a validade da histologia como padrão-ouro, altamente confiável e reprodutivo, no diagnóstico das lesões do epitélio escamoso do colo uterino.

5.3. Análise dos critérios histológicos individuais

A infecção por HPV do epitélio escamoso do colo uterino, sendo o fator iniciador da carcinogênese cervical, está associada com alterações morfológicas do tecido, que incluem o desarranjo arquitetural e alterações nucleares típicas. O grau destas alterações determina o diagnóstico das lesões pré-neoplásicas que vão desde neoplasia intra-epitelial grau 1 até a neoplasia intra-epitelial grau 2 e 3 (KADISH et al., 1992).

No presente trabalho analisamos a aparência histológica das lesões induzidas por HPV, descrevendo os critérios histológicos individualizados e suas associações com o diagnóstico final. Encontramos dois mais consistentes para as lesões mais graves: mitoses aberrantes e multinucleação. Verificamos que a presença dos dois critérios em conjunto pode diagnosticar NIC 2 ou 3, mesmo sem levar em consideração o desarranjo da arquitetura. Similarmente, a disqueratose e a paraqueratose foram importantes marcadores para estas lesões mais graves. Já as células exibindo atipia nuclear mínima circundadas por vacúolos (esboço de coilocitose) propostas anteriormente como critérios *sugestivos de infecção por HPV*, não se mostraram associadas à infecção nem aos padrões histológicos de lesão epitelial. Assim, parece-nos melhor excluir o critério de atipia nuclear mínima do diagnóstico final de infecção induzida por HPV. A valorização deste critério estaria contribuindo para o “superdiagnóstico” de lesões pré-neoplásicas no rastreamento e seguimento das mulheres encaminhadas para os serviços de patologia cervical.

5.4. Relações de marcadores de lesão e de infecção

Entre os métodos virológicos utilizados na detecção da infecção por HPV, o teste de detecção do DNA-HPV por captura de híbridos é de fácil realização e rápido resultado. Tem grande sensibilidade para detectar os tipos considerados de alto risco oncológico e permite a mensuração da carga viral (COX et al., 1995; WRIGHT, SUN, KOULOS, 1995). Entretanto, não diferencia as mulheres que tem apenas infecção das que já apresentam lesão celular (FARTHING et al., 1994; ROTELI-MARTINS, 1996). A hibridização *in situ*, por sua vez, apesar de apresentar uma menor sensibilidade, detecta o DNA-HPV nas lesões presentes no tecido biopsiado (NUOVO et al., 1990). A hibridização *in situ* foi recomendada por RICHART & NUOVO em 1990, como ferramenta para o diagnóstico de lesões induzidas por HPV no trato genital inferior. Por permitir a realização em blocos de parafina de biópsias, tem grande aplicabilidade nos estudos retrospectivos (NUOVO et al., 1990). Os estudos baseados na hibridização *in situ* permitem ainda a localização morfológica das seqüências virais (SOUTHERN et al., 1998).

No presente estudo usamos a hibridização *in situ* e, para aumentar a sensibilidade, adicionamos o recurso de amplificar a reação através de sistema de catalisador de sinal (CSA). As sondas utilizadas foram de DNA-HPV específicas para vírus de baixo, intermediário e alto risco oncológico, na tentativa de avaliar os tipos específicos de HPV que infectam estas mulheres.

Avaliamos assim a taxa de detecção de DNA-HPV de alto risco oncológico por captura de híbridos e por hibridização *in situ*, assim como sua relação com o diagnóstico histológico. Verificamos que 47% das mulheres com captura de híbridos reativa para DNA-HPV apresentaram diagnóstico de NIC 2 ou 3, 36% apresentaram diagnóstico de NIC 1 e 17% não apresentaram lesão induzida por HPV. Verificamos também que a prevalência da reatividade para DNA-HPV por hibridização *in situ* de amplo espectro foi de 37% da amostra. Das biópsias reativas pela hibridização *in situ*, 51% tinham diagnóstico de NIC 2 ou 3, 41% de NIC 1 e 8% não apresentavam lesão induzida por HPV. Apesar desta diferença não ser significativa, a detecção do DNA-viral em mulheres com ausência de lesão induzida por HPV, foi maior pela captura de híbridos do que pela hibridização *in situ*.

Em relação à hibridização *in situ*, SOUTHERN et al. (1998) analisaram 50 lesões de baixo grau e 50 lesões de alto grau com sondas marcadas com HPV dos tipos 6/11,16,18,31 e 33, e detectaram o DNA viral em 92% das lesões de baixo grau e 90% das lesões de alto grau. Entretanto, a acurácia para a tipagem específica da hibridização *in situ* foi de 43% em lesões de baixo grau e de 90% em lesões de alto grau. Em nosso estudo, usando técnica semelhante, das 51 mulheres reativas para o amplo espectro, 26 (51%) foram positivas para os tipos 6/11, 16, 18 e 31/33. Entre estes, o DNA-HPV mais freqüente foi o tipo 16, encontrado em três casos de NIC 1 e oito de NIC 2 ou 3. Apesar do tipo 16 ser considerado como tipo de alto risco oncológico, o encontro do mesmo em três casos de NIC 1 está de acordo com outros autores

que também relataram o encontro de HPV de alto risco em lesões de baixo grau (KATAJA et al., 1990; KADISH et al., 1992).

De uma forma geral, quando analisamos a frequência dos diferentes graus histológicos em relação aos tipos virais detectados pela hibridização *in situ* verificamos que, na maioria dos casos cujo tipo viral foi identificado, o DNA-HPV detectado foi compatível com a expectativa do diagnóstico histológico. Assim, avaliando a reatividade da hibridização *in situ*, verificamos que seis casos positivos para os vírus do tipo 6/11 eram portadoras de NIC 1 e dez casos positivos para os vírus dos tipos 16, 18, 31/33 eram portadores de NIC 2 ou 3.

Os DNA-HPV 6/11, considerados de baixo risco oncológico, além de serem detectados em seis casos de NIC 1 foram também reativos em dois casos de NIC 2 ou 3. Existe a possibilidade que os dois casos de NIC 2 ou 3 tenham infecção por outro tipo, não caracterizado nesta pesquisa. Por outro lado, outros autores também encontraram os tipos considerados de baixo risco, associados a neoplasias de alto grau, apesar da frequência não ser significativa quando comparada com a dos DNA-HPV de alto risco (SCHIFFMAN et al., 1993; HERRINGTON et al., 1995; WOODMAN et al., 1996). Os tipos 31/33 estiveram presentes nas três categorias de biópsia e o tipo 18 foi encontrado apenas em dois casos, sendo um NIC 1 e outro NIC 2 ou 3.

Estes dados mostram que, ainda que válido em análises populacionais, a identificação de DNA denominado de risco baixo (6 e 11) ou intermediário (31 e 33) (SCHIFFMAN et al., 1993; HERRINGTON et al., 1996), não afasta a

possibilidade de lesões mais graves nas mulheres cujo diagnóstico só pode ser estabelecido pela biópsia.

Nossos resultados indicam boa reatividade da hibridização *in situ* de amplo espectro nas lesões de alto grau e menor reatividade nas de baixo grau. A identificação precisa de 25 lâminas reativas por hibridização *in situ* de amplo espectro, porém não especificamente tipáveis, pode decorrer da pequena força do sinal indicador de número de cópias do vírus, que nestes casos seria baixo e não pôde ser identificado com a técnica utilizada. As lâminas com as características histológicas de infecção por HPV que foram negativas, tanto para hibridização *in situ* de amplo espectro quanto para o tipo específico, sugerem um resultado falso-negativo. Entretanto, uma possível explicação para o resultado negativo seria que este teste não detectou outro tipo de HPV presente na espécie (LIZARD et al., 1998)

A baixa sensibilidade das sondas específicas pode ser explicada pela porcentagem elevada de mulheres portadoras de infecção, porém com baixa carga viral, não permitindo boa visualização das reações. São necessários estudos prospectivos para verificar se os casos detectados pelo amplo espectro, mas não reativos para o tipo específico, são os de portadores de infecções transientes com o vírus em condição episomal, não possibilitando a positividade das reações específicas (COOPER et al., 1991). Devemos salientar entretanto, que, o estudo de corte transversal não permite análise temporal da infecção. Entretanto, a presença de DNA-HPV, mesmo de alto risco, não parece

ser suficiente para o desenvolvimento de NIC 2 e 3 ou de neoplasia invasora, uma vez que muitas mulheres infectadas com estes tipos de HPV não apresentam lesão histológica detectável (ÖSTÖR, 1993; SYRJÄNEN, 1997).

Não há dúvidas que os tipos de HPV considerados oncogênicos parecem ter características biológicas que são diferentes dos tipos menos agressivos, provocando alterações nucleares consistentes com aneuploidia mesmo em lesões menos graves como NIC 1 (LONGATTO-FILHO et al., 1997; UTAGAWA et al., 1997). Quando comparamos a reatividade para o DNA viral e os aspectos morfológicos detectados pela avaliação histológica, encontramos uma maior prevalência de alterações morfológicas nucleares associadas com detecção de DNA-HPV de alto risco, tanto através da captura de híbridos quanto da hibridização *in situ*. Assim, a multinucleação e a mitose aberrante estiveram associadas com a reatividade de DNA-HPV por captura de híbridos (RP= 4,1 e 2,9) e por hibridização *in situ* (RP= 5,1 e 2,5). KADISH et al. (1992), estudando características biológicas de HPV com hibridização por *Southern blot*, encontraram núcleos hipercromáticos e mitoses anormais mais freqüentes em lesões positivas para HPV de alto risco oncológico.

Os sinais histológicos clássicos de infecção por HPV, como a coilocitose, disqueratose, paraqueratose e coilócito fusiforme também apresentaram associação significativa com a reatividade para o DNA viral tanto por captura de híbridos (RP= 1,2; 1,8; 1,8 e 1,8, respectivamente), quanto por hibridização *in situ* (RP= 1,3; 1,7; 1,5 e 1,8, respectivamente). Já a atipia celular mínima, ou seja, o esboço de coilocitose, esteve presente de forma semelhante em

pacientes reativas ou não para o DNA-HPV, tanto pela captura de híbridos como pela hibridização *in situ*.

De uma forma geral, as determinações de DNA-HPV tanto por captura de híbridos, como por hibridização *in situ*, estiveram intimamente relacionados ao diagnóstico histológico de NIC e aos principais critérios individuais de lesão associada a HPV. Entretanto, houve considerável divergência entre os dois métodos a nível individual. Tal achado pode decorrer da maior sensibilidade da captura de híbridos ou da forma de colheita da amostra, já que a hibridização *in situ* visualiza a própria lesão enquanto a captura de híbridos é efetuada em raspado de toda circunferência do colo uterino. Os dois métodos, são complementares no diagnóstico virológico de infecção cervical por HPV.

A reatividade do DNA-HPV por hibridização *in situ* apesar de apresentar uma frequência menor, consegue uma associação mais forte com os critérios morfológicos individuais do que a captura de híbridos. A hibridização *in situ*, sendo realizada no tecido da biópsia, demonstra que o fenótipo se altera quando existe maior quantidade de DNA viral detectado no tecido (SOUTHERN et al., 1998). Em relação à captura de híbridos, devemos lembrar que a mulher pode ter o vírus em outro local que não a área do tecido biopsiado, uma vez que este teste é coletado em todo o colo e tem a capacidade de detectar o DNA viral fora do local da amostra para histologia (COX et al., 1995).

Interpretações exageradas de infecção ou de lesão do colo uterino induzidas por HPV, feitas pelos métodos de biologia molecular utilizados neste

estudo, devem ser vistas com cuidado na prática clínica. Essas interpretações exageradas têm como consequência um aumento dos custos na saúde pública uma vez que levam a procedimentos cirúrgicos desnecessários. Além disso, sendo uma infecção predominantemente de contaminação sexual associada ao câncer do colo uterino, gera ansiedade e angústia nas mulheres encaminhadas com este diagnóstico.

Conclusões

6. Conclusões

1. A elevada concordância interobservadores na histologia reforça sua validade como padrão-ouro, altamente confiável e reprodutivo, no diagnóstico das lesões do epitélio escamoso do colo uterino.
2. Dentre os critérios histológicos individuais, a mitose aberrante, a multinucleação, a disqueratose e a paraqueratose, foram importantes marcadores para lesões mais graves (NIC 2 ou 3). Células exibindo atipia nuclear mínima circundadas por vacúolos (esboço de coilocitose) propostas anteriormente como critérios *sugestivos de infecção por HPV*, não se mostraram associadas à infecção nem aos padrões histológicos de lesão epitelial. Coilocitose, coilócitos fusiformes e binucleação mostraram-se associadas à NIC dos diversos graus.
3. Houve uma associação significativa entre a reatividade para DNA-HPV de alto risco oncológico por captura de híbridos e o diagnóstico histológico de NIC 2 ou 3.

4. A reatividade do DNA-HPV por hibridização *in situ* de amplo espectro foi progressivamente e significativamente associada ao diagnóstico histológico de maior gravidade. Entre os casos que foram reativos para DNA-HPV de amplo espectro por hibridização *in situ*, o tipo específico mais freqüente foi o tipo 16.
5. Dentre os critérios morfológicos, a multinucleação apresentou a mais significativa associação com a detecção de DNA viral por captura de híbridos ou por hibridização *in situ*, o que também aconteceu com a mitose aberrante. A coilocitose e o coilocito fusiforme apresentaram associações semelhantes tanto na captura de híbridos quanto na hibridização *in situ*. A paraceratose e a disqueratose apresentaram uma prevalência menor que a multinucleação e a mitose aberrante, e as células com atipia nuclear mínima com vacúolos foram muito freqüentes tanto nos casos positivos como nos negativos para DNA viral. A ausência de associação do encontro das células com atipia nuclear mínima com vacúolos, *esboço de coilocitose*, com o diagnóstico histológico, bem como com a detecção de DNA-HPV, seja por captura, seja por hibridização *in situ*, torna fundamental sua exclusão dentre os critérios diagnósticos em biópsias de colo uterino.

Summary

7. Summary

Aiming at analyze the histological criteria associated with lesion induced by HPV and its relation to the reactivity of HPV- DNA by hybrid capture (HC) and *in situ* hybridization (ISH), this study was accomplished in 138 women guided for colposcopy exam at Leonor Mendes de Barros Hospital in São Paulo and Centro de Atenção à Saúde da Mulher in Campinas (UNICAMP). The rate of agreement of the final biopsy diagnostic was analyzed comparing to the histology blade result evaluated by 2 observers seeking to reach the consent diagnostic to act as a paradigm for future approaches. They appraised: the relation among each individual histological criteria used for HPV induced lesion diagnostic, the distribution of the reactivity for HPV- DNA estimated by HC and ISH and the relation among each individual histological criteria with reactivity of HPV- DNA by HC and ISH. The women were submitted to complete gynecological exam including HC collection (*Digene*) followed by colposcopy with biopsy within the most evident lesions. The biopsy fragment was guided to the reference laboratory (IAL). In the histological analyzes there were described binucleation presence; multinucleation; cells with mild koilocytes; koilocytes; spindle koilocytes; mitosis; disqueratosis and paraceratosis. Each one of these criteria was classified in two

categories: present and absent. Final diagnose was classified into three categories: absence induced HPV lesion; CIN 1 and CIN 2 or 3. For statistical analysis were estimated the prevalence and the prevalence reason (PR), in a confidence interval of 95%, being used Cochran-Armitage test, agreement test and kappa coefficient to quantify the agreement. We conclude that there was high agreement in histology inter observers, reinforcing its validity as gold standard of cervical lesions. Within individual histological criteria: aberrant mitosis and multinucleation besides disqueratosis and paraqueratosis, were important factors for more serious lesions (CIN 2 or 3). Cells showing mild koilocytes previously proposed as criteria for suggestive infection by HPV, did not associate to the infection nor to histological patterns of epithelial lesion. There was a meaningful association between the reactivity to HPV-DNA of high risk by HC and ISH with histological diagnosis of CIN 2 or 3. Among the cases that were reactive to HPV-DNA of wide spectrum by ISH, the specific type more frequent was the type 16. In most of the cases in wich the viral type was identified, the type detected was compatible to the histological diagnosis. Amongst morphological approaches, multinucleation presented the most significant association with the detection of viral HPV-DNA by HC and ISH, also occurring with binucleation and aberrant mitosis. Koilocytes and spindle koilocytes, presented similar prevalence with both tests. Paraceratosis and disqueratosis presented just a weak association and the cells with mild koilocytes appeared more often such as in positive as in negative cases to viral DNA. The association absence of encounter of cells with mild koilocytes with histology diagnostic as well as with detection of HPV-DNA, by HC or ISH turns to be fundamental its exclusion amongst diagnostic criteria within cervical biopsy.

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

- ABADI, M.A.; HO, G.Y.F.; BURK, R.; ROMNEY, S.L.; KADISH, A.S. – Strigent criteria for histological diagnosis of koilocytosis fail to eliminate overdiagnosis of human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia grade 1 – **Hum. Pathol.**, **29**:54-9, 1998.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. – Recombinant DNA technology – How the cells are studied. In: ALBERTS, B.; LEWIS, D.B.J.; RAFF, M.; WATSON, K.R.J.D. - **Molecular biology of the cell**. , 2ª ed., Garland Publishing, Inc., New York & London., 1989. p.180-96.
- ALVES, V.A. F.; LIMA, M.A.N.; UTAGAWA, M.L.; MAEDA, M.Y.S. - Programa de controle de qualidade em citologia ginecológica do Instituto Adolfo Lutz: estratégias e análise crítica dos resultados de sua implantação-piloto. **Rev. Ass. Med. Brasil**, **37**:36-42, 1991.
- ALVES, V.A.F. - Hibridização molecular de ácido nucleico para detecção de DNA de papilomavírus. In: **XII CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CITOPATOLOGIA, LIBRO DE RESUMENES**, v2 p.63-70, 1996.

- BECKER, T.M.; WHEELER, C. M. ; McGOUGH, N. S.; PARMENTER, C.
A.JORDAN, S. W.; STIDLEY, C. A.; McPHERSON, S. ; DORIN, M. H. -
Sexually transmitted diseases and other risk factors for cervical dysplasia
among southwestern hispanic and non-hispanic white women. **JAMA**,
2:1181-8, 1994.
- BOSCH, F.X.; MUÑOZ, N.; SANJOSÉ, S.; NAVARRO, C.; MOREO, P.;
ASCUNCE, N.; GONZALES, L.C.; TAFUR, L.; GILI, M.; LARRANAGA, I. -
Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade
III/carcinoma *in situ*: a case control study in Spain and Colombia. **Cancer
Epidemiol. Biom. Prev.**, 2:415-22, 1993.
- BOSCH, F. X.; MANOS, M.M.; MUÑOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A.M.;
PETO, J.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, K.V. - Prevalence of human
papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **J. Natl. Cancer
Inst.**, 87:796-802, 1995.
- BRINTON, L.A.; HUGGINS, G.R.; LEHMAN, H.F.; MALLIN, K.; SAVITZ, D.A.;
TRAPIDO, E.; ROSENTHAL, J.; HOOVER, R. - Long-term use of oral
contraceptives and risk of invasive cervical cancer. **Int. J. Cancer**, 38: 339-
44, 1986.
- BRODERS, A.C. - Carcinoma *in situ* contrasted with benign penetrating
epithelium. **JAMA**, 99:1670-4, 1932.
- CHOI, Y.J. - Detection of human papillomavirus DNA on routine papanicolaou
smears by in situ hybridization with the use of biotinylated probes. **Am. J.
Clin. Pathol.**, 95: 475-80, 1991.
- COLEMAN, DV; RUSSEL, WJI; HODGSON, J; PE, T; MOWBRAY, JF. Human
papovavirus in Papanicolaou smears of urinary sediment detected by
transmission electron microscopy. **J. Clin. Pathol.**, 30:1015-20, 1977.

- COOPER, K.; HERRINGTON, C.S.; STICKLAND, J.E.; EVANS, M.F.; McGEE, J.O. – Episomal and integrated human papillomavirus in cervical neoplasia shown by non isotopic in situ hybridisation. **J. Clin. Pathol.**, **44**:990-6, 1991.
- COTRAM, R.S.; KUMER, V.; ROBBINS, S.L. In: COTRAM, R.S; KUMER, V.; ROBBINS, S.L. - Pathology of the cervix, vagina and vulva, Philadelphia, Ed. W.B. Saunders Company. 1989.
- COX, J. T.; LORINCZ, A. T.; SCHIFFMAN, M. H.; SHERMAN, M. E.; CULLEN, A.; KURMAN, R.J. – Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **172**:946-54, 1995.
- CREAGH, T.; BRIDGER, J.E.; KUPEK, E.; FISH, D.E.; MARTIN-BATES, E.; WILKINS, M.J. – Pathologist variation in reporting cervical borderline epithelial abnormalities and cervical intraepithelial neoplasia. **J. Clin. Pathol.**, **48**:59-60, 1995.
- CULLEN, A.P.; REID, R.; CAMPION, M.; LORINCZ, A.T. - Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. **J. Virol.**, **65**:606-12, 1991.
- CUZICK, J.; TERRY, G.; HO, L.; HOLLINGWORT, T.; ANDERSON, M. - Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Br. J. Cancer**, **69**:167-71, 1994.
- DECLARAÇÃO DE HELSINKI- Recomendaciones para guiar los medicos en la investigacion biomedica en seres humanos- **Bol. Of. Sanit. Panam.** **108 (5-6)**: 626-37, 1990.
- DELLA TORRRE, G.; PILOTTI, S.; DE PALO, G.; RILKE, F.- Viral particles in cervical condylomatous lesions. **Tumori**, **64**:549-53, 1978

- DE PALO, G. – **Colposcopia e patologia do trato genital inferior**. 2ªed., Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, 1996. p.43.
- DE VILLIERS, E.M.; WAGNER, D.; SCHNEIDER, A.; WESCH, H.; MUNZ, F.; MIKLAW, H.; ZUR HAUSEN, H. - Human papillomavirus DNA in women without and with cytological abnormalities: Results of a five year follow-up study. **Gynecol. Oncol.**, **44**:33-9, 1992.
- DIAS, E.P; GOUVÊA, A.L.F.; EYER, C.C. - Condyloma acuminatum: its histopathological pattern. **São Paulo Med. J./RPM** **115**:1383-9, 1997.
- DUGGAN, M. - Cytologic and histologic diagnosis and significance of controversial squamous lesions In Pathology of the uterine corpus and cervix. Long course. Int. **Acad. Pathol.**, San Francisco, Ca, 1999, p 17-23.
- ELUF-NETO, J.; BOOTH, M.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; MEIJER, C.J.L.M.; WALBOOMERS, J.M.M. -Human papillomavirus and invasive cancer in Brazil. **Br. J. Cancer**, **69**:114-9, 1994.
- FARTHING, A.; MASTERSON, P.; MASON, W.P.; VOUSDEN, K.H. - Human papillomavirus detection by hybrid capture and its possible clinical use. **J. Clin. Pathol.**, **47**:649-652, 1994.
- FERENCZY, A. Viral testing for genital human papillomavirus infections: recent progress and clinical potentials. **Int. J. Gynecol. Cancer**, **5**:321-8, 1995.
- FERRIS, D.G.; WRIGHT, T.C. Jr; LITAKER, M.S.; RICHART, R.M.; LORINCZ, A.T.; SUN, X.W.; WOODWARD, L. - Comparison of two tests for detecting carcinogenic hpv in women with Papanicolaou smear reports of ASCUS and LSIL. **J. Fam. Pract.**, **46**:136-41, 1998.

FRANCO, E.L.; ROHAN, T.E.; VILLA, L.L.- Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, **91**:506-11, 1999.

FU, Y.S. & REAGAN, J.W.- Pathology of the uterine cervix, vagina and vulva. In: FU, YS & REAGAN, JW. Pathology of the uterine cervix. Philadelphia, Ed WB Saunders Company, 1989.

GISSMANN, L. & ZUR HAUSEN, H. - Human papilloma virus DNA: Physical mapping and genetic heterogeneity. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **73**:1310-3, 1976.

HAKAMA, M.; MILLER, A.B.; DAY, N.E. (eds) – **Screening for cancer of the uterine cervix**. IARC Sci. Publi., 76:133-42 International Agency for Research on Cancer, 1986.

HATCH, K.D. - Preinvasive cervical neoplasia. **Sem. Oncol.**, **21**:12-6, 1994.

HERRINGTON, C.S. - Human papillomaviruses and cervical neoplasia I. Classification, virology, pathology, and epidemiology. **J. Clin. Pathol.**, **47**:1066-72, 1994.

HERRINGTON, C.S.; EVANS, M.F.; HALLAM, N.F.; CHARNOCK, F.M.; GRAY, W.; McGEE, J. O.D. – Human Papillomavirus status in the prediction of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in patients with persistent low-grade cervical cytological abnormalities. **Br. J. Cancer**, **71**:206-9, 1995.

HERRINGTON, C.S.; EVANS, M.F.; CHARNOCK, F.M.; GRAY, W.; McGEE, J.O.D. - HPV testing in patients with low grade cervical cytological abnormalities: a follow up study. **J. Clin. Pathol.**, **49**:493-6, 1996.

- HERRINGTON, C.S. & WELLS, M. - Can HPV typing predict the behaviour of cervical epithelial neoplasia? **Histopathology**, **31**:301-3, 1997.
- HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M.H.; GRAVITT, P.E.; GLASS, A.G.; GREER, C.E.; ZHANG, T.; SCOTT, D.R.; RUSH, B.B.; LAWLER, P.; SHERMAN, M.E.; KURMAN, R.J.; MANOS, M.M. - Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. **J. Infect. Dis.** **169**:235-40, 1994.
- HO, G.Y.F.; BURK, R.D.; KLEIN, S.; KADISH, A.S.; CHANG, C.J.; PALAN, P.; BASU, J.; TACHEZY, R.; LEWIS, R.; ROMNEY, S. - Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, **87**: 1365-71, 1995.
- HO, G.Y.F.; BIERMAN, R.; BEARDSLEY, L.; CHANG, C.J.; BURK, R.D. - Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. **N. Engl. J. Med.**, **338**:423-8, 1998.
- ISMAIL, S.M.; COLCLOUGH, A.B.; DINNEN, J.S.; EAKINS, D.; EVANS, D.M.D.; GRADWELL, E.; O'SULLIVAN, J.P.; SUMMERELL, J.M.; NEWCOMBE, R.G. - Observer variation in histopathological diagnosis and grading of cervical intraepithelial neoplasia. **Br. Med. J.**, **298**:707-10, 1989.
- JOURDAN, M.J.; JOANNES, M.; BARRANGER, C.; SOMMÉ, G.; GOUDEAU, A. - Detection and typing of human papillomavirus by in situ hybridization with biotinylated oligonucleotide mixtures. **J. Med. Virol.**, **45**:293-9, 1995.
- KADISH, A.S.; HAGAN, R.J.; RITTER, D.B.; GOLDBERG, G.L.; ROMNEY, S.L.; KANETSKY, P.A.; BEISS, B.K.; BURK, R.D. - Biologic characteristics of specific human papillomavirus types predicted from morphology of cervical lesions - **Hum. Pathol.**, **23**:1262-9, 1992.

- KAINZ, C.; TEMPFER, C.; GITSCH, G.; HEINZL, H.; REINTHALLER, A.; BREITENECKER, G. - Influence of age and human papillomavirus-infection on reability of cervical cytopathology. **Arch. Gynecol. Obstet...**, **256**:23-8, 1995.
- KATAJA, V.; SYRJÄNEN, K.; SYRJÄNEN, S.; MANTYJÄRVI, R.; YLISKOSKI, M.; SAARIKOSKI, S.; SALONEN, J.T. - Prospective follow-up of genital HPV infections: survival analysis of DNA-HPV typing data. **Eur. J. Epidemiol.**, **6**:9-14, 1990.
- KLEINBAUM, D.G.; KUPPER, L.L.; MORGENSTERN, H. - **Epidemiologic research**. New York, Van Nostrand Reinhold, 1982. p.529.
- KOUTSKY, L.A.; HOLMES, K.K.; CRITCHLOW, C.W.; STEVENS, C.E.; PAAVONEM, J.; BECKMANN, A.M.; DeROUEN, T.A.; GALLOWAY, D.A.; VERNON, D.; KIVIAT, N.B. - A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to Papillomavirus infection. **New Engl. J. Med.** **327**:1272-8, 1992.
- KOUTSKY, L.A. - Epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Am. J. Med.**, **102**:3-8, 1997.
- KOSS, L.G. & DURFEE, G.R. - Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: Cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. **Ann. NY Acad. Sci.**, **63**:1245-61, 1956.
- KOSS, L.G. - The papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. **JAMA**, **261**:737-43, 1989.
- LANDIS, J.R. & KOCH, G.G. - The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, **33**:159-74, 1977

- LIZARD, G.; ROIGNOT, P.; BRUNET-LECOMTE, P; CHARDONNET, Y. - Morphological analysis of in situ hybridization signals in cervical intraepithelial neoplasia containing human papillomavirus type 16 or 18: relationship with histological grade and DNA content. **Cytometry**, **34**:180-6, 1998.
- LONDESBOROUGH, P.; HO, L.; TERRY, G.; CUZICK, J.; WHEELER, C.; SINGER, A. - Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. **Int. J. Cancer**, **69**:364-8, 1996.
- LONGATTO-FILHO, A.; MAEDA, M.Y.; OYAFUSO, M.S.; ALVES, V.A.F.; KANAMURA, C.T.; BORTOLAN, J. - Cytomorphologic evidence of human papillomavirus infection in smears from the irradiated uterine cervix. **Acta Cytol.**, **41**:1079-84, 1997.
- LÖRINCZ, A.T.; REID, R.; JENSON, A.B.; GREENBERG, M.D.; LANCASTER, W.; KURMAN, R.J. - Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obstet. Gynecol.**, **79**:328-37, 1992.
- LÖRINCZ, A.T. - Methods of DNA hybridization and their clinical applicability to human papillomavirus detection. In:FRANCO, E. & MONSONEGO, J. - **New developments in cervical cancer screening and prevention**. Blackwell Science, 1997. p.325-37.
- MAEDA, M.Y.S.; DI LORETO, C.; SHIRATA, N.K.; SHIH, L.W.S.; CAVALIERE, M.J.; LONGATTO-FILHO, A.; ALVES, V.A.F. - Image analysis of nuclear/cytoplasmic ratio in cervical smears to discriminate three grades of cervical intraepithelial neoplasia. **Acta Cytol.**, **41**:744-8, 1997.
- McNICOL, A.M. & FARQUHARSON, M.A. - *In situ* hybridization and its diagnostic applications in pathology. **J. Pathol.**, **182**:250-61, 1997.

- MEISELS, A.; & FORTIN, R. - Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I
Cytologic patterns. **Acta Cytol.**, **20**:505-9, 1976.
- MEISELS, A.; FORTIN, R.; ROY, M. - Condylomatous lesions of the cervix II.
Cytologic, colposcopic and histopathologic study. **Acta Cytol.**, **21**:379-90,
1977.
- MOSCICKI, A.B.; PALEFSKY, J.M.; GONZALES, J.; SMITH, G.; SCHOOLNIK,
K. - Colposcopic and histologic findings and human papillomavirus (HPV) DNA
test variability in young women positive for HPV DNA. **JID**, **166**:951-7, 1992.
- MUÑOZ, N. BOSCH, X. KALDOR, J.M. - Does human papillomavirus cause
cervical cancer? The state of the epidemiological evidence. **Br. J. Cancer**,
57:1-5, 1988.
- MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; SANJOSÉ, S.; VILADIU, P.; TORMO, J.; MOREO,
P.; ASCUNCE, N.; GONZALES, L.C.; TAFUR, L.; GILI, M. - Human
Papilloma virus in the etiology of cervicouterine cancer. **Bol. Oficina Sanit.**
Panam., **115**:301-9, 1993.
- MUÑOZ, N. & BOSCH, F.X. - Cervical cancer and human papillomavirus:
epidemiological evidence and perspectives for prevention. **Salud Pub.**
Mex, **39**: 274-82, 1997.
- NAIB, Z.M. & MASUKAWA, N. - Identification of condyloma acuminata cells in
routine vaginal smears. **Obstet. Gynecol.**, **18**:735-8, 1961.
- NUOVO, G.J.; FRIEDMAN, D.; RICHART, R.M. - In situ hybridization analysis
of human papillomavirus DNA segregation patterns in lesions of the female
genital tract. **Gynecol. Oncol.** **36**:256-2, 1990.

- ODUNSI, K.; TERRY, G.; HO, L.; BELL, J.; CUZICK, J.; GANESAN, T.S. – Association between HLA DQB1 * 03 and cervical intra-epithelial neoplasia. **Mol. Med.**, 1:161-71, 1995.
- ÖSTÖR, A.G. - Natural history of cervical intraepithelial neoplasia - a critical review. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, 12:186-92, 1993.
- PAPANICOLAOU, G.N. & TRAUT, H.F. - The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 42:193-206, 1941.
- PLUMMER, T.B.; SPERRY, A.C.; XU, H.S.; LLOYD, R.V. - In situ hybridization detection of low copy nucleic acid sequences using catalyzed reporter deposition and its usefulness in clinical human papillomavirus typing. **Diagn. Mol. Pathol.**, 7: 76-84, 1998.
- REMINK, A.J.; WALBOOMERS, J.M.M.; HELMERHORST, T.J.M.; VOORHORST, F.J.; ROZENDAAL, J.; RISSE, E.K.J.; MEIJER, C.J.L.M.; KENEMANS, P. – The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. **Int. J. Cancer**, 61:306-11, 1995.
- RICHART, R.M. & NUOVO, G.J. - Human papillomavirus DNA in situ hybridization may be used for the quality control of genital tract biopsies. **Obstet. Gynecol.**, 75:223-6, 1990.
- RICHART, R.M.; MASOOD, S.; SYRJÄNEM, K.J.; VASSILAKOS, P.; KAUFMAN, R.H.; MEISELS, A.; OLSZEWSKI, W.T.; SAKAMOTO, A.; STOLER, M.H.; VOOIJS, G.P.; WILBUR, D.C. – Human Papillomavirus IAC Task Force Summary. **Acta Cytol.**, 42:50-8, 1998.

- ROTELI-MARTINS, C.M. - **Fatores associados à neoplasia intra-epitelial cervical grau 2 e 3 em mulheres com alterações da colpocitologia e da colposcopia sugestivas de infecção por papiloma vírus humano.** Campinas, 1996. [Tese - Mestrado - FCM/UNICAMP].
- ROTELI-MARTINS, C.M.; PANETTA, K.; ALVES, V.A.F.; SIQUEIRA, S.A.C.; SYRJÄNEN, K.J.; DERCHAIN, S.F.M. – Cigarette smoking and high-risk HPV DNA as predisposing factors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in young Brazilian women. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, **77**:678-82, 1998.
- SANTOS, R.T.M.; WAKAMATSU, A.; KANAMURA, C.T.; NONOGKIS, S. - Procedimentos imuno-histoquímicos e de hibridização in situ In: **Manual de imuno-histoquímica.** Com menções à técnica de hibridização molecular. Sociedade Brasileira Patologia, 1995. p.91-9.
- SAS Institute Inc. **SAS/STAT software changes and enhancements through release 6.11.** Cary, NC: SAS Institute, Inc.
- SHCROYER, K.R.; HOSEY, J.; SWANSON, L.E.; WOODARD, W.D.; FENNELL, R.H. Cytologic diagnosis of human papillomavirus infection: spindled nuclei. **Diagn. Cytopathol.** , **6**:178-83, 1990.
- SCULLY, R.E.; BONFIGLIO, T.A.; KURMAN, R.J.; SILVERBERG, S.G.; WILKINS, E.J. - Histological typing of female genital tract tumors. - **World Health Organization** - International histological classification of tumors, 2th Ed., - 1994 Springer-Verlag, Berlin.
- SCHIFFMAN, M.; BAUER, H.; HOOVER, R.; GLASS, A.G.; CADELL, D.M.; RUSH, B.B.; SCOTT, D.R.; SHERMAN, M.E.; KURMAN, R.J.; WACHOLDER, S.; STANTON, C.K.; MANOS, M. - Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J. Nat. Cancer Inst.** **85**: 958-64, 1993.

- SCHNEIDER, A.; MEINHARDT, G.; DE VILLIERS, E.M.; GISSMANN, L. - Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies. **Diagn. Cytopathol.**, **3**:250-5, 1987.
- SCHNEIDER, A. & KOUTSKY, L.A. - Natural history and epidemiological features of genital HPV infection. **IARC Sci. Publi.**, **23**:117-28, 1992.
- SCHNEIDER, A. Pathogenesis of genital HPV infection. **Genitourin Med.** **69**:165-73, 1993.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, **98**: 1975.
- SOUTHERN, S.A.; GRAHAM, D.A.; HERRINGTON, C.S. - Discrimination of human papillomavirus types in low and high grade cervical squamous neoplasia by in situ hybridization. **Diagn. Mol. Pathol.**, **7**:114-21, 1998.
- STERNBERGER, L.A.; HARDY, P.H.; CUCULIS, MEYER, H.G. - The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry: Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. **J. Histochem. Cytochem.**, **18**:315-9, 1970
- STOLER, M.H.; RHODES, C.R; WITBECK, A.; WOLINSKY, S.M.; CHOW, L.T.; BROKER, T.R. - Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. **Hum. Pathol.**, **23**:117-28, 1992.
- STOLER, M.H. - A brief synopsis of the role of human papillomaviruses in cervical carcinogenesis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **175**:1091-8, 1996.

- SUN, X.W.; FERENCZY, A.; JOHNSON, D.; KOULOS, J.P.; LUNGU, O.;
RICHART, R.M.; WRIGHT, T.C. - Evaluation of the hybrid capture human
papillomavirus deoxyribonucleic acid detection test. **Am. J. Obstet. Gynecol.**,
173:1432-7, 1995.
- SYRJÄNEN, K.J.; MÄNTYJÄRVI, R.; SAARIKOSKI, S.; VÄYRYNEN, M.;
SYRJÄNEN, S.; PARKKINEN, S.; YLISKOSKI, M.; SAASTAMOINEN, J.;
CASTREN, O. - Factors associated with progression of cervical human
papillomavirus (HPV) infections into carcinoma *in situ* during a long-term
prospective follow-up. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, **95**:1096-102, 1988.
- SYRJÄNEN, K.J.; YLISKOSKI, M.; KATAJA, V.; HIPPELAINEN, M.;
SYRJÄNEN, S.M.; SAARIKOSKI, S. - Prevalence of genital human
papillomavirus infections in a mass-screened Finish female population aged
20-65 years. **Int. J. STD AIDS**, **1**: 410-5, 1990.
- SYRJÄNEN, K.J. - Biological behaviour of cervical intraepithelial neoplasia. In:
FRANCO, E & MONSONEGO, J. **New developments in cervical cancer
screening and prevention**. Ed. Blackwell Science, Oxford, 1997. p.93-108.
- UTAGAWA, M.L.; DI LORETO, C.; MAEDA, M.Y.S.; KANAMURA, C.T.;
LONGATTO-FILHO, A. - Papilomavírus humano em esfregaços citológicos
de mulheres acima de 50 anos: estudo morfológico e de hibridização "in
situ" nas respectivas biópsias. **J. Bras. Ginecol.**, **107**:83-7, 1997.
- VERNON, S.D.; HOLMES, K.K.; REEVES, C. - Human papillomavirus infection
and associated disease in persons infected with immunodeficiency virus.
Clin. Infect. Dis., **21**(Suppl):S121-4, 1995.
- WAGNER, D.; IKENBERG, H.; BOEHM, N.; GISSMANN, L. - Identification of
human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid *in situ*
hybridization. **Obstet. Gynecol.**, **64**:767-72, 1984.

WARD, B.E.; BURKETT, B.; PETERSEN, C.; NUCKOLS, M.L.; BRENNAN, C.; BIRCH, L.M.; CRUM, C.P. - Cytologic correlates of cervical papillomavirus infection. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **9**:297-305, 1990.

WOODMAN, C.B.J.; ROLLASON, T.; TIERNEY, R.; WILSOON, S.; YOUNG, L. - Human papillomavirus infection and high risk of progression of epithelial abnormalities of the cervix. **Br. J. Cancer**, **73**:553-6, 1996.

WRIGHT, T.C.; SUN, X.W.; KOULOS, J. - Comparision of management algorithms for the evaluation of women with low-grade cytologic abnormalities. **Obstet. Gynecol.**, **85**:202-10, 1995.

ZUR HAUSEN, H.; MEINHOF, W.; SCHEIBER, W.; BORNKAMM, G.W. - Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human warts virus. **Int. J. Cancer**, **13**:650-6, 1974.

ZUR HAUSEN, H. - The role of papillomaviruses in anogenital cancer. **Scand. J. Infect. Dis.**, **69**(Suppl.):107-11, 1990.

ZUR HAUSEN, H. - Disrupted dichotomous intracellular control of human papillomavirus infection in cancer of the cervix. **Lancet**, **343**:955-7, 1994.

Bibliografia de Normatizações

9. Bibliografia de Normatizações

1. HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses. BIREME, São Paulo, 1991. 45p.
2. Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD - OF. CIR/ PRPG/06/95 - Normas ABNT. 1995. 8p.

Anexos

10. Anexos

ANEXO 1

nº	Idade	Biópsia	CH	Carga Viral	HIS	Tipo Viral	Binucleação	Multinucleação	Mitose aberrante	Atipia Nuclear Mínima	Coilocitose	Coilócitos Fusiformes	Disqueratose	Paraqueratose
1	25	0	0	0,31	0	9	0	0	0	0	0	0	0	1
2	22	0	0	0,40	0	9	0	0	0	1	1	2	0	1
3	22	1	1	144,57	0	9	0	0	0	1	2	1	2	1
4	30	1	0	0,82	0	9	0	0	0	1	3	2	0	1
5	25	3	1	49,01	1	0	2	2	1	2	3	2	2	0
6	30	0	1	37,10	0	9	1	0	0	0	1	0	0	1
7	20	1	0	0,50	1	18	2	0	0	1	2	1	0	2
8	21	1	1	99,70	0	9	0	0	0	1	2	1	0	2
9	22	0	0	0,35	0	9	0	0	0	0	0	0	0	1
10	21	2	0	0,50	1	0	2	0	0	2	3	2	1	2
11	29	3	0	0,39	1	0	1	0	1	2	3	2	1	1
12	24	1	0	0,52	0	9	1	0	0	1	3	2	1	0
13	28	1	0	0,35	0	9	2	0	0	1	2	1	0	2
14	28	2	0	0,57	1	0	2	1	1	2	3	2	2	1
15	27	2	0	0,40	1	0	3	0	1	2	3	2	0	1
16	21	0	0	0,58	0	9	1	0	0	0	0	1	0	1
17	27	0	1	13,66	1	16	0	0	0	0	1	0	1	1
18	26	1	0	0,66	1	0	0	0	0	1	3	2	1	1
19	27	1	0	0,31	0	9	0	0	0	1	3	1	0	0
20	25	1	0	0,38	1	0	2	0	0	1	3	2	2	2
21	28	0	0	0,86	0	9	0	0	0	0	0	0	0	1
22	26	2	0	0,85	1	0	2	2	1	2	3	2	2	2
23	22	2	0	0,37	0	9	1	0	1	2	3	2	2	2
24	21	0	0	0,67	1	33	1	0	0	1	3	2	0	2
25	24	2	0	0,29	1	33	2	2	0	2	3	2	2	2
26	21	1	1	140,99	1	16	2	0	1	1	3	2	2	2
27	30	1	1	101,13	0	9	2	0	0	1	2	2	0	2
28	26	1	1	71,51	1	33	0	0	0	1	3	2	2	2
29	23	1	1	55,09	0	9	0	0	0	1	2	2	0	0
30	23	0	1	13,21	0	9	0	0	0	1	1	1	0	2
31	34	1	0	0,42	0	9	0	0	0	1	2	1	0	1
32	22	1	0	0,60	0	9	0	0	0	1	1	1	1	1
33	34	1	0	0,38	0	9	0	0	0	1	2	2	1	1
34	22	0	1	2,72	0	9	0	0	0	0	0	0	0	1
35	23	2	1	3,22	0	9	0	0	0	2	2	2	0	1
36	20	1	0	0,43	0	9	0	0	0	1	1	1	1	0

n°	Idade	Biópsia	CH	Carga Viral	HIS	Tipo Viral	Binucleação	Multinucleação	Mitose aberrante	Atipia Nuclear Mínima	Coilocitose	Coilocitos Fusiformes	Disqueratose	Paraqueratose
37	35	1	0	0,41	0	9	1	0	0	1	2	2	0	1
38	20	1	0	0,56	1	0	2	0	0	1	2	2	2	2
39	29	1	0	0,40	0	9	0	0	1	2	2	1	1	1
40	24	0	0	0,55	0	9	1	0	0	0	1	1	0	1
41	26	2	0	0,52	0	9	0	0	0	2	2	2	0	2
42	33	1	0	0,38	0	9	1	0	0	0	1	1	0	2
43	22	2	1	20,33	0	9	1	0	0	1	3	1	0	0
44	32	3	1	4,31	0	9	2	0	1	3	3	2	2	2
45	20	2	1	123,66	1	0	2	0	0	1	3	2	1	2
46	34	2	1	7,55	0	9	0	0	0	2	2	2	1	1
47	27	1	1	129,63	0	9	1	0	0	1	3	2	2	2
48	21	0	1	2,07	0	9	0	0	0	0	1	1	0	0
49	29	0	0	0,56	0	9	0	0	0	1	1	1	0	1
50	35	0	0	0,39	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0
51	26	1	1	2,01	0	9	1	0	0	1	3	2	0	2
52	28	1	0	0,52	1	0	2	0	0	1	2	2	0	2
53	21	1	1	8,67	0	9	0	0	0	1	2	2	0	1
54	25	1	0	0,43	0	9	1	0	0	1	3	3	1	2
55	34	1	0	0,40	0	9	0	0	0	0	1	1	0	1
56	22	3	1	1,77	1	0	2	0	1	3	2	2	2	2
57	31	3	1	4,84	0	9	2	0	1	3	2	2	2	2
58	34	3	1	94,41	0	9	2	2	1	3	2	2	2	2
59	20	0	1	35,46	1	16	0	0	0	0	0	0	0	2
60	31	1	1	2,69	0	9	2	0	0	1	2	1	0	1
61	20	0	1	132,02	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
62	22	1	1	199,15	0	9	0	0	0	1	3	2	1	2
63	22	1	1	1,76	0	9	1	0	0	1	2	2	2	2
64	33	0	0	0,33	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
65	31	0	0	0,34	0	9	0	0	0	0	1	0	0	1
66	28	2	1	90,43	1	33	2	2	1	2	3	2	2	1
67	33	2	1	223,00	1	0	2	0	1	2	2	2	2	2
68	35	0	1	9,63	0	9	0	0	0	1	1	0	1	1
69	34	1	0	0,43	1	9	1	0	0	1	2	0	0	1
70	35	0	1	6,27	0	9	0	0	0	0	1	1	0	0
71	29	1	0	0,55	1	0	1	0	0	1	2	1	0	2
72	32	1	0	0,36	0	9	0	0	0	0	1	1	0	1
73	21	1	0	0,79	0	9	0	0	0	0	2	1	0	1
74	32	2	1	4,05	1	0	2	2	1	2	3	2	2	2
75	26	1	0	0,79	0	9	1	0	0	1	2	2	2	2
76	35	2	1	9,06	1	0	2	1	1	2	3	2	2	2
77	35	3	1	90,43	0	9	2	0	1	3	2	2	2	2
78	25	1	0	0,56	1	0	1	0	0	0	2	1	0	1
79	23	1	0	0,30	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0
80	36	3	1	35,38	1	16	2	1	1	3	3	2	1	2
81	34	0	1	1,69	0	9	0	0	0	0	1	1	0	1
82	26	1	0	0,71	0	9	2	0	0	1	3	2	0	2
83	32	2	0	0,77	0	9	2	0	1	3	2	1	1	2
84	33	1	0	0,20	0	9	0	0	0	1	2	1	0	1
85	34	1	1	59,74	1	16	2	0	0	1	2	2	0	1
86	27	2	1	246,98	1	0	2	1	1	3	3	2	2	2
87	24	1	0	0,92	1	16	2	0	0	1	3	2	0	1

nº	Idade	Biópsia	CH	Carga Viral	HIS	Tipo Viral	Binucleação	Multinucleação	Mitose aberrante	Atipia Nuclear Mínima	Coilocitose	Coilócitos Fusiformes	Disqueratose	Paraqueratose
88	29	0	0	0,86	0	9	0	0	0	0	1	1	1	1
89	21	1	1	5,98	0	9	2	0	0	1	3	2	1	1
90	30	1	0	0,36	0	9	2	0	0	1	2	1	1	1
91	36	0	0	0,57	0	9	0	0	0	0	1	1	0	1
92	25	3	1	26,60	0	9	2	1	1	2	2	2	1	1
93	36	1	0	0,77	0	9	1	0	0	1	2	1	0	1
94	20	1	0	0,90	0	9	1	0	0	1	2	2	1	1
95	24	2	0	0,21	1	18	2	2	0	2	3	2	2	1
96	28	1	1	34,82	0	9	2	2	0	2	3	2	1	2
97	35	3	1	104,56	1	16	2	1	1	3	3	1	2	2
98	27	1	0	0,33	1	6	2	0	0	1	3	2	2	2
99	34	3	1	14,43	0	9	2	1	1	3	2	2	1	2
100	32	2	1	7,83	0	9	2	1	1	2	3	2	2	2
101	22	1	0	0,18	0	9	2	0	0	1	3	2	0	2
102	36	0	1	167,34	0	9	0	0	0	0	1	1	0	2
103	34	1	1	195,83	0	9	2	0	0	1	3	2	0	2
104	30	0	0	0,14	0	9	0	0	0	0	2	1	0	1
105	36	1	1	69,67	1	6	2	0	0	1	3	3	0	2
106	30	1	0	0,22	0	9	0	0	0	1	2	1	0	1
107	27	2	1	44,21	1	16	2	2	1	2	3	3	2	2
108	33	2	0	0,22	0	9	2	0	1	2	3	2	2	2
109	27	1	1	2,34	0	9	2	0	0	1	2	2	1	1
110	28	1	0	0,50	1	6	2	0	0	1	2	1	0	2
111	23	2	0	0,30	0	9	2	1	1	2	3	3	2	2
112	19	2	1	53,11	1	6	2	2	1	2	3	2	2	2
113	35	3	1	6,89	1	16	2	1	1	3	2	2	2	2
114	19	0	0	0,21	0	9	0	0	0	0	1	1	0	0
115	23	1	1	19,13	1	0	2	0	0	2	3	3	0	2
116	32	0	0	0,13	0	9	0	0	0	1	2	0	0	0
117	35	1	1	220,99	1	6	2	0	0	1	3	3	0	1
118	21	0	0	0,31	0	9	0	0	0	0	1	1	0	1
119	28	0	0	0,19	0	9	1	0	0	1	1	0	0	0
120	36	3	1	46,43	1	16	2	2	1	3	2	2	1	2
121	21	2	1	29,95	1	16	2	0	0	2	3	2	1	2
122	24	3	1	102,52	1	16	2	1	1	3	2	2	2	1
123	25	3	1	57,57	0	9	1	0	1	3	2	2	1	1
124	34	3	1	6,95	1	0	2	1	1	3	2	2	2	1
125	30	0	0	0,16	0	9	0	0	0	0	1	0	0	0
126	35	1	1	141,54	0	9	2	0	0	2	3	2	1	1
127	29	1	0	0,39	0	9	1	0	0	1	2	1	0	1
128	31	3	1	6,44	0	9	2	0	1	2	2	2	2	1
129	23	2	1	16,06	1	6	1	0	1	2	2	1	1	1
130	24	2	0	0,68	0	9	2	0	1	2	2	1	1	1
131	34	0	0	0,51	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0
132	23	0	0	0,23	0	9	0	0	0	0	1	1	0	1
133	25	1	1	1,67	1	6	2	0	0	1	3	3	1	2
134	23	2	1	10,20	1	0	3	1	2	2	0	3	2	1
135	18	1	1	1,35	1	0	0	0	0	1	2	2	0	2
136	21	0	0	0,19	0	9	0	0	0	0	1	1	1	0
137	24	1	0	0,31	0	9	0	0	0	1	2	2	0	1
138	30	1	1	76,93	0	9	1	0	0	1	2	1	1	2

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu,.....anos,
RG número, moradora da rua
....., com prontuário
número....., abaixo assinado, concordo em participar
voluntariamente do estudo sobre doenças do colo do útero e fui informada
pela doutora Cecília que: 1) responderei às perguntas do questionário 2)
serei submetida a exame ginecológico para a coleta de amostras necessários
para prevenção do câncer do colo uterino 3) retornarei ao hospital para
receber os resultados e os tratamentos necessários 4) receberei vale
transporte para o retorno. Recebi, antes da entrevista realizada, informações
sobre a realização e sigilo do estudo. Sei também que poderei recusar-me a
participar ou a continuar no estudo a qualquer momento, sem apresentar
explicações ou motivos, e que esta recusa não irá interferir na continuidade
do meu tratamento.

São Paulo, de de 199 .

Assinatura da paciente

Doutora Cecília - telefone: 241-9848

Assinatura

Comissão de Ética - telefone: 292-4188

