

**ANA EMÍLIA BORGES DE AZEVEDO**

**Papilomavírus Humano (HPV) e sua associação com  
alterações citológicas no seguimento precoce de pacientes  
com câncer de colo uterino invasivo tratado**

**BRASÍLIA, 2012**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ANA EMÍLIA BORGES DE AZEVEDO**

**Papilomavírus Humano (HPV) e sua associação com  
alterações citológicas no seguimento precoce de pacientes  
com câncer de colo uterino invasivo tratado**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães

**BRASÍLIA**

**2012**

# **ANA EMÍLIA BORGES DE AZEVEDO**

## **Papilomavírus Humano (HPV) e sua associação com alterações citológicas no seguimento precoce de pacientes com câncer de colo uterino invasivo tratado**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 28 de Fevereiro de 2012

### **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães**

Universidade de Brasília

---

**Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro**

Universidade de Brasília

---

**Profa. Dra. Larissa Cardoso Marinho**

Universidade Federal de Goiás

---

**Prof. Dr. Rivadávio Fernandes Batista de Amorim**

Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho...*

*Aos meus pais, Antonieta e Everaldo. Meus mais profundos agradecimentos serão sempre insuficientes diante de tudo o que me foi proporcionado. Amo vocês.*

*Ao meu irmão, Fábio. Seu companheirismo e amizade são meu porto seguro.*

*Ao meu primo, Alvino Luiz Pereira Júnior (In Memoriam). Recordo-me bem de seu entusiasmo a cada pequena conquista. Sinto sua presença, seu olhar e sua felicidade com esta vitória.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me dar coragem para lutar e vencer os desafios, força para continuar nos momentos de desânimo, sabedoria para discernir e fazer as melhores escolhas e fé para crer que tudo daria certo e que valeria a pena.

Aos meus pais e meu irmão, por seu amor, por me fazerem quem sou. À minha cunhada Luciene pelo companheirismo, e a todos os meus familiares (avós, tios, primos) pelo incentivo, compreensão e apoio nos momentos difíceis.

Aos pacientes, que constituem o maior sentido da ciência médica. Seus dados proporcionaram a realização desta pesquisa. Em uma aplicação do preceito de amor ao próximo, transformaram seu próprio sofrimento em esperança de aperfeiçoar a terapêutica dos que vierem a ter doença semelhante.

Registro desde já, minha gratidão a professores, colegas, técnicos, funcionários, amigos e familiares, participantes diretos ou indiretos neste trabalho, que contribuíram para minha evolução, aperfeiçoamento científico e pessoal.

Ao meu orientador, Dr. Albino Verçosa de Magalhães, pela grande experiência e exemplo de academicismo e humanismo. Por ter depositado sua confiança em mim desde o início de minha residência médica.

À minha co-orientadora, Dra. Fabiana Pirani Carneiro, por ter estado presente em todos os momentos da elaboração deste trabalho, compartilhando conhecimento científico, paciência, serenidade e por ter sido parte essencial do meu amadurecimento enquanto pesquisadora.

À Dra. Larissa Cardoso Marinho por ter me ensinado muito da prática como patologista.

Ao Dr. Rivadávio Fernandes Batista Amorim por seu entusiasmo científico.

Aos Drs. Juliano de Pádua Nakashima e Wenzel Castro de Abreu, radioterapeutas responsáveis pela coleta das amostras e orientação das pacientes submetidas à braquiterapia no Hospital Universitário de Brasília.

Meu sincero agradecimento à Priscila de Souza Maggi Bontempo, pela solicitude e doçura com que abordou as pacientes que fizeram parte deste estudo e cuidado com o material coletado. Posso dizer que ela foi a minha extensão quando eu não estive presente nos ambulatórios de braquiterapia.

À Dra. Viviane Rezende de Oliveira, oncoginecologista do Hospital Universitário de Brasília, pela contribuição com este trabalho realizando os exames de colposcopia e biópsia.

Aos Drs. Anamélia Lorenzetti Bocca e Florêncio Figueiredo Cavalcante Neto pela contribuição com este trabalho realizando os exames de captura híbrida.

A Tércia Maria Lousa de Castro Mendes por sua contribuição com este trabalho realizando as reações imunocitoquímicas.

Aos colegas patologistas e funcionários do Centro de Anatomia Patológica (CAP) do Hospital Universitário de Brasília pela amizade e apoio, em especial ao Prof. Mário Augusto Pinto de Moraes.

Destaco a importância do Dr. Alexandre Cavalca Tavares, chefe do CAP do Hospital Universitário de Brasília, por tornar possível a realização da pesquisa nesta instituição, onde comecei a construir minha vida profissional e pelo incentivo em todos os momentos.

Aos colegas citopatologistas do Núcleo Central de Citopatologia pelo incentivo e apoio.

Aos colegas de trabalho do Laboratório Diagnose, Drs. Horácio Friedman, Isabel Friedman e Jeffersone Maria, pelos ensinamentos contínuos e por serem exemplos de profissionalismo, seriedade e retidão.

Aos amigos e irmãos, Drs. Luiz Eduardo de Almeida Prado Franceschi e Alesso Cervantes Sartorelli, com quem tenho o prazer de compartilhar meus dias de trabalho, com quem aprendo constantemente a ser uma melhor patologista e principalmente uma pessoa melhor. Muito Obrigada.

Meus mais sinceros e emocionados agradecimentos a Dra. Tânia Wanderley e família por se fazerem minha família e base de apoio em Brasília e pela inestimável

contribuição com sua experiência em citopatologia neste trabalho. Por ser uma grande professora e fazer da citopatologia uma área extremamente interessante, instigante e fonte de pesquisa para os que foram e são seus residentes.

A todos os amigos que estiveram presentes e compartilharam comigo momentos doces e árduos, em especial a Lívia Maia, Lisley Calixto, Lêda Rufino, Juca Moreno, Igor Teixeira, Emanuel Adelino, Melissa Vitta, Adriana Sartorelli e Taise Moura, que fizeram os meus dias mais felizes e leves.

A Bráulio Gusmão pelo suporte, dedicação e amor incondicionais, mesmo a distância. Por me oferecer sempre o lado melhor das situações e a certeza de que tudo daria certo e mais uma etapa seria vencida.

*“Se um dia tudo lhe parecer perdido, lembre-se de que você nasceu sem nada, e tudo que conseguiu foi através de esforços e os esforços nunca se perdem, somente dignificam as pessoas.”*

*Charles Chaplin*

*“Nulla dies sine linea (Nenhum dia sem uma linha).”*

*Émile Zola*



**Esta dissertação obedece:**

Às normas para redação de teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília.

Às normas de referências bibliográficas adaptadas do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

## SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>25</b>
2.1 Histórico das lesões precursoras do câncer de colo uterino.....	25
2.2 Etiopatogênese do câncer de colo uterino.....	26
2.3 História natural da neoplasia cervical.....	28
2.4 O papel do HPV na carcinogênese cervical.....	29
2.4.1 Papilomavírus Humano.....	30
2.4.2 Expressão do genoma do HPV.....	31
2.5 Classificação do câncer de colo uterino invasivo.....	32
2.6 Tratamento e prognóstico do câncer de colo uterino invasivo.....	33
2.6.1 Modalidades terapêuticas.....	33
2.6.2 O papel da radioterapia.....	34
2.6.3 Fatores preditivos do prognóstico.....	35
2.7 Métodos de rastreamento e seguimento do câncer de colo uterino.....	36
2.7.1 Citologia esfoliativa convencional.....	37
2.7.2 Citologia em base líquida.....	38
2.7.3 Métodos moleculares de detecção do DNA-HPV.....	38
2.7.3.1 Hibridização com sondas ( <i>Southern blot</i> , <i>Dot blot</i> e Captura Híbrida).....	39
2.7.3.2 Teste de Hibridização <i>in situ</i> (ISH).....	39
2.7.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	40
2.7.3.4 Chipes de DNA.....	40
2.7.4 Imunocitoquímica.....	41

<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
<b>4 MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
4.1 Desenho do estudo e pacientes.....	44
4.2 Citologia e biópsia.....	44
4.3 Avaliação morfológica das amostras.....	45
4.4 Captura híbrida.....	46
4.5 Imunocitoquímica.....	47
4.6 Análise estatística.....	50
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1 Características clínicas da amostra.....	51
5.2 Descrição e comparação dos achados morfológicos pelos métodos convencional e em base líquida.....	55
5.3 Frequência de infecção por HPV pela captura híbrida.....	67
5.4 Expressão imunocitoquímica do anticorpo BPV-1-1H8 para HPV.....	68
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
6.1 Discussão sobre o método.....	73
6.2 Limitações do estudo.....	76
6.3 Dados clínicos e epidemiológicos.....	78
6.4 Achados morfológicos.....	82
6.5 Detecção do HPV pela captura híbrida.....	85
6.6 Detecção do HPV por imunocitoquímica.....	88
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>8 REFERENCIAS.....</b>	<b>93</b>
<b>9 APÊNDICES.....</b>	<b>113</b>
9.1 Apêndice A.....	113
9.2 Apêndice B.....	114

9.3 Apêndice C.....	115
9.4 Apêndice D.....	118
9.5 Apêndice E.....	121
9.6 Apêndice F.....	125
<b>10 ANEXOS.....</b>	<b>137</b>
10.1 Anexo A.....	137
10.2 Anexo B.....	138

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**ACHO:** Anticoncepcional Hormonal Oral

**AGUS:** Do inglês *Atypical glandular cells of undetermined significance* (Células glandulares atípicas de significado indeterminado)

**AIS:** Adenocarcinoma *in situ*

**AP-1:** Proteína ativadora-1

**ASC-H:** Do inglês *Atypical Squamous Cell – cannot exclude HSIL* (Células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau)

**ASC-US:** Do inglês *Atypical Squamous Cell Undetermined Significance* (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)

**ATP:** Trifosfato de adenosina

**ATPase:** Enzima que converte o trifosfato de adenosina em difosfato de adenosina

**CBL:** Citologia em base líquida

**CC:** Citologia convencional

**CEC:** Carcinoma de células escamosas

**CIS:** Carcinoma *in situ*

**CO:** Do inglês *cutoff*

**DAB:** Diaminobenzidina

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DNA-HPV:** Genoma do HPV

**DST:** Doença sexualmente transmissível

**E:** Do inglês *early* (*precoce*)

**ed.:** Edição

**et al.:** e colaboradores

**FIGO:** Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

**G0:** Fase de quiescência do ciclo celular

**G1:** Fase de pré-síntese do ciclo celular

**G2:** Fase pré-mitótica do ciclo celular

**HC2:** Captura híbrida 2

**HE:** Hematoxilina e eosina

**HUB:** Hospital Universitário de Brasília

**HIV:** Vírus da Imunodeficiência humana

**HPV:** Papilomavírus Humano

**HSIL:** Do inglês *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão intraepitelial escamosa de alto grau)

**IARC:** Do inglês *International Agency for Research on Cancer*

**IC:** Intervalo de Confiança

**INCA:** Instituto Nacional do Câncer

**ISH:** Hibridização *in situ*

**K:** Coeficiente Kappa

**Kb:** quilobase

**kDa:** quiloDalton

**L:** Do inglês *late* (tardio)

**LCR:** Do inglês *Long Control Region* (região controladora longa)

**LSIL:** Do inglês *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau)

**M:** Fase mitótica do ciclo celular

**n:** Amostra

**NIC:** Neoplasia intraepitelial cervical

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**ORF:** Do inglês *Open Read Frame*

**p:** Nível de significância

**p.:** Página

**pb:** pares de bases

**PBS:** Do inglês *Phosphate buffered saline* (solução salina tamponada com fosfatos)

**PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase

**pRb:** Proteína do retinoblastoma

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RLU:** Do inglês *relative light unit* (unidade relativa de luz)

**rpm:** rotações por minuto

**RR:** Risco Relativo

**S:** Fase de síntese do ciclo celular

**SE:** Erro padrão

**SIL:** Do inglês *Squamous Intraepithelial Lesion*

**TBS:** Sistema Bethesda

**UCM:** Do inglês *Universal Medium Collection*

**URR:** Do inglês *upstream regulatory region*

$\chi^2$ : qui-quadrado



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Células epiteliais escamosas típicas exibindo expressão citoplasmática ou ausência de expressão para BPV-1-1H8. Imunocitoquímica, 100X.....47
- Figura 2** – Células escamosas atípicas exibindo expressão nuclear e citoplasmática (A) e expressão nuclear (B) para BPV-1-1H8. Imunocitoquímica, 400X.....48
- Figura 3** – Corte histológico de carcinoma de células escamosas *in situ* de colo uterino exibindo expressão nuclear e citoplasmática para BPV-1-1H8. Imunohistoquímica, 100X.....49
- Figura 4** – Esfregaço cervicovaginal convencional exibindo exsudato leucocitário em meio a células escamosas atróficas. Papanicolaou, 100X.....59
- Figura 5** - Esfregaços cervicovaginais convencional (A) e em base líquida (B) exibindo células epiteliais escamosas com alterações reparativas. Papanicolaou, 400X.....59
- Figura 6** - Esfregaços cervicovaginais convencional (A) e em base líquida (B) exibindo células gigantes multinucleadas. Papanicolaou, 100X e 400X.....60
- Figura 7** - Esfregaço cervicovaginal convencional exibindo macrócito com policromasia citoplasmática. Papanicolaou, 400X.....60
- Figura 8** - Esfregaços cervicovaginais convencional (A) e em base líquida (B) exibindo vacuolização citoplasmática com ingestão de neutrófilos. Papanicolaou, 400X.....61
- Figura 9** - ASC-H. Esfregaços cervicovaginais convencionais exibindo agrupamentos de células escamosas com aumento da relação núcleo/citoplasma, hipercromasia e irregularidade da membrana nuclear. Papanicolaou, 400 X.....62

- Figura 10** – ASC-H. Esfregaço cervicovaginal em base líquida exibindo agrupamentos de células escamosas com aumento da relação núcleo/citoplasma, hipercromasia e irregularidade da membrana nuclear. Papanicolaou, 400 X.....63
- Figura 11** – LSIL. Esfregaço cervicovaginal em base líquida. Papanicolaou, 100X.....63
- Figura 12** – Esfregaços cervicovaginais convencionais exibindo halos perinucleares em células escamosas com núcleos aumentados de volume, hipercromáticos e citoplasma queratinizado. Papanicolaou, 400X.....64
- Figura 13** – HSIL. Esfregaços cervicovaginais convencionais exibindo células escamosas profundas com aumento da relação núcleo/citoplasma, hipercromasia e cromatina grosseira. Papanicolaou, 400X.....64
- Figura 14** – CEC. Esfregaços cervicovaginais convencionais exibindo células escamosas com aumento da relação núcleo/citoplasma, hipercromasia, cromatina grosseira, membrana nuclear irregular e citoplasma queratinizado. Amostra 45 (A e B), amostra 48 (C e D), amostra 30 (E) e amostra 33 (F). Papanicolaou, 400X e 40X.....66
- Figura 15** – Esfregaços corados pelo Papanicolaou (A) e imunocitoquímica para HPV (B) em aumento de 400X, exibindo expressão nuclear em células epiteliais escamosas atípicas. Amostra 21.....69
- Figura 16** – Esfregaços corados pelo Papanicolaou (A) e imunocitoquímica para HPV (B) em aumento de 400X, exibindo expressão nuclear e citoplasmática em células epiteliais escamosas atípicas. Amostra 33.....69
- Figura 17** – Imunocitoquímica para HPV em aumento de 400X, exibindo expressão nuclear forte de padrão granular. Amostra 4 (A), amostra 37 (B) e amostra 7.....70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Distribuição da forma de tratamento de acordo com o diagnóstico e estadiamento clínico.....	52
<b>Tabela 2</b> - Distribuição do hábito de fumar de acordo com o diagnóstico histopatológico.....	52
<b>Tabela 3</b> - Distribuição do uso de hormônio de acordo com o diagnóstico histopatológico.....	53
<b>Tabela 4</b> - Distribuição de faixa etária (em anos) de acordo com o diagnóstico histopatológico.....	53
<b>Tabela 5</b> - Distribuição da sexarca (em anos) de acordo com o diagnóstico histopatológico.....	53
<b>Tabela 6</b> - Distribuição do número de parceiros sexuais de acordo com o diagnóstico histopatológico.....	54
<b>Tabela 7</b> - Distribuição do número de gestações de acordo com o diagnóstico histopatológico.....	54
<b>Tabela 8</b> - Frequência dos diagnósticos de acordo com o método citológico.....	55
<b>Tabela 9</b> - Concordância entre os diagnósticos citológicos pela CC e CBL.....	56
<b>Tabela 10</b> - Detalhamento das amostras discordantes pelos métodos CC e CBL....	57
<b>Tabela 11</b> - Frequência das alterações morfológicas de acordo com o diagnóstico citológico pela CC e CBL.....	58

**Tabela 12** - Frequência de expressão de HPV de alto risco e valores de RLU/CO de acordo com os achados citológicos na citologia convencional.....67

**Tabela 13** – Expressão imunocitoquímica do anticorpo BPV-1-1H8 em relação a captura híbrida.....71

**Tabela 14** – Expressão imunocitoquímica do anticorpo BPV-1-1H8 em relação às anormalidades citológicas na CBL.....71

**Tabela 15** – Expressão imunocitoquímica do anticorpo BPV-1-1H8 em relação a estimativa de carga viral (RLU/CO) >10.....72

## RESUMO

Azevedo, AEB. Papilomavírus Humano (HPV) e sua associação com alterações citológicas no seguimento precoce de pacientes com câncer de colo uterino invasivo tratado [dissertação]. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília; 2012.

**INTRODUÇÃO:** O câncer de colo uterino é uma neoplasia que ainda apresenta alta incidência e mortalidade nos países em desenvolvimento e que possui um agente etiológico e história natural bem estabelecidos. O emprego da radioterapia no tratamento é fundamental por sua eficácia terapêutica, porém frequentemente induz alterações morfológicas nas células epiteliais neoplásicas e não neoplásicas e nas células estromais, que dificultam o diagnóstico de doença neoplásica residual, gerando um dilema na rotina do patologista. Considerando as limitações da citologia na detecção de câncer residual, torna-se relevante associar à citologia, métodos capazes de detectar a presença de HPV. Neste estudo, os métodos associados foram captura híbrida e imunocitoquímica, com o objetivo de avaliar a frequência de infecção por HPV em amostras cervicais e vaginais no seguimento precoce de pacientes com câncer de colo uterino invasivo tratado e correlacionar com os resultados do exame citológico. **MÉTODOS:** Estudo descritivo transversal, no qual foram avaliadas 52 amostras cervicais e vaginais de pacientes com câncer de colo uterino invasivo, submetidas à braquiterapia no Hospital Universitário de Brasília, no período de fevereiro a dezembro de 2010. As amostras foram avaliadas pelos métodos citológicos convencional (CC) e em base líquida (CBL), foi realizada captura híbrida para HPV de alto risco e imunocitoquímica com anticorpo que detecta a proteína maior do capsídeo L1 do HPV (BPV-1-1H8). **RESULTADOS:** 1) A análise citológica pela CC e CBL revelou exsudato leucocitário, reparo, macrocitose, células gigantes multinucleadas e vacuolização citoplasmática como achados morfológicos mais frequentes nos casos negativos. Os casos com carcinoma persistente exibiam pouca ou nenhuma atipia radioterápica. 2) A captura híbrida detectou HPV de alto risco em 46,1% das amostras. Não houve diferença significativa na frequência viral e mediana de RLU/CO entre as amostras vaginal e cervical, nem nos diferentes estádios da doença. Anormalidades citológicas foram significativamente mais frequentes em amostras com HPV positivo do que em amostras sem HPV ( $p = 0.019$ , teste de Fisher). A mediana da relação RLU/CO foi significativamente maior em pacientes com anormalidades citológicas quando comparado com a mediana nas amostras com citologia negativa ( $p = 0.029$ , Mann-Whitney). 3) A imunocitoquímica foi positiva em 52,3% das amostras. Houve maior tendência de expressão em amostras com anormalidades citológicas, porém não estatisticamente significativa. **CONCLUSÕES:** O presente estudo sugere que métodos de detecção de DNA-HPV, como a captura híbrida, podem ser úteis como um complemento da citologia no diagnóstico de neoplasia residual no seguimento precoce de pacientes tratadas com radioterapia. Nos casos com diagnóstico citológico negativo e captura híbrida positiva, a imunocitoquímica pode detectar o HPV em células viáveis, infectadas produtivamente, podendo indicar risco para desenvolvimento de lesão posteriormente.

**Palavras-chave:** HPV, câncer cervical; citologia cervical; radioterapia; captura híbrida; imunocitoquímica; proteína maior do capsídeo L1.

## SUMMARY

Azevedo, AEB. *Association between human papillomavirus infection and cytological abnormalities in early follow up of invasive cervical cancer* [Master's thesis]. "Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília"; 2012.

**INTRODUCTION:** Cervical cancer still has high incidence and mortality in developing countries and has a well established etiologic agent and natural history. The use of radiotherapy in the treatment is crucial for its therapeutic efficacy, but often induces morphological changes in the neoplastic and non-neoplastic epithelial cells and stromal cells, which make difficult the diagnosis of residual neoplastic disease, creating a dilemma in pathologist routine. Considering the limitations of cytology in detection of residual cervical cancer, it becomes important to associate to cytology, methods capable of detecting the presence of HPV. In this study, the methods associated were hybrid capture and immunocytochemistry, in order to evaluate the frequency of HPV infection in cervical and vaginal samples in early follow-up of patients treated for invasive cervical cancer and correlate with the results of cytological examination. **METHODS:** Cross-sectional study consisting of cervical and vaginal samples of 52 women with invasive cervical carcinoma treated with brachytherapy at the University Hospital of Brasilia, in the period from February to December 2010. The samples were evaluated by conventional (CC) and liquid-based (CBL) cytological methods. Hybrid capture was carried out to high-risk HPV and immunocytochemistry with an antibody that detects the L1 major capsid protein of HPV (BPV-1-1H8). **RESULTS:** 1) The cytological analysis, in the CC and CBL, revealed exudate leukocyte, repair, macrocytosis, multinucleated giant cells and cytoplasmic vacuolization as morphological findings more frequent in negative cases. Cases with persistent carcinoma showed little or no radiotherapy atypia. 2) High risk HPV was detected in 46.1% of the samples. No significant difference was observed in viral frequency and in median of the ratio RLU/CO between vaginal and cervical samples nor in samples of patients at different clinical stages. Cytological abnormalities were significantly more frequent in samples with HPV than in samples without HPV ( $p = 0.019$ , Fisher's test). The viral load was also significantly higher in samples with cytological abnormalities when compared with the samples with negative cytology ( $p = 0.029$ , Mann-Whitney's test). 3) Immunocytochemistry was positive in 52.3% of samples. There was a greater tendency of expression in samples with cytological abnormalities, but not statistically significant. **CONCLUSIONS:** This study suggests that methods of detection of DNA-HPV, such as hybrid capture, may be useful as a complement to cytology for the diagnosis of residual neoplasia in patients after radiotherapy for cervical cancer in the early follow-up. In cases with negative cytological diagnosis and positive hybrid capture, immunocytochemistry can detect HPV in viable cells, productively infected, which can indicate risk for recurrence.

**Key-words:** HPV; cervical cancer; cervical cytology; radiotherapy; hybrid capture; immunocytochemistry; L1 major capsid protein.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero é o terceiro tipo de câncer mais prevalente entre as mulheres no mundo e a quarta causa de morte por câncer em mulheres, tendo sido responsável por 9,0 % (529.800) do total de novos casos e 8,0% (257.100) do total de mortes por câncer entre mulheres em 2008 (1). Nos países em desenvolvimento, ele ocupa a segunda posição em incidência e mortalidade (1,2).

No Brasil, de acordo com a estimativa de incidência para o ano de 2012 do Instituto Nacional de Câncer (INCA), excluindo os tumores de pele, o câncer de colo uterino é o mais incidente na região Norte e ocupa a segunda posição mais frequente nas regiões Centro-Oeste e Nordeste (3).

No Distrito Federal, a taxa de incidência bruta do câncer de colo uterino para o ano de 2012 é de 23,0 casos para cada 100.000 mulheres (3).

O carcinoma de células escamosas é o tipo histológico mais freqüente, perfazendo 80,0 - 90,0% dos casos. Adenocarcinoma representa 10,0 - 20,0% dos casos, com uma tendência de aumento de incidência nos países desenvolvidos. Este último também tem uma taxa de sobrevida menor quando comparado ao carcinoma de células escamosas no mesmo estágio (4).

Desde 1992, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considera que a persistência da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em altas cargas virais representa o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de colo uterino (3).

A infecção por HPV é umas das mais prevalentes do mundo. O vírus está envolvido na carcinogênese de cânceres de alta prevalência e mortalidade como cânceres da região anogenital e da cabeça e pescoço (1). No colo, diversos tipos de HPV de alto risco têm sido detectados em quase todos os casos de câncer invasivo. Este aumento de prevalência tem sido sentido a partir de 1960, coincidente com o aumento do uso de contraceptivos orais, diminuição do uso de outros métodos de barreira e avanço tecnológico nos métodos diagnósticos (5).

São conhecidos, atualmente, mais de 100 tipos diferentes de HPV e cerca de 20 destes possuem tropismo pelo epitélio escamoso da região anogenital (colo, vulva, períneo, região perianal e anal). Desses tipos, são considerados como de baixo risco para o desenvolvimento de câncer os de números 6, 11, 26, 40, 42, 53-

55, 57, 61 e 70 (relacionados principalmente a lesões benignas, tais como condiloma, e também à lesão de baixo grau). Os de alto risco são os de números 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 (relacionados a lesões de alto grau e câncer) (6).

A OMS, em parceria com a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), identificou os tipos 16 e 18 como os principais agentes etiológicos do câncer de colo uterino, firmando-se cientificamente, pela primeira vez, a indução de um tumor sólido por um vírus (5,6). Estudos que utilizam métodos de hibridização têm demonstrado que mais de 99,0% dos casos podem ser atribuídos a alguns tipos de HPV, sendo o HPV 16 o responsável pela maior proporção de casos (50,0%), seguido do HPV 18 (12,0%), HPV 45 (8,0%) e o HPV 31(5,0%) (7). O efeito oncogênico viral está associado à expressão dos genes E6 e E7 do HPV de alto risco (6,8).

As opções de tratamento para o câncer cervical invasivo são cirurgia, radioterapia e quimioterapia ou combinação destas, dependendo do estadiamento clínico da doença, estabelecido pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (9,10).

O seguimento adequado após o tratamento é importante principalmente nos dois primeiros anos imediatos à terapêutica, visto que 50,0% das recorrências são detectadas no primeiro ano e 85,0% nos dois primeiros anos. A recorrência local tem sido descrita em 14,0% a 57,0% das pacientes. Recomenda-se reavaliação clínica e exame citológico cervicovaginal convencional a cada três meses nos primeiros dois anos de seguimento, ampliando para seis meses do 3º ao 5º ano de seguimento (11).

Há poucas evidências de que a citologia cervical/vaginal acrescente informação significativa ao exame clínico na detecção precoce de doença recorrente, devido à sua baixa sensibilidade e dificuldades diagnósticas relacionadas ao efeito da radioterapia (12-16). A sensibilidade do método varia de 13,0% a 51,0% para detectar lesões intraepiteliais escamosas ou carcinoma invasivo (17). A baixa sensibilidade se deve a vários fatores interferentes. Acredita-se que estes possam interferir, pelo menos em parte, devido à própria subjetividade na interpretação do exame, o que acarreta uma importante variabilidade diagnóstica inter e intraobservadores. Esta interpretação depende diretamente da boa qualidade da amostra, mas também da experiência do observador (18,19). Trabalhos prévios



mostram que o seguimento de pacientes com câncer de colo uterino tratado através do esfregaço cervicovaginal convencional não permite detecção precoce da recorrência, especialmente em pacientes assintomáticas (20,21). Além disso, no exame citológico cervicovaginal de pacientes em seguimento pós-tratamento, principalmente pós-radioterapia, podem surgir alterações celulares tanto no epitélio glandular quanto no escamoso, que frequentemente são confundidas com atipias neoplásicas e que resultam em diagnósticos falso-positivos ou de atipias de significado indeterminado (22,23).

Tendo em vista que, o tratamento pode determinar um grande espectro de alterações tanto nas células neoplásicas quanto nas não neoplásicas, o conhecimento do patologista acerca das modificações morfológicas induzidas pela radio/quimioterapia tem um papel crítico para evitar a possibilidade de erros (24). Se a radioterapia for bem sucedida, a grande maioria das células malignas irá desaparecer no final do tratamento ou um mês após. Então, os esfregaços obtidos 6-8 semanas após o término da radioterapia são os mais adequados e importantes para avaliar a resposta ao tratamento (25).

Estudos recentes indicam que a persistência de infecção por HPV após tratamento radioterápico, pode estar associada com recorrência da doença. Nesse contexto, torna-se relevante associar à citologia convencional, métodos capazes de detectar a presença de HPV após o tratamento. A captura híbrida, apesar de ser um teste utilizado largamente em conjunto com a citologia no diagnóstico pré-tratamento, não é rotineiramente utilizada no seguimento de pacientes após o tratamento, especialmente em países em desenvolvimento. Estudos têm mostrado que a identificação do vírus pode ser clinicamente útil após o tratamento de câncer invasivo porque indica não só a resposta terapêutica como também o risco de desenvolver um novo câncer cervical/vaginal (27-30). A imunocitoquímica para detecção de HPV foi utilizada em poucos estudos recentes. A detecção da proteína maior do capsídeo L1 por este método parece ter significância prognóstica na progressão de lesões intraepiteliais cervicais, porém seu uso permanece restrito à pesquisa (31). A associação entre persistência viral e presença de anormalidades na citologia cervical/vaginal após tratamento de câncer cervical invasivo ainda permanece pouco clara (32-36).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO DAS LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER DE COLO UTERINO

O conceito de lesões precursoras da neoplasia de colo uterino remonta ao fim do século XIX, quando áreas de alterações epiteliais atípicas não invasivas foram identificadas em amostras teciduais adjacentes às neoplasias invasivas (37-42). O termo carcinoma *in situ* (CIS) foi introduzido na literatura em 1932 para indicar as lesões em que as células carcinomatosas indiferenciadas ocupavam a espessura total do epitélio, sem ruptura da membrana basal (43). A associação entre o CIS e a neoplasia invasiva do colo uterino foi posteriormente verificada. O termo displasia foi introduzido no final dos anos 50 para designar a atipia epitelial cervical intermediária entre o epitélio normal e o CIS (44). A displasia recebeu uma categorização adicional em três grupos – leve, moderada e grave – dependendo do grau de comprometimento da espessura epitelial por células atípicas. Posteriormente, durante muitos anos, as lesões pré-neoplásicas cervicais passaram a ser indicadas segundo as categorias de displasia e CIS, e ainda são amplamente usadas em muitos países em desenvolvimento (44).

Um sistema de classificação dividido em classes distintas para displasia e CIS tornou-se cada vez mais arbitrário, baseado nos achados de vários estudos de seguimento com mulheres portadoras de tais lesões. Observou-se que alguns casos de displasia regrediam, alguns persistiam e outros progrediam ao CIS. Uma correlação direta com progressão e grau histológico foi verificada (45). Essas observações levaram ao conceito de um único processo patológico contínuo pelo qual o epitélio normal evolui para lesões precursoras epiteliais e para neoplasia invasiva. Com base nas observações anteriores, o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) foi introduzido em 1968 para indicar uma ampla gama de atipias celulares limitadas ao epitélio. A NIC foi dividida em graus 1, 2 e 3 (45). A NIC I correspondia à displasia leve, a NIC II à displasia moderada e a NIC III à displasia grave e CIS (45).

Nos anos 80, as alterações anatomopatológicas tais como a atipia colocítica ou condilomatosa associada à infecção pelo papilomavírus humano foram cada vez

mais identificadas. Coilocitos são células atípicas com uma cavitação perinuclear no citoplasma que indica alterações citopáticas devido à infecção pelo HPV. Isto levou ao desenvolvimento de um sistema histológico simplificado de dois graus. Assim, em 1990, foi proposta uma terminologia histopatológica baseada em dois graus da doença: NIC de baixo grau que compreendia anomalias compatíveis com efeito citopático pelo HPV e NIC I e NIC de alto grau que compreendia as NIC II e III. As lesões de alto grau foram consideradas como genuínas precursoras da neoplasia invasiva (45).

Em 1988, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos realizou um simpósio para propor um novo esquema de registro dos resultados da citologia cervical (Relatório do Simpósio de NIC, 1989) (46). As recomendações deste simpósio e a revisão posterior dele em um segundo simpósio realizado em 1991 ficaram conhecidas como Sistema Bethesda (TBS) (Relatório do Simpósio de NIC, 1992). A característica principal do TBS foi a criação do termo lesão intraepitelial escamosa (SIL- *Squamous Intraepithelial Lesion*) e um esquema de dois graus que compreendia lesões de baixo grau (LSIL- *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion*) e alto grau (HSIL- *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion*). A classificação do TBS combina alterações condilomatosas (HPV) e NIC de baixo grau (NIC I) em LSIL, enquanto a HSIL compreende NIC mais avançada, como NIC II e III. O termo lesão foi usado para enfatizar que qualquer uma das alterações morfológicas em que se baseia um diagnóstico não identifica necessariamente um processo neoplásico. Embora elaborado para a notificação citológica, o TBS é também usado para informar sobre achados histopatológicos (46).

O TBS foi reavaliado e revisado em um simpósio em 2001, convocado pelo INCA, co-patrocinado por 44 sociedades profissionais representativas de mais de 20 países (47).

## 2.2 ETIOPATOGENESE DO CÂNCER DE COLO UTERINO

Estudos epidemiológicos identificaram vários fatores de risco que contribuem ao desenvolvimento de lesões precursoras e neoplasia invasiva de colo uterino. Estas incluem infecção por certos tipos oncogênicos de HPV, relação sexual

precoce, múltiplos parceiros sexuais, multiparidade, uso prolongado de anticoncepcionais orais, tabagismo, baixo nível socioeconômico, infecção por *Chlamydia trachomatis*, deficiência de micronutrientes e uma dieta deficiente em vegetais e frutas (48-53).

Tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 de HPV estão significativamente associados com lesão de alto grau e neoplasia invasiva (48-51). Considera-se uma infecção persistente por um ou mais dos tipos oncogênicos mencionados anteriormente uma causa necessária para o desenvolvimento da neoplasia cervical (48). A análise de resultados combinados de um estudo de caso-controle multicêntrico, realizado pelo Centro Internacional de Pesquisas sobre o Câncer, revelou riscos relativos (RR) que variavam de 17 na Colômbia a 156 nas Filipinas, com um RR combinado de 60 (Intervalo de Confiança - IC de 95,0%) para a neoplasia do colo uterino (51). A associação foi igualmente significativa para o carcinoma escamoso (RR: 62) e para o adenocarcinoma de colo uterino (RR: 51). O ácido desoxirribonucleico (DNA) do HPV foi detectado em 99,7% das 1.000 amostras avaliáveis de biopsia de neoplasia de colo uterino obtidas em 22 países (51,52). HPV 16 e 18 são os principais genótipos virais encontrados em neoplasias do colo uterino em todo o mundo (53). Vários estudos de coorte revelaram uma associação significativa entre a infecção persistente por HPV oncogênico e alto risco de desenvolver NIC (54-59).

A infecção pelo HPV é transmitida através do contato sexual e os fatores de risco estão intimamente relacionados com o comportamento sexual (por exemplo, número de parceiros sexuais, relação sexual em idade precoce). Na maioria das mulheres, as infecções pelo HPV são transitórias. A história natural da infecção pelo HPV tem sido bastante reavaliada. Embora a prevalência da infecção pelo HPV varie em diferentes regiões do mundo, atinge em geral um pico de cerca de 20,0 - 30,0% das mulheres entre 20 e 24 anos de idade, com uma diminuição posterior a aproximadamente 3,0% a 10,0% das mulheres de mais de 30 anos de idade (60,61). Cerca de 80,0% das mulheres jovens que contraem o HPV têm infecções transitórias que se resolvem em 12 a 18 meses (62).

Acredita-se que a infecção pelo HPV comece nas células basais ou parabasais do epitélio metaplásico. Se a infecção persiste, pode ocorrer a integração do genoma viral ao genoma celular do hospedeiro. A diferenciação e a maturação normal do epitélio escamoso metaplásico imaturo em maduro são interrompidas

como resultado da expressão de oncoproteínas E6/E7 e da perda do controle de crescimento normal. Isto pode levar ao desenvolvimento de epitélio displásico. Se o processo neoplásico segue ininterrupto, com o tempo, a lesão pode ocupar a espessura total do epitélio. Posteriormente, a doença pode atravessar a membrana basal e converter-se em neoplasia invasiva, estendendo-se aos órgãos adjacentes. A neoplasia invasiva pode atingir vasos sanguíneos e linfáticos e a doença se dissemina aos gânglios linfáticos e órgãos à distância (59).

### 2.3 HISTÓRIA NATURAL DA NEOPLASIA CERVICAL

Apesar da exposição frequente das mulheres ao HPV, o surgimento da neoplasia cervical é pouco comum. A maioria das anomalias cervicais causadas pela infecção pelo HPV tem pouca probabilidade de progredir a neoplasia intraepitelial de alto grau ou neoplasia do colo uterino invasiva, visto que a maioria regride espontaneamente. A longa duração entre a infecção inicial e a doença manifesta indica que vários cofatores (por exemplo, diferenças genéticas, efeitos hormonais, deficiências de micronutrientes, tabagismo ou inflamação crônica) podem ser necessários para a progressão da doença. A regressão espontânea da NIC também pode indicar que muitas mulheres não estão expostas a esses cofatores (63).

Vários estudos trataram da história natural da NIC, com ênfase na regressão, persistência e progressão da doença (64-67). Eles revelaram que a maioria das lesões de baixo grau é transitória; grande parte regride ao normal em períodos relativamente curtos ou não progride para formas mais graves. A NIC de alto grau, por outro lado, tem uma probabilidade muito maior de progredir para neoplasia invasiva, embora uma porcentagem de tais lesões também regrida ou torne-se persistente (64).

Alguns estudos tentaram resumir as taxas de regressão, persistência e progressão da NIC. Embora esses estudos tenham muitas limitações, eles oferecem uma visão interessante sobre o comportamento biológico dessas lesões. Em uma revisão, as probabilidades acumulativas para todos os graus de NIC seguidas tanto por citologia como histologia foram de 45,0% para regressão, 31,0% para persistência e 23,0% para progressão (64). As taxas de progressão para neoplasia

invasiva em estudos que fizeram o seguimento de pacientes com CIS por biopsia variaram de 29,0% a 36,0% (63).

Assim como ocorre com as lesões escamosas, a lesão precursora que se reconhece como tendo sido originada do epitélio colunar é denominada de adenocarcinoma *in situ* (AIS). No AIS, o epitélio colunar normal é substituído por epitélio anormal que revela perda da polaridade, aumento do tamanho das células, aumento do tamanho do núcleo, hipercromasia nuclear, atividade mitótica, redução da expressão de mucina citoplasmática e estratificação ou empilhamento celular. Podem também ser observadas glândulas com ramificação e brotos anormais com projeções papilares epiteliais intraluminais sem estroma no seu interior. São subdivididos, com base nos tipos de células, em endocervical, endometriode, intestinal e misto. A maioria dos AIS é encontrado na zona de transformação. O AIS pode estar associado à NIC do epitélio escamoso em um a dois terços dos casos (68).

## 2.4 O PAPEL DO HPV NA CARCINOGENESE CERVICAL

No estudo do carcinoma cervical, o interesse pelo HPV cresceu desde que foi sugerida, na década de 70, a associação entre o este e o câncer cervical. Vários estudos epidemiológicos, clínico-patológicos e moleculares se seguiram, confirmando o papel do HPV na patogênese do câncer cervical e em suas lesões precursoras.

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas que envolve tanto mudanças genéticas quanto epigenéticas, culminando na ativação de proto-oncogenes e/ou inativação dos genes supressores de tumor (69). A passagem da célula pelas diversas fases do ciclo celular é realizada de forma rígida por genes controladores do ciclo. Uma célula maligna difere de uma célula normal principalmente pela sua independência desse controle, sendo necessário um acúmulo de mutações nos cromossomos para tal transformação (70). Alguns tipos de Papilomavírus Humano, nos últimos anos, têm sido responsabilizados pelo desenvolvimento de malignidade nas regiões que comumente infectam, compreendendo, na mulher, o períneo, vulva, vagina, colo de útero e região anal e

no homem, pênis, uretra, saco escrotal e região anal (71,72). Além das áreas comumente descritas na literatura, o desenvolvimento de pesquisas vem demonstrando a presença de HPV de alto risco oncogênico e sua possível associação com o desenvolvimento de malignidade na região da orofaringe e cordas vocais (73). Estudos recentes, usando testes de reação em cadeia da polimerase (PCR) demonstraram a presença do DNA do HPV em mais de 99,7% dos casos de câncer cervical. Atualmente está bem estabelecido que a infecção pelo HPV é o fator central e causal do câncer de colo do útero (74).

#### **2.4.1 Papilomavírus Humano**

Os vírus do papiloma humano são classificados na família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavírus* (75,76). São vírus não envelopados, de simetria icosaédrica, com 72 capsômeros e um genoma de DNA de fita dupla circular, constituindo-se de aproximadamente 6.800 a 8.400 pares de bases (pb) (75,77). A região *early* (E) é formada pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7. É expressa em células infectadas não produtivas e células transformadas. Além disso, a região E codifica proteínas reguladoras virais, incluindo aquelas necessárias para a iniciação da replicação do DNA viral. E1 tem relação com a replicação viral, E2 com a transcrição e replicação, E4 com a maturação viral e alteração da matriz intracelular. E5, E6 e E7 estão envolvidos na transformação celular (78-83). A região *late* (L) é formada pelos genes L1 e L2, que codificam as proteínas do capsídeo e são expressas somente em células produtivamente infectadas. A proteína L1, também chamada de proteína maior do capsídeo apresenta sequência de resíduos de aminoácidos que é específica para o gênero. A proteína L2, também chamada de proteína menor do capsídeo é altamente específica para o tipo. A presença de L1 é correlacionada à presença de HPV intacto nos tecidos, muito usada como alvo na identificação viral em métodos que utilizam biologia molecular (84). Somando-se a isso, o genoma é dotado de uma região reguladora *Long Control Region* (LCR) ou *Upstream Regulatory Region* (URR), variando de 400 a 1000 pb, localizadas entre as regiões L1 e E6. Nessa região, existem seqüências estimuladoras e repressoras da transcrição viral, além da origem de replicação (83).

### 2.4.2 Expressão do Genoma do HPV

O ciclo de vida produtivo do HPV é dependente da diferenciação celular (85). A infecção inicial por HPV ocorre nas células localizadas nas camadas basais do epitélio estratificado. Após a entrada do HPV na célula, o genoma viral se estabiliza na forma de elementos extracromossômicos no núcleo e o número de cópias virais aumenta para aproximadamente 50 por célula. Ao se dividirem, essas células infectadas distribuem equitativamente o DNA viral entre as células filhas. Uma das células filhas migra da camada basal e inicia o programa de diferenciação celular. As demais células filhas continuam dividindo-se na camada basal e servem de reservatório de DNA viral para as posteriores divisões celulares (86,87).

Na fase produtiva da infecção, as células basais sofrem um aumento da taxa de proliferação. No tecido infectado, na medida em que as células se diferenciam, ocorre acúmulo de vírus replicados nas células superficiais. Ocorre nesta fase acúmulo de material protéico relacionado ao capsídeo e de ácidos nucléicos. À microscopia eletrônica, nas células infectadas por HPV, observa-se uma zona clara perinuclear que não possui organelas celulares. Ocasionalmente ela é preenchida por material granular fino que se compacta próximo à membrana nuclear. O núcleo aparece ora picnótico, ora repleto de vesículas. Nestas células observa-se maior quantidade de partículas virais livres (epissomos) que também podem se apresentar associadas à cromatina. Se a membrana nuclear está íntegra, os vírions são observados no núcleo, mas se ela se rompe, podem ser observados no citoplasma. A replicação viral em altas taxas, a transcrição de genes tardios (L) e a produção de vírion estariam limitados à diferenciação celular (84).

A integração do genoma viral parece ocorrer ao acaso. Se, por um lado, não há sítio preferencial de integração no genoma, por outro, há uma grande especificidade no local de clivagem do DNA circular do vírus, como no caso dos tumores malignos, onde a integração do DNA viral ocorre devido à clivagem na região dos genes E1/E2, com conseqüente interrupção do controle transcricional exercido pelo gene E2 (88,92). Os genomas virais com mutações em E1 (*Open Read Frame - ORF*) induzem à perda da capacidade de manutenção do estado epissomal do HPV, devido a uma deficiência na replicação viral, bem como na transcrição de genes de expressão tardia (87). Após a infecção viral, os primeiros



genes a se expressarem são os genes E1 e E2 cujos produtos estão envolvidos na replicação do genoma viral. E1 e E2 agem independentes quanto aos sítios de ligações na origem de replicação (*URR*) do papilomavírus. Porém, poderá ocorrer a interação das proteínas E1-E2 formando um complexo multimérico que auxilia na replicação viral (86,88). O produto do gene E1, uma fosfoproteína nuclear de 68 kDa com atividade ATPase e DNA helicase, liga-se na origem de replicação do DNA viral sendo essencial para a replicação do papilomavírus (93). A proteína codificada pelo gene E2 é um fator que regula a transcrição dos oncogenes E6 e E7. Além de atuar como um forte fator transcricional, recentemente, demonstrou-se que a transcrição, a partir dos promotores da região E6 do HPV 16 e 18, é fortemente reprimida por essa proteína em queratinócitos humanos (89-91).

A proteína E6 do HPV de alto risco oncogênico associa-se à proteína p53, que regula a passagem pelas fases G1/S e G2/M. E6 recruta as proteínas celulares, como é o caso das proteínas da família AP1 (E6-AP) que funcionam como uma ubiquitina ligase; atuando no complexo p53, podendo impedir o efeito supressor da proteína no ciclo celular (87). A função principal do gene E7 do HPV de alto risco é desregular a maquinaria do ciclo celular da célula infectada principalmente pela indução da transição da fase G<sub>0</sub>/S. Isso é efetuado através da ativação de vários genes celulares pela E7 e pela interação dessa proteína com as proteínas que regulam o ciclo celular (84). A proteína E7 do HPV de alto risco oncogênico liga-se às proteínas da família pRb. Essa interação permite que E2F atue na ativação constitutiva dos fatores transcricionais, o que levaria à progressão do ciclo celular. E7 também forma complexos com ciclinas A e E, bem como provoca inativação de p21 e p27(79). Os genes E6 e E7 são considerados os genes de maior poder de transformação do papilomavírus humano (84). Acredita-se que a expressão das proteínas E6 e E7 seja responsável pelo início e a manutenção do processo que culmina no câncer cervical (94).

## 2.5 CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE COLO UTERINO INVASIVO

O planejamento do tratamento e a avaliação do prognóstico requerem exame detalhado da saúde geral da paciente e a determinação do estágio clínico da

neoplasia invasiva. O sistema de classificação amplamente utilizado para neoplasias de colo uterino foi desenvolvido pela FIGO e é apresentada no anexo A. Trata-se, sobretudo, de um sistema de classificação clínica baseado no tamanho do tumor e na extensão da doença na pelve. O grau de crescimento da neoplasia é avaliado clinicamente, bem como mediante diversos exames para categorizar os estádios da doença de I a IV. O estágio I corresponde ao tumor limitado ao colo uterino, enquanto o estágio IV corresponde à fase de crescimento na qual a neoplasia se disseminou a órgãos à distância, por metástases.

A classificação da FIGO é avaliada usando-se métodos que incluem a inspeção e palpação mediante o exame vaginal e retal, colposcopia, cistoscopia, curetagem endocervical, histeroscopia, urografia intravenosa e radiografias esqueléticas e do tórax. A linfangiografia, ultra-sonografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética e laparoscopia podem proporcionar outras informações, mas essas não devem ser usadas para avaliar os estádios clínicos da FIGO, apesar de que essas investigações podem proporcionar informação valiosa para planejar o tratamento. Em muitos meios de poucos recursos, contudo, o exame especular, o exame vaginal e o toque retal são as únicas abordagens factíveis para a classificação. A cistoscopia e a avaliação com radiografias esqueléticas e de tórax e urografias intravenosas podem ser realizadas se possível. A classificação deve habitualmente ser realizada e documentada no registro de casos com um diagrama descritivo quando se descobre uma neoplasia invasiva do colo uterino. Deve-se também descrever as investigações e procedimentos com base nos quais foi realizada a avaliação de classificação (95).

## 2.6 TRATAMENTO E PROGNÓSTICO DO CÂNCER DE COLO UTERINO INVASIVO

### 2.6.1 Modalidades Terapêuticas

O tratamento convencional da neoplasia do colo uterino inclui cirurgia, radioterapia ou uma combinação de ambas e, em estágios mais avançados,

quimioterapia. As neoplasias iniciais do colo uterino (estádio IA e IB) podem ser tratadas com cirurgia (conização, histerectomia simples ou com linfadenectomia pélvica). No estágio IB1 não há tratamento padronizado. As opções incluem cirurgia, radioterapia externa e intracavitária ou cirurgia combinada com radioterapia. Dos estágios IB2 a IVA a terapia de escolha é radio/quimioterapia combinadas. A adição da radiação intracavitária à radioterapia externa resulta num melhor controle e sobrevida, quando comparado com a radioterapia externa exclusiva para a doença avançada localmente, como nos estádios IIB e III. A adição de quimioterapia no estágio IVB traz potenciais benefícios (95). Estudos clínicos aleatórios demonstraram um ganho significativo na sobrevida global e na sobrevida livre de doença para o tratamento baseado na cisplatina administrada simultaneamente à radioterapia (96). Observou-se um benefício significativo da quimioterapia e radiação em relação tanto à recidiva local quanto à distância. O benefício absoluto com a terapia combinada para a sobrevida global foi de 16,0%. Baseado nessa evidência, a quimioterapia simultânea com radioterapia surge como um novo padrão de tratamento para a neoplasia avançada do colo uterino (96).

### **2.6.2. O papel da Radioterapia**

A radioterapia constitui a modalidade terapêutica utilizada mais amplamente no tratamento do câncer de colo uterino nos dias atuais, envolvendo habitualmente a combinação de radioterapia externa e braquiterapia intra-cavitária. O uso de braquiterapia isolada é restrito às lesões iniciais com bons resultados de sobrevida. O emprego de radioterapia isolada deve ser evitado, pois os resultados são inferiores ao tratamento combinado. A não realização de braquiterapia no tratamento da paciente com câncer cervical constitui o fator de maior significado estatístico para prejuízo das taxas de controle local e sobrevida (97).

O objetivo da radioterapia é a destruição das células malignas pela morte seletiva das células tumorais sem dano irreversível ao tecido normal circunjacente. A maioria dos pacientes terá uma resposta positiva à radioterapia, isto é, destruição das células malignas. Entretanto, a administração da radiação na cérvix e área

pélvica adjacente afeta diretamente não apenas as células malignas como também as benignas. Há ainda, efeito indireto no tecido de sustentação destas células. O efeito da radioterapia pode ser dividido temporalmente em estágios clínicos: agudo (0-6 meses); intermediário (7-12 meses); crônico (2-5 anos); tardio (>5 anos) (25).

A radioterapia externa é conduzida com fótons de megavoltagem das unidades de cobalto 60 ou aceleradores lineares. É utilizada para tratar toda a pelve e os paramétrios incluindo os linfonodos ilíacos. A radioterapia pélvica possibilita a redução do tumor no colo melhorando as condições locais para a braquiterapia, promove a diminuição do sangramento e da dor pélvica permitindo a recuperação do estado geral da paciente e atua de maneira profilática em áreas de envolvimento subclínico potencial (97).

A braquiterapia constitui a mais importante etapa do tratamento do câncer cervical, pois permite a liberação de dose tumoricida ao colo e tecidos paracervicais. A isodose resultante tem o formato de pêra, quando se utilizam sonda e colpostatos. Muitos sistemas e vários aplicadores podem ser utilizados para inserção intracavitária, porém os mais comumente empregados são os de Fletcher-Suit. Braquiterapia pode ser realizada em regime de baixa taxa de dose usando tubos de Cesio 137 ou através de alta taxa de dose com microfonte de Iridio 192 operada por controle remoto e comandada por computador. As vantagens operacionais e de proteção radiológica tem feito com que os tratamentos de alta taxa de dose sejam preferíveis aos de baixa taxa de dose. Os resultados de controle local e complicações são comparáveis, porém a braquiterapia de alta taxa de dose tem a vantagem de não utilizar anestesia e dispensar a internação da paciente, sendo realizada em nível ambulatorial. Além disso, como a migração da fonte radioativa é operada por controle remoto, não existe exposição à radiação e a distribuição da dose é otimizada pela seleção dos pontos e dos tempos de parada da fonte (97).

### **2.6.3 Fatores Preditivos do Prognóstico**

O estágio clínico da doença ao diagnóstico é o fator preditivo mais importante da sobrevida em longo prazo; taxas de sobrevida também decrescem com a idade.

Outros fatores que influem na sobrevida são a saúde geral e o estado nutricional. Pacientes anêmicas respondem mal ao tratamento, assim como pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Vários estudos clínicos e populacionais demonstraram uma sobrevida em 5 anos uniformemente alta de 75,0% para as neoplasias do estágio I e a sobrevida diminui bastante com o progredir para os estádios mais avançados (menos de 10,0% para o estágio IV) (97, 98). Em uma grande série de pacientes com neoplasia do colo uterino, tratadas com radioterapia, demonstrou-se que a frequência de metástase à distância (com maior frequência para gânglios linfáticos para-aórticos, pulmões, cavidade abdominal, fígado e aparelho digestivo) crescia com o progredir do estágio da doença, de 3,0% no estágio IA a 75,0% no estágio IVA (99). Em um estudo de 1.028 pacientes tratadas com cirurgia radical, as taxas de sobrevida correlacionaram-se sistematicamente com o volume tumoral (100). As taxas de sobrevida em 5 anos oscilaram entre 91,0% para pacientes com tumores com volume inferior a 2,5 cm<sup>3</sup> e 70,0% para aquelas com tumores de 10-50 cm<sup>3</sup>. A sobrevida livre de doença em três anos variou de 94,6% para tumores em estágio I, menores ou iguais a 5 mm, a 59,5% para tumores em estágio I, maiores ou iguais 21 mm (101). Os estádios clínicos avançados associam-se a uma maior frequência de invasão e disseminação vascular para gânglios linfáticos pélvicos e para-aórticos e metástase à distância.

## 2.7 MÉTODOS DE RASTREAMENTO E SEGUIMENTO DO CÂNCER DE COLO UTERINO

O câncer cervical é uma doença passível de prevenção, que pode ser efetuada através da erradicação do HPV ou da detecção e tratamento das lesões precursoras (102,103). O seguimento pós-tratamento é importante tanto na avaliação da resposta terapêutica, quanto na detecção de possíveis lesões persistentes ou recorrência da neoplasia (31).

### 2.7.1 Citologia Esfoliativa Convencional

Por ser uma técnica de alta eficácia, baixo custo e indolor, além de bem aceita pela população, a citologia convencional (CC) do esfregaço cervicovaginal, introduzida na década de 50, é considerada de escolha, na nossa população, para o rastreamento do câncer de colo do útero (104). O exame citológico é uma prática utilizada na clínica ginecológica desde o início do século XX, quando Schauenstein (1908) e Rubin (1910) descreveram as lesões pré-cancerosas de colo uterino. Em 1928, Papanicolaou e Babés relataram a presença de células cancerosas no esfregaço de colo uterino e sugeriram a possibilidade de o método citológico vir a ser utilizado no diagnóstico do câncer de colo uterino (105). A citologia esfoliativa convencional é realizada a partir de um esfregaço simples, colhido com escova e espátula de madeira ou metálica, que, quando friccionadas sobre a superfície do colo uterino, pode recolher células de todas as camadas do epitélio. Essas células podem fornecer informações importantes sobre eventuais lesões, permitindo não só o diagnóstico, como também o acompanhamento de pacientes previamente tratadas, no sentido de identificar possíveis recidivas. Existem também alterações citopáticas preditivas da ação viral. Alterações inflamatórias, neoplásicas e displásicas, também podem ser avaliadas por este método (106).

O exame de Papanicolaou pelo método citológico convencional apresenta uma alta especificidade (98%), porém uma baixa sensibilidade (51%) para detectar lesões intraepiteliais escamosas ou carcinoma invasivo (107). A taxa de falso-negativo da citopatologia convencional pode variar até 30,0% na dependência da subjetividade (intra e inter observadores) e por vários fatores, desde a coleta do material, fixação e coloração da lâmina, leitura do esfregaço e, finalmente, a interpretação do exame. Cerca de 1/3 dos diagnósticos falso-negativos são atribuídos ao erro de interpretação e 2/3 são devido a amostras insatisfatórias (17) e têm graves implicações médicas, financeiras e legais (19).

### **2.7.2 Citologia em Base Líquida**

A citologia em base líquida (CBL) foi proposta em 1991 por Hutchinson e é uma nova técnica citológica que, embora dispendiosa, vem sendo utilizada por oferecer leituras mais purificadas, livres de detritos celulares. Esse método é considerado como importante alternativa à citologia convencional, especialmente pela menor perda celular no preparo da amostra e de melhor distribuição. As células são fixadas em meio líquido, ocorrendo preservação de proteínas, o que possibilita a análise molecular da amostra (108). A literatura é controversa quanto à acurácia do método. Um trabalho recente demonstrou que a amostra cervicovaginal colhida em base líquida não demonstra aumento de sensibilidade quando comparada ao método convencional (109). Porém, grande parte dos estudos mostra uma queda no número de casos insatisfatórios e aumento de sensibilidade na detecção de anormalidades citológicas quando compara CC e CBL com o exame histopatológico (110). Ademais, os meios líquidos possibilitam a realização de testes complementares de biologia molecular, como PCR, Captura Híbrida 2 (HC2) e imunocitoquímica, sem que seja necessário convocar a paciente para novas coletas de exame (111-113).

### **2.7.3 Métodos Moleculares de detecção do DNA-HPV**

Em virtude da baixa sensibilidade dos métodos morfológicos e sorológicos, a biologia molecular para detecção do HPV é utilizada e apresenta grandes avanços nos últimos anos. As técnicas de biologia molecular detectam diretamente o ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) dos agentes infecciosos, apresentando alta acuidade, permitindo o diagnóstico seguro (114). A detecção direta do DNA do HPV constitui o método mais confiável para identificar o vírus (115). Os procedimentos moleculares disponíveis são os seguintes:

### 2.7.3.1 Hibridização com Sondas (*Southern blot*, *Dot blot* e Captura Híbrida)

Todos esses métodos são baseados na análise do DNA celular total. A técnica denominada *Southern blot* foi o primeiro método adotado. Durante muitos anos foi considerado “padrão ouro” para a identificação do HPV, já que sua especificidade e sensibilidade são elevadas. A sensibilidade da técnica de *Dot blot* é menor que a de *Southern blot*. Os testes disponíveis comercialmente (ViraPap e ViraType) são procedimentos de *Dot blot* modificados. Atualmente, os *kits* para captura híbrida 1 e 2, produzidos pela empresa Digene, demonstram boa acurácia, sendo os mais utilizados na prática clínica (116, 117). O sistema Digene de captura híbrida 2 para HPV de alto risco é uma solução hibridizadora que utiliza anticorpos na captura dos híbridos que são detectados por quimioluminescência através da amplificação de sinal para detectar 13 tipos de DNA do HPV de alto risco em amostras cervicais. Os tipos de HPV detectados são: 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Este teste não determina o tipo específico presente no espécime. O uso deste teste é indicado atualmente, na prática clínica, como monitoramento de pacientes após resultados de Papanicolaou com células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), para determinar a necessidade de colposcopia ou outros procedimentos de seguimento ou em conjunto com o teste de Papanicolaou para detectar a presença ou ausência dos tipos de HPV de alto risco em mulheres com 30 anos ou mais. Esta informação, juntamente com a avaliação do médico, do histórico citológico e de outros fatores de risco, pode ser usada para monitorar a paciente.

### 2.7.3.2 Teste de Hibridização *in situ* (ISH)

Tem como objetivo investigar a presença do DNA de HPV incluído em núcleos das células infectadas, em um corte histológico a fresco, fixado ou até esfregaços celulares. Apesar de o ISH ser menos sensível do que o teste *Blot*, ele permite investigar amostras histológicas e realizar estudos retrospectivos. Assim, o ISH é técnica morfológica e molecular mista, que possibilita avaliação quantitativa,



assim como a demonstração do vírus nas células neoplásicas ou normais. Por isso, poderia ser considerada a técnica de escolha para a detecção do DNA viral, mas seu elevado custo faz com que seja desaconselhada em grandes estudos (117).

### 2.7.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Esse método foi desenvolvido por Mullis, em 1987. É técnica enzimática sofisticada que possibilita a amplificação pelo menos um milhão de vezes de sequências de DNA na amostra do exame. Pode ser aplicada em DNA extraído de tecido fresco ou fixado. Atualmente, é a técnica mais sensível de que se dispõe. Pode ser processada rapidamente (2-3 horas), porém requer notável habilidade e deve ser realizada em laboratórios que disponham de meios especializados de contenção, a fim de se prevenir a contaminação da amostra previamente amplificada. Tal contaminação pode levar a resultados falso-positivos. A tecnologia da reação em cadeia da polimerase também é bastante flexível, permitindo uma série de modificações que possibilitam seu emprego na análise de uma grande variedade de amostras. Entre as principais técnicas resultantes de modificações da reação em cadeia da polimerase, pode-se citar o RT-PCR, *nested PCR*, *multiplex PCR*, PCR a partir de *primers* randômicos e PCR em tempo real. Este método é atualmente mais utilizado em pesquisa (117).

### 2.7.3.4 Chipes de DNA

*Microarrays* de DNA, chipe de DNA, chipe biológico ou biochipe são os nomes dados a mais nova tecnologia para análise dos ácidos nucleicos. Consiste em lâminas de vidro nas quais fragmentos de fita única (sondas) são fixados e imobilizados de forma ordenada e específica, chamadas células de sondas e que contêm milhões de cópias de um segmento gênico em particular. O princípio baseia-se na propriedade de hibridização por complementaridade dos ácidos nucleicos (118). É um método diagnóstico por genotipagem, realizado *in vitro*, que é capaz de

identificar qualitativamente e semi-quantitativamente 24 subtipos de HPV, sendo 6 de baixo risco e 18 de alto risco (119). O Papillocheck® é o método que utiliza esta tecnologia e recentemente passou a ser utilizado comercialmente.

#### **2.7.4 Imunocitoquímica**

A realização de imunocitoquímica tem sido recentemente utilizada em estudos na tentativa de melhorar a sensibilidade do exame cervicovaginal convencional (120-124). A maioria dos trabalhos prévios utilizou o anticorpo p16INK4a, marcador de células displásicas e carcinoma, mostrando que seu uso quando feito na mesma lâmina do esfregaço corado pelo Papanicolau potencializa a sensibilidade do exame (121). A expressão de p16 está relacionada com a gravidade da neoplasia cervical, no entanto, há uma variação extremamente ampla de positividade equívoca de p16 em lesões de baixo grau e até células normais, refletindo sua falta de reprodutibilidade nestas categorias e sua baixa especificidade (120). Uma alternativa muito recente está sendo a associação de marcadores que detectam a proteína maior do capsídeo L1 do HPV (122-124). Os resultados de estudos revelam que a combinação da expressão de p16 e HPV L1 pode ter valor prognóstico, predizendo a evolução de lesões cervicais (122-124). Nenhum dos trabalhos anteriores realizou imunocitoquímica no seguimento de pacientes com câncer de colo uterino tratado.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a frequência de infecção por HPV em amostras cervicais e vaginais no seguimento precoce de pacientes com câncer de colo uterino invasivo tratado e correlacionar com os resultados do exame citológico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Descrever os achados morfológicos da citologia convencional das amostras cervicais e vaginais no seguimento precoce de pacientes com câncer de colo uterino invasivo tratado.

3.2.2 Descrever os achados morfológicos da citologia em base líquida das amostras cervicais e vaginais no seguimento precoce de pacientes com câncer de colo uterino invasivo tratado.

3.2.3 Avaliar a concordância entre os diagnósticos das citologias convencional e em base líquida das amostras cervicais e vaginais no seguimento precoce de pacientes com câncer de colo uterino invasivo tratado.

3.2.4 Avaliar a frequência e carga viral estimada de HPV de alto risco através da captura híbrida em amostras cervicais e vaginais no seguimento precoce de pacientes com câncer de colo uterino invasivo tratado.

3.2.5 Correlacionar a expressão do anticorpo BPV-1-1H8 com a detecção HPV de alto risco através da captura híbrida no seguimento precoce de pacientes com câncer de colo uterino invasivo tratado.

3.2.6 Correlacionar a expressão do anticorpo BPV-1-1H8 com as alterações citológicas encontradas no seguimento precoce de pacientes com câncer de colo uterino invasivo tratado.

## 4. MÉTODOS

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO E PACIENTES

Estudo observacional, descritivo, transversal, no qual foram avaliadas 52 mulheres com câncer de colo do útero, estádios de I a IV (FIGO), tratadas no Hospital Universitário de Brasília (HUB) e Hospital de Base do Distrito Federal e atendidas no ambulatório de radioterapia do HUB, no período de Fevereiro a Dezembro de 2010. O tratamento foi estabelecido de acordo com o estágio da doença e condições clínicas da paciente e incluiu cirurgia, radioterapia (externa e braquiterapia) e quimioterapia. Todas as nossas pacientes foram submetidas à braquiterapia. Após concordarem com a participação no estudo, as participantes foram esclarecidas sobre o documento de inclusão (Apêndice A), responderam ao questionário que abordava as características clínico-epidemiológicas, foram submetidas ao exame clínico e deram início à braquiterapia (4 sessões).

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (Anexo B) e o consentimento informado e esclarecido foi obtido de todas as pacientes (Apêndice B).

Três meses após o término da braquiterapia, no primeiro seguimento, as pacientes foram submetidas à coleta do exame citopatológico da cérvix/vagina que obedeceu a seguinte ordem em todas as pacientes: a primeira coleta foi do citopatológico convencional e a segunda, da citologia em base líquida, a partir da qual também foi realizada a captura híbrida para HPV de alto risco e imunocitoquímica.

### 4.2 CITOLOGIA E BIÓPSIA

As amostras cervicais (de pacientes submetidas exclusivamente a radioterapia ou radio/quimioterapia combinadas) e amostras vaginais (de pacientes submetidas à cirurgia e radioterapia ou cirurgia e radio/quimioterapia) foram obtidas

para análise citológica no primeiro seguimento (3 meses após a braquiterapia). As amostras foram coletadas pelos métodos convencional (CC) e em base líquida (CBL), sempre nessa ordem em todas as pacientes. A CC foi coletada com espátula de Ayre e escova endocervical. Para CBL utilizou-se o kit DNA-Citoliq® (Digene, Brasil).

Os esfregaços convencionais foram fixados em álcool. Na citologia em base líquida, a amostra foi preservada em meio fixador universal (*Universal Medium Collection* - UCM Digene®) e a coleta e a confecção das lâminas foram realizadas de acordo com a orientação do fabricante do sistema. As lâminas foram coradas segundo o método tradicional de Papanicolaou. Os achados citológicos foram classificados de acordo com o Sistema Bethesda 2001 nas seguintes categorias: negativo, células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), células glandulares atípicas de significado indeterminado (AGUS), células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H), lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial de alto grau (HSIL), e carcinoma invasivo. Pacientes com achados citológicos anormais, incluindo células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H), lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial de alto grau (HSIL), e carcinoma invasivo foram submetidas à colposcopia e quando indicado biópsia. Os espécimes de biópsia foram fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina e corados pela hematoxilina e eosina (HE). Todas as amostras foram examinadas por duas patologistas com experiência em citopatologia. O diagnóstico final foi determinado pela concordância entre elas. Em caso de discordância, uma terceira opinião de uma especialista em citopatologia foi requisitada.

#### 4.3 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA AMOSTRAS

Os achados morfológicos das amostras cervicais e vaginais, avaliadas pela CC (Apêndice C) e CBL (Apêndice D), foram divididos em categorias. Nesse contexto, foram avaliadas as alterações inflamatórias decorrentes da destruição e reparo tecidual, alterações celulares induzidas pela radioterapia e alterações neoplásicas. As alterações benignas inflamatórias incluíram a presença de exsudato

leucocitário, presença de histiócitos, reparo e hemorragia. Foram consideradas alterações citoplasmáticas e nucleares induzidas pela radioterapia a presença células gigantes multinucleadas, macrócitos (células marcadoras do efeito radioterápico), vacuolização citoplasmática, ingestão de neutrófilos, halo perinuclear, irregularidade da forma celular, policromasia, inclusões nucleares e bi ou multinucleação. As alterações consideradas neoplásicas após tratamento radioterápico são as mesmas utilizadas para o diagnóstico de neoplasia intraepitelial e carcinoma invasivo pré-tratamento e incluem aumento da relação núcleo/citoplasma, hipercromasia nuclear, irregularidade da membrana nuclear, cromatina grosseira e densa queratinização (125).

#### 4.4 CAPTURA HÍBRIDA

Amostras cervicais e vaginais colhidas em base líquida na primeira visita de seguimento (3 meses após o término da braquiterapia) foram utilizadas para detecção do DNA do HPV de alto risco. A pesquisa do genoma do HPV (DNA-HPV) de alto risco foi realizada pela técnica de Captura Híbrida 2 (Digene®), em amostra preservada em meio fixador (UCM Digene®). O material foi processado conforme orientações do fabricante para identificação de DNA-HPV de alto risco, que compreende HPV dos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68.

O sistema de Captura Híbrida 2 em microplaca da Digene é uma solução hibridizadora que utiliza anticorpos na captura dos híbridos que são detectados por quimioluminescência através da amplificação de sinal. Espécimes contendo DNA hibridizam-se com o coquetel de sonda específico de RNA-HPV. Os híbridos RNA:DNA são capturados sobre a superfície da microplaca sensibilizada com anticorpos específicos para os híbridos RNA:DNA. Híbridos imobilizados reagem com a fosfatase alcalina conjugada com anticorpos específicos para híbridos RNA:DNA e são detectados por substrato quimioluminescente. Várias moléculas de fosfatase alcalina são conjugadas para cada anticorpo. Múltiplos anticorpos conjugados se ligam a cada híbrido capturado resultando na amplificação de sinal. A luz é emitida e medida em Unidade de Luz Relativa (RLU) no luminômetro. A intensidade da luz emitida denota a presença ou ausência de DNA nos espécimes.

Uma Unidade Relativa de Luz corresponde a 1 pg/mL de DNA-HPV, equivalente a 0,1 cópia de vírus/célula, sugerindo a carga viral. A medida de RLU, igual ou acima do valor do *Cutoff* (CO) indica a presença da sequência específica de DNA-HPV no espécime. RLU menor que o valor do *Cutoff* indica a ausência da sequência de DNA-HPV específico ou que os níveis de DNA-HPV estão abaixo do limite de detecção do ensaio. Cada teste foi processado com controles positivos e negativos em triplicata. O teste foi considerado positivo quando a taxa RLU/CO foi maior ou igual a 1,0.

#### 4.5 IMUNOCITOQUIMICA

Utilizou-se o anticorpo monoclonal de camundongo, clone BPV-1-1H8 para HPV da empresa abcam®, que detecta a proteína maior do capsídeo L1 do HPV dos tipos 1, 6, 11, 16, 18, 31. A reação foi considerada negativa na ausência de expressão ou somente expressão citoplasmática (figura 1) e positiva quando houve expressão nuclear e citoplasmática (figura 2-A) ou apenas nuclear (figura 2-B).



Figura 1 – Células epiteliais escamosas típicas exibindo expressão citoplasmática ou ausência de expressão para BPV-1-1H8. Imunocitoquímica, 100X.



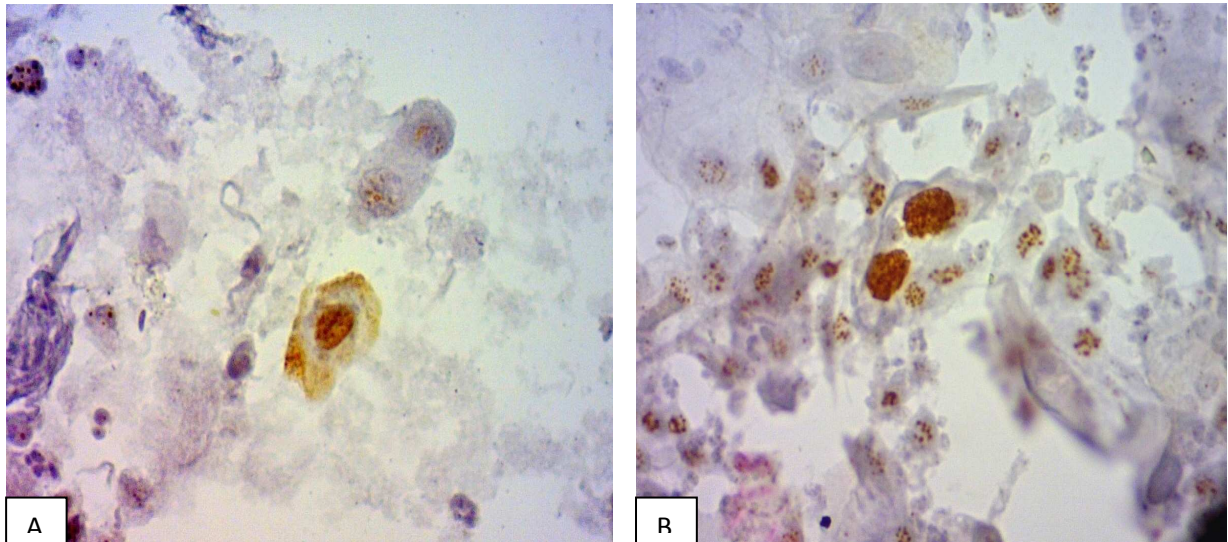


Figura 2 – Células escamosas atípicas exibindo expressão nuclear e citoplasmática (A) e expressão nuclear (B) para BPV-1-1H8. Imunocitoquímica, 400X

A reação imunocitoquímica foi realizada diretamente sobre o esfregaço das amostras colhidas em base líquida, previamente corado pela técnica de Papanicolaou. Em alguns casos, foi utilizado também o esfregaço da citologia esfoliativa convencional. Foram selecionadas apenas lâminas que apresentavam quantidade de células suficientes para análise imunocitoquímica. Em cada amostra, a positividade da reação foi avaliada nas células típicas, células com efeito da radioterapia e células atípicas, quando presentes. As amostras foram submetidas às seguintes etapas:

Primeiramente foi procedida a remoção das lamínulas e meio de montagem em xilol. Em seguida, as lâminas foram descoradas, reidratadas em alcoóis hidratados, água corrente e água destilada. Foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato (10mM - pH6,0) em panela de pressão por 4 minutos, com as lâminas submersas neste tampão. Posteriormente as lâminas sofreram resfriamento à temperatura ambiente, imersas no tampão citrato e foram lavadas em água corrente e água destilada. Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio + metanol (v/v) – 2 banhos de 15 minutos, com posterior lavagem em água corrente e água destilada. As lâminas foram colocadas em cubas com ranhuras em solução salina tamponada com fosfatos (PBS - *Phosphate Bufferes Saline*) e foram incubadas com o anticorpo primário BPV-1-1H8 para HPV (abcam®), na diluição de 1:80, em câmara úmida *overnigh* (18 horas)

sob refrigeração (2-8°C). As lâminas foram então submetidas a lavagens com PBS a fim de retirar o excedente de anticorpo do material em 3 banhos de 5 minutos cada e em seguida foi feita a incubação com anticorpo secundário – sistema polímero-peroxidase (DAKO ENVISION SYSTEM®) em câmara úmida a 37°C por 1 hora. Posteriormente, foram submetidas a lavagens com PBS em 3 banhos de 5 minutos cada e em seguida foi feita a incubação com o sistema polímero-peroxidase (DAKO ENVISION SYSTEM®) em câmara úmida à 37°C durante 30 minutos. Foram feitas novas lavagens com PBS em 3 banhos de 5 minutos cada. Finalmente foi realizada a revelação. A imunocoloração foi desenvolvida pela adição de substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB) (100mg%) e peróxido de hidrogênio (0,1%) em PBS, com imersão das lâminas por 5 minutos. As lâminas passaram então pelas seguintes etapas: lavagem em água corrente e água destilada, contra coloração com Hematoxilina de Harris, lavagem em água corrente, banho em água amoniacal para azular as células: 1 mergulho, lavagens em água corrente e água destilada, desidratação em banhos de álcoois (5 banhos), diafanização em banhos de xilol (4 banhos) e montagem com meio de montagem permanente (Entellan, Merck, Alemanha) e lamínula.

Para assegurar o desempenho das reações imunocitoquímicas foi utilizado como controle positivo corte histológico de carcinoma de colo uterino (figura3).

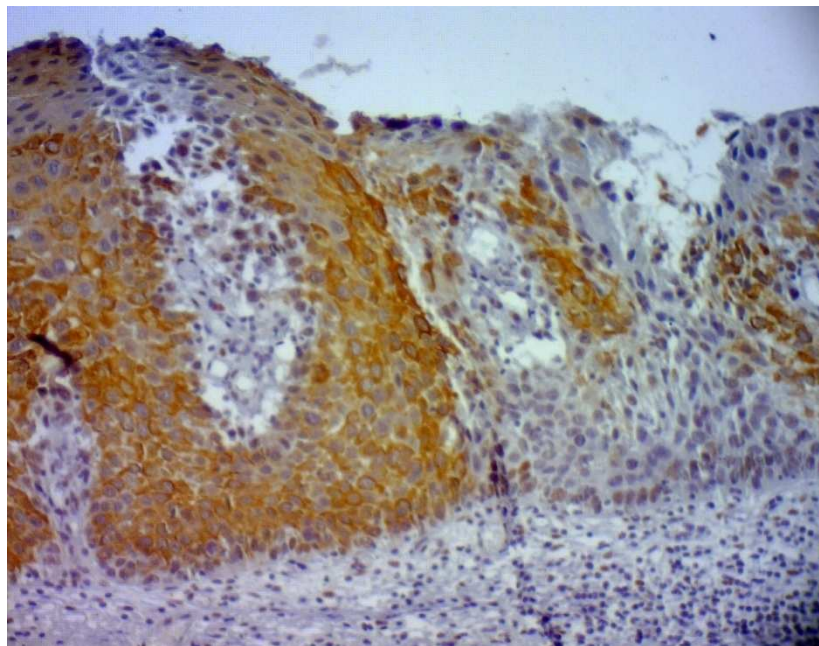


Figura 3 – Corte histológico de carcinoma de células escamosas *in situ* de colo uterino exibindo expressão nuclear e citoplasmática para BPV-1-1H8. Imuno-histoquímica, 100X

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o *GraphPad Prism 4* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e o SPSS versão 19.0 (para Windows). Nas tabelas de contingência foram executados testes  $X^2$  pelo método de Monte Carlo e de Fisher na análise da distribuição das diferenças de frequência de HPV entre os grupos. Para calcular a concordância entre os diagnósticos da CC e CBL foi utilizado o coeficiente Kappa, interpretado de acordo com Shrout (126).  $k < 0,1$ , ausente;  $k = 0,10$  a  $0,40$ , fraca;  $k = 0,41$  a  $0,60$ , discreta;  $k = 0,61$  a  $0,80$ , moderada; e  $k = 0,81$  a  $1,00$ , substancial. Os valores de RLU/CO foram expressos como mediana. Comparações destes valores entre os grupos foram feitas utilizando testes não paramétricos (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis). A significância estatística foi designada para  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA AMOSTRA

A amostra deste estudo consistiu de 52 pacientes portadoras de câncer de colo uterino invasivo tratado.

As variáveis estudadas nessa etapa da análise foram qualitativas: tipo histológico do câncer, estadiamento clínico, tratamento realizado, tabagismo e uso de hormônio, sob a forma de anticoncepcional hormonal oral (ACHO); e quantitativas: idade (em anos) ao entrar no estudo, idade de início da atividade sexual, número de parceiros sexuais e paridade.

Das 52 pacientes avaliadas, 48 (92,3%) possuíam diagnóstico histológico de carcinoma de células escamosas (CEC) e 4 (7,7%) de adenocarcinoma, ambos de colo uterino.

Os estádios clínicos I, II, III e IV foram observados respectivamente em 10/52 (19,2%), 17/52 (32,7%), 23/52 (46,3%) e 2/52 (3,8%) pacientes. As pacientes com adenocarcinoma estavam nos estádios I (n=1), III (n=2) e IV (n=1), conforme detalhado no apêndice E.

O tratamento foi estabelecido de acordo com o estadiamento, sendo que todas as pacientes foram submetidas à radioterapia (braquiterapia). Como observado na tabela 1, os tratamentos mais frequentemente empregados nos estádios I, II, III foram respectivamente: cirurgia/radioterapia (13,5%), radio/quimioterapia (23,0%) e radio/quimioterapia (27,0%). A paciente com CEC no estágio IV foi submetida a radio/quimioterapia, enquanto a paciente com diagnóstico de adenocarcinoma foi tratada com cirurgia/radioterapia.

Tabela 1 - Distribuição da forma de tratamento de acordo com o diagnóstico histopatológico e estadiamento clínico

	<b>Estádio</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Número de Pacientes</b>	<b>%</b>
<b>CEC</b>	I	CR	n = 6	11,5
		CRQ	n = 2	3,8
		RQ	n = 1	2,0
	II	CR	n = 1	2,0
		CRQ	n = 1	2,0
		R	n = 3	5,7
	III	RQ	n = 12	23,0
		CRQ	n = 5	9,6
		R	n = 4	7,6
	IV	RQ	n = 12	23,0
RQ		n = 1	2,0	
<b>Adenocarcinoma</b>	I	CR	n = 1	2,0
	III	RQ	n = 2	3,8
	IV	CR	n = 1	2,0
<b>Total</b>			<b>n = 52</b>	<b>100,0</b>

C – cirurgia; R – radioterapia; Q- quimioterapia

O tabagismo foi relatado por 8 (15,4%) pacientes. Este hábito não foi encontrado em nenhuma paciente com adenocarcinoma, conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição do hábito de fumar de acordo com o diagnóstico histopatológico

	<b>Tabagismo</b>	<b>Número de Pacientes</b>	<b>%</b>
<b>CEC</b>	Sim	n = 8	15,4
	Não	n = 40	76,9
<b>Adenocarcinoma</b>	Sim	n = 0	0
	Não	n = 4	7,7
<b>Total</b>		<b>n = 52</b>	<b>100,0</b>

O uso de hormônio, sob forma de anticoncepcional hormonal oral, foi relatado por somente 2/52 (3,8%) pacientes. Uma delas tinha diagnóstico de adenocarcinoma e a outra de CEC. A tabela 3 indica as porcentagens dos casos em relação ao diagnóstico.

Tabela 3 - Distribuição do uso de hormônio de acordo com o diagnóstico histopatológico

	<b>ACHO</b>	<b>Número de Pacientes</b>	<b>%</b>
<b>CEC</b>	Sim	n = 1	2,0
	Não	n = 47	90,3
<b>Adenocarcinoma</b>	Sim	n = 1	2,0
	Não	n = 3	5,7
<b>Total</b>		<b>n = 52</b>	<b>100,0</b>

ACHO – Anticoncepcional Hormonal Oral

Ao ingressar no estudo, a idade das pacientes com CEC variou entre 28 e 79 anos, com uma média de idade de 51,7 anos. Para as pacientes com adenocarcinoma, a idade variou entre 31 a 62 anos, com uma média de 49,5 anos, conforme exibe a tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição de faixa etária (em anos) de acordo com o diagnóstico histopatológico

	<b>Idade Mínima</b>	<b>Idade Máxima</b>	<b>Média</b>
<b>CEC</b>	28	79	51,7
<b>Adenocarcinoma</b>	31	62	49,5

A idade de início da atividade sexual variou de 12 a 28 anos, com média de 17,8 anos nas pacientes com CEC e de 16 a 20 anos, com média de 18,25 anos nas pacientes com adenocarcinoma, como visto na tabela 5.

Tabela 5 - Distribuição da sexarca (em anos) de acordo com o diagnóstico histopatológico

	<b>Idade Mínima</b>	<b>Idade Máxima</b>	<b>Média</b>
<b>CEC</b>	12	28	17,8
<b>Adenocarcinoma</b>	16	20	18,25

A maioria das pacientes (31/52, 59,0%) teve de 2-5 parceiros sexuais e apenas uma relatou ter mais de 10 parceiros sexuais. A tabela 6 apresenta as porcentagens em relação ao diagnóstico histopatológico.

Tabela 6 - Distribuição do número de parceiros sexuais de acordo com o diagnóstico histopatológico

	Número de Parceiros	Número de Pacientes	%
<b>CEC</b>	1 (fixo)	n = 12	23,1
	2 a 5	n = 9	55,8
	6 a 10	n = 6	11,5
	>10	n = 1	2,0
<b>Adenocarcinoma</b>	1 (fixo)	n = 2	3,8
	2 a 5	n = 2	3,8
	6 a 10	n = 0	0
	>10	n = 0	0
<b>Total</b>		<b>n = 52</b>	<b>100,0</b>

Com relação à paridade, a minoria das pacientes era nulípara (3/52, 5,8%), enquanto a maior parte delas relatou de 1 a 5 gestações (29/52, 55,8%). A tabela 7 exhibe a distribuição do número de gestações em relação ao diagnóstico.

Tabela 7 - Distribuição do número de gestações de acordo com o diagnóstico histopatológico

	Número de gestações	Número de Pacientes	%
<b>CEC</b>	0	2	3,8
	1-5	26	50,0
	6-10	11	21,1
	> 10	9	17,3
<b>Adenocarcinoma</b>	0	1	2,0
	1-5	3	3,8
	6-10	0	0
	> 10	0	0
<b>Total</b>		<b>52</b>	<b>100,0</b>

## 5.2 DESCRIÇÃO E COMPARAÇÃO DOS ACHADOS CITOLÓGICOS PELOS MÉTODOS CONVENCIONAL E EM BASE LÍQUIDA.

As 52 amostras, sendo 35 cervicais e 17 vaginais, foram avaliadas por dois métodos citológicos, através dos quais foram realizadas as análises morfológicas e de categorização diagnóstica. Os métodos utilizados foram a citologia esfoliativa convencional (CC) e a citologia em base líquida (CBL). Os resultados foram classificados de acordo com os critérios do sistema de Bethesda (tabela 8).

Pelo método convencional as amostras tiveram os seguintes diagnósticos: 32/52 (61,5%) negativas, 4/52 (7,7 %) ASC-US, 8/52 (15,4%) ASC-H, 1/52 (2,0%) HSIL, 4/52 (7,7%) carcinomas invasores persistentes no seguimento precoce e 3/52 (5,7%) foram consideradas insatisfatórias por escassa celularidade e intensa hemorragia. Pelo método em base líquida as amostras tiveram os seguintes diagnósticos: 28/52 (53,8%) negativas, 6/52 (11,5%) ASC-US, 5/52 (9,6%) ASC-H, 1/52 (2,0%) AGUS, 1/52 (2,0%) LSIL, 1/52 (2,0%) HSIL, 3/52 (5,7%) carcinomas invasores e 7/52 (13,4%) foram consideradas insatisfatórias, das quais 5 por celularidade baixa e duas por intensa hemorragia. Das amostras vaginais, 6/17 (35,3%) apresentaram alterações citológicas na CC e 5/17 (29,4%) na CBL. Nas amostras cervicais 11/35 (31,4%) exibiram alterações citológicas na CC e 8/35 (22,8%) na CBL.

Tabela 8 - Frequência dos diagnósticos de acordo com o método citológico

DIAGNÓSTICOS	CC	CBL
<b>N</b>	n = 32 (61,5)	n = 28 (53,8%)
<b>ASC-US</b>	n = 4 (7,7%)	n = 6 (11,5%)
<b>ASC-H</b>	n = 8 (15,4%)	n = 5 (9,6%)
<b>AGUS</b>	n = 0	n = 1 (2,0%)
<b>LSIL</b>	n = 0	n = 1 (2,0%)
<b>HSIL</b>	n = 1 (2,0%)	n = 1 (2,0%)
<b>Carcinoma invasor</b>	n = 4 (7,7%)	n = 3 (5,7%)
<b>I</b>	n = 3 (5,7%)	n = 7 (13,4%)
<b>TOTAL</b>	n = 52 (100,0%)	n = 52 (100,0%)

N – negativo; I – insatisfatório; CC – citologia convencional; CBL – citologia em base líquida



A concordância diagnóstica entre os dois métodos utilizando o teste Kappa com significância estatística de  $p < 0,05$  foi de 70,92% ( $\text{kappa} = 0,573 - \text{SE} = 0,90 - p < 0,001$ ). Do total de 52 casos, 40 foram concordantes, como mostra a tabela 9.

Tabela 9 - Concordância entre os diagnósticos citológicos pela CC e CBL

CC	CBL								Total
	AGUS	ASC-H	ASC-US	CEC	HSIL	LSIL	N	I	
ASC-H		n = 5 (62,5%)	n = 1 (12,5%)		n = 1 (12,5%)		n = 1 (12,5%)		n = 8 (100,0%)
ASC-US			n = 3 (75,0%)				n = 1 (25,0%)		n = 4 (100,0%)
CEC			n = 1 (25,0%)	n = 3 (75,0%)					n = 4 (100,0%)
HSIL						n = 1 (100,0%)			n = 1 (100,0%)
N	n = 1 (3,1%)		n = 1 (3,1%)				n = 26 (81,3%)	n = 4 (12,5%)	n = 32 (100,0%)
I								n = 3 (100,0%)	n = 3 (100,0%)
<b>Total</b>	n = 1 (2,0%)	n = 5 (9,6%)	n = 6 (11,5%)	n = 3 (5,7%)	n = 1 (2,0%)	n = 1 (2,0%)	n = 28 (53,8%)	n = 7 (13,4%)	n = 52 (100,0%)

N – negativo; I – insatisfatório; CC – citologia convencional; CBL – citologia em base líquida.  $\text{kappa} = 0,573 - \text{SE} = 0,90 - p < 0,001$

Em doze amostras não houve concordância entre os diagnósticos citológicos pela CC e CBL (tabela 10). Destas, 4 amostras (6, 10, 40 e 51) foram negativas na citologia convencional e consideradas insatisfatórias na citologia em base líquida, 3 tinham diagnóstico de ASC-H na citologia convencional mas na CBL de ASC-US, negativo e HSIL, respectivamente. Uma amostra foi diagnosticada como ASC-US na CC, porém na CBL foi negativa. As amostras 15 e 16 foram negativas na citologia convencional enquanto na CBL tiveram diagnóstico de ASC-US e AGUS. A amostra 20 foi positiva nos dois métodos, entretanto na CC foi diagnosticada como HSIL e na CBL como LSIL. Na amostra 30 foi detectada persistência de carcinoma invasivo na CC e atipias escamosas de significado indeterminado na CBL. Todos os diagnósticos de carcinoma foram confirmados por exame histopatológico.

Tabela 10 – Detalhamento das amostras discordantes pelos métodos CC e CBL

<b>Casos discordantes</b>	<b>CC</b>	<b>CBL</b>
<b>2</b>	ASC-H	ASC-US
<b>5</b>	ASC-US	N
<b>6</b>	N	I
<b>10</b>	N	I
<b>15</b>	N	ASC-US
<b>16</b>	N	AGUS
<b>17</b>	ASC-H	N
<b>20</b>	HSIL	LSIL
<b>21</b>	ASC-H	HSIL
<b>30</b>	Carcinoma invasor	ASC-US
<b>40</b>	N	I
<b>51</b>	N	I

N – negativo; I – insatisfatório; CC – citologia convencional; CBL – citologia em base líquida

Os achados morfológicos foram divididos em categorias, conforme explicado na metodologia. As alterações inflamatórias decorrentes da destruição e reparo tecidual, as alterações celulares induzidas pela radioterapia e as alterações neoplásicas estão distribuídas de acordo com o diagnóstico na tabela 11.

Tabela 11- Frequência das alterações morfológicas de acordo com o diagnóstico citológico pela CC e CBL

		N	ASC-US	ASC-H	AGUS	LSIL	HSIL	CARCINOMA	I
<b>EXUDATO LEUCOCITÁRIO</b>	CC	31 (96,8%)	4(100,0%)	7 (87,5%)			1(100,0%)	4(100,0%)	2 (66,7%)
	CBL	27 (96,4%)	6(100,0%)	4 (100,0)		1(100,0%)	1(100,0%)	3 (100,0%)	4 (57,1%)
<b>HISTIÓCITOS</b>	CC								
	CBL	1 (3,1%)							
<b>HEMORRAGIA</b>	CC	15 (42,9%)	1 (25,0%)	7 (87,5%)				1 (25,0%)	2 (66,7%)
	CBL	5 (17,9%)	2 (33,3%)	1 (20,0%)	1 (100,0%)				3 (42,9%)
<b>REPARO</b>	CC	26 (82,3%)	2(50,0%)	5 (62,5%)			1 (100,0%)	2 (50,0%)	1(33,3%)
	CBL	21 (75,0%)	3(50,0%)	2 (40,0%)					1(14,3%)
<b>CGM</b>	CC	15 (46,9%)	3 (75,0%)	5 (62,5%)			1 (100,0%)	1 (25,0%)	
	CBL	11 (39,3%)	3 (50,0%)	2 (40,0%)				1(33,3%)	
<b>MACROCITOSE</b>	CC	13 (37,1%)	4 (100,0%)	5 (62,5%)				2 (50,0%)	
	CBL	6 (21,4%)	2 (33,3%)	2 (40,0%)				1 (33,3%)	
<b>VACUOLIZAÇÃO</b>	CC	21 (65,6%)	2 (50,0%)	6 (75,0%)					
	CBL	11 (39,3%)	3 (50,0%)	4 (80,0%)				1 (33,3%)	
<b>INGESTÃO NEUTRÓFILOS</b>	CC	9 (28,1%)	2 (50,0%)	4 (50,0%)				1 (25,0%)	
	CBL	5 (17,9%)	4 (66,7%)	2 (40,0%)				1 (33,3%)	
<b>HALO PERINUCLEAR</b>	CC			3 (37,5%)			1 (100,0%)		
	CBL			1 (20,0%)		1 (100,0%)			
<b>IRREG FORMA</b>	CC	2 (6,2%)		3 (37,5%)				1 (25,0%)	
	CBL	1 (3,6%)		1 (20,0%)					
<b>POLICROMASIA</b>	CC	7 (21,9%)	1 (25,0%)	2 (33,3%)					
	CBL	4 (14,3%)							
<b>INCLUSÃO NUCLEAR</b>	CC	1 (3,1%)	1 (25,0%)	1 (12,5%)					
	CBL	2 (7,1%)							
<b>BMN</b>	CC	11 (34,4%)	3 (75,0%)	4 (50,0%)				1 (25,0%)	
	CBL	7 (25,0%)	2 (33,3%)	2 (40,0%)			1 (100,0%)		
<b>AUMENTO DA RELAÇÃO N/C</b>	CC	1 (3,1%)	3 (75,0%)	8 (100,0%)			1 (100,0%)	4 (100,0%)	
	CBL	1 (3,6%)	6 (100,0%)	5 (100,0%)	1(100,0%)	1 (100,0%)	1 (100,0%)	3 (100,0%)	
<b>IRREG MEMBRANA NUCLEAR</b>	CC		1 (25,0%)	7 (87,5%)			1(100,0%)	4(100,0%)	
	CBL		1 (16,7%)	5 (100,0%)		1 (100,0%)	1 (100,0%)	3 (100,0%)	
<b>HIPERCROMASIA</b>	CC		3 (75,0%)	7 (87,5%)			1 (100,0%)	4 (100,0%)	
	CBL	1 (3,6%)	5 (83,3%)	5 (100,0%)	1(100,0%)	1 (100,0%)	1 (100,0%)	3 (100,0%)	
<b>CROMATINA GROSSEIRA</b>	CC			1 (12,5%)			1 (100,0%)	4 (100,0%)	
	CBL			1 (20,0%)			1 (100,0%)	2 (66,7%)	
<b>QUERATINIZAÇÃO DENSA</b>	CC			1 (12,5%)				4 (100,0%)	
	CBL							3 (100,0%)	

CGM – células gigantes multinucleadas; BMN – bi/multinucleação, IRREG – irregularidade; CC- citologia convencional; CBL – citologia em base líquida

**Nas amostras com diagnóstico negativo,** as alterações inflamatórias/reparativas mais frequentes foram o exsudato leucocitário observado em 96,8% (31/32) das amostras na CC (figura 4) e 96,4% (27/28) das amostras na CBL e o reparo, detectado em 82,3% (26/32) das amostras na CC e 75,0% (21/28) das amostras na CBL (figura 5-A e B).

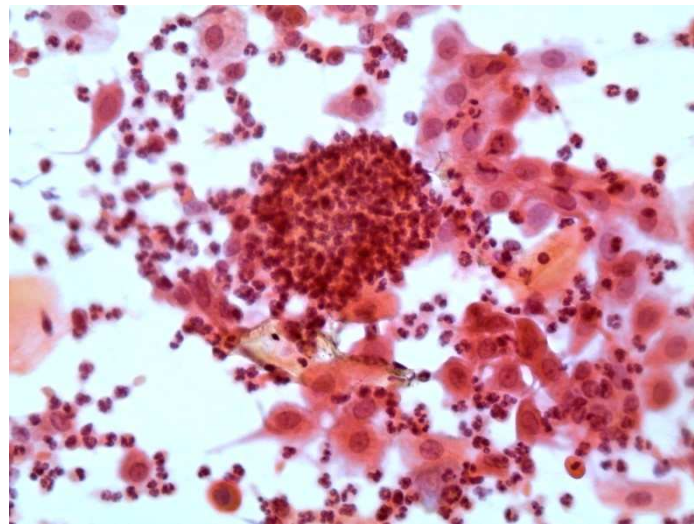


Figura 4 – Esfregaço cervicovaginal convencional exibindo exsudato leucocitário em meio a células escamosas atróficas. Papanicolaou, 100X

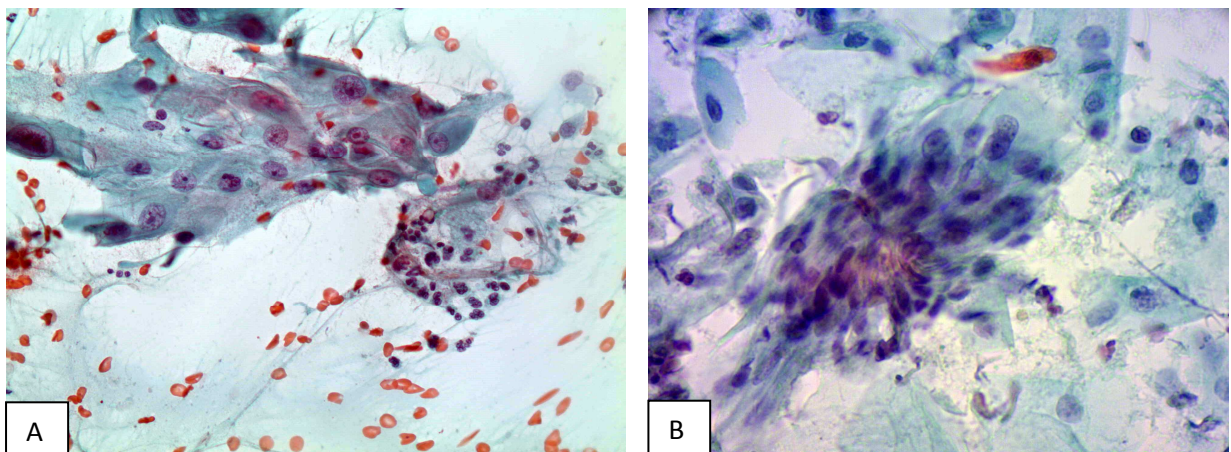


Figura 5 - Esfregaços cervicovaginais convencional (A) e em base líquida (B) exibindo células epiteliais escamosas com alterações reparativas. Papanicolaou, 400X

Com relação às alterações induzidas pela radioterapia nas amostras negativas, as que mais se destacaram foram presença de células gigantes multinucleadas, evidenciadas em 46,9% (15/32) das amostras na CC e 39,3% (11/28) na CBL (figura 6-A e B); macrócitos, vistos em 37,1% (13/32) das amostras na CC (figura 7) e em 21,4% (6/28) das amostras na CBL e vacuolização citoplasmática, encontrada em 65,6% (21/32) das amostras na CC e em 39,3% (11/28) das amostras na CBL (figura 8-A e B).

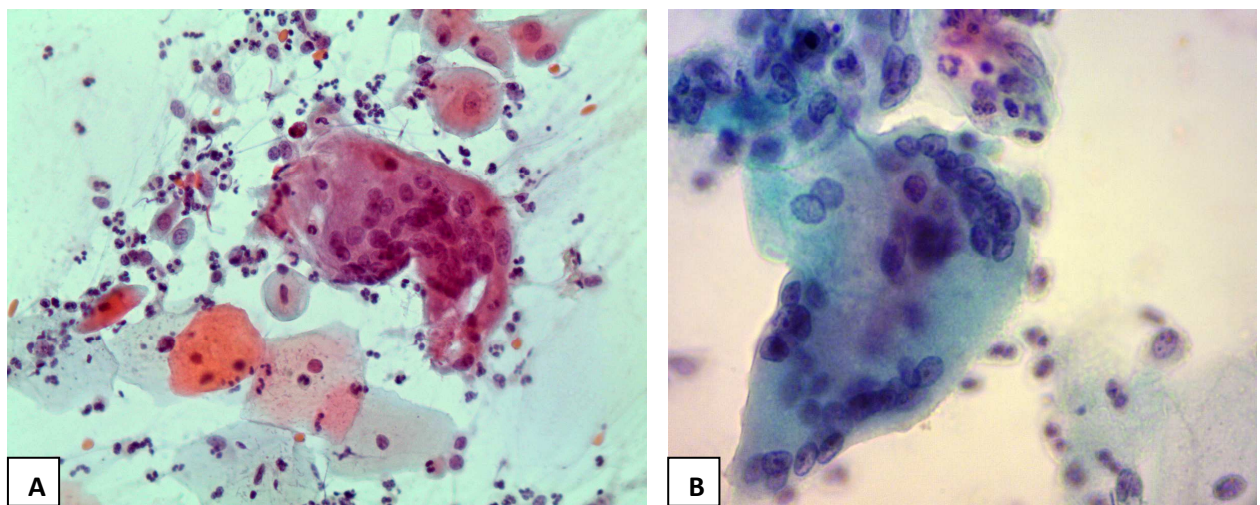


Figura 6 - Esfregaços cervicovaginais convencional (A) e em base líquida (B) exibindo células gigantes multinucleadas. Papanicolaou, 100X e 400X

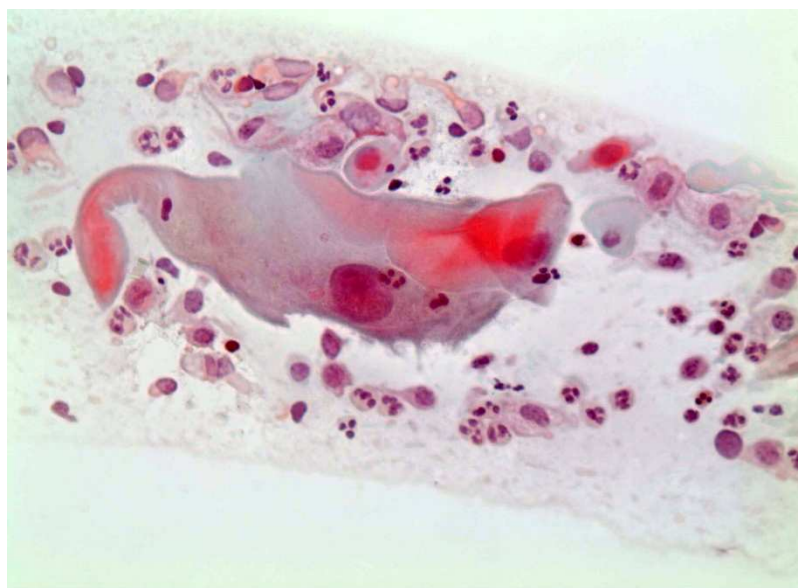


Figura 7 - Esfregaço cervicovaginal convencional exibindo macrócito com policromasia citoplasmática. Papanicolaou, 400X

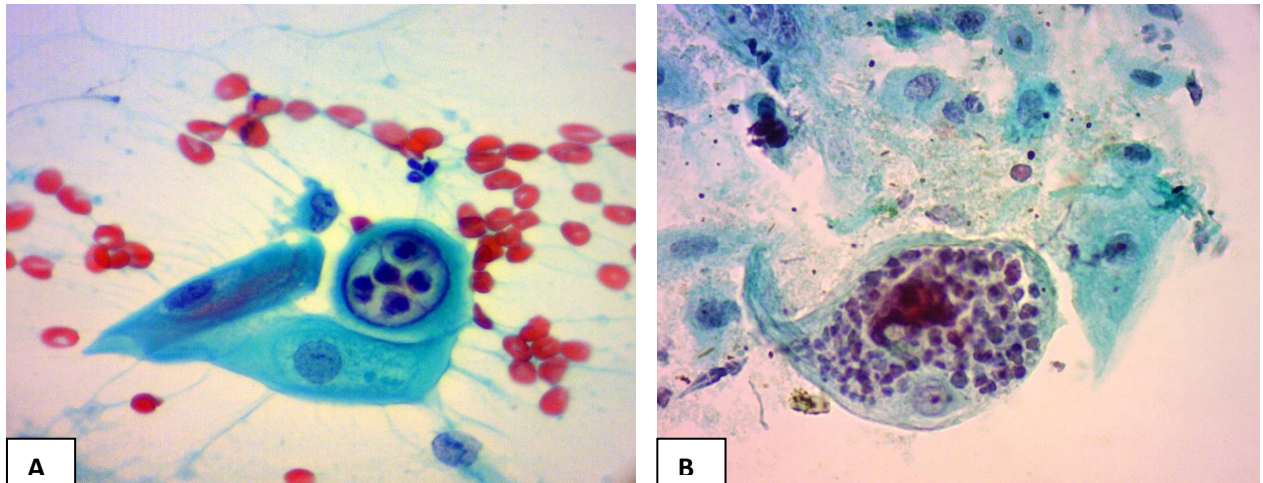


Figura 8 - Esfregaços cervicovaginais convencional (A) e em base líquida (B) exibindo vacuolização citoplasmática com ingestão de neutrófilos. Papanicolaou, 400X

**Nas amostras com diagnóstico de ASC-US,** as alterações inflamatórias/reparativas mais frequentes foram presença de exsudato leucocitário observado em todas as amostras na CC e CBL e reparo, evidenciado em metade das amostras em ambos os métodos.

Com relação às alterações induzidas pela radioterapia nas amostras com ASC-US, as mais freqüentes na CC foram macrócitos, células gigantes multinucleadas e vacuolização com ingestão de neutrófilos, presentes em respectivamente 100,0% (4/4), 75,0% (3/4) e 50,0% (2/4) das amostras. Na CBL, se destacaram a ingestão de neutrófilos, presença de células gigantes multinucleadas e vacuolização citoplasmática, vistos em respectivamente 66,7% (4/6), 50,0% (3/6) e 50,0% (3/6) das amostras.

As alterações neoplásicas associadas ao diagnóstico de ASC-US corresponderam ao aumento da relação núcleo/citoplasma, hipercromasia e irregularidade da membrana nuclear, presentes em respectivamente em 75,0% (3/4), 75,0% (3/4) e 25,0% (1/4) das amostras na CC e 100,0% (6/6), 83,3% (5/6) e 16,7% (1/6) das amostras na CBL.

**Nas amostras com diagnóstico de ASC-H,** as alterações inflamatórias/reparativas mais frequentes foram o exsudato leucocitário, presente em 87,5% (7/8) das amostras na CC e 80,0% (4/5) das amostras na CBL e reparo, evidenciado em 62,5% (5/8) das amostras na CC e em 40,0% (2/5) das amostras na

CBL. Hemorragia foi um achado que se destacou na CC, sendo detectado em 87,5% (7/8) das amostras.

Com relação às alterações induzidas pela radioterapia nas amostras com ASC-H, as mais freqüentes foram presença de células gigantes multinucleadas e macrocitose, detectadas ambas em 62,5% (5/8) das amostras na CC. A vacuolização citoplasmática foi vista em 75,0% (6/8) e 80,0% (4/5) das amostras na CC e CBL respectivamente.

As alterações neoplásicas associadas mais presentes nas amostras diagnosticadas como ASC-H (figuras 9-A e B e 10) foram o aumento da relação núcleo/citoplasma, irregularidade da membrana nuclear e hiper cromasia nuclear, exibidas em respectivamente 100,0% (8/8), 87,5% (7/8) e 87,5% (7/8) das amostras pelo método convencional e em todas as amostras (n=5) pelo método em base líquida.

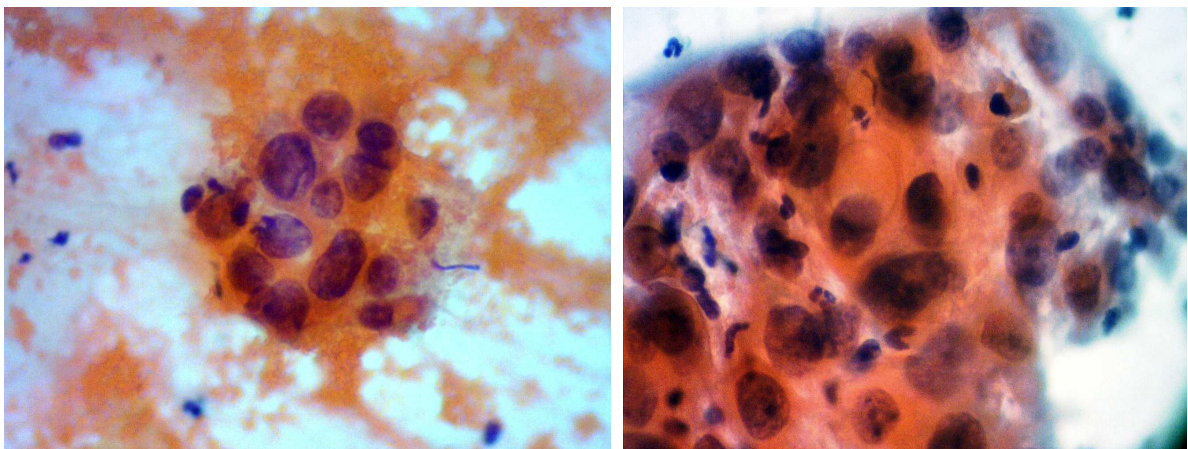


Figura 9 A e B – ASC-H. Esfregaços cervicovaginais convencionais exibindo agrupamentos de células escamosas com aumento da relação núcleo/citoplasma, hiper cromasia e irregularidade da membrana nuclear. Papanicolaou, 400X

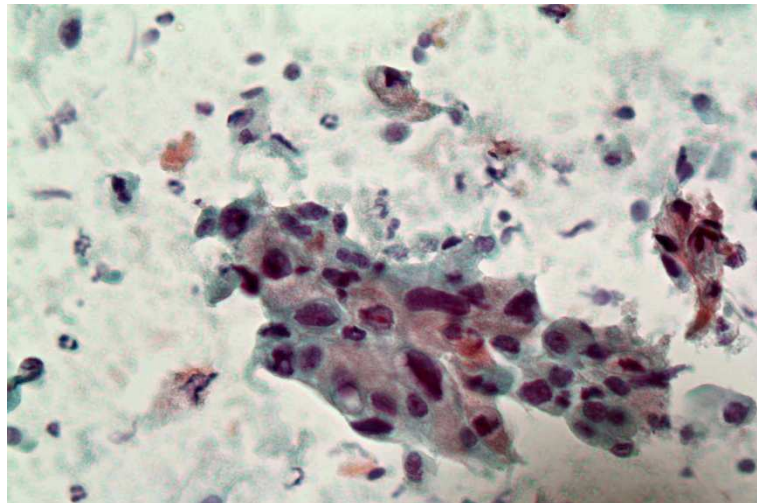


Figura 10 – ASC-H. Esfregaço cervicovaginal em base líquida exibindo agrupamentos de células escamosas com aumento da relação núcleo/citoplasma, hiperchromasia e irregularidade da membrana nuclear. Papanicolaou, 400X

**A amostra com diagnóstico de AGUS** pela CBL evidenciou hemorragia, aumento da relação núcleo/citoplasma e hiperchromasia. Além disso, as células eram pequenas e mostravam arranjo glandular com intensa sobreposição nuclear.

**A amostra com diagnóstico de LSIL**, presente somente na CBL exibiu exsudato leucocitário, halo perinuclear com reforço periférico aumento da relação núcleo/citoplasma e hiperchromasia nuclear (figura 11).

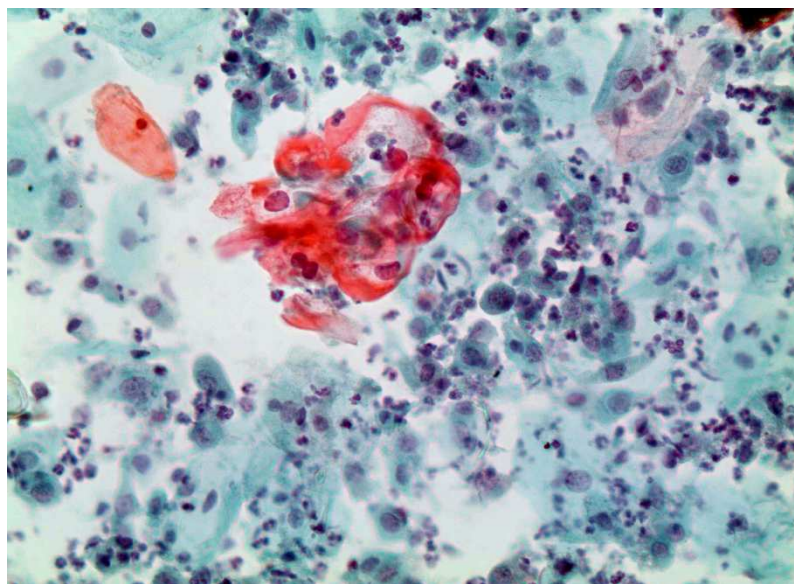


Figura 11 – LSIL. Esfregaço cervicovaginal em base líquida. Papanicolaou, 100X.



**Nas amostras com diagnóstico de HSIL**, distintas na CC e CBL, as alterações inflamatórias/reparativas mais freqüentes foram exsudato neutrofílico, evidenciado em ambos os métodos diagnósticos e reparo visto na CC.

Com relação às alterações induzidas pela radioterapia, halo perinuclear foi visto apenas na CC (Figura 12) e células gigantes multinucleadas e bi/multinucleação apenas na CBL.

As alterações neoplásicas associadas mais frequentemente nas amostras diagnosticadas como HSIL foram o aumento da relação núcleo/citoplasma, irregularidade da membrana nuclear, hiperchromasia e cromatina grosseiramente distribuída, detectadas em ambos os métodos diagnósticos (figura 13).

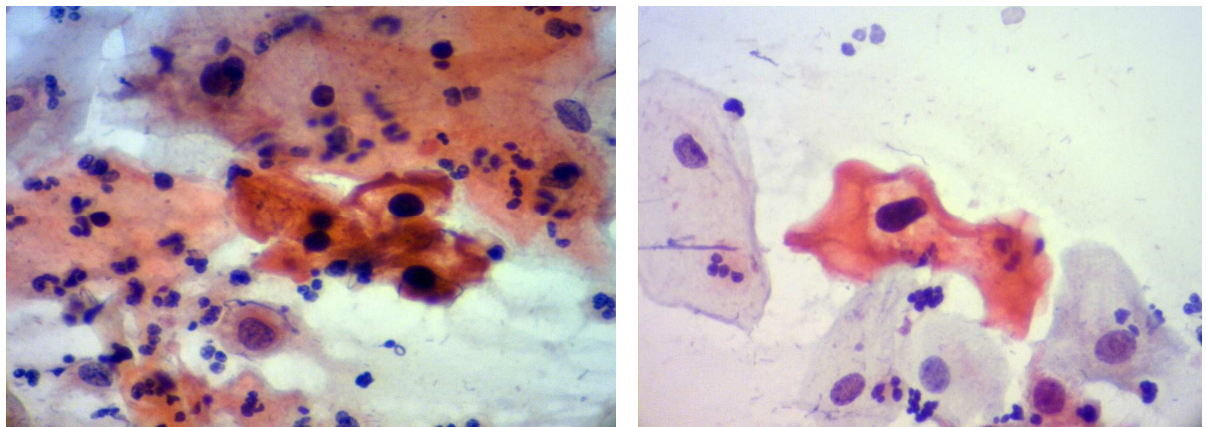


Figura 12 – Esfregaços cervicovaginais convencionais exibindo halos perinucleares em células escamosas com núcleos aumentados de volume, hiperchromáticos e citoplasma queratinizado. Papanicolaou, 400X

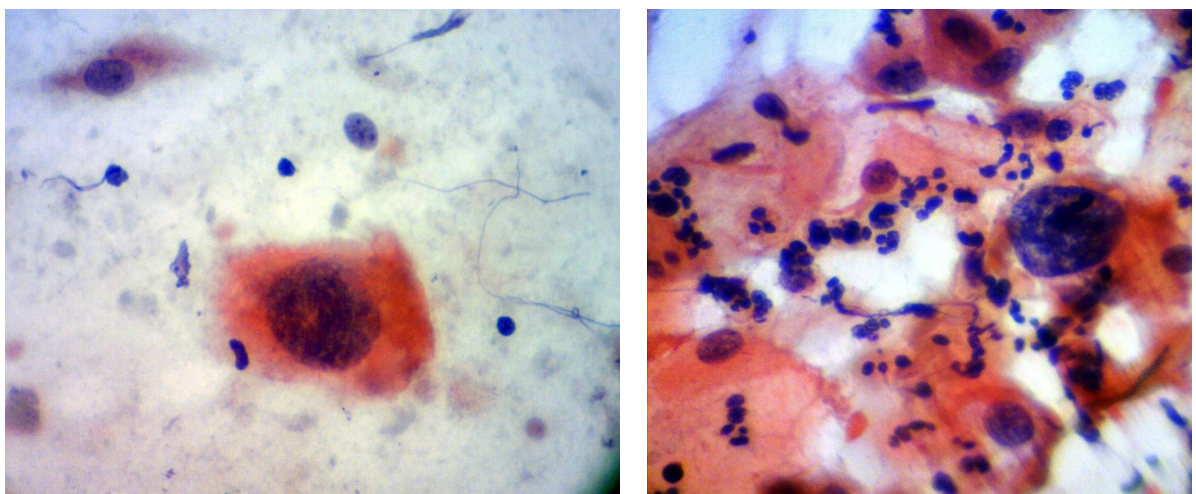


Figura 13 – HSIL. Esfregaços cervicovaginais convencionais exibindo células escamosas profundas com aumento da relação núcleo/citoplasma, hiperchromasia e cromatina grosseira. Papanicolaou, 400X

**Nas amostras com persistência de carcinoma invasor**, a alteração inflamatória/reparativa mais frequente foi o exsudato leucocitário, evidenciado em 100,0% das amostras de CC (n=4) e CBL (n=3).

Com relação às alterações induzidas pela radioterapia, as mais evidenciadas foram presença de células gigantes multinucleadas e macrócitos, em respectivamente 1/4 (25,0%) e 2/4 (50,0%) amostras na CC e em 1/3 (33,3%) amostra na CBL.

As alterações neoplásicas (figura 14-A a F) associadas foram o aumento da relação núcleo/citoplasma, irregularidade da membrana nuclear, hipercromasia, cromatina grosseiramente distribuída e densa queratinização, achados na totalidade dos casos em ambos os métodos diagnósticos, com exceção da cromatina grosseira que foi vista em 2/3 (66,7%) amostras na CBL.

Considerando separadamente as amostras que apresentaram diagnóstico de adenocarcinoma pré-tratamento, a avaliação citológica convencional após o tratamento de todas elas (amostras 16, 18, 54 e 55) revelou diagnóstico negativo. As alterações inflamatórias/reparativas mais frequentes foram a presença de exsudato leucocitário e reparo em 100% das amostras. As alterações induzidas pela radioterapia mais presentes foram bi e multinucleação e vacuolização citopasmática em 50% (2/4) das amostras. Na avaliação citológica em base líquida, 75% (3/4) das amostras foram diagnosticadas como negativas e 1/4 (25%) amostra foi categorizada como AGUS. Reparo e bi e multinucleação foram as alterações morfológicas mais frequentes nas amostras negativas e foram vistas em 75% (3/4) e 50% (2/4) das amostras respectivamente. Na amostra com diagnóstico de AGUS o exame citológico revelou hemorragia, aumento da relação núcleo/citoplasma e hipercromasia nuclear em células glandulares.

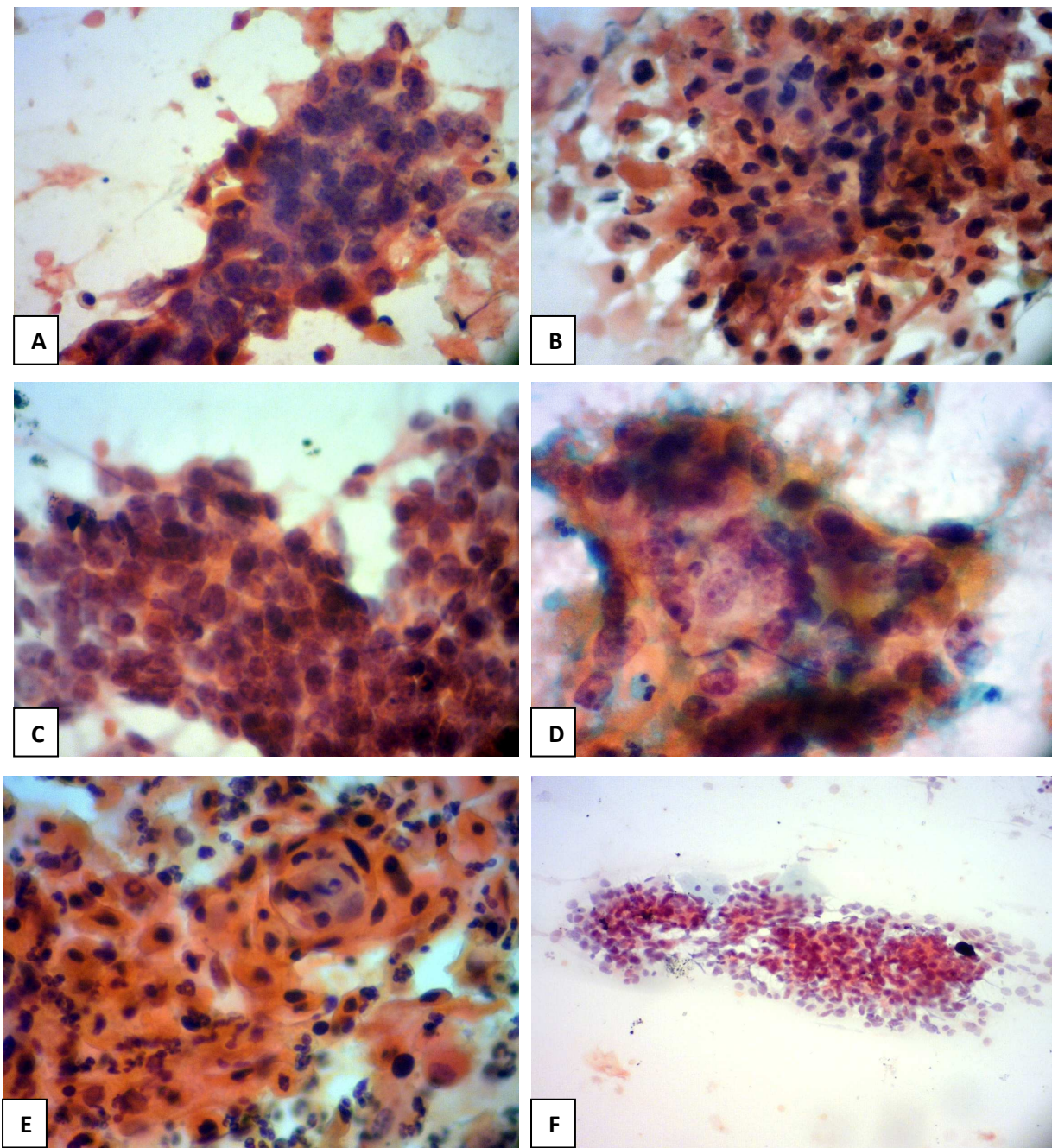


Figura 14 – CEC. Esfregaços cervicovaginais convencionais exibindo células escamosas com aumento da relação núcleo/citoplasma, hiperchromasia, cromatina grosseira, membrana nuclear irregular e citoplasma queratinizado. Amostra 45 (A e B), amostra 48 (C e D), amostra 30 (E) e amostra 33 (F). Papanicolaou, 400X e 40X

Os casos insatisfatórios para análise citológica apresentavam hemorragia e exsudato leucocitário em 66,7% (2/3) das amostras pelo método convencional. Pela CBL, 42,9% (3/7) das amostras eram hemorrágicas e 57,1% (4/7) das amostras exibiam intenso exsudato leucocitário.

### 5.3 FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO POR HPV PELA CAPTURA HÍBRIDA.

A captura híbrida foi positiva em 24/52 (46,1%) amostras. A mediana da relação RLU/CO (estimativa da carga viral) em todas (positivas e negativas) amostras foi de 0,94 (0,26 – 2120,03) e somente nas amostras com alterações citológicas foi de 1,71 (1,00 – 2120,03).

Nas amostras vaginal e cervical, o HPV foi detectado respectivamente em 11/17 (64,7%) e 13/35 (37,1%) pacientes e a mediana da relação RLU/CO foi respectivamente de 1,18 (0,29 – 2120,03) e 0,88 (0,26 – 656,51), entretanto, essas diferenças não foram estatisticamente significantes. Em pacientes nos estágios I, II e III, o número de amostras positivas na captura híbrida foi respectivamente 4/10 (40,0%), 8/17 (47,0%) e 12/23 (52,2%) e a mediana da relação RLU/CO foi 0,81 (0,29 – 1897,8), 0,91 (0,26 – 656,51) e 1,00 (0,26 - 2120,03). No estágio IV não houve amostras positivas na captura híbrida. Apesar de a frequência viral e mediana da relação RLU/CO ter sido menor em pacientes no estágio I, essa diferença não foi significativa. Das 52 pacientes, 17 (32,7%) apresentaram anormalidades citológicas. A frequência de HPV e valores de relação RLU/CO de acordo com os resultados da análise citológica são exibidos na tabela 12.

Tabela 12 - Frequência de expressão de HPV de alto risco e valores de RLU/CO de acordo com os achados citológicos na citologia convencional

Captura Híbrida	Diagnóstico CC					
	I	N	ASC-US	ASC-H	HSIL	Carcinoma invasor
<b>Positivo</b>	n = 1	n = 11	n = 2	n = 5	n = 1	n = 4
	(1,21)	(1,06-33,98)	(22,83 – 656,51)	(1-1,71)	(21210,3)	(1,72-1897,80)
<b>Negativo</b>	n = 2	n = 21	n = 2	n = 3	n = 0	n = 0

I – insatisfatório; N – negativo

Nas amostras vaginal e cervical, as anormalidades citológicas foram detectadas em respectivamente em 6/17 (35,3%) e 11/35 (31,4%) pacientes, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. As anormalidades citológicas foram significativamente mais frequentes em amostras de pacientes com captura

híbrida positiva para o HPV (12/23, 51,2%) do que nas pacientes com captura híbrida negativa para o HPV (5/26, 19,2%) ( $p = 0.019$ , teste de Fisher). A mediana da relação RLU/CO foi significativamente maior em pacientes com anormalidades citológicas (1.39, 0,26 – 2120,03) quando comparado com a mediana nas amostras com citologia negativa (0,79, 0,26 – 33,98) ( $p = 0.029$ , Mann-Whitney). Dos quatro casos com diagnóstico pré-tratamento de adenocarcinoma, 2 (50,0%) foram HPV positivos. Nestes, não foram detectadas anormalidades citológicas no seguimento e a relação RLU/CO foi menor do que 3,11. Dos 48 casos com diagnóstico pré-tratamento de CEC, 22 (45,8%) foram HPV positivos. Destes, 12 (54,5%) apresentavam anormalidades citológicas no seguimento e 5 (41,7%) mostravam relação RLU/CO maior do que 10. Houve associação entre presença de anormalidade citológica e  $RLU > 10$  ( $p = 0,05$ , teste de Fisher). Apenas a amostra 15 apresentou citologia negativa e  $RLU > 10$ .

#### 5.4 EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA DO ANTICORPO BPV-1-1H8 PARA HPV

A reação imunocitoquímica foi realizada nas amostras de CBL coradas previamente pelo Papanicolaou. Em 10 amostras (amostras 6, 10, 11, 16, 17, 18, 23, 39, 40, 51) havia células insuficientes para análise após descoloração para reação imunocitoquímica. Seis dessas amostras eram insatisfatórias já na análise morfológica, duas negativas e uma tinha diagnóstico de AGUS. Em duas dessas amostras, foi possível realização da reação no esfregaço convencional (amostras 17 e 40). Os diagnósticos que eram respectivamente negativo e insatisfatório nas amostras 17 e 40 na CBL passaram a ASCH e negativo na CC.

A imunocitoquímica foi positiva em 23/44 (52,3%) amostras. A positividade foi observada em células típicas, células com efeito da radioterapia e células atípicas. Alguns casos exibiram positividade em mais de um tipo de célula. Sete amostras (30,4%) apresentaram positividade apenas nuclear (figura 15-A e B) e 16 amostras (69,6%) exibiram positividade nuclear e citoplasmática (figura 16-A e B). O padrão de positividade mostrou-se consistentemente como imunocoloração forte, grosseiramente granular, especialmente no núcleo (figura 17-A a C).

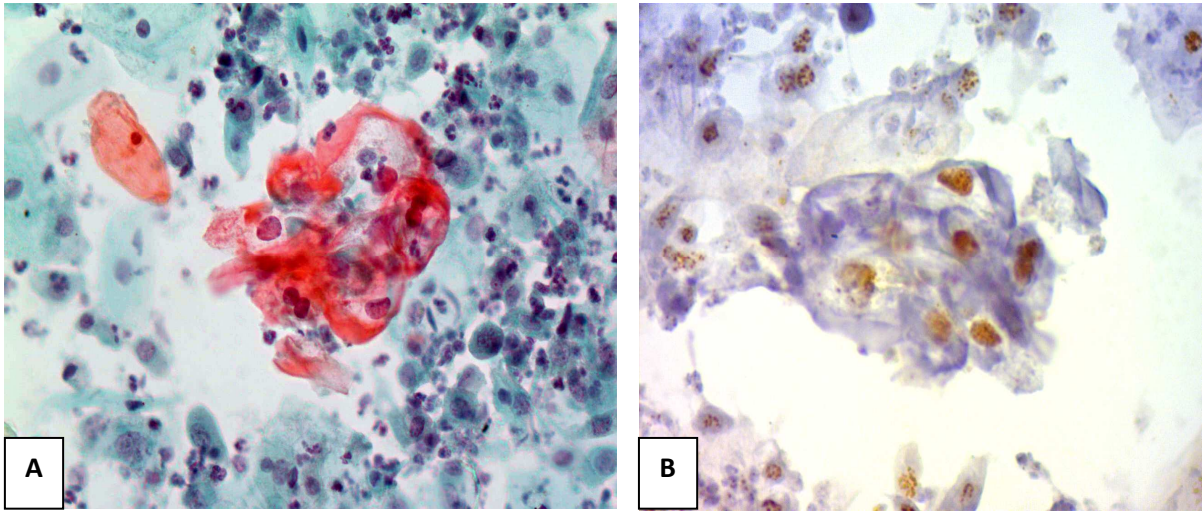


Figura 15 – Esfregaços corados pelo Papanicolaou (A) e imunocitoquímica para HPV (B) em aumento de 400X, exibindo expressão nuclear em células epiteliais escamosas atípicas. Amostra 21.

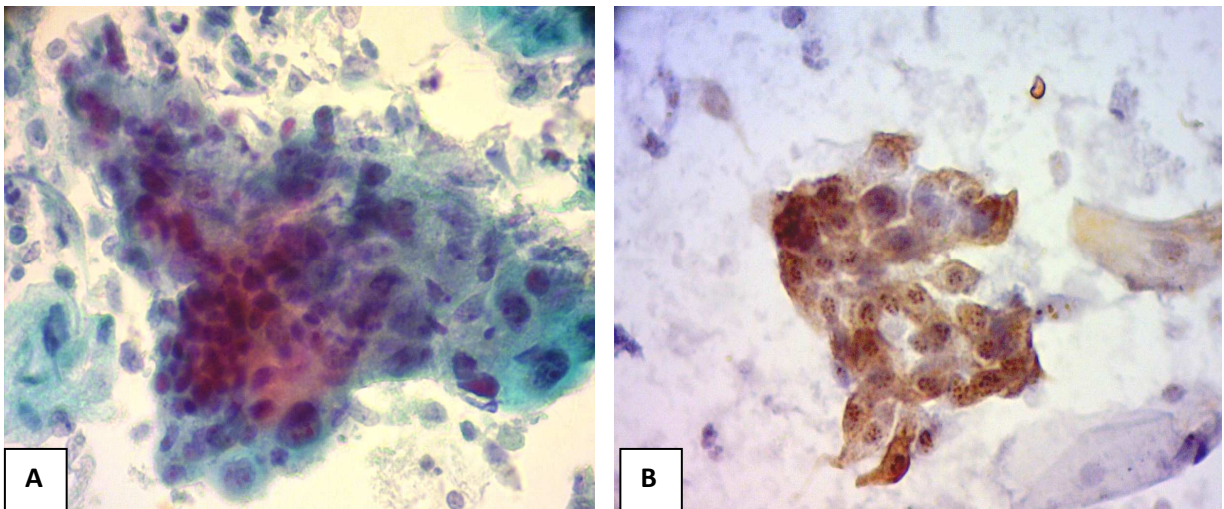


Figura 16 – Esfregaços corados pelo Papanicolaou (A) e imunocitoquímica para HPV (B) em aumento de 400X, exibindo expressão nuclear e citoplasmática em células epiteliais escamosas atípicas. Amostra 33.

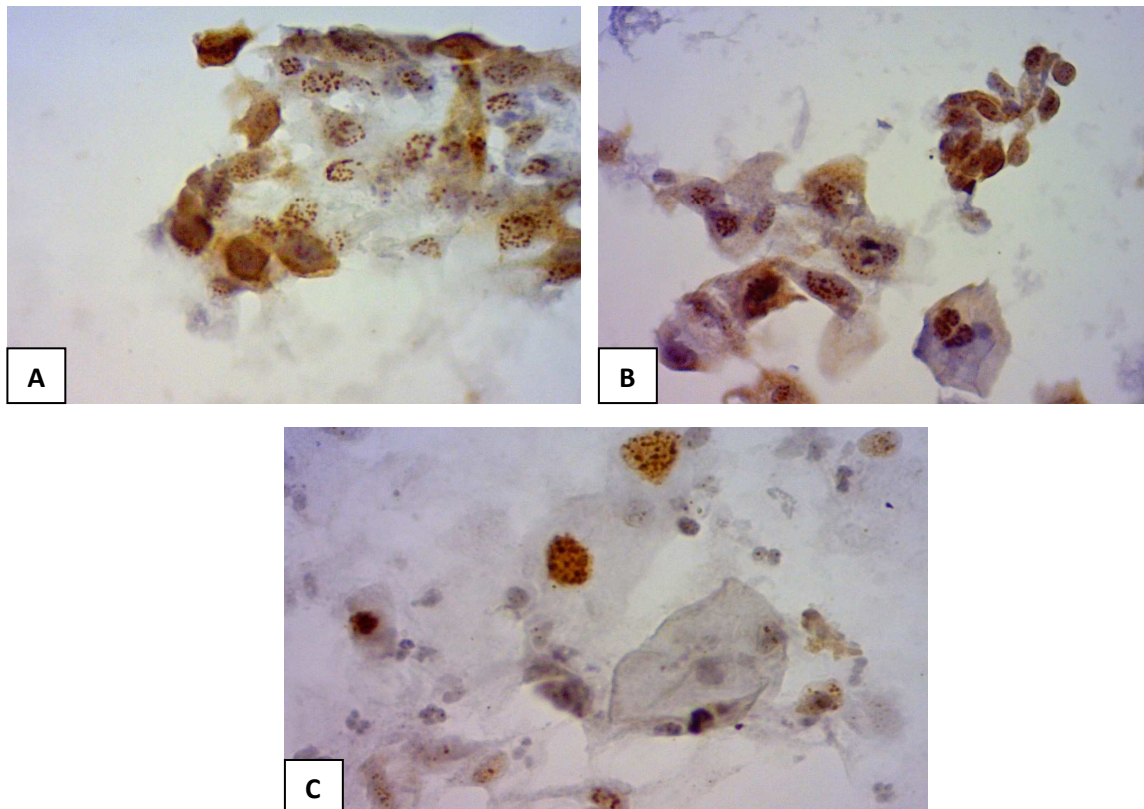


Figura 17 – Imunocitoquímica para HPV em aumento de 400X, exibindo expressão nuclear forte de padrão granular. Amostra 4 (A), amostra 37 (B) e amostra 7 (C).

Nas amostras vaginal e cervical, o BPV-1-1H8 foi expresso respectivamente em 8/16 (50,0%) e 15/28 (53,6%) amostras, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Em pacientes nos estádios I, II, III e IV, o número de amostras positivas na imunocitoquímica foi respectivamente 4/8 (50,0%), 11/15 (73,3%), 7/17 (41,2%) e 1/2 (50,0%). Apesar de a frequência de expressão imunocitoquímica ter sido maior em pacientes no estágio II, essa diferença não foi significativa.

Detectou-se expressão imunocitoquímica em 13/21 (61,9%) amostras com captura híbrida positiva para HPV de alto risco e 10/23 (43,5%) amostras com captura híbrida negativa. Em 38,1% (8/21) das amostras com captura híbrida positiva, não houve positividade para o HPV pela imunocitoquímica, como detalha a tabela 13.

Tabela 13 – Expressão imunocitoquímica do anticorpo BPV-1-1H8 em relação à captura híbrida

Captura Híbrida	Imunocitoquímica (BPV-1-1H8) para HPV		Total
	Positivo	Negativo	
<b>Positivo</b>	13 (61,9%)	8 (38,1%)	21 (100%)
<b>Negativo</b>	10 (43,5%)	13 (56,6%)	23 (100%)
<b>Total</b>	23 (52,3%)	21 (47,7%)	44 (100%)

A frequência de expressão imunocitoquímica em amostras com anormalidades citológicas foi de 70,6% (12/17), enquanto em amostras negativas foi de 40,7% (11/27). Apenas 5/17 (29,4%) amostras com diagnóstico citológico negativo foram positivas para HPV na imunocitoquímica, como exibe a tabela 14. Houve, portanto, uma tendência de maior expressão imunocitoquímica em amostras com anormalidades citológicas, porém não estatisticamente significante.

Tabela 14 – Expressão imunocitoquímica do anticorpo BPV-1-1H8 em relação às anormalidades citológicas na CBL

Anomalias Citológicas	Imunocitoquímica (BPV-1-1H8) para HPV		Total
	Positivo	Negativo	
<b>Positivo</b>	12 (70,6%)	5 (29,4%)	17 (100%)
<b>Negativo</b>	11 (40,7%)	16 (59,3%)	27 (100%)
<b>Total</b>	23 (52,3%)	21 (47,7%)	44 (100%)

(p = 0.0689,  $X^2$  via Monte Carlo)

Considerando-se as amostras com relação  $RLU/CO > 10$ , 83,3% (5/6) apresentaram positividade imunocitoquímica para o HPV e somente 1/6 (16,7%) amostra foi negativa. Contudo, não houve associação entre a expressão imunocitoquímica e  $RLU > 10$ , já que em 18/38 amostras com  $RLU < 10$  houve expressão para HPV (tabela 15).



Tabela 15 – Expressão imunocitoquímica do anticorpo BPV-1-1H8 em relação a estimativa de carga viral (RLU/CO) >10

RLU/CO >10	Imunocitoquímica (BPV-1-1H8) para HPV		Total
	Positivo	Negativo	
<b>Sim</b>	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6 (100%)
<b>Não</b>	18 (47,4%)	20 (52,6%)	38 (100%)
<b>Total</b>	23 (52,3%)	21(47,7%)	44 (100%)

## 6. DISCUSSÃO

A discussão é apresentada em duas partes. A primeira refere-se ao método empregado e suas limitações. Na segunda parte consideram-se os resultados dos objetivos propostos neste trabalho.

Quanto aos resultados, discutem-se as características clínicas e epidemiológicas das pacientes, os achados morfológicos dos esfregaços cervicovaginais de amostras obtidas no seguimento precoce de pacientes com câncer de colo uterino invasivo tratado (pelos métodos convencional e em base líquida) e por fim, a frequência da infecção pelo HPV através da captura híbrida e a expressão imunocitoquímica do anticorpo BPV-1-1H8 para HPV nestas amostras.

### 6.1 DISCUSSÃO SOBRE O MÉTODO

A eleição do câncer de colo uterino invasivo tratado com radioterapia como tema a ser estudado neste trabalho foi feita por esta ser uma neoplasia que ainda apresenta alta incidência e mortalidade nos países em desenvolvimento (1,3,5,37) e que possui um agente etiológico e história natural bem estabelecidos (38, 39, 40).

O emprego da radioterapia no tratamento das neoplasias do colo uterino é fundamental por sua eficácia terapêutica (127). Sabe-se que a radioterapia como tratamento do câncer cervical produz alterações morfológicas nas células epiteliais neoplásicas e não neoplásicas e nas células do estroma, que dificultam o diagnóstico de doença neoplásica residual, gerando um dilema na rotina do patologista (25). As atipias induzidas pela radioterapia podem gerar diagnósticos falso-positivos. Resultados falso-negativos também podem ocorrer devido à dificuldade de coleta de amostras adequadas pelas alterações causadas na anatomia do colo uterino ou da cavidade vaginal, especialmente pela braquiterapia, modalidade terapêutica a que todas as pacientes deste estudo foram submetidas (128,129).

Como estudos prévios questionam o papel do esfregaço cervicovaginal no seguimento de pacientes com câncer de colo uterino tratado, destacando sua baixa

sensibilidade (12-16) e enfatizam que a persistência de infecção por HPV após tratamento radioterápico pode estar associada com recorrência da doença, torna-se relevante associar à citologia convencional, métodos capazes de detectar a presença de HPV após tratamento (27, 28). Neste estudo, os métodos associados foram captura híbrida e imunocitoquímica.

Para descrever os achados morfológicos das amostras cervicovaginais no seguimento precoce pós-tratamento e definir a frequência de infecção por HPV e sua associação com as anormalidades citológicas, foi realizado um estudo observacional, descritivo, transversal. Este tipo de estudo permite descrever características das populações no que diz respeito a determinadas variáveis e os seus padrões de distribuição. Também pode ser utilizado para descrever associações entre variáveis e sugerir explicações para as variações de frequência, o que serve de base ao prosseguimento de pesquisas sobre o assunto, através de estudos analíticos (130).

Como a maioria das pacientes estudadas provinha de outros serviços e o tempo para o seguimento era limitado, o estudo transversal tornou-se uma opção por ser mais rápido, fácil em termos logísticos, podendo-se tirar conclusões com prontidão, sem problemas de existência de um período maior de seguimento, característico dos estudos longitudinais (131).

Escolheram-se como métodos de análise citológica a CC e a CBL. O esfregaço cervicovaginal convencional é a técnica atualmente empregada no rastreamento do câncer de colo uterino e seguimento pós-tratamento. Esta é uma técnica de alta eficácia, baixo custo e indolor, além de bem aceita pela população (106), entretanto apresenta baixa sensibilidade. Alguns estudos classificam como limitado o valor da citologia cervicovaginal na detecção de doença recorrente, especialmente em pacientes assintomáticas (20, 132).

A citologia em base líquida foi eleita por possibilitar a realização de testes complementares de biologia molecular e imunocitoquímica, sem que houvesse necessidade de convocar novamente a paciente para coletas de exame (113, 114), o que seria logisticamente difícil em rede pública de atendimento. Esta foi a principal característica para sua realização neste trabalho. Entretanto, como estudos relatam melhora da sensibilidade do diagnóstico em relação ao método convencional (110), utilizou-se também para a análise morfológica. Como não foi realizado exame

histopatológico de todas as amostras, que seria o padrão ouro para o diagnóstico, não se pode calcular sensibilidade e especificidade neste estudo.

A análise morfológica do esfregaço convencional, no presente estudo, foi mais clara, houve menos casos insatisfatórios e das amostras com diagnóstico de carcinoma invasor, todas confirmadas histopatologicamente, uma não foi detectada pela CBL. Fatores que podem explicar essas diferenças vão desde vieses de coleta, técnica utilizada no preparo das lâminas, até a maior experiência das observadoras com o método convencional. A literatura é controversa quanto à acurácia da CC e CBL. Muitos estudos que compararam os dois métodos apontam para a CBL como tendo maior acurácia (108, 110, 135, 136). De acordo com Beerman *et al.* houve queda no número de casos insatisfatórios e aumento de sensibilidade na detecção de anormalidades citológicas pela CBL quando comparou-se a CC e CBL com o exame histopatológico (135). Outro estudo indicou que a acurácia diagnóstica da citologia cervical foi melhorada com a CBL (136). Já Syrjänen *et al.* em estudo prévio descreveram que a citologia convencional é superior a CBL e a inspeção com ácido acético no rastreamento de lesões do colo uterino (109). Um trabalho recente de revisão concluiu que não há evidências de que a CBL reduza o número de lâminas insatisfatórias ou detecte mais lesões de alto grau, em estudos de boa qualidade, do que a citologia convencional (137).

Os resultados da captura híbrida para HPV de alto risco neste estudo, pelos motivos já expostos, foram comparados com os resultados da análise morfológica realizada pelo método convencional. Já para a imunocitoquímica, por motivos técnicos, houve melhor qualidade da reação nos esfregaços da citologia em base líquida (138-140). Como se realizou imunocoloração na mesma lâmina em que foi feita a análise morfológica, os resultados da imunocitoquímica tiveram que ser comparados com o resultado morfológico da CBL.

Para a detecção do HPV, a captura híbrida foi escolhida por ser um método utilizado comercialmente, que detecta quase todos os tipos de HPV de alto risco, além de apresentar boa sensibilidade e especificidade (141).

A imunocitoquímica é um método utilizado rotineiramente na prática do patologista. Entretanto, a qualidade da reação, as variações da técnica empregada, o cuidado da análise dos controles, a descoloração das lâminas ou realização em lâminas diferentes, a técnica de contra coloração, são motivos de controvérsia na literatura e alguns trabalhos mostram preocupação quanto a sua reprodução (111).

Recentemente, numerosos estudos utilizaram a imunocitoquímica com o anticorpo p16, marcador de células displásicas glandulares e escamosas e relataram que sua expressão está relacionada com gravidade da lesão cervical (121,133, 138). Alguns destes estudos compararam os resultados da imunoexpressão de p16 com a captura híbrida, mostrando menor sensibilidade da primeira (139,140). Uma metanálise recente que incluiu 61 trabalhos, demonstrou que há uma falta de consenso sobre a interpretação da positividade do p16. As discrepâncias na interpretação da imunocoloração, tanto na citologia quanto em biópsias, reduz a especificidade, reprodutibilidade e dificulta a interpretação dos dados em diferentes estudos. A avaliação de suas aplicações clínicas está seriamente prejudicada pela falta de metodologia padronizada (120). Além da baixa especificidade, no presente trabalho, o p16 não foi considerado na análise pela presença de dificuldades técnicas, como por exemplo, excessiva reação de fundo, dificultando sua interpretação de forma segura.

Uma alternativa muito recente para minimizar a baixa especificidade do p16 está sendo a associação de marcadores que detectam a proteína maior do capsídeo L1 do HPV (122-124), que demonstram infecção por HPV na fase produtiva. Há poucos trabalhos na literatura utilizando anticorpos que detectam o HPV diretamente no tecido ou esfregaços (122-124) e todos os que utilizaram, o fizeram em amostras pré-tratamento. Portanto, nosso trabalho traz como contribuição original, a utilização do anticorpo BPV-1-1H8 para HPV no seguimento precoce de pacientes com câncer de colo uterino tratado e sua associação com a captura híbrida e anormalidades citológicas.

## 5.2 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O desenho do estudo por si só traz consigo limitações. Estudos descritivos transversais apresentam baixa capacidade de generalização, entretanto, sugerem explicações para as variações de frequência, o que serve de base ao prosseguimento de pesquisas sobre o assunto, constituindo-se numa primeira etapa para a formulação de hipóteses (130). Neste estudo, avaliamos as pacientes com câncer de colo uterino tratado, somente no seguimento precoce. Outros estudos

longitudinais prospectivos avaliaram a persistência do DNA-HPV por períodos mais longos e concluíram que no carcinoma cervical tratado, a persistência do DNA-HPV na cérvix após radioterapia foi preditivo de recorrência local (22, 32, 142). O seguimento clínico das pacientes possibilitaria a detecção de doença recorrente ou displasia vaginal pós-radioterapia (143). Adicionalmente, o seguimento com realização de exame histopatológico permitiria a determinação da acurácia dos métodos diagnósticos (CC, CBL, captura híbrida e imunocitoquímica) na detecção de lesão após tratamento.

Outra limitação a ser descrita é o viés de seleção. O recrutamento foi feito com base na demanda de pacientes que foram atendidas no ambulatório de radioterapia do HUB e que aceitaram a participação no estudo. Portanto, a distribuição das variáveis pode não refletir a real proporção de pacientes que são atendidas neste serviço. Nem todos os prontuários consultados continham todos os dados utilizados para formação da casuística e algumas informações foram colhidas diretamente com as pacientes, que podem não compreender adequadamente os questionamentos ou mascarar algumas informações.

Vieses de aferição podem ocorrer em todas as fases da análise. A coleta das amostras, apesar da padronização da sequência sofre a influência de diversos fatores. Os coletadores foram os próprios radioterapeutas que realizaram a braquiterapia. Os dois médicos assistentes foram treinados por uma das observadoras desse estudo quanto à importância da coleta e fixação do material e foram familiarizados com a CBL, que não é utilizada na rotina clínica neste serviço. Nesta técnica utiliza-se somente uma escova própria para coleta ecto e endocervical ou vaginal. O fato de a radioterapia gerar necrose, inflamação e reparo, também dificulta a coleta de material adequando e sua análise. Há também que se considerar problemas técnicos que podem ocorrer na centrifugação do material em base líquida, realização da captura híbrida e imunocitoquímica, que procuraram ser minimizados seguindo-se rigorosamente a técnica adequada para cada método.

Quanto ao tamanho da amostra, sabe-se que conclusões da análise de eventos que ocorrem em menos de 10% da casuística apresentam baixo poder estatístico (130). Dessa forma, os resultados referentes às variáveis de baixa frequência devem ser analisados com cautela. No presente estudo, o principal fator limitante foi o baixo "n" amostral em algumas categorias diagnósticas. As amostras categorizadas como ASC-H, LSIL e HSIL corresponderam a apenas 2% do total. O

aumento do “n” em cada categoria diagnóstica traria resultados comparativos mais consistentes.

### 6.3 DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

O câncer de colo uterino se configura como um importante problema de saúde pública devido a sua alta taxa de incidência e mortalidade. Em decorrência da crescente exposição a fatores de risco ambientais e da modificação de hábitos de vida da população, torna-se importante a discussão dos aspectos epidemiológicos e características clínicas das pacientes que constituíram a amostra desse estudo.

Os achados com relação ao tipo histológico do câncer de colo foram concordantes com a literatura, na qual o carcinoma de células escamosas é o tipo histológico mais freqüente, perfazendo 80,0-90,0% dos casos e o adenocarcinoma, representa 10,0-20,0% do total, com uma tendência de aumento de incidência nos países desenvolvidos (144). Neste estudo, 92,3% das pacientes possuíam diagnóstico histológico de CEC e 7,7% de adenocarcinoma de colo uterino.

O estadiamento clínico do carcinoma cervical é feito de acordo com as recomendações da FIGO, definidas em 1995. O sistema usado para carcinomas cervicais contempla tanto carcinomas escamosos quanto adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos (145). Neste trabalho, os estádios clínicos I, II, III e IV foram observados respectivamente em 19,2% (10/52), 32,7% (17/52), 46,3% (23/52) e 3,8% (2/52) das pacientes. A maioria das pacientes encontrava-se em estágios avançados, como também observaram Murta *et al.* em estudo prévio (146).

A escolha da terapia mais adequada e a formulação do prognóstico para um paciente com câncer são feitas com base no conhecimento clínico sobre a extensão da doença e seu comportamento biológico. Para os carcinomas cervicais, a histerectomia e a radioterapia constituem os métodos terapêuticos mais utilizados (147). Pacientes com estágio IA1 são tratadas com histerectomia simples ou em casos especiais, somente com conização da cérvix. Pacientes com estágio IA2 são tratadas com histerectomia radical e linfadenectomia pélvica. As pacientes nesses estádios também podem ser tratadas com braquiterapia. Apesar da preferência pelo tratamento cirúrgico, este pode ser inviável devido a condições clínicas

desfavoráveis das pacientes ou as características da lesão. Quanto tratadas com cirurgia, as pacientes receberão radioterapia adjuvante se forem evidenciadas metástases em linfonodos pélvicos ou comprometimento de margens cirúrgicas. Pacientes no estágio IB1 não há tratamento padronizado. Opções são cirurgia ou radioterapia externa e braquiterapia ou cirurgia combinada com radioterapia. A partir do estágio IB2 todas as pacientes são tratadas com radioterapia e quimioterapia, sem cirurgia. Exceção se faz em algumas instituições que utilizam a radioterapia neoadjuvante nos estádios IIB. No estágio IVA as pacientes podem ser submetidas à exenteração pélvica. Para o estágio IVB a quimioterapia tem um potencial benefício (95). No nosso trabalho, a maioria (70,0%, 7/10) das pacientes no estágio I foi tratada com cirurgia e radioterapia. Nos estádios II e III o principal tratamento foi radioterapia e quimioterapia, em respectivamente, 70,6% (12/17) e 60,8% (14/23) das pacientes. No estágio IV, a paciente com CEC foi tratada com radioterapia e quimioterapia enquanto a paciente com adenocarcinoma foi tratada com cirurgia e radioterapia.

A idade das pacientes variou de 28 a 79 anos, com uma média de 50,6 anos, concordando com a literatura, que mostra uma maior incidência do carcinoma cervical em mulheres com idades entre 40 e 60 anos, sendo menos freqüente antes dos 30 anos (148). Em um estudo prévio, foi observado que o maior número de casos estava acima dos 40 anos, independentemente do estadiamento (146). Isso se deve ao longo período da evolução da infecção inicial pelo HPV no início das atividades sexuais, na adolescência ou até por volta dos 20 anos, até o aparecimento do câncer. Porém, esse quadro vem se modificando aos poucos e o aparecimento de lesões precursoras está ocorrendo cada vez mais precocemente, devido à iniciação cada vez mais antecipada das atividades sexuais associada aos demais fatores de risco, como mostra o trabalho de Bezerra *et al.*, em que a média de idade das pacientes com diagnóstico de carcinoma cervical foi de 30 anos (148).

Está bem estabelecido que a infecção por HPV oncogênico seja uma causa necessária para o desenvolvimento do carcinoma cervical (149). Entretanto, muitas mulheres com infecção por HPV não progridem para o câncer. Uma gama de cofatores endógenos e exógenos estão envolvidos para influenciar o risco de progressão da infecção cervical por HPV ao carcinoma cervical (150).

Estudos epidemiológicos conduzidos nos últimos 30 anos têm indicado consistentemente que o risco de câncer cervical é fortemente influenciado por



medidas de atividade sexual como o número de parceiros sexuais, idade da primeira relação sexual e comportamento sexual dos parceiros. Evidências circunstanciais da transmissão sexual de agentes infecciosos vêm de estudos mostrando que esposas de pacientes com câncer de pênis têm um risco aumentado de câncer cervical. Este achado foi o suporte para vários estudos que mostraram forte associação entre incidência e mortalidade entre câncer cervical e câncer de pênis (151). O fato de a infecção pelo HPV de alto risco estar presente em quase a totalidade dos casos de câncer do colo do útero fez com que alguns autores considerassem essa patologia como uma doença sexualmente transmissível.

Quanto ao número de parceiros sexuais, no nosso estudo a maioria (59,0%) relatou entre dois a cinco parceiros, enquanto 26,9% relataram parceiro fixo ao longo de suas histórias ginecológicas. O fato de um considerável número de pacientes atendidas no serviço confirmarem um só parceiro nos leva a considerar a possibilidade de seus parceiros sexuais terem tido uma vida sexual mais ativa, com múltiplas parceiras ou história de DST (doença sexualmente transmissível), sendo este um dado de valor tão importante quanto à vida sexual da mulher, conforme vem registrando a literatura (151).

A média de idade da sexarca foi de 17,3 anos neste estudo. O início precoce da atividade sexual está relacionado com um maior tempo de ação sobre um epitélio cervical, ainda em maturação, de fatores oncogênicos, como a infecção precoce pelos tipos de HPV de alto risco, além de fatores traumatizantes sobre esse epitélio, decorrentes do processo inflamatório resultante (149).

A associação da alta paridade com o câncer cervical tem sido consistentemente encontrada em muitos estudos caso-controle. Grande parte desses estudos foram realizados com mulheres portadoras de HPV e mostraram risco aumentado de HSIL e carcinoma invasor com o aumento do número de gravidezes (149). No nosso estudo, a maioria (55,8%) das pacientes relatou até 5 gestações em suas histórias obstétricas e apenas 3,8% das pacientes eram nulíparas. Grande parte delas (38,4%), engravidaram 6 ou mais vezes. Tais dados corroboram a literatura, segundo a qual, a multiparidade figura como cofator na gênese do câncer cervical. Castellsagué *et al.* em um estudo de revisão descreveram que a explicação está no fato de que a alta paridade pode aumentar o risco de carcinoma do colo uterino porque ela mantém a zona de transformação na ectocérvice por muitos anos, facilitando a exposição direta ao HPV e provavelmente

de outros cofatores (149). Somando-se a isso, as alterações hormonais induzidas pela gravidez (incluindo aumento dos níveis de estrogênio e progesterona) podem também modular a resposta imune ao HPV e influenciar o risco de persistência e progressão da doença (148).

O uso de ACHO tem sido associado ao carcinoma cervical em muitos, mas não em todos os estudos epidemiológicos como cofator da infecção pelo HPV. As evidências desta associação em mulheres HPV positivas é geralmente fraca (149). Alguns estudos demonstraram associação positiva para um tipo histológico particular ou um subgrupo específico de mulheres com outros fatores de risco. Um estudo prévio mostrou aumento significativo do risco em usuárias de ACHO para adenocarcinoma *in situ* (151). No presente estudo, apenas 3,8% das pacientes relataram o uso de ACHO. Uma delas tinha diagnóstico de adenocarcinoma e outra de CEC. Estudos apontam que mecanismos hormônio relacionados podem influenciar a progressão de células pré-malignas promovendo a integração do DNA-HPV no genoma do hospedeiro, resultando em desregulação de E6 e expressão de E7 (149). Madeleine *et al.*, em seu trabalho, destacaram duas linhas de evidências que suportam o papel dos ACHO no acúmulo de alterações endocervicais necessárias para carcinogênese. Os ACHO podem aumentar o risco de câncer cervical por predispor à ectopia e contato direto do HPV com as células endocervicais. A outra seria sua ação direta como promotor, ativando células glandulares metaplásicas fagocíticas, que se transformariam em tumorigênicas na presença do HPV e progestinas (151).

O efeito do tabagismo tem sido bem documentado em muitos estudos que mostraram associação causal estatisticamente significativa com o câncer cervical, independente da ação modificadora da infecção pelo HPV (149,150,152). Um estudo prospectivo recente apresentou evidências convincentes de que mulheres fumantes têm infecção mais duradoura pelo HPV e reduzida taxa de clearance da infecção oncogênica, quando comparado com mulheres não fumantes (153). Há evidências de que o risco de carcinoma de células escamosas aumenta significativamente com o tabagismo, entretanto, não foi encontrada associação entre tabagismo e adenocarcinoma da cérvix (150). No nosso estudo, 15,4% das pacientes relataram este hábito. Em todas elas, o diagnóstico histológico foi de CEC. Possíveis mecanismos para o efeito do cigarro incluem a redução da resposta imune da

cérvice, efeitos relacionados ao metabolismo de hormônios femininos e dano genético direto causado pelos carcinógenos relacionados ao tabaco (150).

#### 6.4 ACHADOS MORFOLÓGICOS

O emprego da radioterapia no tratamento das neoplasias do colo uterino é fundamental por sua eficácia terapêutica, considerando a alta incidência da doença. A radioterapia pode ser utilizada em pacientes com neoplasias malignas do colo uterino antes da cirurgia (neoadjuvante), após a cirurgia (adjuvante) ou como uma única modalidade terapêutica (exclusiva). Quando indicada, pode ser empregada na forma de braquiterapia (terapia de contato), teleterapia (terapia à distância) ou ambas (127). Na literatura, muitos relatos tentam caracterizar a resposta das neoplasias ao tratamento, assim como a eficácia do esfregaço cervicovaginal convencional e em base líquida para avaliar esta resposta (20,128, 132).

Desde a introdução da radioterapia como modalidade terapêutica do câncer cervical, tem sido reconhecido que esta produz alterações morfológicas nas células epiteliais neoplásicas e não neoplásicas e nas células do estroma (5). Durante o diagnóstico é difícil distinguir essas alterações de doença neoplásica residual. Estudos prévios investigaram a significância de alterações celulares induzidas pela terapia e seu impacto no prognóstico. Entretanto, esses estudos são relativamente antigos e não utilizaram terminologia uniforme por terem sido realizados antes da introdução do sistema Bethesda, tornando difícil a comparação dos resultados (21).

Um estudo prévio que avaliou espécimes cirúrgicos de histerectomia após tratamento radioterápico mostrou acentuadas alterações morfológicas. Estas incluíram estreitamento do lúmen vaginal, obliteração do seio vaginal, adesão entre a cérvice e parede vaginal, estenose ou até obliteração do canal cervical e ulceração da cérvice e vagina (129). Estas alterações tornam tecnicamente difícil a obtenção de um esfregaço representativo e explica porque muitas amostras são hipocelulares (128). No nosso estudo 5,7% (3/52) e 13,4% (7/52) das amostras foram insatisfatórias na CC e CBL por hipocelularidade e hemorragia. As alterações inflamatórias e reparativas que acompanham esse processo, representadas nos

esfregaços cervicovaginais por exsudato inflamatório e reparo, estiveram uniformemente presentes em todas as categorias diagnósticas.

Chien *et al.*, em um trabalho prévio, realizaram seguimento de pacientes tratadas com radioterapia curativa para câncer de colo uterino com citologia cervicovaginal convencional e demonstraram que maioria dos esfregaços estava dentro dos limites da normalidade (65,8%) ou exibia alterações reativas e atrofia com inflamação (25,2%). ASC, LSIL, HSIL e carcinoma foram detectados em 2,6%, 2,8%, 2,8%, e 0,8% das amostras, respectivamente. Em todos os casos com diagnóstico citológico de carcinoma foi evidenciada doença recorrente no seguimento clínico (154).

No presente estudo, pelo método convencional, 61,5% das amostras tiveram diagnóstico negativo, 7,7 % ASC-US, 15,4% ASC-H, 2,0% HSIL e 7,7% de carcinoma invasor. Pelo método em base líquida 53,8% das amostras tiveram diagnóstico negativo, 11,5% ASC-US, 9,6 % ASC-H, 2,0 % AGUS, 2,0% LSIL, 2,0 % HSIL e 5,7% de carcinomas invasores. Semelhante ao estudo referido, a maioria de nossos diagnósticos foi negativo em ambos os métodos. As amostras com diagnóstico de carcinoma foram biopsiadas, sendo detectada doença invasora persistente em todas elas. A taxa mais elevada de anormalidades citológicas, no presente estudo, pode ser explicada pelo menor tempo de seguimento. As atipias induzidas pela radioterapia tendem a diminuir com o tempo (14, 25). No nosso estudo, o seguimento foi precoce (3 meses após o término da braquiterapia), enquanto no estudo prévio referido, a média de seguimento foi de 22 meses. Zannoni *et al.* descreveram que o risco de câncer em pacientes com ASCUS pós-tratamento radioterápico é similar ao dos esfregaços negativos. Este estudo recomenda que achados morfológicos de malignidade indeterminada devem ser considerados como benignos (128) e que casos com diagnóstico de ASC podem ser casos falso-positivos devido às alterações nas células epiteliais escamosas e glandulares induzidas pela radioterapia. O oposto, casos falso-negativos, podem ser explicados pela dificuldade de acesso das células neoplásicas encarceradas por fibrose, durante a coleta com escova ou pela espátula (128).

Quanto à concordância entre os métodos diagnósticos, Chhieng *et al.* em um estudo prévio relataram uma forte concordância diagnóstica entre observadores com os métodos convencional e em base líquida em amostras pré-tratamento (155). No presente trabalho, a concordância diagnóstica pelo índice Kappa foi de 0,573 com

uma variabilidade de 0,9. Este valor é classificado como discreto. A menor concordância encontrada no nosso estudo reflete a grande subjetividade na avaliação desse exame, especialmente quando as amostras foram submetidas à radio/quimioterapia. Outro fator que pode explicar a concordância mais elevada no trabalho prévio deve-se ao fato de que nele foi avaliada a concordância entre observadores em cada método separadamente, diferentemente do nosso em que foi avaliada a concordância entre os diagnósticos da CC e CBL. Este resultado reflete a importância de associar métodos adicionais que melhorem a sensibilidade do exame cervicovaginal no acompanhamento de pacientes tratadas com radioterapia.

As alterações morfológicas após a radioterapia para câncer cervical não têm sido descritas em detalhes. Há poucos trabalhos na literatura, especialmente sobre as alterações causadas pela radioterapia no esfregaço cervicovaginal (5,156-158). Entretanto, as características histológicas do câncer cervical tratado com radioterapia são semelhantes às descritas para cânceres de outros sítios, com alterações nucleares, citoplasmáticas e estromais.

Um estudo recente mostrou que parece haver uma forte relação entre a resposta terapêutica e alterações morfológicas. As alterações radioterápicas foram mais frequentes em pacientes com resposta completa ou parcial à radioterapia do que em pacientes com doença persistente/recorrente. Nesse estudo, considerou-se como resposta patológica completa a ausência de células neoplásicas invadindo o estroma cervical. Esta resposta pode exibir neoplasia intraepitelial (129). No nosso estudo, encontramos achados semelhantes quanto à presença de alterações radioterápicas menos frequentes em pacientes com persistência de lesão invasora.

Considerando as alterações morfológicas mais frequentemente evidenciadas em nossas amostras (células gigantes multinucleadas, macrófagos e vacuolização citoplasmática), observou-se que células gigantes multinucleadas estiveram presentes em apenas uma amostra (1/4, 25,0%) de carcinoma invasor enquanto nas demais amostras em conjunto (negativas, ASC e SIL) foram verificadas em 24 amostras (24/45, 42,5%) pela CC. Na CBL, as porcentagens foram respectivamente 33,3% (1/3) e 42,5% (16/40). Macrófagos foram visualizados em 2 amostras (2/4, 50,0%) de carcinoma invasor e 22/44 (50,0%) amostras sem lesão invasora na CC. Na CBL, as porcentagens foram respectivamente 33,3% (1/3) e 35,9% (14/39) das amostras. Vacuolização citoplasmática não foi evidenciada nas amostras com persistência de lesão invasora na CC e foi evidente em 65,9% (29/44) das amostras

sem lesão invasora. Pela citologia em base líquida as porcentagens foram respectivamente 33,3% (1/3) e 46,1% (18/39) das amostras.

Os critérios utilizados para diagnóstico de carcinoma invasor persistente foram o aumento da relação núcleo/citoplasma, irregularidade da membrana nuclear, hiperchromasia, cromatina grosseiramente distribuída e densa queratinização (5), que se apresentaram em todas as amostras com este diagnóstico, em ambos os métodos, com exceção da cromatina grosseira que foi vista em 2/3 (66,7%) amostras na CBL.

## 6.5 DETECÇÃO DO HPV PELA CAPTURA HÍBRIDA

Neste estudo, a detecção do HPV foi feita em amostras cervicais e vaginais colhidas de pacientes no seguimento precoce após tratamento de câncer de colo uterino invasivo, para avaliar o papel de testes para detecção de HPV em conjunto com os métodos morfológicos citológicos na detecção de câncer residual. O HPV foi detectado em 24/52 (46,1%) amostras pela captura híbrida com uma mediana da taxa RLU/*cutoff* (estimativa de carga viral) nas amostras positivas de 1,71 (1 – 2120,03). Em estudos prévios, a taxa de detecção de HPV em amostras cervicais e vaginais após tratamento de câncer invasivo variou de 21,2% a 78,0% e possíveis fatores responsáveis por esta variação são o tempo de coleta da amostra após o tratamento, o método de detecção do vírus, estágio da doença e formas de tratamento (22, 31-34). No presente estudo, as amostras foram obtidas pouco tempo depois do tratamento, durante o primeiro seguimento (3 meses após o término da braquiterapia) porque nosso objetivo foi diagnosticar precocemente câncer residual. A captura híbrida foi escolhida por ser um método utilizado comercialmente, que detecta quase todos os tipos de HPV de alto risco.

A maioria das nossas pacientes se encontrava em estágio avançado da doença e foram tratadas de acordo com seu estadiamento e condições clínicas, mas não houve diferença significativa na frequência viral e mediana da taxa de RLU/CO nos diferentes estádios (I, II, III). Também não houve diferença significativa entre as amostras cervicais (obtidas de pacientes submetidas exclusivamente a radioterapia com ou sem quimioterapia) e amostras vaginais (obtidas de pacientes submetidas a

histerectomia e radioterapia com ou sem quimioterapia). Em um estudo recente que avaliou a presença de HPV 3 meses após radioterapia por captura híbrida, a taxa de detecção de HPV foi de 22,4% (34). De acordo com os autores desse estudo, a baixa taxa observada foi explicada pelo tratamento da maioria das pacientes com radioquimioterapia. O autor desse estudo também observou que em aproximadamente metade das amostras houve clareamento do vírus em avaliações subseqüentes e sugeriu que alguns vírus detectados nos primeiros meses estavam provavelmente em *debris* celulares resultantes da radioterapia.

Com respeito aos achados morfológicos, nossos resultados mostraram que as anormalidades citológicas foram significativamente mais frequentes nas amostras com HPV (captura híbrida positiva) do que nas amostras sem HPV (captura híbrida negativa). A carga viral (estimada pela relação RLU/CO) foi significativamente maior nas amostras com anormalidades citológicas quando comparadas com amostras com citologia negativa.

Das 26 amostras com captura híbrida negativa, apenas 5 (19,2%) exibiam anormalidades citológicas na citologia esfoliativa convencional. Como o resultado da citologia foi ASC nessas amostras, grande parte dessas anormalidades citológicas pode ser explicada pela presença de atipia reativa induzida pela radioterapia ou, menos provavelmente, pela presença de alterações celulares causadas por um tipo de HPV que não foi detectado pela captura híbrida. De acordo com um estudo prévio, células atípicas induzidas pela radioterapia foram detectadas em 28,0% dos esfregaços durante os primeiros quatro meses após a radioterapia, com uma diminuição com o passar do tempo (14). Essas alterações morfológicas, que atingem as células epiteliais não neoplásicas e neoplásicas, tornam extremamente difícil a interpretação dos achados morfológicos. Então, a captura híbrida pode ser muito útil em amostras diagnosticadas como ASC precocemente após a radioterapia, já que a ausência do DNA do HPV nesse teste irá favorecer atipia induzida pela radiação, enquanto a presença do vírus, especialmente em altas cargas virais, levará a suspeita de neoplasia residual.

Em contraste, também encontramos captura híbrida positiva em amostras sem anormalidades citológicas (11/32, 34,4%). As explicações para isso são a presença de vírus em *debris* celulares após radioterapia e a presença de uma infecção latente com risco de desenvolver uma neoplasia cervical ou vaginal tardia. Song *et al.* observaram num estudo prévio que em amostras com relação RLU/CO

abaixo de 10 havia um clareamento do vírus e eles sugeriram que amostras com baixas cargas virais podem estar associadas com presença de pequena quantidade de HPV DNA em células tumorais degradadas pela radioterapia. No nosso estudo, todas as amostras com captura híbrida positiva, mas sem anormalidades citológicas apresentaram valores de RLU/CO abaixo de 3,11, com exceção de uma amostra na qual o valor foi de 33,98. Então os resultados do nosso estudo e estudos prévios indicam que a positividade de testes para HPV, imediatamente após o tratamento, não deve ser interpretada isoladamente como indicativo de tumor residual ou risco de desenvolver nova lesão, sendo necessário considerar a carga viral e os achados citológicos em conjunto. Em relação à infecção latente após o tratamento, resultados de estudo prévios evidenciaram o papel causal do HPV no desenvolvimento de displasia vaginal após radioterapia, visto que DNA HPV de alto risco foi encontrado em 97,7% dessas lesões vaginais (143).

Liao *et al.* concluíram que a displasia vaginal após radioterapia é mais refratária ao tratamento do que a displasia não associada com a radioterapia. Esta também tem mais tendência a recorrer após cirurgia e terapia ablativa e sua progressão para câncer invasivo é mais provável.

Outro aspecto a ser discutido é a possibilidade de resultado falso-negativo na citologia ou captura híbrida. No nosso estudo 21/52 (40,4%) amostras foram negativas em ambos os testes. Como dito anteriormente, é tecnicamente difícil obter um esfregaço representativo após o tratamento devido às intensas alterações causadas pela radioterapia, incluindo hemorragia, aderência e ulceração da cérvix e vagina (128). Além disso, na avaliação histológica, células neoplásicas residuais são escassas, geralmente dentro do estroma cervical e cobertas por epitélio reativo e reparativo (128,129). Isso significa que o tumor residual raramente alcança a superfície cervical para poder ser amostrado por espátula ou escova. Um estudo prévio mostrou que muitos espécimes de histerectomia após radioterapia tinham câncer residual que não foi detectado pela citologia (128).



## 6.6. DETECÇÃO DE HPV POR IMUNOCITOQUÍMICA

A detecção do HPV, em amostras cervicais e vaginais colhidas de pacientes no seguimento precoce após tratamento de câncer de colo uterino invasivo, também foi realizada através de imunocitoquímica. Foi utilizado o anticorpo monoclonal BPV-1-1H8 para HPV que reconhece a proteína maior do capsídeo L1 dos HPV dos tipos 1, 6, 11, 16, 18, 31, sendo os tipos 1, 6 e 11 de baixo risco e 16, 18 e 31 de alto risco. No presente estudo, as amostras foram obtidas de pacientes submetidas à radioterapia, portanto, a positividade foi considerada em células típicas, células com efeito da radioterapia e células atípicas.

A expressão nuclear do BPV-1-1H8 foi detectada em 52,3% (23/44) das amostras. Não houve diferença estatisticamente significativa da expressão do BPV-1-1H8 nas amostras vaginal e cervical, nem nos diferentes estádios clínicos da doença. Um estudo prévio que utilizou imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal para a proteína do capsídeo L1 do HPV 16 em cortes histológicos de carcinoma de colo uterino (159) e outro que realizou imunocitoquímica com anticorpo monoclonal para proteína do capsídeo L1 para HPV de alto risco em amostras de cérvix uterina composta de casos negativos e com anormalidades citológicas (122), detectaram o HPV em respectivamente 55,0% e 30,6% dos casos (122, 159).

Recentemente, estudos apontaram a expressão da proteína maior do capsídeo L1 como um importante marcador para revelar a fase produtiva e ou ativa da infecção por HPV (160-162). A proteína do capsídeo L1 é expressa juntamente com a produção de partículas virais infecciosas. A perda de expressão dessa proteína pode refletir dois estados do genoma viral: a integração do DNA viral no genoma do hospedeiro e infecção latente pelo HPV. Testes que detectam o DNA-HPV, como a captura híbrida, não podem diferenciar entre infecção latente ou ativa. Portanto, esta pode ser uma importante característica da imunocitoquímica. Não há relatos na literatura da utilização de imunocitoquímica para a proteína do capsídeo L1 em amostras pós-tratamento de câncer de colo uterino invasivo. Estudos prévios que realizaram imunocitoquímica e imuno-histoquímica para proteína L1 do capsídeo, em amostras negativas e com alterações citológicas pré-tratamento, mostraram que há redução da expressão do anticorpo com o aumento da gravidade da lesão (160-167). A expressão da proteína L1 denota bom prognóstico devido ao

estímulo da resposta imune humoral. A proteína L1 do capsídeo viral é capaz de arranjar-se em partículas morfológicamente e antigenicamente semelhantes ao vírus, denominadas *virus-like particles* (VLPs), que induzem altos títulos de anticorpos neutralizantes. Este princípio é utilizado na fabricação de vacinas anti-HPV (166).

Ungureanu *et al.* utilizaram amostras de CBL e detectaram a expressão da proteína do capsídeo L1 em 1/8 (12,5%) casos negativos, 2/6 (33,3%) ASC-US, 16/32 (50,0%) LSIL, 5/27 (18,51%) HSIL e nenhum caso de carcinoma (122). No presente estudo, em amostras de CBL obtidas durante o primeiro seguimento pós-tratamento, o HPV foi detectado em 11/27 (40,7%) amostras negativas, 5/6 (83,3%) ASC-US, 4/6 (66,7%) ASC-H, 1/1 (100%) LSIL, 1/1(100%) HSIL e 1/3 (33,3%) amostras de carcinoma invasor.

A imunocitoquímica foi positiva em 13 de 21 (61,9%) amostras com captura híbrida positiva. A expressão imunocitoquímica em menos amostras pode ser explicada pela menor quantidade de HPV de alto risco detectada por este clone de anticorpo, apenas três tipos (16,18 e 31), enquanto a captura híbrida para HPV de alto risco detecta os 13 tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68. Houve também expressão em casos com captura híbrida negativa (10/23, 43,5%). Esta positividade pode ser explicada pela detecção de HPV de baixo risco pelo anticorpo utilizado.

A prevalência de HPV de alto e baixo risco, em amostras cervicais de pacientes do sexo feminino, considerando todas as categorias diagnósticas, pré-tratamento, varia de 13,4 a 44,9% em diferentes estudos (167-170). No estudo de Carestiato *et al.*, realizado no Brasil, a prevalência foi de 44,9%. Destes, 5,1% dos casos eram de baixo risco, 25,5% de alto risco e 14,3% combinados de alto e baixo risco (167). Um estudo de metanálise, que determinou a prevalência dos genótipos do HPV no carcinoma cervical pré-tratamento, mostrou que os tipos mais comumente identificados em ordem decrescente de prevalência são HPV 16, 18, 45, 31, 33, 58, 52, 35, 59, 56, 6, 51, 68, 39, 82, 73, 66, 70. Dentre estes, o HPV 6 e 70 são de baixo risco, mostrando que casos de carcinoma podem exibir HPV de baixo risco, geralmente em associação com HPV de alto risco. Como os tipos 16, 18, 45, 31 e 33, todos de alto risco, perfazem juntos de 63,0% a 97,0% dos casos, a prevalência dos demais tipos, especialmente os de baixo risco é muito baixa no carcinoma (170), explicando apenas parcialmente a elevada prevalência de

expressão de HPV pela imunocitoquímica em amostras com captura híbrida negativa no nosso estudo. Outra possibilidade de explicar a expressão da imunocitoquímica em amostras com captura híbrida negativa é que estas pacientes se comportem como pacientes pré-tratamento, e sofram reinfecção com cepas de baixo risco, que não são detectadas na captura híbrida para HPV de alto risco. Mais uma explicação possível é a presença de reação cruzada. Um estudo recente demonstrou que a proteína maior do capsídeo L1 do HPV 16 compartilha 34 pentâmeros com proteínas humanas podendo gerar uma reação cruzada (171).

Como a RLU/CO estima a carga viral na captura híbrida e a proteína L1 do capsídeo só é expressa em infecções produtivas, pesquisamos se havia essa associação. No presente estudo, apenas uma das seis amostras foi negativa na imunocitoquímica nos casos com captura híbrida positiva e RLU/CO >10. Nesta amostra o diagnóstico foi de carcinoma persistente no exame citológico. Provavelmente o DNA-HPV detectado na captura híbrida havia se integrado ao DNA do hospedeiro e a imunocitoquímica não detecta a infecção nesta fase. Em 5/6 amostras com RLU/CO >10 a imunocitoquímica foi positiva, refletindo infecção ativa. Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Sabe-se que a persistência de detecção de HPV em mulheres com citologia normal aumenta o risco de recorrência pós-tratamento (156). Há evidências também que nas pacientes pós-tratamento, o HPV detectado pela captura híbrida, especialmente com baixa relação RLU/CO pode estar presente em *debris* celulares (34), não sendo possível detectar se a infecção está em fase ativa ou latente. Portanto, talvez a principal vantagem da imunocitoquímica seja nos casos com diagnóstico citológico negativo e captura híbrida positiva, onde o HPV provavelmente está presente em células viáveis, infectadas produtivamente, podendo indicar risco para desenvolvimento de lesão posteriormente.

## 7 CONCLUSÕES

Neste estudo foram avaliados dados citopatológicos, moleculares e imunocitoquímicos de 52 amostras cervicais e vaginais obtidas no seguimento precoce de pacientes com câncer de colo uterino invasivo tratado. Realizou-se a pesquisa de DNA-HPV pela técnica de captura híbrida e a detecção da proteína do capsídeo L1 pela expressão imunocitoquímica do anticorpo BPV-1-1H8. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. A análise citológica pela CC e CBL revelou que as alterações morfológicas mais freqüentes foram presença de exsudato leucocitário e reparo em todas as categorias diagnósticas. As alterações radioterápicas mais frequentes foram macrocitose, células gigantes multinucleadas e vacuolização citoplasmática. Os critérios para diagnóstico de carcinoma invasor persistente são os mesmos utilizados no diagnóstico pré-tratamento.

2. A análise morfológica de esfregaços cervicovaginais de pacientes submetidas a tratamento radioterápico pela CC e CBL mostrou que as alterações radioterápicas são mais freqüentes em amostras negativas ou com ASC do que em pacientes com lesão invasora persistente.

3. A concordância diagnóstica entre a CC e CBL foi discreta de acordo com o coeficiente Kappa. Este resultado reflete a importância de associar métodos adicionais que melhorem a sensibilidade da citologia cervicovaginal no acompanhamento de pacientes tratadas com radioterapia.

4. O HPV de alto risco detectado pela captura híbrida está presente em quase metade das amostras após tratamento precoce de câncer invasivo e sua frequência e carga viral não estão relacionadas ao estágio da doença e local do qual as amostras foram obtidas (cervical ou vaginal).

5. As anormalidades citológicas foram significativamente mais frequentes nas amostras com HPV (captura híbrida positiva) do que nas amostras sem HPV (captura híbrida negativa). A carga viral (estimada pela relação RLU/CO) foi significativamente maior nas amostras com anormalidades citológicas quando comparadas com amostras com citologia negativa.

6. A expressão imunocitoquímica do anticorpo BPV-1-1H8 para o HPV foi positiva em mais de metade das amostras. Houve uma maior tendência de expressão em amostras com anormalidades citológicas.

Como as amostras com anormalidades citológicas estiveram associadas à presença de vírus e alta carga viral, pode-se concluir que os métodos de detecção de DNA-HPV podem ser úteis no seguimento precoce como um complemento da citologia no diagnóstico de neoplasia residual em pacientes após tratamento radioterápico do câncer de colo uterino. Nos casos com diagnóstico citológico negativo e captura híbrida positiva, a expressão imunocitoquímica da proteína maior do capsídeo L1 pode detectar o HPV em células viáveis, infectadas produtivamente, podendo indicar risco para desenvolvimento de lesão posteriormente.

Uma proposta interessante para um estudo posterior seria a ampliação do tempo de seguimento dessas pacientes, incluindo um maior número de amostras e utilizando a captura híbrida e imunocitoquímica para detecção do HPV periodicamente. A realização de exame histopatológico em todas as amostras com anormalidades citológicas seria ideal por ser o padrão ouro de diagnóstico, possibilitando o cálculo da sensibilidade/especificidade dos métodos diagnósticos e sua acurácia na detecção de doença invasora persistente/recorrente, bem como de displasia vaginal após tratamento radioterápico.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Bruni L, Diaz M Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*. 2010 Dec 15;202(12):1789-99.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
3. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2008: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>. Acesso em 05 de fevereiro de 2012.
4. Andrade JM, Yamaguchi NH, Oliveira AB, Perdicaris M, Pereira ST, Petitto JV, Alves MJ. Projeto Diretrizes Rastreamento, Diagnóstico e Tratamento do Carcinoma do Colo do Útero. Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia Sociedade Brasileira de Cancerologia, 2001.
5. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/11-25.
6. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):518-27.
7. Brinton LA. Epidemiology of cervical cancer--overview. *IARC Sci Publ*. 1992;(119):3-23.
8. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*. 1989 Dec 1;8(12):3905-10.

9. Petignat P, Roy M. Diagnosis and management of cervical cancer. *BMJ*. 2007 Oct 13;335(7623):765-8.
10. Creasman WT. New gynecologic cancer staging. *Gynecol Oncol*. 1995 Aug;58(2):157-8.
11. Elit L, Fyles AW, Devries MC, Oliver TK, Fung-Kee-Fung M; Gynecology Cancer Disease Site Group. Follow-up for women after treatment for cervical cancer: a systematic review. *Gynecol Oncol*. 2009 Sep;114(3):528-35.
12. Elit L, Fyles AW, Oliver TK, Devries-Aboud MC, Fung-Kee-Fung M; members of the Gynecology Cancer Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-Based Care. Follow-up for women after treatment for cervical cancer. *Curr Oncol*. 2010 Jun;17(3):65-9.
13. Cooper AL, Dornfeld-Finke JM, Banks HW, Davey DD, Modesitt SC. Is cytologic screening an effective surveillance method for detection of vaginal recurrence of uterine cancer? *Obstet Gynecol*. 2006 Jan;107(1):71-6.
14. Rintala MA, Rantanen VT, Salmi TA, Klemi PJ, Grénman SE. PAP smear after radiation therapy for cervical carcinoma. *Anticancer Res*. 1997 Sep-Oct;17(5B):3747-50.
15. Wright JD, Herzog TJ, Mutch DG, Gibb RK, Rader JS, Davila RM, Cohn DE. Liquid-based cytology for the postirradiation surveillance of women with gynecologic malignancies. *Gynecol Oncol*. 2003 Oct;91(1):134-8.
16. Singh N, Titmuss E, Taylor A, Powell ME. Routine cervical cytology has no role after primary chemoradiation for cervical cancer. *Cytopathology*. 2005 Dec;16(6):315-6.
17. Soisson AP, Geszler G, Soper JT, Berchuck A, Clarke-Pearson DL. A comparison of symptomatology, physical examination, and vaginal cytology in the

detection of recurrent cervical carcinoma after radical hysterectomy. *Obstet Gynecol.* 1990 Jul;76(1):106-9.

18. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine.* 2006 Mar 30;24 Suppl 1:S1-15.

19. Davey DD, Gallion H, Jennings CD. DNA cytometry in postirradiation cervical-vaginal smears. *Hum Pathol.* 1992 Sep;23(9):1027-31.

20. Morice P, Deyrolle C, Rey A, Atallah D, Pautier P, Camatte S, Thoury A, Lhomme C, Haie-Meder C, Castaigne D. Value of routine follow-up procedures for patients with stage I/II cervical cancer treated with combined surgery-radiation therapy. *Ann Oncol.* 2004 Feb;15(2):218-23.

21. Shield PW, Wright RG, Free K, Daunter B. The accuracy of cervicovaginal cytology in the detection of recurrent cervical carcinoma following radiotherapy. *Gynecol Oncol.* 1991 Jun;41(3):223-9.

22. Singh RK, Maulik S, Mitra S, Mondal RK, Basu PS, Roychowdhury S, Panda CK. Human papillomavirus prevalence in postradiotherapy uterine cervical carcinoma patients: correlation with recurrence of the disease. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 May-Jun;16(3):1048-54.

23. Tabatabai ZL, Krishnamurthy S. Radiation-induced atypical glandular cells mimicking recurrent adenocarcinoma in a posthysterectomy vaginal smear. *Acta Cytol.* 2003 Jan-Feb;47(1):106-7.

24. Guarisi, R, et al. Rastreamento, Diagnóstico e Tratamento das Lesões Precursoras do Câncer Invasor de Colo Uterino no Município de Francada Rocha, SP. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2004; 50(1): 7-15)

25. Powers CN. Radiation treatment effects in cervical cytology. *Diagn Cytopathol.* 1995 Jul;13(1):75-80



26. Ministério da Saúde/ Instituto Nacional de Câncer, Viva Mulher. Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo Uterino, Rio de Janeiro, dezembro, 1996.
27. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM for the ALTS Group. Hybrid capture 2 viral load and the 2-year cumulative risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191:1590-7.
28. Wu Y, Chen Y, Li L, Yu G, Zhang Y, He Y. Associations of high risk HPV types and viral load with cervical cancer in China. *J Clin Virol.* 2006;35:264-9.
29. Santos ALF, Derchain SFM, Martins MR, Sarian LOZ, Martinez EZ, Syrjanen KJ. Human Papillomavirus viral load in predicting high grade CIN in women with cervical smears showing only atypical squamous cells or low-grade squamous intraepithelial lesion. *São Paulo Med J.* 2003;121:238-43.
30. Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, Carval KLB, Sautiere JL, Carbillet JP, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer.* 2003;106:396-403.
31. Badaracco G, Savarese A, Micheli A, Rizzo C, Paolini F, Carosi M, Cutillo G, Vizza E, Arcangeli G, Venuti A. Persistence of HPV after radio-chemotherapy in locally advanced cervical cancer. *Oncol Rep.* 2010 Apr;23(4):1093-9.
32. Venturoli S, Ambretti S, Cricca M, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Correlation of high-risk human papillomavirus genotypes persistence and risk of residual or recurrent cervical disease after surgical treatment. *J Med Virol.* 2008 Aug;80(8):1434-40.
33. Nagai Y, Toma T, Moromizato H, Maehama T, Asato T, Kariya K. Persistence of human papillomavirus infection as a predictor for recurrence in carcinoma of the cervix after radiotherapy. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 191: 1907-1913.

34. Song YJ, Kim JY, Lee SK, Lim HS, Lim MC, Seo SS, Kang S, Lee DO, Park SY. Persistent human papillomavirus DNA is associated with local recurrence after radiotherapy of uterine cervical cancer. *Int J Cancer*. 2010; 129(4):896-902.
35. Harima Y, Sawada S, Nagata K, Sougawa M, Ohnishi T. Human papilloma virus (HPV) DNA associated with prognosis of cervical cancer after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002 Apr 1;52(5):1345-51.
36. Rauber D, Mmehlhorn G, Fasching PA, Beckmann MW, Ackermann S. Prognostic significance of the detection of human papilloma virus L1 protein in smears of mild to moderate cervical intraepithelial lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008, 140(2):258–262.
37. Ministério da Saúde, 2001, Implantando o Viva Mulher - Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama, Rio de Janeiro - Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância.
38. Lorincz AT, Lancaster WD, Kumman RJ, et al. Characterization of human papillomaviruses in cervical neoplasia and their detection in routine clinical screening, in: Petro R, zur Hausen H, (eds): *Viral etiology of cervical cancer*. ColdSpring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory. 1986;225.
39. Zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*. 1991;184:9-13.
40. Coggin JR, Zur Hausen H. Workshop on papillomaviruses and cancer. *Cancer Res*. 1979;39:545-546.
41. Ministério da Saúde, 1997, Falando sobre câncer e seus fatores de risco. 2 ed., Rio de Janeiro, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação Nacional de Controle do Tabagismo e Prevenção Primária de Câncer.
42. William, J. (1888) *Cancer of the uterus: Harveian lectures for 1886*. HK Lewis, London.

43. Broders AC. Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium. *J. Am. Med. Assoc.* 1917; 99.
44. Reagan JW, Seidermann IL, Saracusa Y. The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix. *Cancer.* 1953 Mar;6(2):224-34.
45. Richart RM. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 1990 Jan;75(1):131-3.
46. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: developed and approved at the National Cancer Institute Workshop in Bethesda, Maryland, December 12-13, 1988. *Hum Pathol.* 1990 Jul;21(7):704-8.
47. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002 Apr 24;287(16):2114-9
48. Human papillomaviruses. IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC Working Group. 1995;65.
49. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Jun 7;87(11):796-802.
50. Schiffman MH, Brinton LA, Devesa SS, Fraumeni JF Jr. Cervical cancer. *Cancer epidemiology and prevention.* 1996; 1090-116.
51. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):12-9.

52. Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Mar 17;91(6):506-11.
53. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol.* 2002 Jan;3(1):11-6.
54. Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, DeRouen TA, Galloway DA, Vernon D, Kiviat NB. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med.* 1992 Oct 29;327(18):1272-8.
55. Ho, G.Y, Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C.J., & Burk, R.D. (1998) Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N. Engl. J. Med.*, 338, 423-428.
56. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 1998 Feb 12;338(7):423-8.
57. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, Miller S, Clayton L, Farhat S, Broering J, Darragh T, Palefsky J. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamousintraepithelial lesion development in young females. *JAMA.* 2001 Jun 20;285(23):2995-3002.
58. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA.* 2001 Dec 26;286(24):3106-14.
59. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, Yates M, Rollason TP, Young LS. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet.* 2001 Jun 9;357(9271):1831-6.

60. Herrero R, Schiffman MH, Bratti C, Hildesheim A, Balmaceda I, Sherman ME, Greenberg M, Cárdenas F, Gómez V, Helgesen K, Morales J, Hutchinson M, Mango L, Alfaro M, Potischman NW, Wacholder S, Swanson C, Brinton LA. Design and methods of a population-based natural history study of cervical neoplasia in a rural province of Costa Rica: the Guanacaste Project. *Rev Panam Salud Publica*. 1997 May;1(5):362-75.
61. Sellors JW, Mahony JB, Kaczorowski J, Lytwyn A, Bangura H, Chong S, Lorincz A, Dalby DM, Janjusevic V, Keller JL. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) Group. *CMAJ*. 2000 Sep 5;163(5):503-8.
62. Thomas GM. Concurrent chemotherapy and radiation for locally advanced cervical cancer: the new standard of care. *Semin Radiat Oncol*. 2000 Jan;10(1):44-50.
63. McIndoe WA, McLean MR, Jones RW, Mullins PR. The invasive potential of carcinoma in situ of the cervix. *Obstet Gynecol*. 1984 Oct;64(4):451-8.
64. Mitchell MF, Hittelman WN, Hong WK, Lotan R, Schottenfeld D. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia: an argument for intermediate endpoint biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994 Oct-Nov;3(7):619-26.
65. Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BK, Howell LP. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 1998 Oct;92(4 Pt 2):727-35.
66. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Feb 3;91(3):252-8.
67. Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*. 1993 Apr;12(2):186-92.

68. Kashimura M., Shinohara M., Oikawa K., Hamasaki K., Sato H. An adenocarcinoma in situ of the uterine cervix that developed into invasive adenocarcinoma after 5 years. *Gynecol. Oncol.*, 36: 128-133, 1990.
69. Jacob SE, Sreevidya S, Chacko E, Pillai MR. Cellular manifestations of human papillomavirus infection in laryngeal tissues. *J Surg Oncol.* 2002;79:142-50.
70. Kisseljov FL. Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papilloma viruses. *Biochemistry (Mosc).* 2000 Jan;65(1):68-77.
71. Santos OSN, Romanos VTM, Wigg DM. *Introdução à virologia humana.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
72. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer.* 2001;92(4):805-13.
73. Scully C. Oral squamous cell carcinoma: from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol.* 2002;38:227-34.
74. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Can Med Assoc J.* 2001;164(7):1017-25.
75. Neves D, Camara GNL, Alencar TR, da Cruz MR, Martins CRF, Carvalho LGS. Prevalence of human papillomavirus in penile carcinoma. *Braz J Urol.* 2002;28(3):221-6.
76. Rivoire AW, Capp E, Carleta EH, Silva BSI. Bases biomoleculares da oncogenese cervical. *Rev Bras Cancerol.* 2001;47(2):179-84.
77. Nelson LM, Rose RC, Moroianu J. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem.* 2002;277(26):23958-64.

78. Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 2003;22:5201-7.
79. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(9):690-8.
80. Rosenstierne MW, Vinther J, Hansen CN, Prydsoe M, Norrild B. Identification and characterization of a cluster of transcription start sites located in the E6 ORF of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*. 2003;84:2909-20.
81. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(1):1-17.
82. Lin BY, Makhov AM, Griffith JD, Broker TR, Chow LT. Chaperone proteins abrogate inhibition of the human papillomavirus (HPV) E1 replicative helicase by the HPV E2 protein. *Mol Cell Biol*. 2002;22(18):6592-604.
83. Lee D, Lee B, Kim J, Kim DW, Choe J. cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2 dependent transcription. *J Biol Chem*. 2000;275(10):7045-51.
84. Payne S, Kernohan NM, Walker F. Proliferation in the normal cervix and in preinvasive cervical lesions. *J Clin Pathol*. 1996 Aug;49(8):667-71.
85. Silva AMTC, Amaral MVT, da Cruz AD. O papel do papiloma vírus humano no câncer. *Biotechnol Ciênc Desenvol*. 2003;29:48-54.
86. Stubenrauch F, Laimins LA. Human Papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Cancer Biol*. 1999;9:379-86
87. Thomas TJ, Hubert WG, Ruesch MN, Laimins LA. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96:8449-54.

88. Villa LL. Aspectos moleculares da oncogênese por papilomavirus. In: Bibbo M, Silva Filho AM. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p. 51-8.
89. Bibbo M, Silva Filho AM. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. Rio de Janeiro: Revinter; 1998.
90. Alvarez IA, Lazo PS, Gonzales SR, Tapia PR, Batalla FN, Nieto CS. Using polymerase chain reaction to human papillomavirus in oral and pharyngolaryngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol.* 1997;18(6):375-81.
91. García-Carrancá A, Gariglio P. Aspectos moleculares de los papillomavirus humanos y su relación com el câncer cervicouterino. *Rev Invest Clín.* 1993;45:85-92.
92. Bosch FX, Rohan T, Schneider A, Frazer I, Pfister H, Castellsagué X, et al. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *J Clin Pathol.* 2001;54:163-75.
93. Benson JD, Howley P. Amino-terminal domains of the bovine papillomavirus tipe 1 E1 and E2 proteins participate in complex formation. *J Virol.* 1995;69(7):4364-72.
94. Bechtold V, Beard P, Raj K. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol.* 2003;77(3):2021-8.
95. Haie-Meder C, Morice P, Castiglione M; ESMO Guidelines Working Group. Cervical cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009;20 Suppl 4:27-8.
96. Thomas GM. Concurrent chemotherapy and radiation for locally advanced cervical cancer: the new standard of care. *Semin Radiat Oncol.* 2000 Jan;10(1):44-50.
97. Novaes PERS. Técnicas Internas; Capítulo 1. Câncer de colo uterino: Etiopatogenia, Diagnóstico e Estadiamento Clínico. Disponível em



[http://www.inca.gov.br/pqrt/publicacoes/tec\\_internas.asp](http://www.inca.gov.br/pqrt/publicacoes/tec_internas.asp). Acesso em 11 de Março de 2012.

98. Denton AS, Bond SJ, Matthews S, Bentzen SM, Maher EJ; UK Link Gynaecology-Oncology Group. National audit of the management and outcome of carcinoma of the cervix treated with radiotherapy in 1993. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2000;12(6):347-53.

99. Fagundes H, Perez CA, Grigsby PW, Lockett MA. Distant metastases after irradiation alone in carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992;24(2):197-204.

100. Burghardt E, Baltzer J, Tulusan AH, Haas J. Results of surgical treatment of 1028 cervical cancers studied with volumetry. *Cancer*. 1992 Aug 1;70(3):648-55.

101. Delgado G, Bundy B, Zaino R, Sevin BU, Creasman WT, Major F. Prospective surgical-pathological study of disease-free interval in patients with stage IB squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 1990 Sep;38(3):352-7.

102. Arbeit JM, Howley PM, Hanahan D. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:2930-2935.

103. Michelin D, Gissmann L, Street D, et al. Regulation of human papillomavirus type 18 in vivo: Effects of estrogen and progesterone in transgenic mice. *Gynecol Oncol* 1997; 66:202-208.

104. World Health Organization (WHO). Manual on the Prevention and Control of Common Cancers. WHO Regional publications - Westerns Pacific Series n<sup>o</sup> 20, 1998.

105. Acha A, Ruesga MT, Rodríguez MJ, Martínez de Pancorbo MA, Aguirre JM. Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005 Mar-Apr;10(2):95-102.
106. Gompel C, Koss, LG. *Citología ginecológica e suas bases anatomoclínicas*. Editora Manole Ltda, 1997.
107. Davey DD, Zarbo RJ. Introduction and commentary, strategic science symposium. Human Papillomavirus testing - Are you ready for a new era in cervical cancer screening? *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127:927-929.
108. Hutchinson ML, Cassin CM, Ball HG 3rd. The efficacy of an automated preparation device for cervical cytology. *Am J Clin Pathol*. 1991 Sep;96(3):300-5.
109. Syrjänen K, Derchain S, Roteli-Martins C, Longatto-Filho A, Hammes LS, Sarian L; Latin American Screening Study Group. Value of conventional pap smear, liquid-based cytology, visual inspection and human papillomavirus testing as optional screening tools among latin american women <35 and > or =35 years of age: experience from the Latin American Screening Study. *Acta Cytol*. 2008 Nov-Dec;52(6):641-53.
110. Herbert A, Johnson J. Is it reality or an illusion that liquid-based cytology is better than conventional cervical smears? Authors' reply. *Cytopathology*. 2002 Apr;13(2):133.
111. Bibbo M, Klump W, DeCecco J, Kovatich A. Procedure for immunocytochemical detection of P16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol*. 2001;46:25-29.
112. Bibbo M, DeCecco J, Kovatich A. P16INK4A as an adjunct test in liquid-based cytology. *Anal Quant Cytol Histol*. 2003;25(1):8-11.

113. Keyhani-Rofagha S, Vesey-Shecket M. Diagnostic value, feasibility, and validity of preparing cell blocks from fluid-based gynecologic cytology specimens. *Cancer*. 2002 Aug 25;96(4):204-9.
114. Liaw KL, Glass AG, Manos MM, Greer CE, Scott DR, Sherman M, et al. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Jun 2;91(11):954-60.
115. De Palo G, Chanen W, Dexeus S. *Patologia e tratamento do trato genital inferior*. Rio de Janeiro: Medsi, 2002; p.44.
116. Goodman A. Screening for human papillomavirus infections of the lower genital tract. *Rev Gynaec Pract*, Paris, 2002; 2:99-101.
117. Molina AL, Tobo PR. Série - Biologia molecular. Atualização. Parte 2 - Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. Einstein, São Paulo, 2004; 2,2:140-42.
118. Guindalinic TS. Uso de microarrays na busca de perfis de expressão gênica: aplicação no estudo de fenótipos complexos. *Rev.Bras. Psiquiatria* 2007, vol 29 (4), p. 370-374.
119. PAPILOCHECK®: Test Kit for the genotyping of 24 types of genital HPV: Manual. Version BQ-013-04, 2008.
120. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Malamou-Mitsi V, Paraskevidis E. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2009 May;35(3):210-20.
121. G Negri, G Moretto, E Menia, F Vittadello, A Kasal, C Mian, E Egarter-Vigl Immunocytochemistry of p16INK4a in liquid-based cervicovaginal specimens with modified Papanicolaou counterstaining. *J Clin Pathol* 2006;59:827–830.

122. Ungureanu C, Socolov D, Anton G, Mihailovici MS, Teleman S. Immunocytochemical expression of p16INK4a and HPV L1 capsid proteins as predictive markers of the cervical lesions progression risk. *Rom J Morphol Embryol.* 2010;51(3):497-503.
123. Jeon JH, Shin DM, Cho SY, Song KY, Park NH, Kang HS, Kim YD, Kim IG. Immunocytochemical detection of HPV16 E7 in cervical smear. *Exp Mol Med.* 2007 Oct 31;39(5):621-8.
124. Soma M, Kamaraj S. Detection of Human Papillomavirus in Cervical Gradings by Immunohistochemistry and Typing of HPV 16 and 18 in High-Grades by Polymerase Chain Reaction. *J Lab Physicians.* 2010 Jan;2(1):31-6.
125. De May RM, *The Art And Science of Cytophatology*, vol. I. Exfoliative cytology. Chicago ASCP Press, 1996.
126. Shrout P. Measurement reliability and agreement in psychiatry. *Statistical Methods in Medical Research* 1998;7:301-317.
127. Lilic G, Filipovic S, Milosevic J, Tasic M, Stojiljkovic M. Modern treatment of invasive carcinoma of the uterine cervix. *J BUON.* 2009 Oct-Dec;14(4):587-92.
128. Zannoni GF, Vellone VG. Accuracy of Papanicolaou smears in cervical cancer patients treated with radiochemotherapy followed by radical surgery. *Am J Clin Pathol.* 2008 Nov;130(5):787-94.
129. Zannoni GF, Vellone VG, Carbone A. Morphological effects of radiochemotherapy on cervical carcinoma: a morphological study of 50 cases of hysterectomy specimens after neoadjuvant treatment. *Int J Gynecol Pathol.* 2008 Apr;27(2):274-81.
130. Bonita R, Beaglehole R, Kjellström, T. *Epidemiologia Básica*. 2ª edição. São Paulo: Editora Santos; 2010.

131. [http://www.anvisa.gov.br/institucional/snvs/coprh/cursos/met\\_epid.pdf](http://www.anvisa.gov.br/institucional/snvs/coprh/cursos/met_epid.pdf). Acesso em 13 de janeiro de 2012.
132. Injumba N, Suprasert P, Srisomboon J, Nimmanahaeminda K, Phongnarisorn C, Siriaree S, Charoenkwan K, Cheewakriangkrai C, Kietpeerakool C. Limited value of vaginal cytology in detecting recurrent disease after radical hysterectomy for early stage cervical carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2006 Oct-Dec;7(4):656-8.
133. Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kritpetcharat O, Swadpanich U, Pengsa P, Yuenyao P. Immunocytochemical staining of p16INK4a protein from conventional Pap test and its association with human papillomavirus infection. *Diagn Cytopathol*. 2004 Oct;31(4):235-42.
134. Negri G, Moretto G, Menia E, Vittadello F, Kasal A, Mian C, Egarter-Vigl E. Immunocytochemistry of p16INK4a in liquid-based cervicovaginal specimens with modified Papanicolaou counterstaining. *J Clin Pathol*. 2006 Aug;59(8):827-30.
135. Beerman H, van Dorst EB, Kuenen-Boumeester V, Hogendoorn PC. Superior performance of liquid-based versus conventional cytology in a population-based cervical cancer screening program. *Gynecol Oncol*. 2009 Mar;112(3):572-6.
136. Schledermann D, Ejersbo D, Hoelund B. Improvement of diagnostic accuracy and screening conditions with liquid-based cytology. *Diagn Cytopathol*. 2006 Nov;34(11):780-5.
137. Davey E, Barratt A, Irwig L, Chan SF, Macaskill P, Mannes P, Saville AM. Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet*. 2006 Jan 14;367(9505):122-32.
138. Yoshida T, Fukuda T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Nakajima T. Usefulness of liquid-based cytology specimens for the immunocytochemical study of p16 expression and human papillomavirus testing: a comparative study using simultaneously sampled histology materials. *Cancer*. 2004 Apr 25;102(2):100-8.

139. Holladay EB, Logan S, Arnold J, Knesel B, Smith GD. A comparison of the clinical utility of p16(INK4a) immunolocalization with the presence of human papillomavirus by hybrid capture 2 for the detection of cervical dysplasia/neoplasia. *Cancer*. 2006 Dec 25;108(6):451-61.
140. Nassar A, O'Reilly K, Cohen C, Siddiqui MT. Comparison of p16INK4A and Hybrid Capture 2 human papillomavirus testing as adjunctive tests in liquid-based gynecologic SurePath preparations. *Diagn Cytopathol*. 2008 Mar;36(3):142-8.
141. Baleriola C, Millar D, Melki J, Coulston N, Altman P, Rismanto N, Rawlinson W. Comparison of a novel HPV test with the Hybrid Capture II (hcII) and a reference PCR method shows high specificity and positive predictive value for 13 high-risk human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2008 May;42(1):22-6.
142. Nagai Y, Toma T, Moromizato H, Maehama T, Asato T, Kariya K, Kanazawa K. Persistence of human papillomavirus infection as a predictor for recurrence in carcinoma of the cervix after radiotherapy. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Dec;191(6):1907-13.
143. Barzon L, et al. Vaginal dysplastic lesions in women with hysterectomy and receiving radiotherapy are linked to high-risk human papillomavirus. *J Med Virol* 2002;67(3):401-5.
144. Tase T, Okagaki T, Clark BA, et al. Human Papillomavirus types and localization in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix: a study by in situ DNA hybridization. *Cancer Res* 1988;48:993-998.
145. Pecorelli S, Odicino F. Cervical cancer staging. *Cancer J*. 2003 Sep-Oct;9(5):390-4.
146. Murta EFC, Franca HG, Carneiro MC, et al. Câncer do Colo Uterino: Correlação com o início da atividade sexual e paridade. *RBGO* - v. 21, nº 9, 1999.

147. Janicek, MF, Averette HE. Cervical Cancer: Prevention, Diagnosis, and Therapeutics. *CA Cancer J Clin* 2001;51:92-114.
148. Bezerra SJS, Gonçalves PC, Franco ES, Pinheiro AKB. Perfil de mulheres portadoras de lesões cervicais por HPV quanto aos fatores de risco para câncer de colo uterino. *DST – J bras Doenças Sex Transm* 17(2): 143-148, 2005.
149. Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;(31):20-8.
150. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/1-10.
151. Madeleine MM, Daling JR, Schwartz SM, et al. Human papillomavirus and long-term oral contraceptive use increase the risk of adenocarcinoma in situ of the cervix. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Mar;10(3):171-7.
152. Shields TS, Brinton LA, Burk RD, et al. A case-control study of risk factors for invasive cervical cancer among U.S. women exposed to oncogenic types of human papillomavirus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Oct;13(10):1574-82.
153. Giulian AR, Sedjo RL, Roe DJ, et al. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). *Cancer Causes Control* 2002;13:839–46.
154. Chien CR, Ting LL, Hsieh CY, Lai MS. Post-radiation Pap smear for Chinese patients with cervical cancer: a ten-year follow-up. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2005;26(6):619-22.
155. Chhieng DC, Talley LI, Roberson J, Gatscha RM, Jhala NC, Elgert PA. Interobserver variability: comparison between liquid-based and conventional preparations in gynecologic cytology. *Cancer.* 2002 Apr 25;96(2):67-73.

156. Murad TM, August CD. *Diagn Cytopathol*. Radiation-induced atypia. A review 1985 Apr-Jun;1(2):137-52.
157. Gupta S, Mukherjee K, Gupta YN, Kumar M. Sequential radiation changes in cytology of vaginal smears in carcinoma of cervix uteri during radiotherapy. *Int J Gynaecol Obstet*. 1987 Aug;25(4):303-8.
158. Shield PW, Daunter B, Wright RG. Post-irradiation cytology of cervical cancer patients. *Cytopathology*. 1992;3(3):167-82.
159. Rashed MM, Bekele A. The prevalence and pattern of HPV-16 immunostaining in uterine cervical carcinomas in Ethiopian women: a pilot study. *Pan Afr Med J*. 2011;8:21.
160. Melsheimer P, Kaul S, Dobeck S, Bastert G. Immunocytochemical detection of HPV high-risk type L1 capsid proteins in LSIL and HSIL as compared with detection of HPV L1 DNA. *Acta Cytol*, 2003, 47(2):124–128.
161. Griesser H, Sander H, Walczak C, Hilfrich R. Immunocytochemical detection of HPV-L1 capsid: a prognostic marker for early squamous lesions of the cervix. *Acta Cytologica*, 2007, 51(2 Suppl):268.
162. Rauber D, Mehlhorn G, Fasching PA, Beckmann MW, Ackermann S. Prognostic significance of the detection of human papilloma virus L1 protein in smears of mild to moderate cervical intraepithelial lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2008, 140(2):258–262.
163. Huang MZ, Li HB, Nie XM, Wu XY, Jiang XM. An analysis on the combination expression of HPV L1 capsid protein and p16INK4a in cervical lesions. *Diagn Cytopathol*. 2010 Aug;38(8):573-8.
164. Choi YS, Kang WD, Kim SM, Choi YD, Nam JH, Park CS, Choi HS. Human papillomavirus L1 capsid protein and human papillomavirus type 16 as prognostic



markers in cervical intraepithelial neoplasia 1. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 Feb;20(2):288-93.

165. Hoshikawa S, Sano T, Yoshida T, Ito H, Oyama T, Fukuda T. Immunohistological analysis of HPV L1 capsid protein and p16 protein in low-grade dysplastic lesions of the uterine cervix. *Pathol Res Pract*. 2010 Dec 15;206(12):816-20.

166. Sarmadi S, Izadi-Mood N, Pournashkari M, Yarandi F, Sanii S. HPV L1 capsid protein expression in squamous intraepithelial lesions of cervix uteri and its relevance to disease outcome. *Arch Gynecol Obstet*. 2011 Jul 26.

167. Carestiato FN, Silva KC, Dimetz T, Oliveira LH, Cavalcanti SM. Prevalence of human papillomavirus infection in the genital tract determined by hybrid capture assay. *Braz J Infect Dis*. 2006 Oct;10(5):331-6.

168. Giorgi Rossi P, Bisanzi S, Paganini I, Di Iasi A, Angeloni C, Scalisi A, Macis R, Pini MT, Chini F, Carozzi FM; HPV Prevalence Italian Working Group. Prevalence of HPV high and low risk types in cervical samples from the Italian general population: a population based study. *BMC Infect Dis*. 2010 Jul 20;10:214.

169. Chen HC, Schiffman M, Lin CY, Pan MH, You SL, Chuang LC, Hsieh CY, Liaw KL, Hsing AW, Chen CJ; CBCSP-HPV Study Group. Persistence of type-specific human papillomavirus infection and increased long-term risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Sep 21;103(18):1387-96.

170. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003 Jan 13;88(1):63-73.

171. Kanduc D. Potential cross-reactivity between HPV16 L1 protein and sudden death-associated antigens. *J Exp Ther Oncol*. 2011;9(2):159-65.

### 9.1 APÊNDICE A- DOCUMENTO DE INCLUSÃO

**Aplicação de imunocitoquímica e de tipagem do HPV no seguimento de pacientes pós-tratamento de câncer de colo uterino – comparação de diferentes estratégias para a detecção precoce da recorrência da doença.**

Registro: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ DN: \_\_/\_\_/\_\_

Sexarca: \_\_\_\_\_ anos DST no Passado : não( ) sim ( ) Qual \_\_\_\_\_

Gesta: \_\_\_\_\_/Parto: \_\_\_\_\_ Aborto: \_\_\_\_\_/Cesariana: \_\_\_\_\_

Menopausada Não( ) sim ( ) Terapia de reposição hormonal? \_\_\_\_\_

Método contraceptivo atual: \_\_\_\_\_ Escolaridade: \_\_\_\_\_

Número de parceiros sexuais na vida: \_\_\_\_\_ nos últimos 12 meses: \_\_\_\_\_

Tabagismo não( ) sim( ) quantos/dia \_\_\_\_\_

Etilismo não( ) sim( ) quantos/dia \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_ em \_\_/\_\_/\_\_

Estadiamento: \_\_\_\_\_

Cirurgia não( ) sim( ) Qual? \_\_\_\_\_

Radioterapia Externa não( ) sim( ) Duração \_\_\_\_\_ Término \_\_\_\_\_

Braquiterapia não( ) sim( ) Duração \_\_\_\_\_ Término \_\_\_\_\_

Quimioterapia não( ) sim( ) Duração \_\_\_\_\_ Término \_\_\_\_\_

Tem Biópsia não( ) sim( ) Número: B- \_\_\_\_\_

Coleta do citopatológico em \_\_/\_\_/\_\_

Lâmina de citopatológico Papanicolaou número \_\_\_\_\_

Diagnóstico \_\_\_\_\_

Lâmina da CBL número \_\_\_\_\_

Diagnóstico \_\_\_\_\_

Lâmina de citopatológico ICQ número \_\_\_\_\_

Diagnóstico \_\_\_\_\_

Captura Híbrida para HPV de alto risco \_\_\_\_\_

## 9.2 APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Aplicação de imunocitoquímica e de tipagem do HPV no seguimento de pacientes pós-tratamento de câncer de colo uterino – comparação de diferentes estratégias para a detecção precoce da recorrência da doença.

Objetivo do Estudo: Avaliar a viabilidade do emprego das técnicas de imunocitoquímica e tipagem do HPV no seguimento dos pacientes com Câncer de colo uterino.

Investigador: Dra. Ana Emília Borges de Azevedo – Médica Patologista do Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB), CRM 15.081-DF.

Orientador: Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães.

Você está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa de nome: Aplicação de imunocitoquímica e de tipagem do HPV no seguimento de pacientes pós-tratamento de câncer de colo uterino – comparação de diferentes estratégias para a detecção precoce da recorrência da doença.

Se você decidir participar deste estudo, o primeiro passo será uma entrevista privada com um profissional da saúde que explicará o estudo detalhadamente. Após esta entrevista, será realizada colheita de material para exame citopatológico, que já faz parte do protocolo de prevenção e seguimento do câncer de colo uterino. Este consiste de coleta do exame “preventivo” de forma tradicional que envolve uma “raspagem” do colo do útero, utilizando espátula de madeira (espátula de Ayre) e escova individuais e descartáveis. Para tanto, será utilizado espéculo vaginal. Será coletada uma amostra a mais (extra) para a realização de exames adicionais (imunocitoquímica e biologia molecular) normalmente não feitos nas pacientes e que seriam mais sensíveis na detecção precoce do câncer de colo uterino, de acordo com trabalhos realizados em outros hospitais.

O exame será feito no ambulatório de ginecologia do HUB por médicos ginecologistas deste ambulatório. No procedimento poderá haver desconforto momentâneo pelo uso do espelho vaginal. A coleta do citopatológico (“preventivo”) poderá ocasionar sangramento no local da “raspagem”, geralmente de pequena monta. Suas fichas clínicas e que seus dados serão utilizados para estudo e aprendizado, atividades e publicações científicas, tanto no país como no exterior, respeitada toda legislação vigente em relação ao assunto. Você não receberá nenhum tipo de pagamento por concordar em participar do estudo e nem terá custos monetários em decorrência de sua decisão.

Você também receberá orientação a respeito de quaisquer anormalidades que possam vir a ser reveladas pelos resultados dos exames e, se for preciso, você receberá as informações de contato necessárias para tratamento adicional. Você pode fazer perguntas sobre o estudo. Apesar de apreciarmos o seu apoio contínuo, você tem direito de retirar-se do estudo quando quiser e não estará obrigada a ser submetida a exame do colo de útero com coleta de amostras. Se você tiver alguma pergunta, por favor entre em contato com: Dra. Ana Emília Borges de Azevedo, telefone (61)34485499 e com o comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, telefone (61)33073799.

A sua participação é voluntária. Seu nome não será mencionado nos informes do estudo. Todos os dados dessa pesquisa serão confidenciais, bem como o seguimento de sua doença cervical (colo uterino), se presente, não sofrerá alteração pela inclusão ou exclusão no grupo estudo ou grupo controle.

Eu, \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_ por este meio e de livre e espontânea vontade, dou o meu consentimento para participar deste estudo.

Brasília, \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

-----  
(assinatura do paciente ou responsável)

---

assinatura de médico assistente

## 9.3 APÊNDICE C - TABELA DOS ACHADOS MORFOLÓGICOS CITOLOGIA CONVENCIONAL

AMOSTRA	INFLAMAÇÃO					RADIOTERAPIA								NEOPLASIA					DIAGNÓSTICOS
	EL	Hist	CGM	Rep	Hem	MAC	ICN	BMN	VAC	IN	HP	Irreg	Polic	N/C	IMN	HC	CG	DQ	
1	1+		X	X															NEGATIVO
2	1+		X		X			X	X	X				X	X	X			ASC-H
3	3+		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			ASC-H
4	1+					X		X	X	X				X		X			ASC-US
5	3+		X	X		X		X	X	X						X			ASC-US
6	2+			X	X				X										NEGATIVO
7	1+		X	X	X	X		X											NEGATIVO
8	1+			X					X										NEGATIVO
9	2+			X															NEGATIVO
10	3+			X		X			X										NEGATIVO
11					X														INSATISFATORIO
12	1+																		NEGATIVO
15	2+		X	X	X	X		X	X	X									NEGATIVO
16	3+			X	X				X										NEGATIVO
17	1+				X								X	X	X				ASC-H
18	1+			X		X		X	X										NEGATIVO
19	2+		X	X	X				X										NEGATIVO
20	2+		X	X							X			X	X	X	X		HSIL
21	2+		X	X	X	X			X		X			X	X	X			ASC-H
22	3+		X	X	X	X		X	X	X		X		X	X	X			ASC-H
23	3+			X															INSATISFATORIO
24	2+		X		X	X		X					X	X		X			ASC-US

EL – exsudato leucocitário; Hist – histiócitos; CGM – células gigantes multinucleadas; Rep – reparo; Hem – hemorragia; INC – inclusão nuclear; BMN – bi/multinucleação; VAC – vacuolização citoplasmática; IN – ingestão de neutrófilos; HP – halo perinuclear; Irreg – irregularidade de forma celular; Polic – policromasia; N/C – aumento da relação núcleo/citoplasma; IMN – irregularidade da membrana nuclear; HC - hiperchromasia nuclear; CG – cromatina grosseira; DQ – densa queratinização

(continua)

(continuação)

AMOSTRA	INFLAMAÇÃO					RADIOTERAPIA								NEOPLASIA					DIAGNÓSTICOS
	EL	Hist	CGM	Rep	Hem	MAC	ICN	BMN	VAC	IN	HP	Irreg	Polic	N/C	IMN	HC	CG	DQ	
25	1+			X	X	X			X	X				X					NEGATIVO
26	3+		X	X		X		X	X	X			X						NEGATIVO
29	3+		X	X		X		X	X										NEGATIVO
30	1+			X		X				X				X	X	X	X	X	CEC
31	2+		X	X	X	X			X					X	X	X		X	ASC-H
32	2+		X	X		X			X	X		X							NEGATIVO
33	3+		X	X		X		X				X		X	X	X	X	X	CEC
34	1+																		NEGATIVO
36	1+		X					X	X										NEGATIVO
37	1+					X			X	X	X	X		X	X	X			ASC-H
38	1+		X	X		X		X	X	X	X	X	X						NEGATIVO
39	2+				X														INSATISFATORIO
40	1+		X	X	X					X									NEGATIVO
41	2+		X	X		X	X							X	X				ASC-US
42	1+		X						X										NEGATIVO
44	2+		X	X	X	X			X				X						NEGATIVO
45	3+				X									X	X	X	X	X	CEC
46	1+				X		X	X											NEGATIVO
47				X	X			X						X		X	X		ASC-H
48	3+													X	X	X	X	X	CEC
49	2+		X	X	X				X										NEGATIVO
50	2+				X				X										NEGATIVO

EL – exsudato leucocitário; Hist – histiócitos; CGM – células gigantes multinucleadas; Rep – reparo; Hem – hemorragia; INC – inclusão nuclear; BMN – bi/multinucleação; VAC – vacuolização citoplasmática; IN – ingestão de neutrófilos; HP – halo perinuclear; Irreg – irregularidade de forma celular; Polic – policromasia; N/C – aumento da relação núcleo/citoplasma; IMN – irregularidade da membrana nuclear; HC - hiperchromasia nuclear; CG – cromatina grosseira; DQ – densa queratinização

(continua)

(continuação)

AMOSTRA	INFLAMAÇÃO					RADIOTERAPIA								NEOPLASIA				DIAGNÓSTICOS	
	EL	Hist	CGM	Rep	Hem	MAC	ICN	BMN	VAC	IN	HP	Irreg	Polic	N/C	IMN	HC	CG		DQ
51	2+		X	X	X	X													NEGATIVO
52				X				X											NEGATIVO
53	1+		X	X					X	X									NEGATIVO
54	2+			X	X														NEGATIVO
55	1+			X				X					X						NEGATIVO
56	2+			X	X			X	X	X			X						NEGATIVO
57	1+	X		X		X			X				X						NEGATIVO
58	1+			X					X	X									NEGATIVO

EL – exsudato leucocitário; Hist – histiócitos; CGM – células gigantes multinucleadas; Rep – reparo; Hem – hemorragia; INC – inclusão nuclear; BMN – bi/multinucleação; VAC – vacuolização citoplasmática; IN – ingestão de neutrófilos; HP – halo perinuclear; Irreg – irregularidade de forma celular; Polic – policromasia; N/C – aumento da relação núcleo/citoplasma; IMN – irregularidade da membrana nuclear; HC - hiperchromasia nuclear; CG – cromatina grosseira; DQ – densa queratinização

(conclusão)

## 9.4 APÊNDICE D - TABELA DOS ACHADOS MORFOLÓGICOS CITOLOGIA EM BASE LÍQUIDA – CBL

AMOSTRA	INFLAMAÇÃO					RADIOTERAPIA								NEOPLASIA					DIAGNÓSTICOS
	EL	Hist	CGM	Rep	Hem	MAC	ICN	BMN	VAC	IN	HP	Irreg	Polic	N/C	IMN	HC	CG	DQ	
1	1+		X	X															NEGATIVO
2	2+		X					X	X	X				X		X			ASC-US
3	2+		X	X	X	X		X	X	X				X	X	X			ASC-H
4	1+		X		X				X	X				X		X			ASC-US
5	2+			X					X	X			X						NEGATIVO
6	2+				X														INSATISFATÓRIO
7	1+		X	X	X	X													NEGATIVO
8	1+			X				X	X	X									NEGATIVO
9	1+			X		X		X											NEGATIVO
10	3+			X															INSATISFATÓRIO
11					X														INSATISFATORIO
12	1+			X															NEGATIVO
15	2+			X						X				X		X			ASC-US
16					X									X		X			AGUS
17	3+				X														NEGATIVO
18	1+			X		X		X	X										NEGATIVO
19	3+		X	X									X						NEGATIVO
20	2+							X			X			X	X	X			LSIL
21	2+													X	X	X	X		HSIL
22	3+		X						X					X	X	X	X		ASC-H
23	3+																		INSATISFATORIO
24	1+				X	X			X	X				X		X			ASC-US

EL – exsudato leucocitário; Hist – histiócitos; CGM – células gigantes multinucleadas; Rep – reparo; Hem – hemorragia; INC – inclusão nuclear; BMN – bi/multinucleação; VAC – vacuolização citoplasmática; IN – ingestão de neutrófilos; HP – halo perinuclear; Irreg – irregularidade de forma celular; Polic – policromasia; N/C – aumento da relação núcleo/citoplasma; IMN – irregularidade da membrana nuclear; HC - hiperchromasia nuclear; CG – cromatina grosseira; DQ – densa queratinização

(continua)

(continuação)

AMOSTRA	INFLAMAÇÃO					RADIOTERAPIA								NEOPLASIA					DIAGNÓSTICOS
	EL	Hist	CGM	Rep	Hem	MAC	ICN	BMN	VAC	IN	HP	Irreg	Polic	N/C	IMN	HC	CG	DQ	
25	1+			X			X	X	X										NEGATIVO
26	2+		X						X				X						NEGATIVO
29	3+			X	X														NEGATIVO
30	1+			X		X								X		X			ASC-US
31	1+					X		X	X					X	X	X			ASC-H
32	1+			X		X			X	X		X							NEGATIVO
33	3+		X						X	X				X	X	X	X	X	CEC
34	1+																		NEGATIVO
36	1+		X					X	X										NEGATIVO
37	1+			X					X	X	X	X		X	X	X			ASC-H
38	1+		X	X															NEGATIVO
39					X														INSATISFATORIO
40	1+																		INSATISFATORIO
41	2+		X	X				X						X	X				ASC-US
42	1+		X						X										NEGATIVO
44	2+		X	X	X	X			X				X						NEGATIVO
45	3+					X								X	X	X		X	CEC
46	1+				X		X	X											NEGATIVO
47														X	X	X			ASC-H
48	3+													X	X	X	X	X	CEC
49	2+		X	X					X										NEGATIVO
50	1+			X					X	X									NEGATIVO

EL – exsudato leucocitário; Hist – histiócitos; CGM – células gigantes multinucleadas; Rep – reparo; Hem – hemorragia; INC – inclusão nuclear; BMN – bi/multinucleação; VAC – vacuolização citoplasmática; IN – ingestão de neutrófilos; HP – halo perinuclear; Irreg – irregularidade de forma celular; Polic – policromasia; N/C – aumento da relação núcleo/citoplasma; IMN – irregularidade da membrana nuclear; HC - hiperchromasia nuclear; CG – cromatina grosseira; DQ – densa queratinização

(continua)



(continuação)

AMOSTRA	INFLAMAÇÃO					RADIOTERAPIA								NEOPLASIA				DIAGNÓSTICOS	
	EL	Hist	CGM	Rep	Hem	MAC	ICN	BMN	VAC	IN	HP	Irreg	Polic	N/C	IMN	HC	CG		DQ
51																			INSATISFATÓRIO
52	2+		X											X					NEGATIVO
53	2+		X	X															NEGATIVO
54	2+			X															NEGATIVO
55	1+			X				X								X			NEGATIVO
56	3+			X		X													NEGATIVO
57				X															NEGATIVO
58	1+			X						X									NEGATIVO

EL – exsudato leucocitário; Hist – histiócitos; CGM – células gigantes multinucleadas; Rep – reparo; Hem – hemorragia; INC – inclusão nuclear; BMN – bi/multinucleação; VAC – vacuolização citoplasmática; IN – ingestão de neutrófilos; HP – halo perinuclear; Irreg – irregularidade de forma celular; Polic – policromasia; N/C – aumento da relação núcleo/citoplasma; IMN – irregularidade da membrana nuclear; HC - hiper Cromasia nuclear; CG – cromatina grosseira; DQ – densa queratinização

(conclusão)

## 9.5 APÊNDICE E - TABELA GERAL

CASO	TRATAMENTO	ESTÁDIO	DIAGNOSTICO	INSAT	NEG	ASC-US	AGUS	ASC-H	LSIL	HSIL	CEC	CAPTURA HÍBRIDA	IMUNOCITOQUÍMICA
1	CR	IB2	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/CO = 0,50	NEGATIVO
2	RQ	IIB	CEC			CBL		CC				NEGATIVO RLU/CO = 0,42	NEGATIVO
3	R	IIB	CEC					CC,CBL				POSITIVO URL/CO 1,08	POSITIVO
4	RQ	IIB	CEC			CC, CBL						NEGATIVO RLU/CO = 0,26	POSITIVO
5	RQ	IIB	CEC		CBL	CC						NEGATIVO RLU/CO = 0,26	POSITIVO
6	R	IIIB	CEC	CBL	CC							NEGATIVO RLU/CO = 0,29	
7	RQ	IIB	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/PC = 0,26	POSITIVO
8	CRQ	IB	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/CO = 0,38	NEGATIVO
9	RQ	IIB	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/CO = 0,27	POSITIVO
10	RQ	IIIB	CEC	CBL	CC							NEGATIVO RLU/CO = 0,29	
11	RQ	IIB	CEC	CC, CBL								NEGATIVO RLU/CO = 0,91	
12	CR	IB1	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/CO = 0,29	POSITIVO
15	RQ	IIB	CEC		CC	CBL						POSITIVO RLU/CO = 33,98	POSITIVO
16	RQ	IIIB	ADENO		CC		CBL					POSITIVO RLU/CO = 3,11	

C – cirurgia; R – radioterapia; Q – quimioterapia; CC – citologia convencional; CBL – citologia em base líquida; CEC- carcinoma de células escamosas; ADENO – adenocarcinoma, INSAT – insatisfatório; NEG – negativo

(continua)

(continuação)

CASO	TRATAMENTO	ESTÁDIO	DIAGNOSTICO	INSAT	NEG	ASC-US	AGUS	ASC-H	LSIL	HSIL	CEC	CAPTURA HÍBRIDA	IMUNOCITOQUÍMICA
17	CRQ	IIIB	CEC		CBL			CC				POSITIVO RLU/CO = 1,71	POSITIVO
18	CR	IB1	ADENO		CC, CBL							POSITIVO RLU/CO = 1,18	
19	RQ	IIIB	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/CO = 0,97	POSITIVO
20	CRQ	IIIA	CEC						CBL	CC		POSITIVO RLU/CO = 2120,03	POSITIVO
21	RQ	IIIB	CEC					CC		CBL		POSITIVO RLU/CO = 1,04	POSITIVO
22	RQ	IIIB	CEC					CC, CBL				NEGATIVO RLU/CO = 0,95	POSITIVO
23	RQ	IIB	CEC		CC, CBL							POSITIVO RLU/CO = 1,21	
24	RQ	IIB	CEC				CC, CBL					POSITIVO RLU/CO = 56,51	POSITIVO
25	CRQ	IIIB	CEC		CC, CBL							POSITIVO RLU/CO = 1,09	NEGATIVO
26	CRQ	IIB	CEC		CC, CBL							POSITIVO RLU/CO = 2,99	POSITIVO
29	RQ	IB2	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/CO = 0,88	POSITIVO
30	CRQ	IIIB	CEC			CBL					CC	POSITIVO RLU/CO = 67,09	POSITIVO
31	RQ	IIIB	CEC					CBL, CC				NEGATIVO RLU/CO = 0,65	NEGATIVO
32	RQ	IVA	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/CO = 0,51	POSITIVO

C – cirurgia; R – radioterapia; Q – quimioterapia; CC – citologia convencional; CBL – citologia em base líquida; CEC- carcinoma de células escamosas; ADENO – adenocarcinoma, INSAT – insatisfatório; NEG – negativo

(continua)

(continuação)

CASO	TRATAMENTO	ESTÁDIO	DIAGNOSTICO	INSAT	NEG	ASC-US	AGUS	ASC-H	LSIL	HSIL	CEC	CAPTURA HÍBRIDA	IMUNOCITOQUÍMICA
33	CR	IIB	CEC								CC, CBL	POSITIVO RLU/CO = 3,32	POSITIVO
34	RQ	IIIB	CEC		CC, CBL							POSITIVO RLU/CO = 1,42	NEGATIVO
36	RQ	IIIB	CEC		CC, CBL							POSITIVO RLU/CO = 1,07	NEGATIVO
37	CR	IB	CEC					CC, CBL				POSITIVO RLU/CO = 1,39	POSITIVO
38	CR	IB2	CEC		CC, CBL							POSITIVO RLU/CO = 1,06	POSITIVO
39	R	IIIB	CEC	CC, CBL								NEGATIVO RLU/CO = 0,83	
40	R	IIIB	CEC	CBL	CC							POSITIVO RLU/CO = 2,09	NEGATIVO
41	RQ	IIB	CEC			CC, CBL						POSITIVO RLU/CO = 22,83	POSITIVO
42	RQ	IIB	CEC		CC, CBL							POSITIVO RLU/CO = 1,28	POSITIVO
44	RQ	IIIB	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/CO = 0,93	NEGATIVO
45	RQ	IIIB	CEC								CC, CBL	POSITIVO RLU/CO = 1,72	NEGATIVO
46	R	IIIB	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/CO = 0,79	POSITIVO
47	RQ	IIIB	CEC					CC, CBL				POSITIVO RLU/CO = 1,00	NEGATIVO
48	CR	IB	CEC								CC, CBL	POSITIVO RLU/CO = 1897,80	NEGATIVO

C – cirurgia; R – radioterapia; Q – quimioterapia; CC – citologia convencional; CBL – citologia em base líquida; CEC- carcinoma de células escamosas; ADENO – adenocarcinoma, INSAT – insatisfatório; NEG - negativo

(continua)

(continuação)

CASO	TRATAMENTO	ESTÁDIO	DIAGNOSTICO	INSAT	NEG	ASC-US	AGUS	ASC-H	LSIL	HSIL	CEC	CAPTURA HÍBRIDA	IMUNOCITOQUÍMICA
49	CRQ	IB2	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/PC = 0,74	
50	RQ	IIIB	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/PC = 0,72	
51	RQ	IIIB	CEC	CBL	CC							NEGATIVO RLU/CO = 0,42	
52	R	IIA	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/CO = 0,79	NEGATIVO
53	CR	IB2	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/CO = 0,60	NEGATIVO
54	CR	IV	ADENO		CC, CBL							NEGATIVO RLU/CO = 0,90	NEGATIVO
55	RQ	IIIB	ADENO		CC, CBL							NEGATIVO RLU/CO = 0,71	NEGATIVO
56	R	IIB	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/CO = 0,41	NEGATIVO
57	RQ	IIB	CEC		CC, CBL							NEGATIVO RLU/CO = 0,28	NEGATIVO
58	CRQ	IIIB	CEC		CC, CBL							POSITIVO RLU/CO = 2,59	NEGATIVO

C – cirurgia; R – radioterapia; Q – quimioterapia; CC – citologia convencional; CBL – citologia em base líquida; CEC- carcinoma de células escamosas; ADENO – adenocarcinoma, INSAT – insatisfatório; NEG - negativo

(conclusão)

## 9.6 APÊNDICE F - ARTIGO

### **Association between human papillomavirus infection and cytological abnormalities in early follow up of invasive cervical cancer**

Azevedo AEB, Carneiro FP, Figueiredo F, Bocca AL, Teixeira LS, Maurício Filho, MARQ, Nakashima JP, Abreu WC, Junqueira MIMB, Magalhães AV.

Considering the limitations of cytology in detection of residual cervical cancer, the aim of this study was to evaluate frequency and load of high risk HPV in cervical and vaginal samples in early follow up of patients treated for invasive cervical cancer and correlate this with the results of cytological examination. Conventional cytology and hybrid capture were performed in cervical and vaginal samples of 52 women with invasive cervical carcinoma three months after therapy. High risk HPV was detected in 46.1% of the samples and median and range of ratio RLU/CO (estimated viral load) in positive samples was 1.71 (1 - 2120.03). No significant difference was observed in viral frequency and in median of the ratio RLU/CO between samples of patients at different stages (I, II, III) and between cervical samples (obtained from patients submitted to exclusive radiotherapy with or without chemotherapy) and vaginal samples (obtained from patients submitted to hysterectomy and radiotherapy with or without chemotherapy). Cytological abnormalities were significantly more frequent in samples with HPV than in samples without HPV. The viral load was also significantly higher in samples with cytological abnormalities when compared with the samples with negative cytology. In conclusion, HPV detection methods may be useful as a complement to conventional cytology for the diagnosis of residual cancer in patients after radiotherapy for cervical cancer in early follow-up.

Key-words: cervical cancer, cervical cytology, hybrid capture, radiotherapy

## INTRODUCTION

Human papillomavirus (HPV) infection is one of the most prevalent infections all the world, the estimated overall HPV prevalence is 11.7% [Bruni et al., 2010]. The virus is involved in carcinogenesis of cancers of high prevalence and morbidity such as cancers of the head and neck and in anogenital region [Parkin and Bray, 2006]. In cervix, various types of high-risk HPV have been detected in almost all cases of invasive cancer [Thomison et al., 2008]. Cervical cancer is the third most common cancer among women worldwide [Ferlay et al., 2010; Jemal et al., 2011]. The treatment includes surgery, external beam radiotherapy, brachytherapy and chemotherapy and is established according to clinical stage of the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) [Creasman, 1995; Petignat and Roy, 2007]. It is known that most relapses occur within the first two years after treatment and the local recurrence has been described in 14% to 57% of patients. Follow-up visits strategy involves every 3-4 months in the first two years, and every 6-12 months in years 3-5 [Elit et al., 2009; Haie-Meder et al., 2009].

There is little evidence that cervical / vaginal cytology significantly adds to the clinical exam in detecting early disease recurrence, because of the low sensitivity and diagnostic difficulties related to the effects of radiotherapy [Cooper et al., 2006; Elit et al., 2010; Rintala et al., 1997; Singh et al., 2005; Wright et al., 2003]. Although hybrid capture is a test widely used associated with cytology in pretreatment diagnosis, HPV detection tests are not routinely used in following patients after treatment, especially in developing countries. Recent studies have shown that the identification of the virus may be clinically useful after treatment of invasive cervical cancer, because it indicates not only the therapeutic response as well as the risk of developing a new cervical or vaginal cancer [Badaracco et al., 2010; Harima et al., 2002; Nagai et al., 2004; Singh et al., 2006; Song et al., 2010; Venturoli et al., 2008]. But it remains unclear if there is an association between viral persistence and presence of abnormalities in cervical/vaginal cytology soon after treatment for invasive cervical cancer. Therefore, in view of the importance of early diagnosis of residual cervical carcinoma, the aim of this study was to evaluate the frequency and load of high risk HPV by hybrid capture in cervical and vaginal

samples soon after the treatment for invasive cervical cancer and correlate this with the results of cytological examination.

## **METHODS**

### Patients

The present study included 52 women with invasive cervical carcinoma, stages I to IV (International Federation of Gynecology and Obstetrics [FIGO]) treated in the Base Hospital and University Hospital of Brasilia during the years 2009-11. The treatment was established in accordance with the stage of disease and clinical conditions of the patients and included hysterectomy, radiotherapy (external beam radiotherapy and brachytherapy) and chemotherapy. All our patients underwent brachytherapy. Of these patients, 48 had squamous cell carcinoma and 4 adenocarcinoma. This study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Health Sciences at the University of Brasilia and informed consent was obtained from all patients.

### Cytology and biopsy

Cervical samples (from patients submitted to exclusive radiotherapy with or without chemotherapy) and vaginal samples (from patients submitted to hysterectomy and radiotherapy with or without chemotherapy) were obtained for cytological analysis in the first follow-up visit (three months after brachytherapy). The samples were analyzed by conventional cytology and the slides were fixed with absolute alcohol and stained by the Papanicolaou method. The cytological findings were classified according to the 2001 Bethesda System into the following categories [Solomon et al., 2002]: negative, atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US), atypical glandular cells of undetermined significance (AGUS),



atypical squamous cells - cannot exclude high-grade intraepithelial lesion (ASC-H), low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high-grade intraepithelial lesion (HSIL) and invasive carcinoma.

### Hybrid capture

Cervical or vaginal samples for HPV detection also were obtained in the first follow-up visit (three months after brachytherapy). In hybrid capture, 13 types of high-risk HPV have been identified 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68. The ratio RLU (relative light unit)/CO(Cutoff) $>1.0$  was considered positive. The ratio values RLU/CO were considered a semi-quantitative estimate of viral load [Terry et al., 2001].

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The  $\chi^2$  and Fisher's tests were used to analyze the distribution differences of HPV frequency between groups. The values of RLU/CO were expressed as median and range. Comparisons of these values between groups were made with non-parametric (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis) tests. Statistical significance was assigned to  $p < 0.05$ .

## RESULTS

The hybrid capture was positive in 24/52 (46.1%) samples. The median of the ratio RLU/cutoff (estimated viral load) in all (positive and negative) samples was 0.94 (0.26 – 2120.03) and in positive samples 1.71 (1 - 2120.03). In vaginal and cervical specimens, HPV was detected respectively in 11/17 (64.7%) and 13/35 (37.1%) of

patients and the median of ratio RLU/CO was respectively 1.18 (0.29 - 2120.03) and 0.88 (0.26 - 656.51), but these differences were not significant. In patients with stage I, II and III, the number of positive samples in hybrid capture was respectively 4/10 (40%), 8/17 (47%) and 9/23 (52.2%) and the median and range of ratio RLU/CO was respectively 0.81 (0.29 - 1897.8), 0.91 (0.26 - 656.51) and 1.00 (0.26 - 2120.03). Although the viral frequency and median of ratio RLU / CO had been lower in samples of patients in stage I, this difference was not significant.

Of the 52 patients, 17 (32.7%) presented cytological abnormalities. In vaginal and cervical specimens, cytological abnormalities were detected respectively in 6/17 (35.3%) and 11/35 (31.4%) of patients, but these difference was not significant. The frequency of HPV and the values of ratio RLU/CO according to results of cytological examination are shown in Table 1. The cytological abnormalities were significantly more frequent in samples with HPV (positive hybrid capture) (12/23, 52.1%) than in samples without HPV (negative hybrid capture) (5/26, 19.2%) ( $p = 0.019$ , Fisher's test). The median of the RLU/CO was also significantly higher in samples with cytological abnormalities (1.39, 0.26 – 2120.03) when compared with the median in samples with negative cytology (0.79, 0.26 - 33.98) ( $p = 0.029$ , Mann-Whitney). The cytological diagnosis of invasive squamous cell carcinoma (SCC) was confirmed by biopsy in all patients except for one who died shortly after brachytherapy.

## DISCUSSION

In this study, HPV detection was performed in cervical and vaginal samples of patients in early follow-up after treatment for invasive cervical cancer to evaluate the role of an HPV test as an adjunct method to cytology to diagnose residual cancer. In previous studies, the detection rate of HPV in cervical and vaginal samples after treatment for invasive cervical cancer has varied from 21.2% to 78% and possible factors responsible for this variation are the time of sample collection after treatment, the method of virus detection, staging of the disease and type of treatment [Badaracco et al., 2010; Nagai et al., 2004; Singh et al., 2006; Song et al., 2010; Venturoli et al., 2008]. In present study, HPV was detected in 46.1% of the samples which were obtained soon after treatment, during the first follow up visit (3 months

after brachytherapy) because the aim was to diagnose residual cancer early and hybrid capture was chosen to be a method used commercially that detects virtually all types of high risk HPV. Most of patients were in advanced stage of the disease and were treated according to their disease staging and clinical conditions, but no significant difference was observed in viral frequency and in median of ratio RLU/CO between patients at different stages (I, II, III) and between cervical samples (obtained from patients submitted to exclusive radiotherapy with or without chemotherapy) and vaginal samples (obtained from patients submitted to hysterectomy and radiotherapy with or without chemotherapy). In a recent study, that also evaluated the presence of HPV at 3 months after radiotherapy by hybrid capture, the detection rate of HPV was 22.4% [Song et al., 2010]. According to the authors of this previous study, the low rate observed may be explained by the treatment of the most patients with chemoradiotherapy. The authors of this previous study also observed that in about half of the samples there was a disappearance of the virus in subsequent evaluations and they suggest that some virus detected in the first months were probably in cellular debris resulting from radiotherapy.

The results of present study show that the cytological abnormalities were significantly more frequent in samples with HPV than in samples without HPV. The viral load (estimated by RLU/CO) was also significantly higher in samples with cytological abnormalities when compared with samples with negative cytology.

In present study, of the 26 samples that were negative in hybrid capture, only 5 (19.2%) had Pap smear abnormalities. As the result of the cytology was ASC in these samples, this cytological abnormality may be explained by the presence of reactive atypia induced by radiation therapy or, less probably, the presence of cellular changes caused by a type of HPV not detected by hybrid capture. According to a previous study, radiation-induced atypical cells are detected in 28% of pap smears taken during the first 4 months after radiotherapy, with the rate decreasing thereafter [Rintala et al., 1997]. These morphological changes, which affect non-neoplastic and neoplastic epithelial cells, make it extremely difficult to interpret cytological finding. So, hybrid capture may be very useful in samples diagnosed as ASC soon after radiotherapy, since the absence of HPV DNA on this test will favor atypia induced by radiation and the presence of the virus, mainly with high viral load, will be suspected for residual cancer.

In contrast, samples with positive hybrid capture but without cytological abnormalities were found in present study (11/32, 34.4%). The explanations for this are the presence of virus in cell debris after radiotherapy or the presence of a latent infection with risk of developing cervical or vaginal neoplasia later. Song *et al* observed that in most samples with the ratio RLU/CO below 10 there was a disappearance of virus, and they suggest that samples with low viral load may be associated with the presence of small amount of HPV DNA in tumor cells degraded after radiotherapy. In present study, all samples with positive hybrid capture but without cytological abnormalities presented values of the ratio RLU/CO below 3.11, except for one which value was 33.98. So, the results of present and previous studies indicate that positivity in HPV test, immediately after treatment, should not be interpreted singly as indicative of residual tumor or risk of developing new lesion since the viral load and cytological findings must be considered. In relation to latent infection after treatment, results from a previous study provide evidence that HPV has a causative role in the development of post radiation vaginal dysplasia, since high-risk HPV DNA was found in 97.7% of these vaginal lesions [ Barzon *et al.*, 2002].

Another aspect to be discussed is the possibility of a false-negative result in cytology and hybrid capture; in present study, 21/52 (40.4%) of the samples were negative in both tests. As reported earlier, it is technically often difficult to obtain a representative smear after treatment due marked morphologic alterations caused by radiation therapy including narrowing, obliteration and ulceration of the cervix and vagina [Zannoni and Vellone *et al.*, 2008]. Besides this, on histological examination, neoplastic residual cells are scant, often inside the cervical stroma, and covered by reparative or reactive epithelium [Zannoni and Vellone *et al.*, 2008; Zannoni *et al.*, 2008]. This means that the residual tumor rarely reached the cervical surface where it could be sampled by spatula or brush. A previous study showed that most hysterectomy specimens after radiotherapy have residual cancer and cytology does not detect most cases [Zannoni and Vellone *et al.*, 2008].

In summary, present study showed that the high-risk HPV is present in almost half of the samples soon after treatment for invasive cervical cancer and its frequency and viral load is not related to the stage of disease and local where samples are obtained (cervix or vagina). As samples with cytological abnormalities are associated with the presence of the virus and higher viral load, it is possible to

conclude that HPV detection methods may be useful in early follow-up as a complement to conventional cytology for the diagnosis of residual cervical cancer after radiotherapy.

Table 1 Frequency of high risk HPV and the values of ratio RLU/CO according to cytological findings

Hybrid capture	Diagnostic					
	I	N	ASC-US	ASC-H	HSIL	Invasive Carcinoma
<b>Positive</b>	n = 1 (1.21)	n = 11 (1.06-33.98)	n = 2 (22.83 – 656.51)	n = 5 (1-1.71)	n = 1 (2121.03)	n = 4 (1.72-1897.80)
<b>Negative</b>	n = 2	n = 21	n = 2	n = 3	n = 0	n = 0

I – unsatisfactory; N - negative

## REFERENCES

- 1 Badaracco G, Savarese A, Micheli A, Rizzo C, Paolini F, Carosi M, Cutillo G, Vizza E, Arcangeli G, Venuti A. 2010. Persistence of HPV after radio-chemotherapy in locally advanced cervical cancer. *Oncol Rep*23:1093-9.
- 2 Barzon L, Pizzighella S, Corti L, Mengoli C, Palù G. 2002. Vaginal dysplastic lesions in women with hysterectomy and receiving radiotherapy are linked to high-risk human papillomavirus. *J Med Virol* 67:401-5.
- 3 Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S.2010. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* 202:1789-99.
- 4 Cooper AL, Dornfeld-Finke JM, Banks HW, Davey DD, Modesitt SC. 2006. Is cytologic screening an effective surveillance method for detection of vaginal recurrence of uterine cancer? *Obstet Gynecol* 107:71-6.
- 5 Creasman WT. 1995. New gynecologic cancer staging. *Gynecol Oncol* 58:157-8.
- 6 Elit L, Fyles AW, Devries MC, Oliver TK, Fung-Kee-Fung M. 2009. Gynecology Cancer Disease Site Group. Follow-up for women after treatment for cervical cancer: a systematic review. *Gynecol Oncol* 114:528-35.
- 7 Elit L, Fyles AW, Oliver TK, Devries-Aboud MC, Fung-Kee-Fung M. 2010. Follow-up for women after treatment for cervical cancer. *Curr Oncol* 17:65-9.
- 8 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM.2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127:2893-917.

- 9 Haie-Meder C, Morice P, Castiglione M. 2009. ESMO Guidelines Working Group. Cervical cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 20 Suppl 4:27-8.
- 10 Harima Y, Sawada S, Nagata K, Sougawa M, Ohnishi T. 2002. Human papilloma virus (HPV) DNA associated with prognosis of cervical cancer after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52:1345–51.
- 11 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90.
- 12 Nagai Y, Toma T, Moromizato H, Maehama T, Asato T, Kariya K, Kanazawa K. 2004. Persistence of human papillomavirus infection as a predictor for recurrence in carcinoma of the cervix after radiotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 191: 1907-1913.
- 13 Parkin DM, Bray F. 2006. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 31;24 Suppl 3:S3/11-25.
- 14 Petignat P, Roy M. 2007. Diagnosis and management of cervical cancer. *BMJ* 335(7623):765-8.
- 15 Rintala MA, Rantanen VT, Salmi TA, Klemi PJ, Grenman SE. 1997. PAP smear after radiation therapy for cervical carcinoma. *Anticancer Res* 7:3747–50.
- 16 Singh N, Titmuss E, Taylor A, Powell ME. 2005. Routine cervical cytology has no role after primary chemoradiation for cervical cancer. *Cytopathology* 16:315-6.
- 17 Singh RK, Maulik S, Mitra S, Mondal RK, Basu PS, Roychowdhury S, Panda CK. 2006. Human papillomavirus prevalence in postradiotherapy uterine cervical carcinoma patients: correlation with recurrence of the disease. *Int J Gynecol Cancer* 16:1048–54.

- 18 Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M. 2002. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama* 287:2114–9.
- 19 Song YJ, Kim JY, Lee SK, Lim HS, Lim MC, Seo SS, Kang S, Lee DO, Park SY. 2010. Persistent human papillomavirus DNA is associated with local recurrence after radiotherapy of uterine cervical cancer. *Int J Cancer* 129:896-902.
- 20 Terry G, Ho L, Londesborough P, Cuzick J, Mielzynska-Lohnas I, Lorincz A. 2001. Detection of high-risk HPV types by the hybrid capture 2 test. *J Med Virol* 65:155-62.
- 21 Thomison J 3rd, Thomas LK, Shroyer KR. 2008. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 39:154-66.
- 22 Venturoli S, Ambretti S, Cricca M, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M. 2008. Correlation of high-risk human papillomavirus genotypes persistence and risk of residual or recurrent cervical disease after surgical treatment. *J Med Virol* 80:1434-40.
- 23 Wright JD, Herzog TJ, Mutch DG, Gibb RK, Rader JS, Davila RM, Cohn DE. 2003. Liquid-based cytology for the postirradiation surveillance of women with gynecologic malignancies. *Gynecol Oncol* 91:134-8.
- 24 Zannoni GF, Vellone VG. 2008. Accuracy of Papanicolaou smears in cervical cancer patients treated with radiochemotherapy followed by radical surgery. *Am J Clin Pathol* 130:787-94.
- 25 Zannoni GF, Vellone VG, Carbone A. 2008. Morphological effects of radiochemotherapy on cervical carcinoma: a morphological study of 50 cases of



hysterectomy specimens after neoadjuvant treatment. *Int J Gynecol Pathol* 27:274-81.

## 10. ANEXOS

### 10.1 ANEXO A - SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO PARA NEOPLASIAS DO COLO UTERINO - FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA (FIGO)

<b>Estádio I</b>	
O estágio I refere-se ao carcinoma estritamente limitado ao colo uterino; este estágio deve ser desconsiderado se há extensão ao corpo uterino. O diagnóstico dos estádios IA1 e IA2 deve ser baseado no exame microscópico do tecido excisado, de preferência um cone que inclua toda a lesão.	
Estádio IA:	Neoplasia invasiva identificada somente microscopicamente. Há uma invasão medida do estroma com uma profundidade máxima de 5 mm e um diâmetro de até 7 mm.
Estádio IA1:	Invasão medida do estroma de até 3 mm de profundidade e 7 mm de diâmetro.
Estádio IA2:	Invasão medida do estroma maior que 3 mm mas de até 5 mm de profundidade e até 7 mm de diâmetro.
Estádio IB:	Lesões clínicas limitadas ao colo uterino ou lesões pré-clínicas maiores que no estágio IA. Todas as lesões macroscópicas, mesmo com invasão superficial, são consideradas neoplasias no estágio IB.
Estádio IB1:	Lesões clínicas de até 4 cm.
Estádio IB2:	Lesões clínicas maiores de 4 cm.
<b>Estádio II</b>	
O estágio II refere-se ao carcinoma que se estende mais além do colo uterino, mas não invade a parede pélvica. O carcinoma atinge a vagina, mas até o seu terço inferior.	
Estádio IIA:	Não há comprometimento evidente do paramétrio. A invasão dá-se até os dois terços superiores da vagina.
Estádio IIB:	Comprometimento evidente do paramétrio, mas não à parede pélvica lateral.
<b>Estádio III</b>	
O estágio III refere-se ao carcinoma que invadiu a parede pélvica lateral. Ao toque retal, não há espaço sem neoplasia entre o tumor e a parede pélvica lateral. O tumor ocupa o terço inferior da vagina. Todos os casos com hidronefrose ou rim não-funcionante são considerados neoplasias no estágio III.	
Estádio IIIA:	Não há extensão à parede pélvica lateral, mas há invasão do terço inferior da vagina.
Estádio IIIB:	Extensão à parede pélvica lateral, hidronefrose ou rim não-funcionante.
<b>Estádio IV</b>	
O estágio IV refere-se ao carcinoma que se estendeu mais além da pelve verdadeira ou invadiu clinicamente a mucosa da bexiga e/ou o reto.	
Estádio IVA:	Disseminação do tumor para órgãos pélvicos adjacentes.
Estádio IVB:	Disseminação para órgãos a distância.
É impossível avaliar clinicamente se uma neoplasia do colo uterino invadiu o corpo do útero. Assim, a determinação da extensão ao corpo deve ser desconsiderada.	

## 10.2 ANEXO B – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

### PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **158/09**

Título do Projeto: “Aplicação de imunocitoquímica e de tipagem do HPV no seguimento de pacientes pós-tratamento de câncer de colo uterino – comparação de diferentes estratégias para a detecção precoce da recorrência da doença”.

Pesquisadora Responsável: Ana Emília Borges de Azevedo

Data de Entrada: 30/11/2009

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **158/09** com o título: “Aplicação de imunocitoquímica e de tipagem do HPV no seguimento de pacientes pós-tratamento de câncer de colo uterino – comparação de diferentes estratégias para a detecção precoce da recorrência da doença”, analisado na 11ª Reunião Ordinária, realizada no dia 15 de dezembro de 2009.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 23 de fevereiro de 2010.

Prof. Volnei Garrafa  
Coordenador do CEP-FS/UnB