

PAULO NEWTON DANZI SALVIA

***CORRELAÇÃO ENTRE CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS,
CITOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS E PRESENÇA DO DNA
DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM BIÓPSIAS CERVICAIS
UTERINAS DETECTADO POR MEIO DA TÉCNICA DE
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE***

CAMPINAS

2004

PAULO NEWTON DANZI SALVIA

***CORRELAÇÃO ENTRE CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS,
CITOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS E PRESENÇA DO DNA
DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM BIÓPSIAS CERVICAIS
UTERINAS DETECTADO POR MEIO DA TÉCNICA DE
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas, Área de Anatomia Patológica.*

ORIENTADORA : *Prof.a. Dra. LILIANA A. L. De ANGELO ANDRADE*

CO-ORIENTADORA: *Prof.a. Dra. CHRISTINE HACKEL*

CAMPINAS

2004

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a) : Prof.(a) Dr.(a) .Liliana Ap. Lucci De Angelo Andrade

Membros:

1. Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

2. Prof. Dr. José Eduardo Bueno Zappa

3. Prof. Dr. Paulo César Giraldo

4. Prof. Dr. José Vassallo

5. Profa. Dra. Liliana Ap. Lucci De Angelo Andrade

200504580

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 06/08/04

Dedico...

*à minha esposa Maria Isabel,
às minhas filhas Marina e Maria Júlia,
a meus pais, minha família de origem,
a meus amigos, a meu país,
ao Ser Supremo*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lílíana Aparecida Lucci De Angelo Andrade e à Professora Dra. Christine Hackel, que me deram as diretrizes.

Ao Prof. José Lopes de Farias, mestre de todos nós que me ensinou a importância da morfologia.

Ao Prof. Athanase Billis, que me ensinou método e perseverança.

À Dra. Sílvia Maria Bergo, Dr. Ronaldo Ribeiro De Melo, Dr. Markus Traue pelo empenho e dedicação.

Aos biólogos Mestres Eduardo Becker Tagliarini, companheiro e amigo e Patrícia Ivana Pires Bonesso Sabadini, pela dedicação.

Ao Dr. Gilson Manfio e Dr. Ismael Dale, que me ajudaram a ensaiar os primeiros passos na Biologia Molecular.

Aos docentes do Departamento de Anatomia Patológica, dos quais me orgulho de ter sido aluno.

À Andréa Ferreira Semoline, pela análise dos dados.

Ao Maurício Bueno Filho, pelo acabamento das fotos.

À Juliana, à Ângela, à Cínthia, pela dedicação, a todos os colaboradores e amigos do Citocamp, que estiveram a meu lado desde o início.

Às Instituições

- Departamento de Anatomia Patológica FCM Unicamp
- Departamento de Genética Médica FCM-Unicamp
- Ambulatório de Patologia Cervical – Prefeitura Municipal de Campinas
- Citocamp Laboratório de Patologia S/C Ltda.
- Comissão de Ensino e Pesquisa - Departamento de Estatística FCM-Unicamp
- Fundação Tropical André Toselo

“Persegue os teus objetivos ainda que difícil te possa parecer. Os navios nunca alcançam as estrelas, mas é seguindo-as que se lançam ao mar”.

...pelo velho Lucente

	PÁG.
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1- INTRODUÇÃO	01
1.1- Associação do HPV com o câncer do colo uterino	01
1.2- Lesões intraepiteliais cervicais ou precursoras do câncer	01
1.3- História natural da infecção pelo HPV	03
1.4- Associação do HPV com a lesão intraepitelial escamosa	03
1.5- O vírus	04
1.5.1- Taxonomia.....	04
1.5.2- Tipos virais	06
1.6- Estratégias para prevenção do câncer cervical	08
1.7- Marcadores de infecção pelo HPV	09
1.8- Técnicas de detecção de DNA viral	10
1.8.1- Captura de híbridos	10
1.8.2- Hibridização “in situ” e imunistoquímica	11
1.8.3- Reação em cadeia da polimerase	12
1.9- Justificativa do trabalho	14
2- OBJETIVOS	16
2.1- Objetivo geral	16
2.2- Objetivos específicos	16
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS	17
3.1- Seleção de pacientes e técnicas	17
3.1.1- Seleção de pacientes	17
3.1.2- Seleção de “primers”	17
3.2- Procedimentos técnicos	21
3.2.1- Reação em cadeia da polimerase (PCR) com os primers MY 09/11.....	21
3.2.2- Digestão enzimática com análise pelo polimorfismo dos tamanhos dos fragmentos de restrição (RFLP)	22

3.2.3- Reação em cadeia da polimerase (PCR) primers GP5+/6+	23
3.2.4- Biópsia	25
3.2.5- Citologia oncótica	26
3.3- Metodologia estatística	27
3.3.1- Aplicada aos dados da biópsia.....	27
3.3.2- Aplicada aos dados da citologia.....	28
4- RESULTADOS	29
4.1- Informações complementares sobre a detecção do DNA viral e frequência dos tipos de HPV encontrados nessa amostra	29
4.2- Dados obtidos do exame histológico.....	31
4.2.1- Diagnóstico histológico x DNA de HPV	32
4.2.1.1- NIC x DNA do HPV	32
4.2.1.2- SHPV X DNA do HPV	34
4.2.2- Critérios morfológicos histológicos x DNA do HPV	34
4.3- Dados obtidos do exame citológico	36
4.3.1- Critérios citológicos x diagnóstico histológico de NIC	37
4.3.2- Critérios citológicos x diagnóstico histológico de NIC III	38
4.3.3- Critérios citológicos x DNA do HPV	39
4.4- Diagnóstico citológico x diagnóstico histológico	41
5- DISCUSSÃO	42
5.1- DADOS HISTOLÓGICOS.....	42
5.1.1- Diagnósticos x DNA do HPV.....	42
5.1.1.1- NIC x DNA do HPV	42
5.1.1.2- SHPV x DNA do HPV	44
5.1.2- Critérios morfológicos x DNA do HPV	45
5.1.2.1- Atipia coilocitótica x DNA do HPV	45
5.1.2.2- Binucleação x DNA do HPV	48
5.1.2.3- Mitose, disceratose, acantose e paraceratose x DNA do HPV.....	48
5.2- Dados Citológicos	49

5.2.1- Critérios associados a células superficiais x diagnóstico histológico de NIC III	49
5.2.2- Critérios associados a células imaturas x diagnóstico histológico de NIC III	50
5.2.3- Critérios citológicos x DNA do HPV	50
5.3- Informações complementares	51
5.3.1- Diferenças no poder de detecção de DNA do HPV dos “primers”	51
5.3.2- Frequência dos tipos de HPV	52
5.3.3- Contribuição deste estudo	53
6- CONCLUSÕES	54
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
8- ANEXOS	68
Anexo 1- Figuras de imagens digitalizadas de microscopia óptica	69
Anexo 2- Trabalho publicado	
Anexo 3- Aspectos éticos	79
Anexo 4- Termo de consentimento livre e esclarecido	80
Anexo 5- Responsabilidade do pesquisador	83
Anexo 6- Ficha clínica de atendimento	84

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Artefato de fixação
AK	Atipia coilocitótica
AGUS	Atipias de células glandulares de significado indeterminado
ASC-US	Atipias de células escamosas de significado indeterminado
ASC-H	Atipias de células escamosas de significado indeterminado que não pode excluir lesão intraepitelial escamosa de alto grau
<i>Bam</i> H1, <i>Dde</i> I, <i>Hae</i> III, <i>Hinf</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Rsa</i> I e <i>Sau3AI</i>	Enzimas de restrição
Bi	Binucleação
CC	Cervicite crônica
CCA	Cervicite crônica ativa
CCI	Cervicite crônica inespecífica
CID	Cromatina irregularmente distribuída
CNI	Contorno nuclear irregular
DIS	Disceratose
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNTPs	Dinucleotídeos
FI	Fila indiana
FS	Formação sincicial com atipia
HC	Captura de híbridos
HCl	Ácido clorídrico
HCP	Halo citoplasmático peri-nuclear
HE	Hematoxilina e eosina
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral
LIEAG	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau

HN	Hipercromatismo nuclear
HPV	Papilomavírus Humano
E6	Seqüência genética de uma região do genoma do Papilomavírus Humano
KCI	Cloreto de Potássio
L1	Seqüência genética da região conservada do genoma do Papilomavírus Humano que codifica para proteínas do capsídeo do vírus
LIC	Lesão intraepitelial cervical
LIEBG	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
LIEAG	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
ME	Metaplasia escamosa do epitélio endocervical
µl	Microlitros
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MY 09/11, GP 05+/06	Grupos de primers ou segmentos iniciadores
NIC I,II e III	Neoplasia intraepitelial cervical graus I, II e III.
pb	Pares de bases nitrogenadas (em uma seqüência no DNA)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pmol	Picomol
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
RFLP	Polimorfismo dos tamanhos dos fragmentos de restrição
RNC	Perda da relação núcleo-citoplasma
Rpm	Rotações por minuto
SHPV	Sugestivo de Papilomavírus Humano
SIL	Lesão intraepitelial escamosa
SP	Estado de São Paulo (Brasil)
TE	Tris EDTA

U	Unidades
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultravioleta
OMS	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Número de seqüências de HPV identificadas ao longo dos anos	06
Tabela 2- Quadro comparativo entre as técnicas de detecção do HPV.....	14
Tabela 3- Seqüências de primers genéricos para detecção do HPV e de beta globina	19
Tabela 4- Condições da digestão enzimática.....	25
Tabela 5- Correlação entre o diagnóstico histológico e o DNA do HPV.....	31
Tabela 6- Distribuição da presença do DNA do HPV entre os diagnósticos histológicos estratificados.....	31
Tabela 7- Correlação entre os diagnósticos de SHPV, CC e DNA do HPV.....	32
Tabela 8- Correlação entre AK (na histologia) e DNA do HPV.....	33
Tabela 9- Correlação entre BI na histologia e o DNA do HPV.....	33
Tabela 10- Diagnósticos citológicos da amostra colhida no dia da colposcopia.....	34
Tabela 11- Diagnósticos histopatológicos de 29 casos biopsiados por imagens colposcópicas suspeitas associadas à citologia normal (DLN=56, casos biopsiados = 29)	35
Tabela 12- Critérios citológicos de células superficiais x NIC histológico	35
Tabela 13- Critérios citológicos de células imaturas x NIC histológico	36
Tabela 14- Critérios citológicos de células superficiais x NIC III histológico	37
Tabela 15- Critérios citológicos de células imaturas x NIC III histológico	38
Tabela 16- Critérios citológicos de células superficiais x DNA do HPV	38
Tabela 17- Critérios citológicos de células imaturas x DNA do HPV	38
Tabela 18- Diagnóstico citológico e histopatológico	39
Tabela 19- Percentual de detecção de DNA de HPV com os pares de “primers” MY09/11 e GP5+/GP6+	41
Tabela 20- Positividade de DNA de HPV com o par de “primers” GP em 56 mulheres com citologia normal	41
Tabela 21- Tipagem de DNA do HPV por RFLP.....	42

LISTA DE FIGURAS

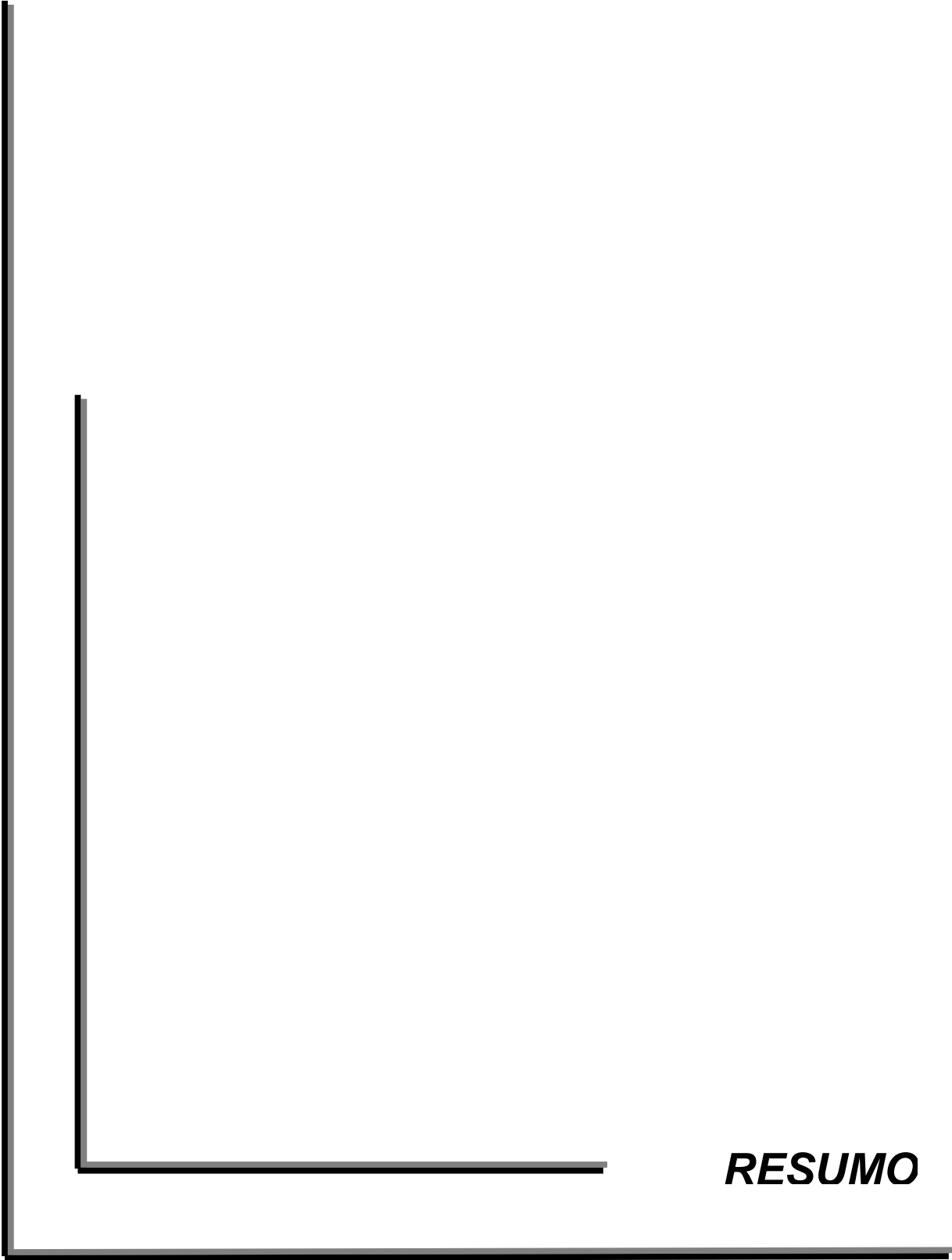
	PÁG.
Figura 1- Representação esquemática do genoma do HPV-16	05
Figura 2- Seqüência do gene L1 do HPV 16 (5526 a 7154, sentido 5' → 3').....	20
Figura 3- Gel de agarose de dois casos negativo e positivo para MY09/11	24
Figura 4- Gel de agarose de RFLP	24
Figura 5- Gel de agarose de dois casos negativo e positivo para GP5/GP6+	24
Figura 6- Tipos prevalentes de HPV em 32 amostras de cérvix uterina obtidas de pacientes com atipias na citologia sugestivas de lesão intraepitelial positivas para HPV pelo par de “primers” MY	31
Figura 7- Caso S_046, HPV Negativo	69
Figura 8- Caso S_010, HPV Positivo	69
Figura 9- Caso S_010, HPV Positivo	69
Figura 10- Caso S_068, HPV Negativo.	69
Figura 11- Caso S_068, HPV Negativo	69
Figura 12- Caso S_011, HPV Positivo Tipo 58	69
Figura 13- Caso S_017, HPV Positivo	69
Figura 14- Caso S_059, HPV Positivo Tipo 16	70
Figura 15- Caso S_059, HPV Positivo Tipo 16	70
Figura 16- Caso S_044, HPV Positivo Tipo 58	70
Figura 17- Caso S_047, HPV Negativo	70
Figura 18- Caso S_002, HPV Positivo	70
Figura 19- Caso S_052, HPV Negativo	70
Figura 20- Caso S_044, HPV Positivo Tipo 58	71
Figura 21- Caso S_068, HPV Negativo	71
Figura 22- Caso S_011, HPV Positivo Tipo 58	71
Figura 23- Caso S_011, HPV Positivo Tipo 58	71
Figura 24- Caso S_068, HPV Negativo	71
Figura 25- Caso S_017, HPV Positivo	71
Figura 26- Caso S_059, HPV Positivo Tipo 16	72

Figura 27- Caso S_068, HPV Negativo.....	72
Figura 28- Caso S_050, HPV Negativo.....	72
Figura 29- Caso S_036, HPV Negativo	72
Figura 30- Caso S_002, HPV Positivo	72
Figura 31- Caso S_068, HPV Negativo	72
Figura 32- Caso S_017, HPV Positivo	73
Figura 33- Caso S_036, HPV Negativo	73
Figura 34- Caso S_44, HPV Negativo	73
Figura 35- Caso S_059, HPV Positivo,Tipo 16	73
Figura 36- Caso S_083, HPV Positivo,Tipo 16	74
Figura 37- Caso S_017, HPV Positivo	74
Figura 38- Caso S_017, HPV Positivo	74
Figura 39- S_042, HPV Negativo	74
Figura 40- Caso S_08, HPV – exame prejudicado	74
Figura 41- Caso S_067, HPV Positivo	74
Figura 42- Caso S_067, HPV Positivo.....	75
Figura 43- Caso S_083, HPV Positivo Tipo 16.....	75
Figura 44- Caso S_084, HPV Positivo.....	75
Figura 45- Caso S_067, HPV Positivo.....	75
Figura 46- Caso S_067, HPV Positivo	75
Figura 47- Caso S_067, HPV Positivo	75
Figura 48- Caso S_067, HPV Positivo	76
Figura 49- Caso S_082, HPV – exame prejudicado.....	76
Figura 50- Caso S_084, HPV Positivo	76
Figura 51- Caso S_018, HPV Positivo	76
Figura 52- Caso S_083, HPV Positivo Tipo 16	76
Figura 53- Caso S_017, HPV Positivo	76
Figura 54- Caso S_018, HPV Positivo	77
Figura 55- Caso S_042, HPV Negativo	77
Figura 56- Caso S_075, HPV Negativo	77

Figura 57- Caso S_037, HPV Positivo Tipo 55	77
Figura 58- Caso S_059, HPV Positivo Tipo 16	77
Figura 59- Caso S_017, HPV Positivo	77
Figura 60- Caso S_018, HPV Positivo	78
Figura 61- Caso S_040, HPV Positivo	78
Figura 62- Caso S_083, HPV Positivo Tipo 16	78
Figura 63- Caso S_059, HPV Positivo Tipo 16	78
Figura 64- Caso S_042, HPV Negativo	78

LISTA DE QUADROS

	PÁG.
Quadro 1- “Primers” genéricos para GP5+/GP6+ para detecção de genótipos de HPV genitais. Raras bases não se pareiam com determinados tipos virais	18



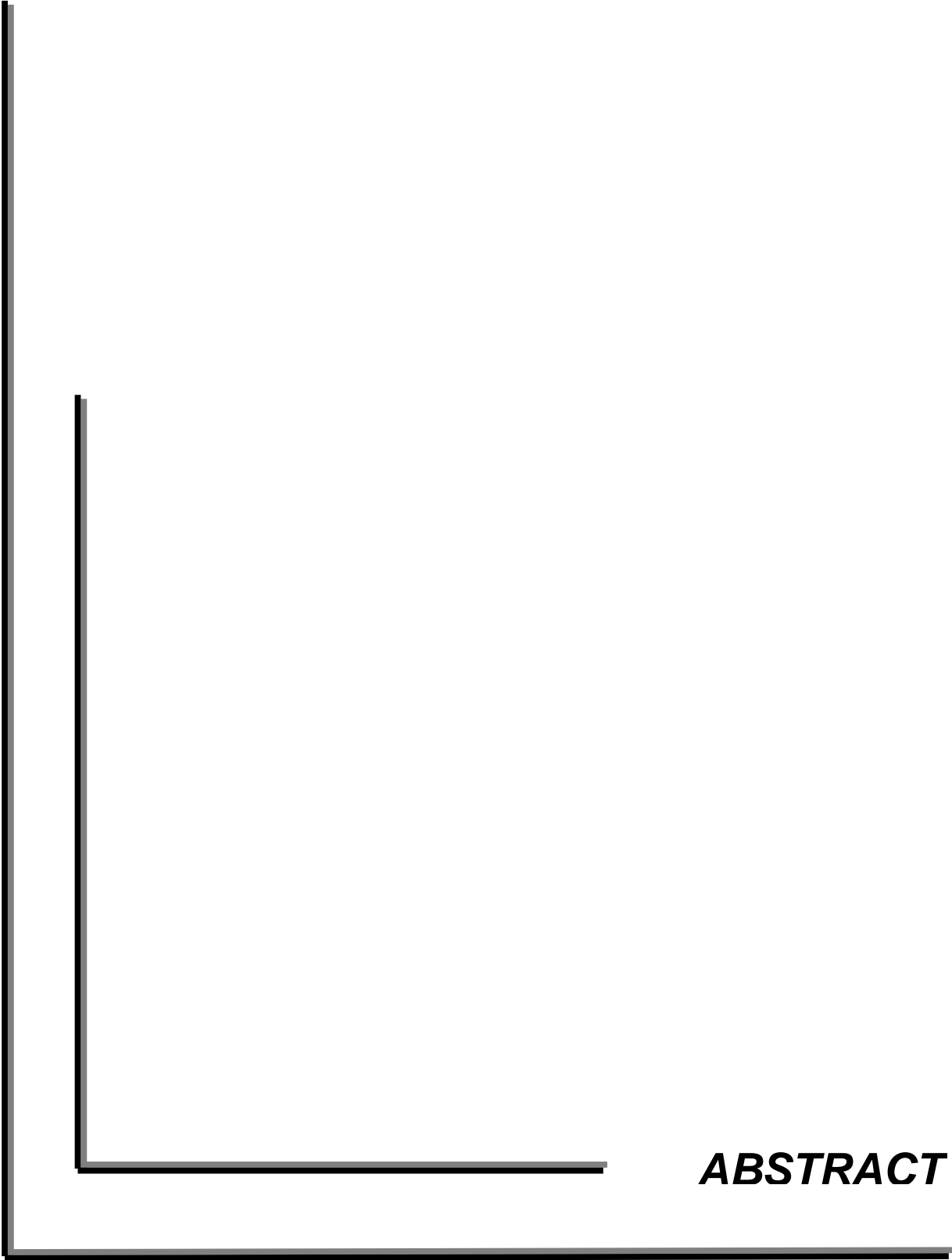
RESUMO

O Papilomavírus Humano (HPV) está associado à neoplasia intraepitelial cervical uterina (NIC) e desempenha importante papel na carcinogênese. Diferenças subjetivas freqüentemente levam a discordâncias entre os examinadores quanto ao diagnóstico citológico e histológico de infecção pelo HPV, o que pode resultar em mudança na conduta terapêutica. O objetivo foi testar os critérios histológicos e citológicos utilizados para diagnóstico do HPV na cérvix uterina, comparando-os à presença do DNA viral detectado por PCR. Pela triagem citológica, 107 mulheres que apresentaram atipia foram submetidas à colposcopia, quando novas amostras foram coletadas para citologia e PCR e imagens suspeitas biopsiadas. Foi realizada PCR com “primers” MY09/11 e GP05/06+ e beta-globina amplificada como controle. Foram selecionadas 101 amostras para análise citológica (excluídas seis por artefatos de fixação) e realizadas 61 biópsias. A extração do DNA não foi possível em oito casos. Os critérios estudados na histologia foram paraceratose, acantose, atipia coilocitótica, binucleação, disceratose, mitose e número de mitoses; e na citologia, halo claro perinuclear, cromatina irregularmente distribuída, hiperchromatismo nuclear, perda da relação núcleo-citoplasmática, contorno nuclear irregular, bi-multinucleação (em células superficiais e imaturas), fila indiana e formação sincicial com atipia (somente em células imaturas) e disceratose. Os diagnósticos histológicos foram: 11 cervicites crônicas (CC); 36 NIC (13 NIC I ; 10 NIC II; 13 NIC III) e 14 sugestivos para HPV (SHPV). O HPV foi encontrado em 37,5% das CC, 77,4% das NIC (91,7% das NIC I, 66,7% das NIC II e 70% das NIC III) e em 64,3% dos SHPV.

Dentre os critérios histológicos, os que mais se correlacionaram ao HPV foram atipia coilocitótica (VPP = 72,7%) e binucleação (VPP = 77,1%), porém, com baixa especificidade, 29,4% e 52,9% respectivamente. Em conjunto, atipia coilocitótica, disceratose e binucleação apresentaram VPP de 72,4%, podendo ser utilizadas como marcadores de infecção pelo HPV, devendo, porém, ser considerado que há uma chance aproximada de 27,6% de um resultado falso positivo. Dentre os critérios citológicos associados a células imaturas para detectar NIC III histológica, formação sincicial com atipia obteve o maior VPP (69,2%), seguida de cromatina

irregularmente distribuída (62,5%). Os VPNs para HPV-DNA dos critérios estudados das células superficiais ou imaturas foram baixos, ao redor de 40% e os VPPs, relativamente elevados, variando entre 50% e 93,9% (superficiais) e entre 76,9% e 100% (imaturas), sendo os maiores, fila indiana (VPP = 100%) e halo claro perinuclear em células superficiais (VPP = 93,9%). Portanto, diante do aparecimento de um destes critérios, pode ser inferida, razoavelmente, a infecção pelo HPV.

Houve concordância intermediária na detecção do HPV-DNA entre os dois pares de “primers” (Kappa = 0,4972). O par de “primers” GP5+/GP6+ detectou DNA de HPV em 63% das amostras que permitiram amplificação. Com o par MY09/11, foram detectadas 36% de amostras positivas. Destas, destacaram-se os tipos de HPV por RFLP em 71,9% dos casos, sendo o HPV 16 o mais freqüente (40,6%).



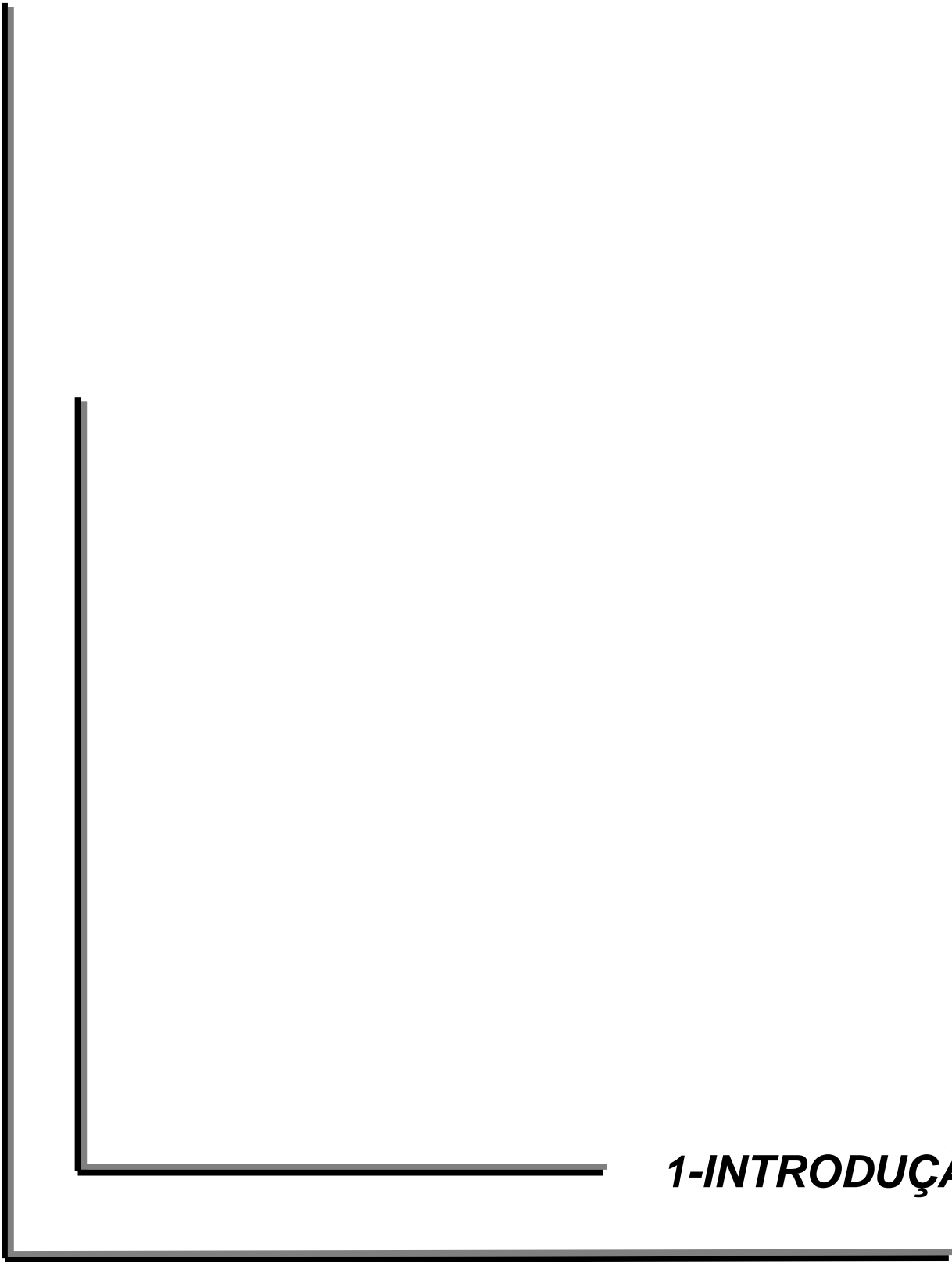
ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is associated to uterine cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and has an important role in cervical cancer. Subjective differences in evaluation lead to disagreement among examiners in relation to the cytological and histological diagnosis of HPV infection, which can lead to changes in clinic management. The aim of the present study was to test the histological and cytological criteria used for detection of HPV in uterine cervix, by comparing to the presence of viral DNA as detected by PCR. By cytological screening, 107 women with atypia were submitted to colposcopy, when new samples were collected for cytology and PCR and suspicious images were biopsied. The PCR assay was performed with primers MY09/11 and GP05/06+ and, as control, beta-globin was amplified. For cytological analysis, 101 samples were selected (6 excluded due to fixation artifacts) and 61 biopsies taken. DNA extraction was not possible in 8 cases. Parakeratosis, acanthosis, koilocytotic atypia, binucleation, dyskeratosis and number of mitoses were assessed histologically; and clear perinuclear halos, irregularly distributed chromatin, hyperchromatic nuclei, increased nuclear-cytoplasmic ratio, irregular nuclear outline, binucleation (in superficial and immature cells), indian files, formation of syncytia with atypia (in immature cells only) and dyskeratosis were examined in cytological preparations. The histological diagnoses were: 11 chronic cervicitis (CC); 36 CIN (13 CIN I; 10 CIN II; 13 CIN III) and 14 suggestive of HPV (SHPV). HPV was found in 37.5% of CC, 77.4 % of CIN (91.7% of CIN I, 66.7% of CIN II and 70% of CIN III) and 64.3% of SHPV.

Among the histological criteria, the most highly correlated to HPV were koilocytotic atypia (positive predictive value or PPV = 72.7%) and binucleation (PPV = 77.1%). However, specificity was low: 29.4% and 52.9% respectively. Taken together, koilocytotic atypia, dyskeratosis and binucleation showed PPV of 72.4%. They could be used as markers of HPV infection, but false positive results were found in 27.6%. Among cytological criteria associated to immature cells for detection of CIN III, formation of syncytia with atypia had the highest PPV (69.2%), followed by irregularly distributed chromatin (62.5%).

The negative predictive values (NPV) for HPV-DNA involving superficial or immature cells were low (about 40%). PPV were relatively high, ranging from 50% to 93.9% (superficial cells) and from 76.9% to 100% (immature cells). The highest were indian

files (PPV=100%) and clear perinuclear halos in superficial cells (PPV=93.9%). HPV infection can be considered positive when one of these criteria is found. There was partial concordance in the detection of HPV-DNA among pair of primers (Kappa=0.4972). The pair of primers GP5+/GP6+ detected HPV-DNA in 63% of samples, in which amplification was permitted, while primers MY 09/11 detected 36%. In the latter, it was possible to identify HPV type in 71.9% of the cases using restriction fragment length polymorphisms , HPV 16 being the most frequent (40.6%).



1-INTRODUÇÃO

1.1-ASSOCIAÇÃO DO HPV COM O CÂNCER DO COLO UTERINO

Há um consenso de que o Papilomavírus Humano (HPV) está associado ao câncer cervical. As evidências incluem um corpo grande e consistente de estudos (BOSCH, 2001). Esta associação foi reconhecida por várias revisões desde os anos 90 (HO et al., 1998; GU et al., 1997). Após o desenvolvimento de novos “primers” que são segmentos de DNA iniciadores da reação para a detecção do DNA do HPV por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), ficou claro que o Papilomavírus Humano tem um importante papel no desenvolvimento do câncer cervical porque se provou que quase todas as amostras desta neoplasia contêm DNA do HPV (BOSCH et al., 1995; ROLON et al., 2000). Assim, há uma forte evidência de que o DNA do HPV parece ser um fator necessário para o aparecimento de câncer cervical (SOLOMON et al., 2001; BOSCH et al., 1995). Estudos de coorte têm demonstrado que a presença e persistência do DNA-HPV são necessárias para o desenvolvimento da neoplasia cervical e o seu desaparecimento prediz a regressão da neoplasia (IARC, 2002; NOBBENHUIS et al., 1999; KOUTSKY et al., 1992; WALLIN et al., 1999).

1.2-LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS OU PRECURSORAS DO CÂNCER

As lesões intraepiteliais cervicais podem ocorrer na endocérvice ou na ectocérvice. A maioria surge no epitélio escamoso que reveste a ectocérvice uterina ou no epitélio metaplásico escamoso que surge a partir do epitélio glandular endocervical. No epitélio escamoso, são denominadas de lesões escamosas intraepiteliais cervicais, neoplasia intraepitelial cervical ou displasia-carcinoma *in situ* de acordo com a Organização Mundial da Saúde - OMS (SCULLY et al, 1994). São classificadas em três graus que dependem de sua extensão e gravidade e denominadas: neoplasia intraepitelial cervical (NIC) graus I, II e III. Uma outra nomenclatura também existente na literatura, em analogia à classificação de Bethesda (BETHESDA SYSTEM, 2001) é a de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LIEBG) e de alto grau (LIEAG). Apesar de mais simples e, logicamente, permitir uma maior concordância entre os

diagnósticos, esta classificação ainda não foi adotada pela OMS. A LIEBG, que corresponde à NIC I da OMS, apresenta leve desarranjo arquitetural do epitélio associado à presença de sinais morfológicos sugestivos de infecção pelo HPV ou, apenas os sinais morfológicos sugestivos de infecção pelo HPV. A LIEAG corresponde às NIC II e NIC III/carcinoma *in situ* da OMS. Esta estratificação está baseada em critérios estabelecidos morfolologicamente e sua finalidade é definir grupos de acordo com o seu comportamento biológico, o que permite aos clínicos escolher a metodologia mais adequada para o tratamento e seguimento. Embora amplamente usada, sabe-se que existe sempre certa subjetividade na interpretação dos dados morfológicos e a concordância entre observadores na graduação das NIC não é alta, sendo, de um modo geral, ainda menor, nas NIC I (SPITZER et al, 1990; KURMAN et al, 1991; LAZCANO PONCE et al, 1997; DE RUIZ et al, 1996; CIATTO et al, 1996; YOUNG et al, 1994).

1.3-HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO HPV

A história natural da maioria dos cânceres cervicais se inicia a partir de uma doença infecciosa associada ao HPV que leva a anomalias celulares do epitélio ou lesões intraepiteliais propriamente ditas. Sabe-se que a lesão de baixo grau pode evoluir e se tornar de alto grau, porém está bem estabelecido que a maioria das lesões de baixo grau tende a desaparecer espontaneamente (BOSCH et al., 1995). A NIC III é o último estágio antes do câncer. Por este motivo, costuma ser usada como um ponto de corte (também chamado de “endpoint”) em vários estudos epidemiológicos a fim de se testar tecnologias novas, candidatas a se tornarem ferramentas epidemiológicas na prevenção do câncer cervical (embora o “endpoint” verdadeiro seja o estágio de câncer cervical propriamente dito ou de óbito por câncer cervical (CUZICK, 2001)).

1.4-ASSOCIAÇÃO DO HPV COM A LESÃO INTRAEPITELIAL ESCAMOSA

Vários estudos mostraram que o HPV está relacionado tanto às lesões chamadas de precursoras (NIC) quanto aos cânceres invasivos avançados (SCHIFFMAN et al., 1993; MUNOZ et al., 1993; OLSEN et al., 1995; KJAER et al.,

1996; HERRERO et al., 2000; SCHIFFMAN et al., 2000). Com o desenvolvimento dos métodos de detecção do DNA viral em amostras cervicais, a prevalência de DNA do HPV em lesões de intraepiteliais de baixo e alto grau elevou-se a níveis de 80%-90% (SOLOMON et al., 2001).

Dados do estudo longitudinal LUDWIG-MCGILL (SCHLECHT et al., 2001) envolvendo 2.404 mulheres na cidade de São Paulo mostraram que aquelas infectadas por um período de oito meses, comparadas com as sem infecção, com dois exames citológicos negativos, têm risco relativo cerca de 11 a 12 vezes maior para o desenvolvimento de lesão intraepitelial escamosa citológica de alto grau. Sabe-se que mulheres portadoras do DNA do HPV têm risco aumentado em cerca de 100 vezes para o desenvolvimento do câncer e, especificamente, portar o HPV 18 representa um risco aumentado em 1.000 vezes para o desenvolvimento do adenocarcinoma cervical em relação às mulheres que não são portadoras deste vírus (BOSCH et al., 2001).

1.5-O VÍRUS

1.5.1-Taxonomia

Os *Papillomavirus* formavam um gênero que, juntamente com os *Polyomavirus*, constituíam a família **Papovaviridae** e até a 7^a edição do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, 2004). Esta família foi originalmente nomeada agrupando-se os vírus que produziam **papiloma** (pa) nos coelhos, os vírus que produziam o **polyoma** (po) dos ratos e os vírus que produziam lesões com alterações **vacuolares** (va) nos macacos, os SV40 (vacuolating vírus) (PAPOVAVIRUSES, 1999). Atualmente, o gênero *Papillomavirus* assinalado com o número 00.099.0.01 pelo ICTV constitui a família *Papillomaviridae* assinalada com o número 00.099 (ICTV, 2004). Este nome é derivado em parte do latim, *papilla* significando mamilo ou pústula e em parte do grego: o sufixo *oma* significa tumor; ou seja, tumor que forma mamilos ou papilas. O nome oficial da espécie é representado pelo nome do hospedeiro em itálico seguido do nome do gênero, por exemplo, *Bovine papillomavirus*, *Canine oral papillomavirus*, *Cottontail rabbit*

papillomavirus, *European elk papillomavirus*, *Human papillomavirus*, *Ovine papillomavirus*.

Os *Papillomavirus* são caracterizados por serem isométricos quanto à morfologia, pequenos e similares entre si à microscopia eletrônica, constituídos por fita dupla de DNA, apresentando configuração genômica circular com tamanho de cerca de 8.000 pares de bases nitrogenadas (pb) (Figura 1).

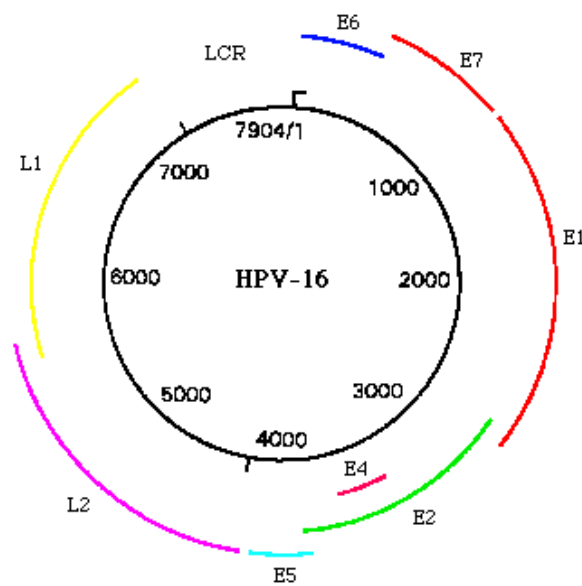


Figura 1-Representação esquemática do genoma do HPV-16

L (Late) – Genes que se expressam tardiamente no ciclo vital do vírus.

E (Early) – Genes que se expressam precocemente no ciclo vital do vírus.

LCR (Long Control Region) – Gene que fica entre o final de L1 e início de E6.

São livres de lipídios, infectam animais vertebrados, chimpanzés, macacos, cães, cavalos, alces, bois (seis tipos), ovelhas, elefantes, tartarugas, ratos, papagaios, gambás, camundongos e uma única espécie de ave chamada tentilhão (ICTV, 2004). Eles têm tropismos por epitélio e mucosas, sendo freqüentemente encontrados na mucosa cérvico-vaginal da mulher, onde podem

permanecer por longos períodos sem causar sintomatologia ou desaparecer em função da resposta imunológica individual.

1.5.2-Tipos virais

Há mais de 3.600 espécies de vírus já identificadas. Mais de 30.000 vírus estão sendo estudados no mundo segundo o ICTV. Com o avanço das técnicas de detecção, elevou-se o número de seqüências de HPV encontradas na natureza (Tabela 1). Atualmente, há 86 seqüências publicadas no banco de dados do NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI, 2004).

Tabela 1: Número de seqüências de HPV identificadas ao longo dos anos

▪ 1976	4	▪ 1986	40
▪ 1980	6	▪ 1989	60
▪ 1982	1	▪ 1997	77
▪ 1983	24	▪ 2004	86

Consideram-se tipos de alto e baixo risco de malignidade, cuja diferença está no papel transformante dos produtos (oncoproteínas) dos genes E6 e E7. As proteínas codificadas por E6 e E7 se ligam, respectivamente, às proteínas p53 e pRB, que são proteínas reguladoras do ciclo celular, consideradas supressoras do câncer. Este fenômeno leva ao desbloqueio do ciclo celular e instabilidade genética, o que provoca alterações genéticas adicionais que levam ao câncer por impedirem a apoptose, causando o fenômeno de imortalização celular. Este processo é encontrado somente nos vírus de alto risco, não sendo observado nos de baixo risco (HELT et al, 2002). Além disto, foi observado que há quatro mutações do gene E6 do HPV 16 que não estimulam a degradação da proteína p53, impedindo a replicação viral estável, sugerindo que esta atividade possa ser necessária para a manutenção do vírus na forma epissomal. Também

foi demonstrado que o gene E6 do HPV 31 tem um papel essencial na manutenção do vírus na forma episomal em queratinócitos humanos. Uma mutação de ponto no gene E7 que impede que seu produto se ligue à proteína RB tem sido descrita como causadora da incapacidade do HPV 31 de replicação estável (PARK e ANDROPHY, 2002). Porém, estudos experimentais mostram que o genoma do HPV 31, o qual possui duas de três mutações do gene E6 que tornam seu produto incapaz de induzir à degradação da proteína p53, combinada com a mutação de ponto do gene E7, foi mantido como epissoma replicante, sugerindo que o equilíbrio entre as funções de E6 e E7 é crítico para a manutenção episomal do genoma do HPV de alto risco (PARK e ANDROPHY, 2002).

Os tipos ano-genitais mais freqüentes (DOCUMENTO DE CONSENSO, 2004) de acordo com o risco de malignidade são:

1. Alto risco : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82;
2. Potencialmente oncogênicos: 26, 53 e 66;
3. Baixo risco : 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81.

1.6-ESTRATÉGIAS PARA PREVENÇÃO DO CÂNCER CERVICAL

Historicamente, a maior parte dos países estabeleceu políticas de prevenção do câncer cervical usando o exame citológico de Papanicolaou como triagem para detectar as lesões precursoras. Se houver uma alteração compatível com NIC, a paciente é submetida à colposcopia e biópsia de eventual área suspeita. O diagnóstico histológico baseia-se em critérios morfológicos, descritos pela OMS (SCULLY et al., 1994). A maioria dos estudos que estabelecem relação entre lesão intraepitelial escamosa com HPV e câncer cervical foi realizada usando-se a biópsia como padrão ouro a fim de se testar tipos específicos do DNA do HPV como possíveis candidatos a marcadores com valor preditivo para o desenvolvimento do câncer. Portanto, os critérios usados para o diagnóstico histológico que sugerem a presença do HPV na amostra cervical são muito

importantes, pois definem um grupo de mulheres com risco aumentado para câncer cervical. Nos últimos cinco anos, tem-se discutido a utilidade de testes que detectam o DNA do HPV antes da colposcopia para casos com diagnóstico citológico suspeito para lesão intraepitelial ou atipia de células escamosas de significado indeterminado (WALLIN et al., 1999). Alguns estudos epidemiológicos defendem o uso destes testes tanto para selecionar para a colposcopia casos que poderiam evoluir para NIC II ou III, quanto para afastar os casos que certamente não evoluirão para lesão intraepitelial escamosa de alto grau, propondo o estabelecimento de novos marcadores com valores preditivos positivos e negativos em relação ao desenvolvimento de NIC III (ZIELINSKI D.G, et al., 2001; CUZICK, 2001).

1.7-MARCADORES DE INFECÇÃO PELO HPV

Atualmente, há uma forte tendência à quantificação de marcadores que já são conhecidos intuitivamente do ponto de vista qualitativo para melhor conhecer e agrupar os critérios diagnósticos, classificando-os de acordo com sua evolução. Transforma-se o fenômeno em dado qualitativo que é a representação simbólica ou numérica do evento, o que permite ao observador analisar o evento com a versatilidade dos números e suas operações, quantificá-lo, normatizá-lo, conferindo um caráter objetivo à observação (PEREIRA, 2001). Na patologia cervical, ROTELI-MARTINS et al. (2001a) avaliaram os critérios morfológicos das lesões induzidas pelo HPV e neoplasias intraepiteliais cervicais, observando que a atipia colicitótica isoladamente é o mais poderoso fator discriminante entre NIC I e lesões não induzidas pelo HPV. Em outro estudo, os mesmos autores avaliaram o valor dos critérios morfológicos histológicos, binucleação, colicitose, colócitos fusiformes, mitoses anormais e disceratose no diagnóstico do HPV confirmados por captura híbrida e hibridização *in situ*. Dentre esses, multinucleação, binucleação e mitoses anormais estiveram significativamente associadas ao DNA do HPV e a multinucleação provou ser o mais forte fator preditivo para a positividade do DNA do HPV. Entretanto, a binucleação, mitose anormal,

coilocitose e coilócito fusiforme também foram considerados critérios confiáveis para lesão pelo HPV. Leves atipias nucleares e leve coilocitose não tiveram valor para concluir este diagnóstico (ROTELI-MARTINS et al., 2001b).

1.8-TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE DNA VIRAL

Há várias técnicas de detecção de DNA viral, dentre as quais destacam-se quatro, cujas diferenças estão sumarizadas na Tab. 2:

1. Captura de híbridos: somente realizada *in filtro*.
2. Hibridização: *in situ*, ou seja, em lâminas provenientes de biopsia ou citologia ou *in filtro* a partir de líquidos e secreções
3. Imunoistoquímica: *in situ*.
4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) que pode ser realizada *in situ* ou *in filtro*.

1.8.1-Captura de híbridos (HC)

Baseia-se em uma reação de hibridização molecular que utiliza sondas não radioativas com amplificação da detecção de híbridos por quimioluminescência, utilizando amostra líquida. Permite a detecção por grupos de risco, baseada na pesquisa de 18 sondas dos HPV mais freqüentes, além de permitir avaliação de carga viral. O grupo A possui sondas para os HPV de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44), e o grupo B, sondas para os HPV de risco intermediário ou alto (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68). Sua sensibilidade é de 1 pg/ml de DNA-HPV, equivalente a 0,1 cópia de vírus/célula. Porém, pode apresentar reações cruzadas e não permite especificar o tipo viral; não detecta tipos que possam estar presentes na amostra e que não tenham homologia com as sondas testadas, além de não preservar a morfologia dos tecidos, já que necessita de amostra líquida.

1.8.2-Hibridização *in situ* e imunoistoquímica

São técnicas bastante específicas, porém pouco sensíveis, o que é explicado por necessitarem ou de DNA íntegro em grande quantidade no tecido, no caso da hibridização *in situ* ou, de seqüências virais com capsídeo íntegro, no caso da imunoistoquímica. Ambas têm a vantagem de preservar a morfologia do tecido, permitindo marcar a célula infectada. A técnica de imunoistoquímica detecta antígenos do capsídeo viral através de um anticorpo que, a seguir, é revelado por um sistema imunoenzimático (geralmente peroxidase) que propicia coloração permanente com corantes do tipo da diaminobenzidina. Esta técnica permite detectar apenas se existe o HPV no tecido, não sendo específica para nenhum tipo em particular, nem mesmo para os HPV humanos, pois o anticorpo reage cruzadamente com o Papilomavírus bovino. (ANDRADE et al, 1991; VASSALLO et al, 1999). A técnica de hibridização *in situ* detecta segmentos do DNA viral presentes na célula infectada por meio de sondas de DNA marcadas geralmente com fluoresceína ou biotina. Após a hibridização realizada, expondo-se a célula-teste com a sonda, a reação é revelada por um sistema imunoenzimático (geralmente peroxidase) que propicia coloração permanente com corantes do tipo da diaminobenzidina (semelhante ao estudo imunoistoquímico). A coloração específica se dá no núcleo das células onde o vírus se replica. Esta técnica permite detectar o tipo infectante, havendo sondas comerciais para os HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33 etc., e um “coquetel” para vários tipos, denominada sonda “wide spectrum” ou de amplo espectro. (VASSALLO et al, 1999; VASSALLO et al, 2000).

1.8.3-Reação em cadeia da polimerase

A técnica de “polymerase chain reaction” ou reação em cadeia da polimerase, também conhecida como PCR, é uma técnica de síntese de ácidos nucléicos *in vitro*, pela qual um segmento específico de DNA é replicado. Pode ser realizada *in situ*, a partir de lâminas de exame histológico ou citológico ou, *in filtro*,

a partir de líquidos provenientes de secreções, sangue ou líquido de cavidades. Para que ela ocorra, são necessários:

A. **SUBSTRATO:** DNA extraído a partir de diversos tipos de amostras como: secreções: (cérvico-vaginal,oral,etc), líquido amniótico (utilizado na investigação de paternidade), sangue (manchas na cena do crime), tecido fresco, material formolizado, material parafinado, bulbo capilar, ossos.

B. REAGENTES:

- a) Um par de “primers” ou iniciadores de reação: pequena seqüência de DNA que inicia a reação caso seja complementar a uma região do DNA molde;
- b) Desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs): unidades do DNA;
- c) Taq DNA polimerase: enzima que adiciona os dNTPs às novas fitas, sintetizadas por extensão dos “primers”.

Prepara-se uma solução em um microtubo que será colocado em um termociclador, aparelho utilizado para automatizar ciclos de elevação e diminuição da temperatura com o objetivo de desnaturar as fitas de DNA na primeira fase, atingindo, logo após, a temperatura ideal para anelamento (ou hibridização). Estes, se forem complementares, se ligarão a uma região específica da fita molde e darão início à formação de uma nova fita de DNA complementar à mesma. Esses dois pares de “primers” atuam em sentidos opostos, um para cada fita molde e a amplificação sempre se dá no sentido 5' ► 3'. Ao final de vários ciclos, obtém-se um fragmento de tamanho definido que pode ser visualizado sob iluminação de UV, após eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídio. A enzima termoestável que liga os nucleotídeos à fita molde é chamada de Taq DNA polimerase, cujo nome se deriva da bactéria *Thermus aquaticus* de onde é proveniente. Em suma, a reação ocorre basicamente em três fases:

1. Desnaturação do DNA que ocorre entre 94 e 96°C.
2. Anelamento dos “primers” com as seqüências complementares do DNA molde entre 50 a 65 °C.
3. Extensão, por meio da ação da enzima Taq DNA polimerase a 72°C.

Em relação ao PCR do material parafinado, *in situ* ou *in filtro*, há estudos mostrando que a fixação em formaldeído produz alterações na estrutura do DNA do tecido, dependendo do tipo de tecido e tempo de fixação. Estas alterações na estrutura do DNA são mais importantes que a própria quantidade de DNA extraída da amostra em termos de performance do PCR . A eficiência da amplificação está diretamente relacionada ao tamanho dos produtos a serem amplificados exatamente por causa destas alterações de estrutura. Somente oito horas de fixação em formaldeído são suficientes para inibir a amplificação de seqüências maiores que 421 pb (KARLSEN et al.,1994).

Há estudos comparativos entre as técnicas de HC e PCR, demonstrando que as sondas usadas na HC de segunda geração para HPV de alto risco detectaram os tipos 6, 11, 40, 42, 53, 55, 66, 70, MM4, MM7, MM8 e MM9, que são de baixo risco, caracterizando um subgrupo com resultado falso positivo (SOLOMON et al., 2001).

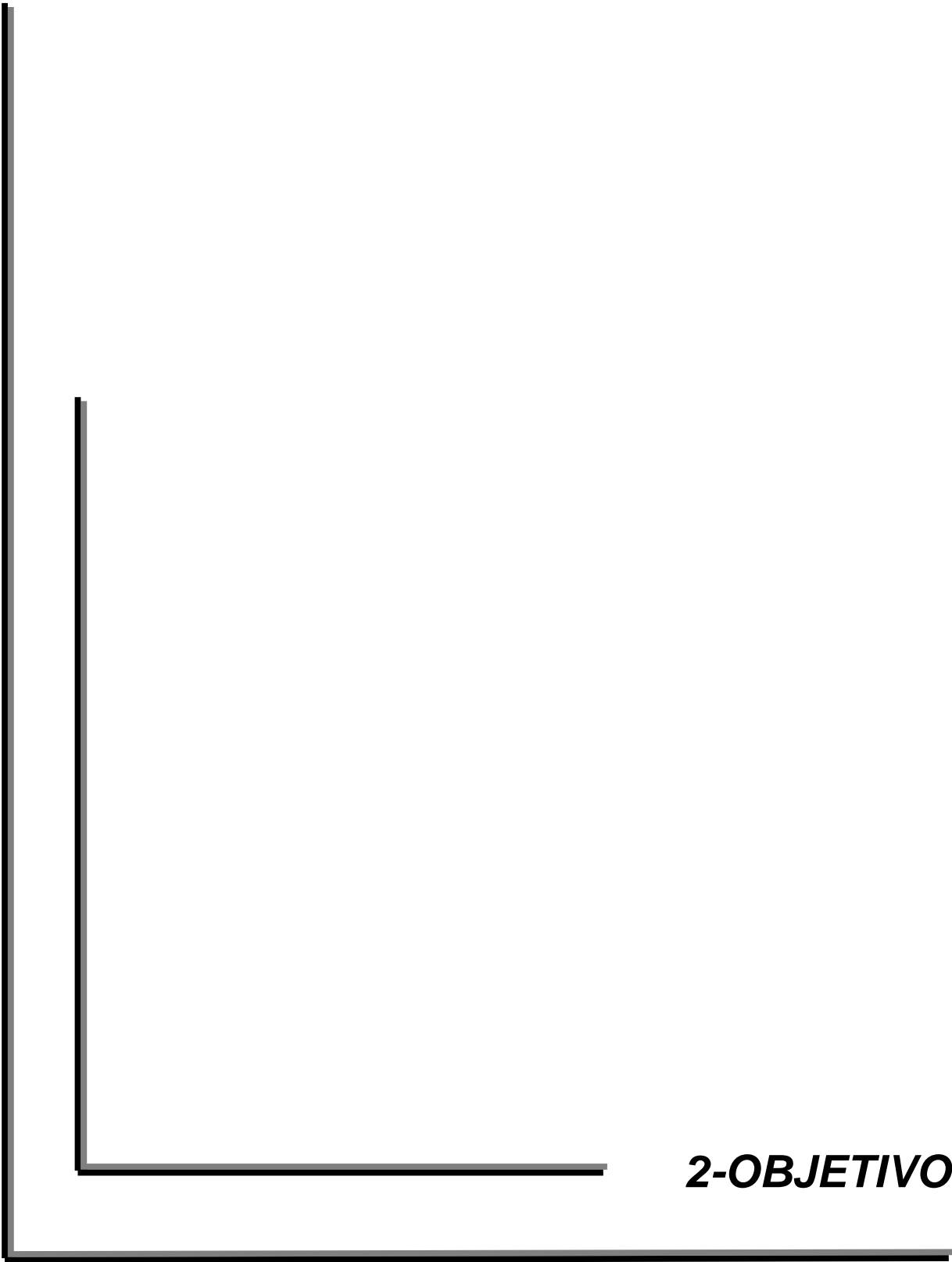
Tabela 2-Quadro comparativo entre as técnicas de detecção do HPV.

	Captura de Híbridos	PCR	IMPX / HIS
Amostra	Líquida	Líquida ou parafinada	Líquida ou parafinada
Morfologia do tecido	Não preserva	Não preserva	Preserva
Conservação	Líquido	Líquido	Lâminas
Carga Viral	Sim	Não	Não
Sensibilidade	Boa	Padrão ouro	Moderada
% Detecção/tipo	18 sondas investigadas	Todos os tipos (100%)	Sondas Investigadas
Forma de detecção	Por grupos de risco	Tipo específico Ex: HPV 16	Tipo específico
Reações cruzadas	Sim	Não	Não

PCR: Reação em cadeia da Polimerase - IMPX: Imunoistoquímica. HIS: Hibridização *in situ*.

1.9-JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Conhecendo: a) a relativa dificuldade para o diagnóstico das lesões intraepiteliais cervicais (LIC) ou NIC e da infecção pelo Papilomavírus Humano em amostra cérvico-vaginal, que é sugerido nos laudos anatomopatológicos baseado em critérios morfológicos citológicos e histológicos; b) que as LIC têm caráter evolutivo, podendo progredir para o câncer cervical; c) que a presença e persistência da infecção pelo HPV está associada a um risco elevado para o desenvolvimento do câncer cervical (particularmente dos tipos de alto risco); c) que esta é uma infecção cuja forma de contágio mais freqüente é por via sexual; d) que a técnica de PCR é a mais sensível de que se dispõe na atualidade para verificar a presença do DNA viral em amostras biológicas; entende-se que o diagnóstico presuntivo de infecção pelo HPV tem conseqüências na história familiar da pessoa por ser uma infecção sexualmente transmissível e ainda pressupõe que esta pessoa faz parte de um grupo de risco aumentado para o câncer cervical. Portanto, pretende-se avaliar estes critérios morfológicos, comparando-os com o resultado da pesquisa de DNA de HPV, estabelecendo graus de concordância e valores preditivos, a fim de oferecer ao patologista dados que permitam referir a probabilidade da infecção, aumentando, conseqüentemente, a precisão e acurácia do diagnóstico.



2-OBJETIVOS

2.1-OBJETIVO GERAL

Avaliar os critérios morfológicos citológicos e histológicos utilizados para o diagnóstico do HPV nas lesões cervicais uterinas e compará-los com a presença do DNA do vírus na secreção cérvico-vaginal.

2.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os diagnósticos histológicos com a presença do DNA do HPV na amostra cervical.
- Comparar os critérios morfológicos histológicos, individualmente ou agrupados com a presença do DNA do HPV na amostra cervical, e definir valores preditivos para a infecção.
- Comparar os diagnósticos e critérios morfológicos citológicos com o diagnóstico histológico de NIC (NIC qualquer, NIC I, NIC II ou NIC III), e definir os critérios com maior valor preditivo para estes diagnósticos.
- Comparar os critérios morfológicos citológicos, individualmente ou agrupados, com a presença do DNA do HPV na amostra cervical, e definir valores preditivos para a infecção.



**3-CASUÍSTICA E
MÉTODOS**

3.1-SELEÇÃO DE PACIENTES E TÉCNICAS

3.1.1-Seleção de pacientes

Este é um estudo transversal de validação diagnóstica aprovado pelo Comitê de Ética Institucional local em que as mulheres participantes assinaram, previamente, termo de consentimento. Cento e sete (107) mulheres do Centro de Saúde de Campinas, SP, com atipia no esfregaço de Papanicolaou, foram submetidas a exame ginecológico completo inclusive com colposcopia. Neste exame, foi coletada nova amostra para exame citológico por meio de escova endocervical raspada sobre a superfície de duas lâminas, cujo material foi fixado por meio de solução de carboxol aplicado sobre a superfície das mesmas. Essa mesma escova foi imersa em frasco estéril contendo 1 ml de DNAzol (Invitrogen™) e enviada ao laboratório para realização de PCR. Além disso, foram realizadas sessenta e uma (61) biópsias de áreas suspeitas à colposcopia. A primeira citologia não foi revista nesse estudo.

3.1.2-Seleção de “primers”

Elegeram-se a técnica de PCR com os sistemas MY e GP porque há estudos prévios mostrando diferenças nas sensibilidades e características destes dois sistemas (SNIJDERS et al., 1990; QU et al., 1997) que, se utilizados em conjunto, tornam o método de detecção do DNA do HPV extremamente sensível.

Nesse estudo, utilizaram-se dois pares de “primers” para detecção do HPV e um par para amplificação do gene da beta-globina como controle interno da reação: MY09/MY11, GP5+/GP6+, KM29/RS42 respectivamente (Tabela 3). Os dois primeiros flanqueiam uma seqüência que pertence a uma região chamada de L1 do genoma viral (Figura 2). A letra “L” é a abreviatura de “Late”, que, em inglês, se refere a uma região que se expressa tardiamente no ciclo vital do vírus. Essa é uma região conservada, estando presente em todos os tipos virais e, portanto, serve como marcadora, prestando-se à detecção de todos os tipos virais. O par de primers MY09/11 flanqueia uma seqüência de cerca de 450 pb, enquanto o par GP5+/GP6+, uma seqüência de cerca de 150 pb, interna à seqüência

flanqueada pelo par MY (Figura 2). O par MY é sintetizado a partir de vários nucleotídeos degenerados em cada “primer” e é, na verdade, uma mistura de 25 “primers” capazes de identificar um amplo espectro de tipos de HPV. Já o par GP5+/GP6+ consiste de uma seqüência fixa de nucleotídeos para cada “primer” (Tabela 3). Esse par usa baixa temperatura de anelamento durante o PCR (QU et al., 1997; DE RODA-HUSMAN et al., 1995), trabalhando abaixo de sua temperatura ideal, ou em baixa estringência. Isto permite que se anelize com a fita molde, mesmo que não haja total complementaridade, possibilitando a detecção de um amplo espectro de tipos de HPV, até mesmo aqueles que possuam leves alterações em suas seqüências na região conservada L1 (Quadro 1).

Tabela 3-Seqüências dos primers genéricos para detecção do HPV e de beta globina

CÓDIGO	NÚMERO DE NUCLEOTÍDEOS	SEQÜÊNCIA
KM29	20	GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG
RS42	20	GCTCACTCAGTGTGGCAAAG
MY11	20	GCMCAGGGWCATAAYAATGG
MY09	20	CGTCCMARRGGAWACTGATC
GP5+	23	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
GP6+	25	GAAAATAAACTGTAAATCATATTC

Quadro 1- Primers genéricos GP5+/GP6+ para detecção de genótipos de HPV genitais. Raras bases não se pareiam com determinados tipos virais.

GP5	5'	T	T	T	G	T	T	A	C	T	G	T	G	G	T	A	G	A	T	A	C	3'
HPV 6b		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HPV 11		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HPV 16		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	T	-	-	-	-	-	-	
HPV 18		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HPV 31		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HPV 33		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
GP6	3'	A	C	T	A	A	A	T	G	T	C	A	A	A	T	A	A	A	A	A	G	5'
HPV 6b		-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HPV 11		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HPV 16		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HPV 18		-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HPV 31		-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	
HPV 33		-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	

5521 tatagttcca ggtctccac aatatacaat tattgctgat gcaggtgact tttatttaca
 5581 tcctagttat tacatgttac gaaaacgacg taaacgttta ccatatTTTT tttcagatgt
 5641 ctctttggct gcctagtgag gccactgtct acttgcctcc tgtcccagta tctaaggttg
 5701 taagcacgga tgaatatggt gcacgcacaa acatatatta tcatgcagga acatccagac
 5761 tacttgacgt tggacatccc tattttccta ttaaaaaacc taacaataac aaaatattag
 5821 ttcttaaagt atcaggatta caatacaggg tatttagaat acatttacct gacccaata
 5881 agtttggttt tcctgacacc tcattttata atccagatac acagcggctg gtttgggct
 5941 gtgtaggtgt tgaggtaggt cgtggtcagc cattaggtgt gggcattagt ggccatcctt
 6001 tattaaataa attggatgac acagaaaatg ctagtgctta tgcagcaaat gcaggtgtgg
 6061 ataatagaga atgtatatct atggattaca aacaaacaca atttgtgtta attggttga
 6121 aaccacctat aggggaacac tggggcaaaag gatccccatg taccaatggt gcagtaaact
 6181 caggtgattg tccaccatta gagttaataa acacagttat tcaggatggg gatatggttc
 6241 aactggctt tgggtctatg gactttacta cattacaggc taacaaaagt gaagttccac
 6301 tggatatttg tacatctatt tgcaaatatc cagattatat taaaatgggt tcagaacct
 6361 atggcgacag ctattTTTT tatttacgaa gggaaacaaat gtttgttaga catttatta
 6421 atagggctgg tactgttggg gaaaatgtac cagacgattt atacattaa ggctctgggt
 6481 ctactgcaa tttagccagt tcaaattatt ttctacacc tagtggttct atggttacct
 6541 ctgatgcca aatattcaat aaaccttatt ggttacaacg **agcacagggc cacaataatg**
 6601 **gcattt**gttg ggtaaccaa ct**attt**gta **ctgtt**gta **tactac**acgc agtacaata
 6661 tgtcattatg tgctgccata tctacttcag aaactacata taaaaatact aactttaagg
 6721 agtacctacg acatggggag **gaatatgatt tacagttat ttttc**aactg tgcaaaataa
 6781 ccttaactgc agacgttatg acatacatac attctatgaa ttccactatt ttggaggact
 6841 ggaattttgg tctacaacct ccccaggag gcacactaga agatacttat aggtttgtaa
 6901 cccaggcaat tgcttgtcaa aaacatacac ctccagcacc taaagaagat gatcccccta
 6961 aaaaatacac tttttgggaa gtaaatttaa aggaaaagtt ttctgcagac ct**agatcagt**
 7021 **ttcctttagg acg**caaattt ttactacaag caggattgaa ggccaaacca aaatttacat
 7081 taggaaaacg aaaagctaca cccaccacct catctacctc tacaactgct aaacgcaaaa
 7141 aacgtaagct gtaagtattg tatgtatggt gaattagtgt tgtttgttgt gtatatgttt

Figura 2-Seqüência do gene L1 do HPV 16 (5526 a 7154, sentido 5' → 3')

Região de anelização dos primers:

- My09 e My11 (6583-6602/7015-7034) - - ➤
- GP5+ e GP6+ (6624-6649/6719-6746) ➤

3.2-PROCEDIMENTOS TÉCNICOS

3.2.1-Reação em cadeia da polimerase (PCR) com os “primers” MY 09/11

O tampão de DNAzol foi transferido para um microtubo de microcentrífuga de 1,5 ml com 500 µl de etanol 95%. A solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado; uma nova alíquota de 500 µl de etanol 95% foi adicionada, seguida de centrifugação. Este procedimento foi realizado por duas vezes. O DNA foi deixado para secar por 15 minutos à temperatura ambiente e ressuspensão em 50 µl de Tris-EDTA (10mM/1mM , pH 8,0). Para amplificar o DNA viral, foram utilizados “primers” genéricos MY 09/11 (BAUER et al., 1992; TACHEZY et al., 1994). Como controle interno da reação, foi amplificado o gene da beta-globina humana com os “primers” RS42 e KM29 (BAUER et al., 1992; TACHEZY et al., 1994). Este procedimento teve a finalidade de garantir o resultado negativo para HPV, pois, quando não se obtém a banda correspondente ao produto amplificado (proveniente de DNA de HPV) é necessário que se tenha certeza que a reação funcionou adequadamente. Esta confirmação se faz pela presença da banda correspondente ao produto de amplificação do gene da beta-globina. A reação foi realizada para um volume total de 50 µl contendo 1,5 µl de DNA ressuspensão, 10 mM dNTPs , 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 2,5mM MgCl₂, 20 pmol para cada “primer”, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™). A amplificação consistiu de desnaturação inicial por 5 minutos seguida por 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C. O produto do PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio (0,5 mg/ml) e examinado sob luz ultravioleta. O resultado foi considerado positivo para DNA viral quando duas bandas foram visualizadas, sendo uma com 450 pb, correspondente ao DNA do HPV e a outra com 550 pb, ao gene da beta-globina (Figura 3). Se apenas a banda de 550 pb foi visualizada, o resultado foi considerado negativo para HPV. Foram excluídas da análise as amostras negativas para o gene da beta globina.

3.2.2-Digestão enzimática com análise pelo polimorfismo dos tamanhos dos fragmentos de restrição (RFLP)

O HPV foi tipado por meio de digestão enzimática e posterior análise pelo polimorfismo dos tamanhos dos fragmentos de restrição (Figura 4). Foram utilizadas sete enzimas de restrição: *Bam* H1, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Pst* I, *Rsa* I e *Sau*3AI como descrito previamente por BERNARD et al.(1994). As digestões foram realizadas segundo o protocolo a seguir: 5 µL do produto da reação de PCR; 3,75 µL de H₂O ultrapura, 1,0 µL de tampão 10X, específico da enzima, e 5 U da enzima *Pvu* II, em um volume final de reação de 30 µL. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose ultrapura, corado com brometo de etídio (0,5 mg/ml) e examinado sob luz ultravioleta (Tabela 4).

3.2.3-Reação em cadeia da polimerase (PCR) com os “primers” GP5+/6+

Todas as amostras positivas para beta-globina foram, a seguir, submetidas à amplificação com “primers” GP5+/6+, os quais são internos à seqüência do MY 09/11 e geram um produto menor que o produto do par MY de 142 pb. O PCR foi realizado conforme descrito previamente (BERNARD et al., 1994; DE RODA-HUSMAN et al., 1995). A reação foi realizada para um volume total de 50 µl contendo 1,5 µl de DNA ressuspenso, 10 mM dNTPs , 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 20 pmol para cada “primer”, 1,5 U de Taq DNA polimerase (InvitrogenTM). A amplificação consistiu de desnaturação inicial por 3 minutos a 94 °C, seguida por 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 40°C e 1,5 minutos a 72°C seguido de 7 minutos a 72°C. O produto do PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio (0,5 mg/ml) e examinado sob luz ultravioleta. O resultado foi considerado positivo para DNA viral quando uma banda foi visualizada com cerca de 150 pb, correspondente ao DNA do HPV e negativo quando esta banda estava ausente (Figura 5). O resultado padrão ouro de PCR foi considerado positivo quando um dos testes com os “primers” MY09/11 ou GP5+ GP6+ detectaram DNA de HPV.

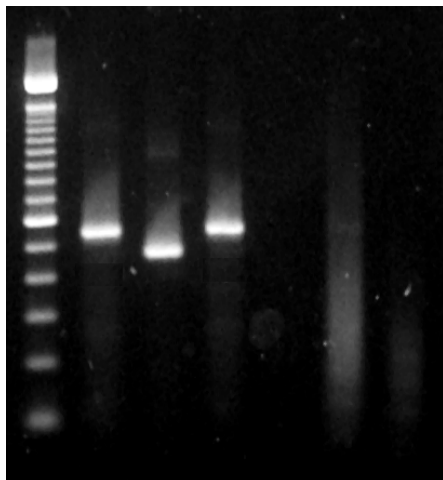


Figura 3-Gel de agarose de dois casos negativo e positivo para MY09/11

Colunas:

- 1: Ladder (as bandas variam de 100 em 100 pb).
- 2 e 3: paciente testada 1, 3 e 4: paciente testada 2.
- 2: Banda de beta globina (550 pb) da paciente 1.
- 3: Banda do HPV (450pb) da paciente 1.
- 4; Banda da beta globina (550 pb) da paciente 2.
- 5: Ausência de banda do HPV na amostra da paciente 2.
- 6- Ausência de bandas da beta globina (controle negativo: água + beta globina).
- 7- Ausência de banda em amostra de controle negativo externo (amostra de paciente HPV negativa + MY).

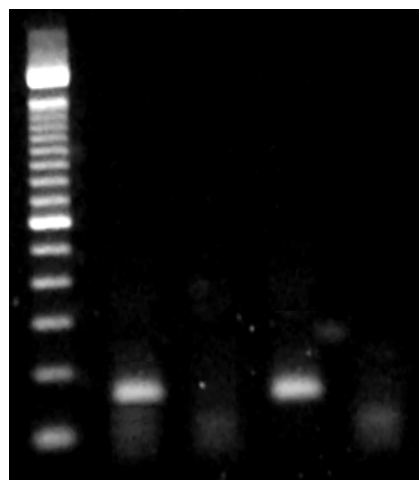


Figura 5-Gel de agarose de dois casos negativo e positivo para GP5/GP6+

Colunas:

- 1: Ladder (as bandas variam de 100 em 100 pb).
- 2: Banda do HPV (150 pb) da paciente testada 1.
- 3: Ausência de banda do HPV da paciente testada 2.
- 4: Banda do HPV (150pb) de amostra de controle positivo externo.
- 5: Ausência de banda em amostra de controle negativo externo (amostra de paciente HPV negativa + GP).

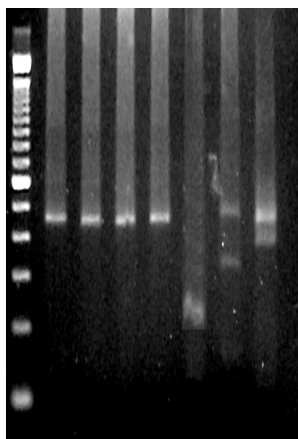


Figura 4-Gel de agarose de RFLP

Colunas:

- 1- Ladder (as bandas variam de 100 em 100 pb).
- 2 a 7- (da esquerda para direita): *Bam* H1, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Pst* I, *Rsa* I e *Sau*3AI (fragmentos do DNA cortado pelas enzimas de restrição em sítios específicos. O padrão do gel forma um mosaico que é específico para cada tipo de HPV).

Tabela 4- Condições da digestão enzimática

Enzima	Sítio de Corte (5' → 3')	Temp (°C)	Tempo (horas)	Tamanho dos fragmentos	Posição do corte
<i>Bam H I</i>	GGATCC CCTAGG	30	1	*	*
<i>Hae III</i>	GGCC CCGG	37	1	*	*
<i>Dde I</i>	CTNAG GANTC	37	1	*	*
<i>Hinf I</i>	GANTC CTNAG	37	1	*	*
<i>Pst I</i>	CTGCAG GACGTC	37	1	*	*
<i>Rsa I</i>	GTAC	37	1	*	*
<i>Sal 3AI</i>	GATC CTAG	37	1	*	*

* Dependem do tipo ou seqüência do DNA do HPV.

3.2.4-Biópsia

O fragmento foi processado e corado com hematoxilina e eosina (HE). O diagnóstico histológico foi estabelecido por dois patologistas, doutorando e orientador, que avaliaram e tabularam a presença dos seguintes critérios morfológicos: paraceratose, acantose, atipia coilocitótica, binucleação, disceratose, mitose e número de mitoses a cada 10 campos de maior aumento (400X) (Figuras 19 a 34). Quando houve forte evidência de atipia coilocitótica, definida como aumento de volume, hipercromatismo e irregularidade de contorno nucleares, presentes em células superficiais com citoplasma claro e membrana citoplasmática espessa, o diagnóstico foi ao menos NIC I (Figuras 8 e 9), como proposto pela Organização Mundial de Saúde (SCULLY, 1994). Leve atipia coilocitótica foi definida como núcleo hipercromático com leve irregularidade de forma e contorno e halo citoplasmático claro perinuclear (Figuras 28 a 30). Quando houve somente leve atipia coilocitótica, sem binucleação ou célula

disceratótica, o caso foi classificado como morfológicamente sugestivo, mas não definitivo para a presença do HPV ou SHPV (Figuras 16 a 18). Considerou-se acantose quando o epitélio possuía mais de dez camadas de células escamosas (Figuras 19 e 20). O diagnóstico de NIC II foi feito quando havia atipia nuclear com hiperchromatismo, pleomorfismo e despolarização, além de perda da maturação celular, ocupando até dois terços da espessura epitelial a partir do estrato basal (Figuras 10 a 13). NIC III foi diagnosticada quando as atipias ultrapassaram estes dois terços, porém ainda estavam restritas ao epitélio, sem romper a membrana basal (Figuras 14 e 15).

3.2.5-Citologia oncótica

As lâminas foram preparadas com a coloração de hematoxilina e eosina usada rotineiramente no laboratório de anatomia patológica. Foram avaliados apenas pelo orientado os seguintes critérios morfológicos para o diagnóstico citológico das lesões do colo uterino: cromatina irregularmente distribuída (CID), perda da relação núcleo-citoplasma (RNC), bi ou multinucleação com atipia (BI), hiperchromatismo nuclear (HN) e contorno nuclear irregular (CNI), os quais foram subclassificados e apontados como “S” quando ocorreram em células superficiais (Figuras 53 a 64) e como “P” quando ocorreram em células profundas, imaturas (Figuras 41 a 52); fila indiana (FI) e formação sincicial com atipia (FS) somente para células imaturas (Figuras 41 a 52); halo claro perinuclear (HCP) e disceratose (DIS), não sendo estes últimos considerados como próprios de células imaturas ou superficiais (Figuras 35 a 40). Do total das 101 pacientes com citologia alterada, 61 foram biopsiadas por apresentarem imagens suspeitas à colposcopia.

3.3-METODOLOGIA ESTATÍSTICA

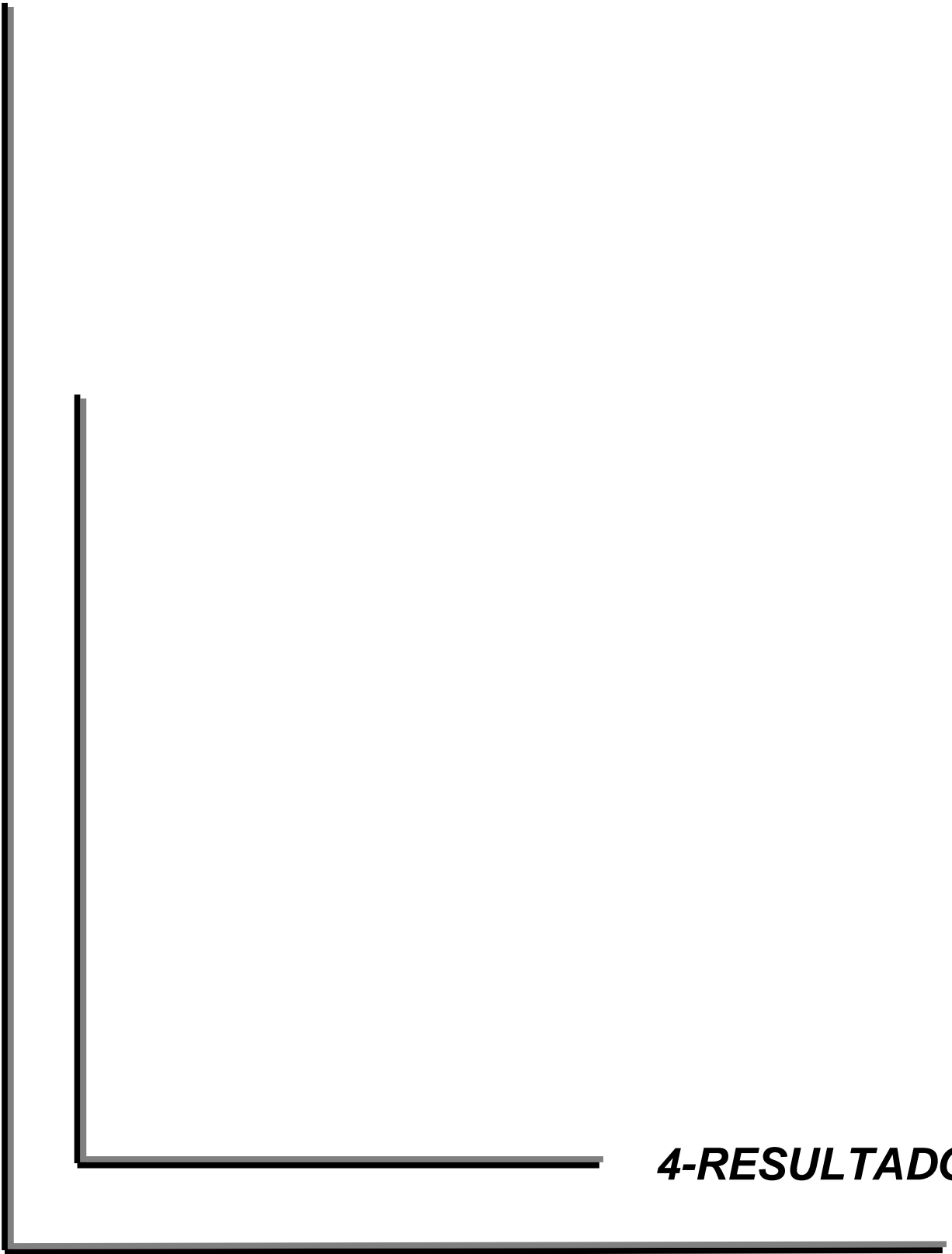
3.3.1- Aplicada aos dados da biópsia

O teste de PCR foi considerado como padrão ouro para a presença de HPV. A fim de comparar o diagnóstico histológico de NIC ou SHPV e os critérios morfológicos descritos anteriormente com o resultado de PCR, para verificar a existência ou não de associação entre eles, o teste de Qui-quadrado foi utilizado.

Quando todos os valores das frequências esperadas foram menores que 5, o teste exato de Fisher foi utilizado, sendo considerada significativa a associação quando o p-valor foi $\leq 0,05$. Para verificar se havia associação (diferença) entre os critérios e os diagnósticos histológicos, foi também utilizado o teste Qui-quadrado e o teste exato de Fisher. A fim de comparar-se o número de mitoses e o diagnóstico histológico, utilizou-se o teste não-paramétrico exato de Mann-Whitney, também conhecido como teste de Wilcoxon, foi utilizado (CONOVER, 1971). Para verificar a concordância entre os diagnósticos e os critérios morfológicos com o resultado da PCR, o coeficiente de Kappa foi calculado, o qual pode assumir os valores entre -1 e $+1$. Valores próximos a $+1$ indicam total concordância e valores próximos a -1 , total discordância. Valores maiores que $0,75$ mostram forte concordância; valores menores que $0,40$, fraca concordância e entre $0,40$ e $0,75$, concordância intermediária.

3.3.2- Aplicada aos dados da citologia

Compararam-se os critérios morfológicos utilizados na citologia com a presença do DNA do HPV em secreção cérvico-vaginal, a fim de verificar quais deles, individualmente ou agrupados, poderiam ser considerados mais importantes como preditivos do diagnóstico de HPV na amostra. Além disto, e para verificar a concordância dos critérios citológicos com os diagnósticos histológicos e a presença do DNA do HPV, calculou-se o coeficiente de Kappa. Compararam-se, também, os critérios citológicos com dois grupos, sendo o primeiro constituído por NIC I, II ou III (qualquer grau) e o segundo apenas por NIC III, a fim de se determinar quais os critérios que, individualmente ou agrupados, poderiam ser considerados mais importantes como preditivos desses diagnósticos.



4-RESULTADOS

4.1-Dados obtidos do exame histológico

Os diagnósticos histopatológicos foram separados em três grupos: cervicite crônica (CC), neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e sugestivo para infecção pelo HPV (SHPV). De 107 pacientes, foram efetuadas 61 biópsias com os seguintes diagnósticos: 11 CC, 36 NIC (13 NIC I, 10 NIC II e 13 NIC III) e 14 SHPV. O DNA não pôde ser extraído das amostras de esfregaços cervicais coletadas em tampão de oito casos, portanto 53 casos foram analisados.

4.1.1-Diagnóstico histológico x DNA do HPV

4.1.1.1-NIC x DNA de HPV

Comparando-se o resultado da PCR com o diagnóstico de biópsia, obteve-se positividade para DNA de HPV em 37,5% das cervicites crônicas, 64,3% dos SHPV e 77,4% dos NIC (Tabela 5). Em relação ao grau de NIC, o HPV foi positivo em 91,7% das NIC I, 66,7% das NIC II e 70% das NIC III (Tabela 6). A sensibilidade do diagnóstico histológico de NIC em relação à positividade para DNA de HPV foi de 88,9%, especificidade de 41,7%, valor preditivo negativo (VPN) de 62,5% e valor preditivo positivo (VPP) de 77,4%. Entretanto, o coeficiente de Kappa foi de 0,34 indicando fraca concordância entre o diagnóstico de NIC e a positividade para HPV. Todavia, perante a um diagnóstico de NIC, há uma probabilidade de predizer positividade para HPV (VPP) de 77,4%.

Tabela 5- Correlação entre o diagnóstico histológico e o DNA do HPV

<i>Diagnóstico</i>	<i>DNA do HPV</i>		<i>Total</i>	<i>kappa</i>
	Positivo	Negativo		
CC	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8	
SHPV	9 (64,3%)	5 (35,7%)	14	0,2542
NIC	24 (77,4%)	7 (22,6%)	31	0,3367
Total	36	17	53	

NIC: neoplasia intraepitelial cervical, SHPV: sugestivo de infecção pelo HPV, CC: cervicite crônica.

Tabela 6- Distribuição da presença do DNA do HPV entre os diagnósticos histológicos estratificados

<i>Diagnóstico</i>	<i>DNA do HPV</i>		<i>Total</i>
	Positivo	Negativo	
CC	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8
SHPV	9 (64,3%)	5 (35,7%)	14
NIC I	11 (91,7%)	1 (8,3%)	12
NIC II	6 (66,7%)	3 (33,3%)	9
NIC III	7 (70%)	3 (30%)	10
Total	36	17	53

NIC: neoplasia intraepitelial cervical, SHPV: sugestivo de infecção pelo HPV, CC: cervicite crônica.

4.1.1.2-SHPV X DNA de HPV

O diagnóstico de SHPV esteve associado com positividade para DNA de HPV em 64,3% dos casos, com Kappa de 0,25, o que também indica fraca concordância; observando-se sensibilidade de 75%, especificidade de 50%, VPN de 62,5%, e VPP de 64,3% (Tabela 7). Diante de um diagnóstico de SHPV, há uma probabilidade de prever a positividade para HPV pela PCR na amostra (VPP) de 64,3%.

Tabela 7- Correlação entre os diagnósticos de SHPV e CC e DNA do HPV

	<i>DNA do HPV</i>		<i>Total</i>	<i>Sensibilidade= 75%</i> <i>Especificidade= 50%</i>
	Positivo	Negativo		
SHPV	9	5	14	<i>VPP: 64,3%</i>
CC	3	5	8 (36,4%)	<i>VPN: 62,5%</i>
Total	12 (54,6%)	10 (45,5%)	22	<i>Kappa: 0,2542</i>

SHPV: sugestivo de infecção pelo HPV, CC: cervicite crônica

4.1.2-Critérios morfológicos histológicos x DNA do HPV

A comparação entre os critérios morfológicos na histologia e os resultados do PCR não indicou qualquer dado que sempre estivesse fortemente relacionado à presença do DNA do HPV. Os critérios com maior sensibilidade para o diagnóstico histológico de HPV foram a atipia colicitótica (88,9%) e a binucleação (75%), porém com baixa especificidade (29,4% e 52,9%) respectivamente (Tabelas 8 e 9). Os maiores VPP encontrado para o diagnóstico do HPV foram, também, atribuídos à atipia colicitótica (VPP = 72,7%) e à binucleação (VPP = 77,1%). Os valores de Kappa encontrados foram de 0,2090 para atipia colicitótica e de 0,2751 para binucleação, indicando fraca concordância entre estes critérios e a presença do DNA do HPV. Os valores de Kappa para número de mitoses, disceratose, acantose e paraceratose foram 0,0220, 0,0484, 0,0236 e – 0,0015 respectivamente.

Tabela 8- Correlação entre AK (na histologia) e DNA do HPV

AK	Teste de PCR		Total	<i>Sensibilidade= 88,9%</i>
	HPV positivo	HPV negativo		
Presente	32	12	44 (83%)	<i>Especificidade= 29,4%</i>
Ausente	4	5	9 (16,9%)	<i>VPP: 72,7%</i>
Total	36 (67,9%)	17 (32%)	53 (100%)	<i>VPN: 55,6%</i>
				<i>Kappa= 0,2090</i>

Tabela 9- Correlação entre BI na histologia e DNA do HPV

Binucleação	Teste de PCR		Total	<i>Sensibilidade= 75%</i>
	HPV positivo	HPV negativo		
Presente	27	8	35 (66%)	<i>Especificidade= 52,9%</i>
Ausente	9	9	18 (34%)	<i>VPP: 77,1%</i>
Total	36 (67,9%)	17 (32,1%)	53 (100%)	<i>VPN: 50%</i>
				<i>Kappa: 0,2751</i>

4.2-Dados obtidos do exame citológico

As pacientes estudadas foram encaminhadas para colposcopia por apresentarem exame citológico prévio alterado. Novas amostras para citologia foram, então, colhidas. Destas 107 novas colheitas, foram selecionadas 101 amostras para exame citológico, pois seis delas foram excluídas devido a artefatos de fixação. O novo exame citológico resultou em diagnóstico de atipias glandulares de significado indeterminado (AGUS) em um caso (1%), atipia de células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) em 24 casos (23,8%), atipias de células escamosas de significado indeterminado que não pode excluir lesão intraepitelial de alto grau associada (ASC-H) em um caso (1%), dentro dos limites da normalidade (DLN) em 56 casos (55,5%), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (LIEAG) em 15 casos (14,9%) e lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LIEBG) em quatro casos (3,9%) (Tabela 10). Das 56 pacientes com

citologia DLN, 29 tinham sido biopsiadas por apresentarem imagens suspeitas à colposcopia, cujos resultados histológicos foram: 14 NIC I , 7 SHPV e 8 CC, sendo 5 CCI e 3 CCA (Tabela 11).

Tabela 10- Diagnósticos citológicos da amostra colhida no dia da colposcopia.

Diagnóstico	N	Percentual	Frequência Cumulativa	Percentual Cumulativo
AGUS	1	1	1	1
ASC-US	24	23,8	25	24,8
ASC-H	1	1	26	25,7
DLN	56	55,5	82	81,2
LIEAG	15	14,9	97	96
LIEBG	4	3,9	101	100

AGUS: atipias glandulares de significado indeterminado, ASC-US: atipias de células escamosas de significado indeterminado, ASC-H: atipias de células escamosas de significado indeterminado que não pode excluir lesão intraepitelial de alto grau associada, DLN: dentro dos limites de normalidade, LIEAG: lesão intraepitelial escamosa de alto grau, LIEBG: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau.

Tabela 11- Diagnósticos histopatológicos de 29 casos biopsiados por imagens colposcópicas suspeitas associadas à citologia normal (DLN=56, casos biopsiados=29).

Diagnóstico	N	Percentual	Frequência Cumulativa	Percentual Cumulativo
CCA	1	10,3	3	10,3
CCI	5	17,2	8	27,6
NIC I	14	48,3	22	75,7
SHPV	7	24,1	29	100

CCA: cervicite crônica ativa, CCI: cervicite crônica inespecífica, NIC I: neoplasia intraepitelial escamosa grau I, SHPV: sugestivo para infecção pelo Papilomavírus humano.

4.2.1-Critérios citológicos x diagnóstico histológico de NIC

Todos os critérios citológicos analisados separadamente ou em conjunto apresentaram concordância fraca em relação ao diagnóstico histológico de NIC com baixas sensibilidades, variando de 2,6% a 30,8% e altas especificidades, variando de 80% a 100%. Mesmo quando os critérios HCP, DIS e BI são analisados conjuntamente o valor do índice de Kappa foi de 0,0106 (Tabela 12 e 13).

Tabela 12- Critérios citológicos de células superficiais x NIC histológico

Critérios	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	KAPPA
HCP	20,51%	90%	88,89%	22,50%	0,0497
DIS	23%	100%	100%	25%	0,1091
CID	2,56%	100%	100%	20,83%	0,0106
RNC	20,51%	80%	80%	20,51%	0,0025
BI	10,26%	80%	66,6%	18,60%	0,0438
HN	10,26%	100%	100%	22,22%	0,0446
CNI	7,69%	100%	100%	21,74%	0,0329

HCP: halo claro perinuclear; DIS: disceratose; CID: cromatina irregularmente distribuída; RNC: perda da relação núcleo citoplasmática; BI: binucleação; HN: hiper Cromatismo nuclear; CNI: contorno nuclear irregular.

Tabela 13- Critérios citológicos de células imaturas x NIC histológico

Critérios	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	KAPPA
CID	20,5%	100%	100%	24,4%	0,0953
RNC	23,1%	100%	100%	25,0%	0,1091
BI	17,18%	100%	100%	23,8%	0,0820
HN	30,8%	100%	100%	27,0%	0,1536
CNI	18%	100%	100%	23,8%	0,0820
FI	7,7%	100%	100%	21,7%	0,0329
FS	30,8%	100%	100%	27,0%	0,1536

HCP: halo claro perinuclear; DIS: disceratose; CID: cromatina irregularmente distribuída; RNC: perda da relação núcleo citoplasmática; BI: binucleação; HN: hiper Cromatismo nuclear; CNI: contorno nuclear irregular.

4.2.2-Critérios citológicos x diagnóstico histológico de NIC III

Em relação ao NIC III histológico, os critérios citológicos mostraram também baixas sensibilidades (entre 0 e 52,9%), altas especificidades (entre 80% e 97,8%), VPP baixos para os critérios relacionados às células superficiais, HCP ou DIS e VPP intermediários quando relacionados às células imaturas. Os VPN foram moderadamente elevados no que se refere aos critérios de células superficiais (variando entre 72% e 74,6%) e também às células imaturas (variando entre 72,4% e 83,7%). O critério citológico com mais alto VPP para NIC III nesta amostra foi a FS com atipia com 69,2% (Tabelas 14 e 15). Não houve um só caso em que todos os critérios aparecessem na mesma amostra, porém, a maioria dos casos mostrou uma combinação entre eles.

Tabela 14- Critérios citológicos de células superficiais x NIC III histológico

Critérios	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	KAPPA
HCP	17,7%	84,4%	30,0%	73,08%	0,0240
DIS	17,7%	82,2%	27,3%	72,55%	-0,0015
CID	0,0%	97,8%	0,0%	72,13%	-0,0314
RNC	17,7%	80,0%	25,0%	72,00%	-0,0259
BI	17,7%	91,1%	42,9%	74,55%	0,1072
HN	11,8%	93,3%	40,0%	73,68%	0,0653
CNI	5,9%	95,6%	33,3%	72,88%	0,0193

HCP: halo claro perinuclear; DIS: disceratose; CID: cromatina irregularmente distribuída; RNC: perda da relação núcleo citoplasmática; BI: binucleação; HN: hipercromatismo nuclear; CNI: contorno nuclear irregular.

Tabela 15- Critérios citológicos de células imaturas x NIC III histológico

Critérios	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	KAPPA
CID	29,4%	93,3%	62,5%	77,8%	0,2723
RNC	29,4%	86,7%	45,5%	76,5%	0,1806
BI	17,7%	91,1%	42,9%	74,6%	0,1072
HN	47,1%	86,7%	57,1%	81,3%	0,3568
CNI	23,5%	93,3%	57,1%	76,3%	0,2064
FI	5,9%	93,3%	25,0%	72,4%	-0,0103
FS	52,9%	91,1%	69,2%	83,6%	0,4753

CID: cromatina irregularmente distribuída; RNC: perda da relação núcleo citoplasmática; BI: binucleação; HN: hipercromatismo nuclear; CNI: contorno nuclear irregular; FI: fila indiana; FS: formação sincicial com atipia.

4.2.3-Critérios citológicos x DNA do HPV

Em relação à positividade para DNA do HPV na amostra, os VPN variaram entre 37,7% e 41,3% para os critérios associados às células superficiais (Tabela 16) e entre 39,2% e 41,3% para aqueles associados às células imaturas (Tabela 17), enquanto os VPP variaram entre 50% e 88,9% para os critérios associados às células superficiais e 76,9% e 100% para aqueles associados às células imaturas. O critério com mais alto VPP em relação à positividade para DNA do HPV na amostra foi a FI - mostrou DNA positivo em todos os seis casos em que esteve presente (VPP = 100%). Em seguida, aparecem HN em células superficiais, CID em células imaturas (ambos com VPP = 88,9%) e BI em células superficiais ou imaturas (VPP = 87,5%) o que equivale a dizer que diante do encontro de pelo menos um destes últimos três aspectos morfológicos na citologia há uma chance de pelo menos 80% de infecção pelo HPV em nossa amostra.

Tabela 16- Critérios citológicos de células superficiais x DNA do HPV

Critérios	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	KAPPA
HCP	12,5%	93,9%	77,8%	38,8%	0,0871
DIS	21,4%	93,9%	85,7%	41,3%	0,0782
CID	1,8%	97%	50,0%	39,5%	0,0729
RNC	17,8%	93,9%	83,3%	40,3%	0,0692
BI	12,5%	97%	87,5%	39,5%	0,0639
HN	14,3%	97%	88,9%	40,0%	0,0817
FS	5,4%	97%	75,0%	37,7%	0,1218

HCP: halo claro perinuclear; DIS: disceratose; CID: cromatina irregularmente distribuída; RNC: perda da relação núcleo citoplasmática; BI: binucleação; HN: hiperchromatismo nuclear; FS: fila indiana.

Tabela 17- Critérios citológicos de células imaturas x DNA do HPV

Critérios	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	KAPPA
CID	14,3%	97%	88,9%	40,0%	0,0871
RNC	16,1%	93,9%	81,8%	39,7%	0,0782
BI	12,5%	97%	87,5%	39,5%	0,0729
HN	17,9%	90,9%	76,9%	39,5%	0,0692
CNI	14,3%	93,9%	80,0%	39,2%	0,0639
FI	10,7%	100,0%	100,0%	39,8%	0,0817
FS	21,4%	93,9%	85,7%	41,3%	0,1218

CID: cromatina irregularmente distribuída; RNC: perda da relação núcleo citoplasmática; BI: binucleação; HN: hiper Cromatismo nuclear; CNI: contorno nuclear irregular; FI: fila indiana; FS: formação sincicial com atipia.

4.3-Diagnóstico citológico x diagnóstico histológico

Compararam-se os diagnósticos da citologia com os diagnósticos da histologia a fim de verificar se havia concordância entre os dois métodos, que representam formas diferentes de se avaliar a mesma lesão epitelial. Excluindo-se os SHPV da análise, houve concordância fraca entre LIEAG citológica e NIC II ou NIC III histológica, (Kappa = 0,34), LIEBG citológica e NIC I (Kappa = -0,0392) e entre DLN citológica e cervicite, (Kappa = 0,31) (Tabela 18).

Tabela 18- Diagnóstico citológico e histopatológico

Diagnóstico citológico	Diagnóstico histopatológico					
	CC	NIC I	NIC II	NIC III	SHPV	TOTAL
AGUS	0	0	0	1	0	1
ASC-US	2	2	4	6	4	18
ASC-H	0	0	0	0	0	0
DLN	8	9	3	2	7	29
LIEAG	0	1	3	7	1	12
LIEBG	0	0	0	1	0	1
TOTAL	10	12	10	17	12	61

AGUS : atipias glandulares de significado indeterminado; ASC-US: atipias de células escamosas de significado indeterminado; ASC-H: atipias de células escamosas de significado indeterminado que não pode excluir lesão intraepitelial escamosa de alto grau; DLN: dentro dos limites da normalidade; LIEAG: lesão intraepitelial escamosa de alto grau; LIEBG: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; CC: cervicite crônica; NIC: neplasia intraepitelial cervical; SHPV: sugestivo para infecção pelo HPV.

4.4-Informações complementares sobre a detecção do DNA viral e frequência dos tipos de HPV encontrados nessa amostra

Processaram-se 101 amostras, das quais 12 não permitiram amplificação do DNA e 89 foram viáveis. O par de “primers” GP5+/GP6+ detectou DNA de HPV em 63% das amostras que permitiram amplificação, correspondendo ao percentual máximo de detecção se comparado com o grupo padrão ouro com positividade para um dos dois pares de “primers”. O par de “primers” MY 09/11 detectou DNA de HPV em 36% destas amostras que permitiram amplificação (Tabela 19). Houve concordância intermediária entre os dois pares de “primers” em relação à detecção do DNA do HPV (Kappa = 0,4972). Se for tomado o resultado de GP5+/6+ como referência, encontra-se 100% de especificidade e 57,1% de sensibilidade para o par MY 09/11. Isto significa que todas as amostras negativas para GP também foram negativas para MY e que pouco mais da metade

das amostras detectadas pelo GP não foi detectada pelo MY. O PCR detectou DNA de HPV em 28 de 56 amostras (52,8%) provenientes de diagnóstico citológico dentro dos limites da normalidade (Tabela 20), embora 17 apresentaram imagens colposcópicas que foram biopsiadas, encontrando-se 10 diagnósticos de NIC, 4 SHPV e 3 CC.

Tabela 19- Percentual de detecção de DNA de HPV com os pares de “primers” MY09/11 e GP5+/GP6+

Resultado	N	Percentual
MY09/11		
Negativo	57	64
Positivo	32	36
Total	89	100
GP5+/GP6+		
Negativo	33	37
Positivo	56	63
Total	89	100

Tabela 20- Positividade de DNA de HPV com o par de “primers” GP em 56 mulheres com citologia normal.

Resultado	N	Percentual	Percentual cumulativo
Negativo	25	47,2	47,2
positivo	28	52,8	100

Excluímos 3 casos dessa tabela cuja amplificação não foi possível.

De acordo com os dados da presente amostra, houve 63% de positividade para DNA do HPV entre os casos amplificados pelo par de “primers” GP5+/GP6+. Obteve-se frequência de 37,5% de HPV entre os casos diagnosticados como cervicite crônica, 77,42% entre os diagnosticados como NIC e 68,4% entre os NIC II e NIC III considerados em conjunto na biopsia (Tabela 5). Conseguiu-se apontar tipos de HPV pela técnica de RFLP em 71,95% dos casos amplificados pelo par MY (23/32). Destes, o HPV 16 foi o mais freqüente,

constituindo 40,6% dos casos positivos (13/32), seguido do HPV 58 encontrado em 12,5% (4/32), HPV 31 em 9,3% (3/32), HPV 55 em 3% (1/32), MM7 em 3% (1/32) e MM8 em 3% (1/32) (Figura 6 e Tabela 21).

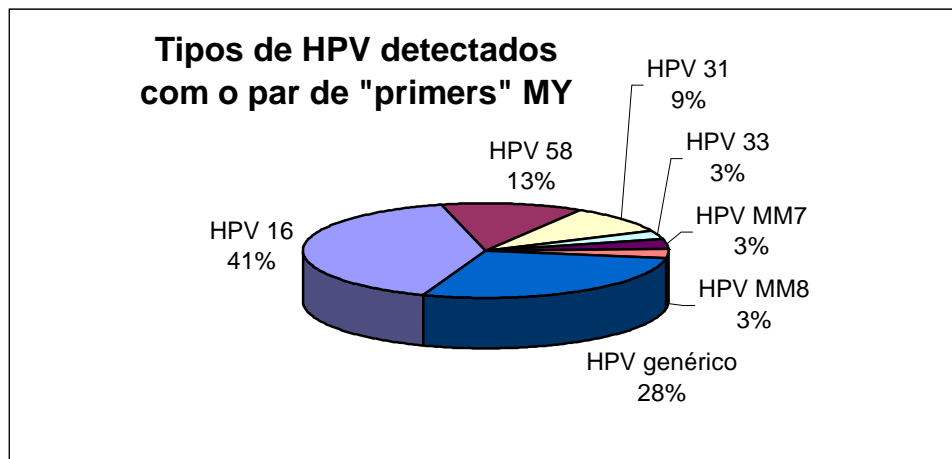


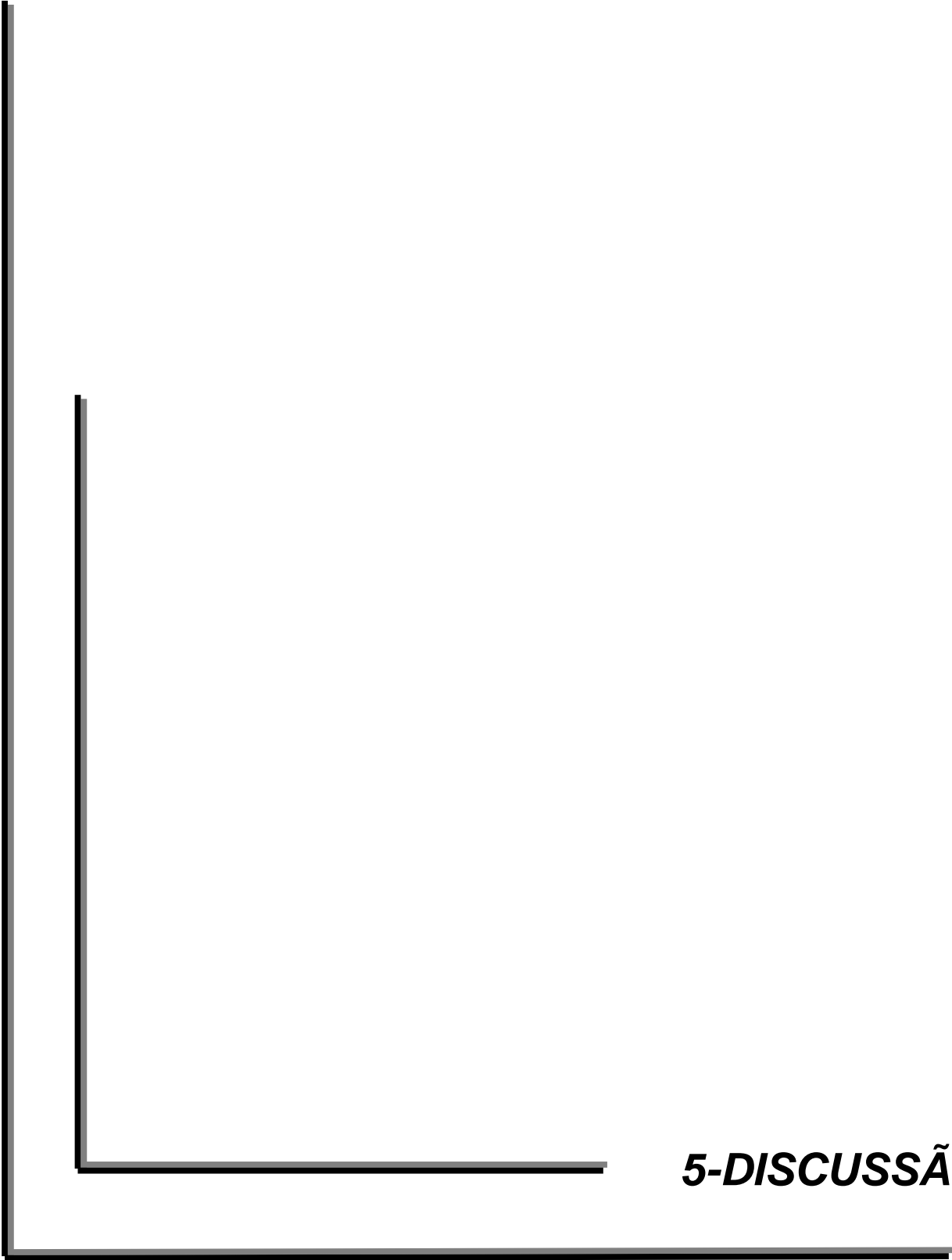
Figura 6- Tipos de HPV detectados em 32 amostras de cérvix uterina obtidas de pacientes positivas para HPV pelo par de “primers” MY.

Tabela 21- Tipagem de DNA de HPV por RFLP

Resultado	N	Percentual
16	13	40,6
31	3	9,3
55	1	3,1
58	4	12,5
MM7	1	3,1
MM8	1	3,1
*POSITIVO S/T	9	28,1
TOTAL	32	100

*POSITIVO SEM TIPAGEM

RFLP (polimorfismo dos tamanhos dos fragmentos de restrição)



5-DISCUSSÃO

Entende-se que o diagnóstico de lesão intraepitelial seja tão importante quanto o de infecção pelo HPV. Por um lado, sabe-se que a maioria das lesões intraepiteliais de baixo grau regridem espontaneamente (SOLOMON et al., 2001), e por outro, que a simples presença e persistência do DNA do HPV aumenta em 100 vezes a chance do aparecimento do câncer cervical em relação às mulheres livres da infecção (BOSCH, 2001). Há que se considerar, ainda, que a presunção da presença do vírus na amostra cito ou histológica é interpretada como possivelmente causada por infecção transmitida por contágio sexual, trazendo conseqüências sociais muitas vezes irreparáveis no âmbito do casal. Pela análise dos nossos resultados, procuramos verificar quais dados morfológicos contribuem para acurácia diagnóstica.

5.1-DADOS HISTOLÓGICOS

5.1.1-Diagnósticos x DNA do HPV

5.1.1.1-NIC x DNA do HPV

Nossos dados demonstraram fraca concordância entre a presença do HPV e o diagnóstico do NIC, com coeficiente de Kappa de 0,3367, o que significa dizer que HPV positivo nem sempre quer dizer NIC, podendo haver infecções que não se manifestam ou não produzem alteração morfológica.

A maioria das NIC mostrou positividade para DNA de HPV (VPP = 77,4% e sensibilidade = 88,9%), ou seja, diante de um diagnóstico de NIC na presente amostra, há uma chance de 77,4% de positividade para DNA de HPV. Em relação ao grau de NIC, houve predomínio de positividade nas lesões de baixo grau (positivo em 91,7% das NIC I, 66,7% das NIC II e 70% das NIC III), o que pode indicar que estas lesões se associam a infecções produtivas com grande quantidade de vírus na forma episossomal no interior da célula superficial de um epitélio com maturação preservada; o que torna mais fácil a detecção do DNA viral na secreção, pois, além da maior quantidade de DNA, ocorre também maior exposição, visto que as células superficiais podem sofrer lise, despejando o conteúdo citoplasmático para a superfície da cérvix. Por outro lado, a

incorporação do DNA viral ao genoma da célula ocorre mais freqüentemente nas lesões de alto grau, podendo dificultar a detecção se houver quebra na região de L1 flanqueada pelos “primers” e, portanto, necessária para que a reação ocorra adequadamente. Outros estudos mostram algumas diferenças. LIAW et al. (1995) estudaram HPV e neoplasia cervical em um trabalho de casos-controle. O DNA do HPV foi encontrado em 92% das LIEAG e câncer invasivo, em 54% das LIEBG e em 9% dos controles. HERRERO et al. (2000), na Costa Rica, selecionaram 9.175 mulheres ao acaso para obter um diagnóstico padrão final e testaram 3.024 mulheres para mais de 40 tipos de HPV com o sistema de PCR. Entre as LIEBG, encontraram 73% de HPV positivas, sendo o HPV tipo 16 predominante (16% entre mulheres positivas). O HPV foi encontrado em 89% das LIEAG e 88% dos cânceres, sendo, também, o HPV 16 altamente predominante (51% e 53% respectivamente). Virtualmente todas as LIEAG e cânceres se associaram ao HPV com elevadas razões das chances (*odds-ratios*) e frações atribuídas em torno de 80%.

5.1.1.2-SHPV x DNA do HPV

O diagnóstico histológico de SHPV foi feito quando os critérios morfológicos não eram tão convincentes para o diagnóstico de NIC, porém suspeitos. A presença de atipia colocitótica leve e duvidosa é o critério utilizado para o diagnóstico de SHPV. Pela correlação com os dados da PCR, 64% dos SHPV se correlacionaram ao HPV positivo. Pela análise estatística, o valor de Kappa foi de 0,2542, indicando fraca concordância entre positividade viral e diagnóstico histológico de SHPV. Portanto, na presente amostra, o diagnóstico de SHPV baseado somente na presença de atipia colocitótica leve e duvidosa indica que há uma chance de infecção pelo HPV em cerca de 2/3 dos casos (64,3%) (Tabela 7), apresentando probabilidade de falso positivo em 35,7%. Desta forma, 35,7% das pacientes que recebessem este diagnóstico presuntivo poderiam pressupor, equivocadamente, que foram infectadas por meio de relação sexual com seu parceiro, atribuindo-lhe a culpa e desencadeando desconfiança, o que

pode inclusive causar desestruturação familiar. Além disso, podem, ainda, pressupor que, doravante, fazem parte de um grupo de pacientes com risco relativo altamente elevado para o desenvolvimento de câncer cervical em relação à população feminina livre desta infecção.

5.1.2-Critérios morfológicos x DNA do HPV

5.1.21-Atipia colicitótica x DNA do HPV

Quando a atipia colicitótica está presente na amostra, há uma boa chance para infecção por HPV. Entretanto, o baixo coeficiente de Kappa (0,2090) mostra que a atipia colicitótica nem sempre significa infecção por HPV, baseado nos resultados da PCR. Encontrou-se atipia colicitótica com PCR negativa em 27,2% dos casos. Portanto, se o diagnóstico de HPV se faz com base exclusivamente neste critério, a probabilidade de um resultado falso positivo é de 27,2% dos casos. Considerando-se em conjunto atipia colicitótica, disceratose e binucleação, obteve-se um valor preditivo positivo aproximado similar ao encontrado isoladamente para cada um destes critérios em relação à presença de HPV (VPP = 72,4%). A atipia colicitótica é considerada o maior critério morfológico usado pelos patologistas para diagnosticar infecção por HPV. Entretanto, este achado não é completamente confiável de acordo com os presentes resultados e com os previamente demonstrados por NUOVO (1988 b). Este autor detectou seqüências do DNA de HPV em 63% e 56% das lesões colposcopicamente visíveis na vagina e no colo respectivamente, que foram diagnosticadas como condiloma ou neoplasia intraepitelial. Seqüências de DNA de HPV foram detectadas em 14% e 47% de outras lesões vaginais e cervicais que não preencheram os critérios histológicos de condiloma ou neoplasia intraepitelial (i.e. não diagnósticas). Em lesões vaginais, NUOVO et al. (1988 a) detectaram HPV em 63% e 11,7% dos casos com e sem atipia colicitótica respectivamente. A presença do vírus na célula tem sido demonstrada também por métodos de microscopia eletrônica (DELLA TORRE et al., 1978; HILLS et al.,1979) e métodos de hibridização com DNA de HPV (ISHI et al. 1995; SHROYER et al.,1990). Se

se considera a atipia colicitótica como marcadora para a presença de HPV, então alguns fatores devem estar interferindo na sensibilidade da PCR:

- 1) Talvez haja seqüências de vírus que escapem aos “primers” consensos usados neste teste ou poderia haver deleções na seqüência interna à região L1 do genoma do HPV flanqueada pelos mesmos.
- 2) Existência de variações entre os métodos de detecção.
- 3) As condições para amplificação poderiam não ter sido excelentes para todas as seqüências de HPV.

HUSNJAK et al. (2000) compararam cinco métodos diferentes de PCR para a detecção do HPV em amostras cervicais. O primeiro grupo foi testado com três tipos de “primers” consensos localizados dentro da região L1 do genoma do HPV: MY09/MY11 (i.e MY), L1C1/ L1C2-1/ L1C2-2 (i.e. LC) e pl-1/pl-2 (i.e pl). O segundo grupo, constituído de amostras negativas com os “primers” MY foi testado com os “primers” LC e GP5+/GP6+ (i.e GP). Os “primers” GP foram usados neste grupo após a amplificação com os “primers” MY ter sido tentada, no próprio produto de amplificação, o que é chamado de MY/GP “nested” PCR. Amostras dos dois grupos foram testadas com “primers” do tipo específico para HPV 6/11, 16, 18, 31 e 33. No 1º grupo (N=164) houve 76,2% de resultados positivos obtidos ao menos com um dos pares dos “primers” consensos. No 2º grupo de estudo (N=250) houve 8,4%, 38,8% e 4% de amostras positivas com os “primers” LC, “nested” MY/GP e “primers” tipo-específicos respectivamente. Eles concluíram que o uso de MY/GP em “nested PCR” aumentou significativamente a taxa de detecção do DNA do HPV e deveria ser usado para amostras com baixo número de cópias virais. EVANDER et al. (1992) compararam resultados obtidos com sistemas MY,GP e MY/GP em “nested PCR”. Houve 56,5% de amostras negativas com MY e positivas com “primers” GP. As possíveis razões estão nos tamanhos menores dos produtos de PCR (142 pb para o sistema GP contra 450 pb para o sistema MY) e o fato de que os “primers” GP não contêm bases degeneradas. GU et al. (1997) encontraram variações entre os métodos. Eles usaram diferentes seqüências de “primers” consensos de L1 do HPV e seqüências

de “primers” consensos do HPV E6, tendo detectado seqüências de L1 em somente 29,1% das amostras enquanto seqüências HPV E6 foram encontradas em 60,7%. Os dados do presente estudo confirmam as variações entre os dois diferentes métodos utilizados, pois foi observada maior positividade de detecção com o sistema GP5/GP6+, o qual pôde ser considerado como o padrão-ouro dos atuais resultados em relação ao MY09/11.

Por outro lado, também se encontrou baixa especificidade (29,4%) para atipia coilocitótica, significando que casos sem este critério poderiam ser HPV positivos, o que permite pensar que seria possível ter o vírus naquele microambiente de forma latente, ainda sem causar lesões ou alterações morfológicas.

5.1.2.2-Binucleação x DNA do HPV

A binucleação apresentou alta sensibilidade (75%), moderada especificidade (52,9%), VPP = 77,1% e VPN = 50%, significando que é um marcador importante com um valor similar ao da atipia coilocitótica para indicar infecção pelo HPV. Estes dados estão em conformidade com os dados previamente encontrados na literatura. ROTELI-MARTINS et al. (2001a) avaliaram os critérios morfológicos das lesões induzidas pelo HPV detectado por meio das técnicas de hibridização *in situ* e captura de híbridos, observando que entre os critérios estudados, multinucleação, binucleação e mitoses atípicas estiveram significativamente associadas com a positividade para DNA do HPV, sendo confiáveis para a detecção da infecção. Multinucleação provou ser o mais forte fator preditivo de DNA de HPV. Coilocitoses e coilócitos fusiformes também foram critérios confiáveis. Atipia leve nuclear e leve coilocitose não tiveram valor para fazer este diagnóstico.

5.1.2.3-Mitose, diskeratose, acantose e parakeratose x DNA do HPV

Houve fraca concordância entre os critérios acima e o resultado de PCR (Kappa = -0,0220, 0,0484, 0,0236 e - 0,0015 respectivamente). O estudo citado anteriormente de ROTELI-MARTINS et al. (2001a) encontrou associação significativa entre mitoses atípicas e positividade para DNA do HPV detectado por hibridização *in situ* e captura de híbridos. Alguns autores ainda mostram que estes critérios são freqüentes nas lesões do HPV, porém os consideram como sinais menores, por serem inespecíficos para o diagnóstico. (SCHNEIDER e SCHNEIDER, 1998; COLLAÇO et al, 2001). De acordo com os dados obtidos neste estudo, estes elementos são indicativos porém não específicos para o diagnóstico de HPV, sendo recomendável sua utilização em conjunto com os demais critérios discutidos anteriormente.

5.2-DADOS CITOLÓGICOS

A grande maioria das pacientes atendidas no ambulatório de Patologia Cervical da Prefeitura Municipal de Campinas é triada para exame colposcópico com diagnóstico prévio citológico de LIEAG, o que explica a baixa freqüência de LIEBG citológica na presente amostra (Tabela 10).

5.2.1-Critérios associados a células superficiais x diagnóstico histológico de NIC III

Houve baixos valores preditivos positivos e baixas sensibilidades dos diferentes critérios avaliados para o diagnóstico de NIC III. Isto se explica por serem estes achados morfológicos relacionados principalmente às lesões de baixo grau ou NIC I, cuja alteração se dá na célula superficial, estando, portanto, de acordo com as expectativas deste estudo.

5.2.2-Critérios associados a células imaturas x diagnóstico histológico de NIC III

Os valores preditivos dos critérios associados às células imaturas para NIC III avaliados neste estudo permitem, quando estiverem presentes, suspeitar ou inferir que exista uma chance razoável de NIC III, sendo indicativos ou sugestivos deste diagnóstico. Portanto, diante da positividade destes critérios na citologia, há uma probabilidade de NIC III subjacente ao redor de 60% dos casos da atual amostra. Raramente estes dados morfológicos aparecem isoladamente, mas combinados, o que facilita o diagnóstico, justificando o uso da citologia como um bom método de triagem para os epitélios atípicos cervicais.

5.2.3-Critérios citológicos x DNA do HPV

O halo citoplasmático claro perinuclear, o hiperchromatismo nuclear e a bi ou multinucleação foram os critérios morfológicos das células superficiais com maior valor preditivo para a presença do DNA do HPV pelo PCR, porém com baixa sensibilidade. Quanto às células mais profundas ou imaturas, os critérios FI, CID e BI apresentaram alto valor preditivo para a presença viral, também com baixa sensibilidade. Desta forma, este trabalho reforça que estes dados morfológicos, há muito tempo conhecidos e valorizados, são fortes indicadores da infecção viral, com alto valor preditivo quanto à presença do HPV, demonstrado pela PCR. Entretanto, há que se admitir que o método morfológico, apesar de muito bom, tem limites que devem ser sempre lembrados e respeitados na sua interpretação.

5.3-DIFERENÇAS NO PODER DE DETECÇÃO DE DNA DO HPV DOS “PRIMERS”

Utilizaram-se dois diferentes pares de “primers” para a realização da PCR e observaram-se diferenças no poder de detecção de DNA do HPV ou na positividade da reação. O par de “primers” GP5+/GP6+ apresentou maior índice de positividade, ocorrendo em 63% das amostras, contra 36% do par MY 09/11 (Tabela 13), indicando que há uma certa limitação deste último par de acordo com

os presentes dados e de outros autores (HUSNJAK et al, 2000). Dentre as possíveis explicações, destacam-se:

1. O produto de amplificação para GP5+/6+ é menor que o produto para o par MY09/11.
2. O par GP de “primers” trabalha com baixa estringência, possibilitando a amplificação de seqüências com alguma diferença entre as bases, enquanto o par MY é formado por “primers” degenerados que são um conjunto de “primers” com diferença em alguns nucleotídeos de sua seqüência de bases, portanto a metodologia de detecção é diferente. O reconhecimento destas diferenças é importante, principalmente quando se comparam com os dados apresentados na literatura. Assim, o método de PCR é o mais sensível, porém também apresenta variações na sua sensibilidade de acordo com o par de “primers” escolhidos.

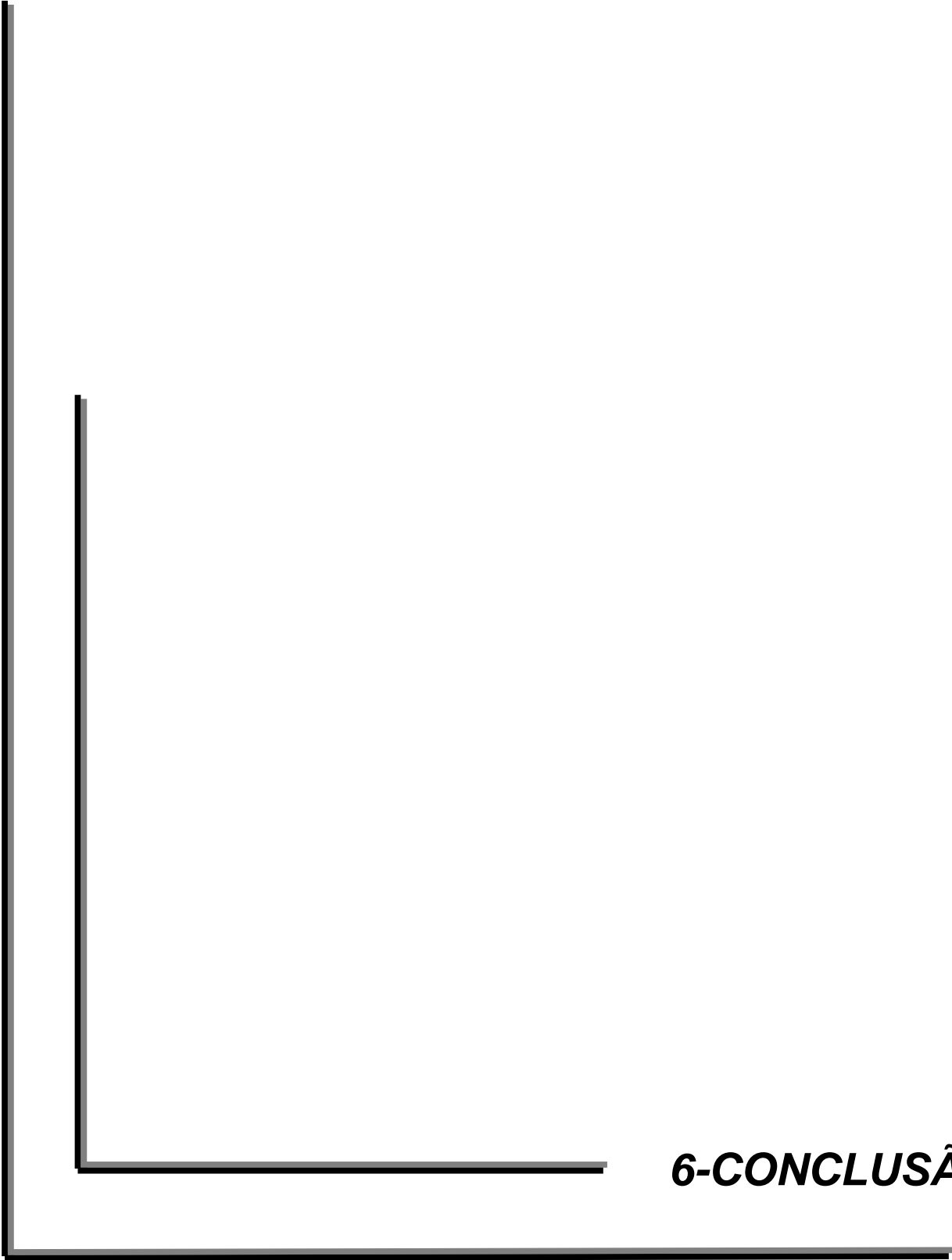
5.4-FREQÜÊNCIA DOS TIPOS DE HPV

A freqüência dos tipos de HPV identificadas neste estudo se assemelha às freqüências publicadas em outras regiões do país. NORONHA et al. (1999) estudaram a freqüência do HPV em 228 mulheres portadoras de lesões na cérvix uterina em Belém, Pará, no período de março de 1992 a maio de 1996, as quais foram submetidas à biópsia de colo uterino e pesquisa de HPV por PCR e hibridização por “dot-blot”. Distribuíram-se as participantes em três grupos, conforme o diagnóstico. O grupo A constituiu-se de 155 mulheres com carcinoma epidermóide invasor ou com adenocarcinoma, o grupo B de 54 portadoras de neoplasia intraepitelial cervical grau II ou III, e o grupo C de 19 pacientes com cervicite crônica. Observaram-se freqüências de HPV em 70,3%, 63,0% e 36,8% das mulheres dos grupamentos A, B e C, respectivamente, sendo o HPV 16, registrado em 60,4% das amostras positivas do grupo A e 54,5% daquelas do grupo B. Os tipos 16, 18 e 33 representaram 71,4% dos detectados no grupo C. CAMARA et al. (2003) descreveram a freqüência dos tipos de HPV entre mulheres com resultado de citologia oncótica cervical anormal no Distrito Federal, Brasília.

Estudaram 129 amostras de pacientes com lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas, utilizando PCR com os “primers” MY09 e MY11, seguido pela identificação através de RFLP. O DNA do HPV foi detectado em 62% das amostras, HPV 16 em 43,8%, HPV 58 em 12,5%, HPV 31 em 10%, HPV 53 em 6.3%, HPV 18 em 3,8% e HPV 33 em 3,8% das amostras. Outros tipos foram menos freqüentes, com freqüência igual ou menor que 2,5% cada, HPV 35, 52, 66, CP8304, 6, 11, e CP8061. A freqüência do HPV 58 foi relativamente mais alta nesta população que os dados obtidos da população da América do Sul, mas similares aos resultados obtidos em outros estudos na América Latina, Europa e Leste Asiático.

5.5-CONTRIBUIÇÃO DESSE ESTUDO

No contexto da prevenção do câncer cervical uterino adotado pela maioria dos países, o exame citológico tem o papel primordial de triar as pacientes que apresentem alterações morfológicas celulares epiteliais possivelmente causadas pelo HPV, visto que a presença e persistência desta infecção são fatores de risco para o desenvolvimento da neoplasia. O exame clínico que se segue tem como função selecionar, por meio da colposcopia, as áreas onde se suspeite que haja uma lesão intraepitelial instalada que deverão ser biopsiadas para que se proceda à análise histológica que é a confirmação do diagnóstico sugerido pela citologia. Os diagnósticos citológico e histológico nem sempre são totalmente seguros, pois dependem de critérios que apresentam variações caso a caso, trazendo problemas de interpretação. Este fato tem levado a uma tendência de se presumir infecção viral cervical quando os critérios não são totalmente preenchidos (diagnósticos presuntivos). Este estudo tenta trazer uma contribuição para a prática do patologista, introduzindo dados numéricos no seu embasamento dos diagnósticos (diagnósticos probabilísticos) com fundamentação na literatura, o que traz conforto e segurança para o patologista, ginecologista e, principalmente, para as pacientes. Com esta mudança de postura, evitam-se tanto as implicações sociais já mencionadas como demandas judiciais.



6-CONCLUSÃO

Dentre os critérios histológicos, atipia colicitótica e binucleação, isoladamente ou em conjunto foram os mais relacionados à presença do HPV no exame histológico. Apesar de boa sensibilidade, (88,9% e 75%), apresentaram baixa especificidade (29,4% e 52,9%) e valores preditivos razoavelmente elevados (72,7% e 77,1% isoladamente e 72,4% quando considerados em conjunto). Portanto, esses dados podem ser utilizados como marcadores de infecção pelo HPV, porém com certa limitação, devendo ser considerado que há uma chance aproximada de 27,6%, de um resultado falso positivo.

Todos os critérios citológicos avaliados apresentaram baixa sensibilidade, porém alta especificidade e moderados VPP para DNA de HPV. Os VPP variaram entre 50% e 88,9% para os critérios associados às células superficiais e 76,9% e 100% para células imaturas, destacando-se, em células imaturas a fila indiana (VPP=100%), binucleação (VPP=87,5%) e cromatina irregularmente distribuída (VPP=88,9%) e, em células superficiais, hipercromatismo nuclear (VPP = 88,9%) e binucleação (VPP=87,5%). Portanto, podem ser considerados como fortemente indicativos, porém não conclusivos para a presença do DNA do HPV.

Com exceção da binucleação, todos os critérios citológicos observados nas células superficiais apresentaram baixa sensibilidade, porém alta especificidade e alto VPP para o diagnóstico de NIC na histologia (VPP variando entre 80% e 100%).

Os VPP dos critérios associados às células imaturas para o diagnóstico de NIC III histológica variaram entre 25% e 79,23% , estando acima de 40% na maioria dos casos, sendo indicativos, porém não conclusivos de NIC III. Os critérios com maior VPP foram a formação sincicial com atipia e a cromatina irregularmente distribuída no núcleo das células profundas (69,2% e 62,5%).

CONCLUSÃO GERAL:

O exame morfológico citológico e histológico é um importante indicador para o diagnóstico de infecção pelo HPV. Entretanto nenhum dos critérios avaliados se mostrou um marcador forte e definitivo para a presença do vírus, indicando certa limitação da morfologia para este diagnóstico.



***7-REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

ANDRADE, L. A. L. A.; OYAKAWA, N.; VASSALLO, J. Immunohistochemical demonstration of papillomavirus infection in condylomatous and preneoplastic lesions of the lower female genital tract. **Pathologica**, 83: 301-306, 1991.

BAUER, H.M.; CATHERINE, E.G.; E MANOS, M.M.. in: HERRINGTON, C.S.; MCGEE J.O.D. **Diagnostic molecular pathology: a practical approach**. Oxford, UK: Oxford University Press, 1992. p. 131-52.

BERNARD, H.U.; CHAN, S.Y.; MANOS, M.M.; ONG, C.K.; VILLA, L.L.; DELIUS, H. et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **J Infect Dis**, 170:1077-85, 1994.

BETHESDA SYSTEM 2001. Disponível em: <<http://www.bethesda2001.cancer.gov>>. Acesso em: 26 de Março 2004.

BOSCH, F.X.; MANOS, M.; MUNOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A.M.; PETO et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study. **J Natl Cancer Inst**, 87:796-802, 1995.

BOSCH, F. X., INTERNATIONAL PAPILOMAVIRUS CONFERENCE, 09, 2001, Costão do Santinho, Florianópolis, SC, Brazil.

CAMARA, G.N.L.; CERQUEIRA, D.M.; OLIVEIRA, A.P.G.; SILVA, E.O.; CARVALHO, L.G.S.; MARTINS, C.R.F. Prevalence of Human Papillomavirus Types in Women with Pre-neoplastic and Neoplastic Cervical Lesions in the Federal District of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 98(7): 879-83, 2003.

CIATTO S.; CARIAGGI M.P.; MINUTI A.P.; CONFORTINI M.; PALLI D.; PAS L.; MCKEE G.; SCHENCK U.; BONACCORSI A.; CORRADI G.; OLIVATI S.; PIERI L.; CARRETTI D.; COCCHI V. Interlaboratory reproducibility in reporting inadequate cervical smears, a multicentre multinational study. **Cytopathology**, 7(6):386-90, 1996.

COLLAÇO, L.M.; PINTO, A.P. Cytological effects of human papillomavirus infection in cervical smears: a review article. **J Bras Patol**, 37(1): 57-61, 2001.

CONOVER, W.J. **Practical Nonparametric Statistics**. 3. ed. New York, John Wiley & Sons, 1971.

CUZICK, J. INTERNATIONAL PAPILOMAVIRUS CONFERENCE, 09, 2001, Costão do Santinho, Florianópolis SC, Brazil.

DE RODA-HUSMAN, A.M.; WALBOOMERS, J.M.M.; VAN DEN BRULE, A.J.C.; MEIJER, C.J.L.M.; SNIJDERS, P.J.F. The use of general "primers" GP5 and GP6 elongated at their 39 ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **J Gen Virol**, 76:1057-62, 1995.

DE RUIZ P.A.; LAZCANO PONCE E.C.; DUARTE TORRES R.; RUIZ JUAREZ I.; MARTINEZ CORTEZ I. Diagnostic reproducibility of Pap testing in two regions of Mexico: the need for quality control mechanisms. **Bull Pan Am Health Organ**, 30(4):330-8, 1996.

DELLA TORRE, G.; PILOTTI, S.; DE PALO, G.; RILKE, F. Viral particles in cervical condylomatous lesions. **Tumori**, 64:549-53, 1978.

DOCUMENTO DE CONSENSO - LA INFECCIÓN POR PAPILOMAVIRUS. Disponível em: <<http://www.aepcc.org/congreso/pdf/CONS-VPH.pdf>>. Acesso em: 26 Janeiro. 2004

EVANDER, M.; EDLUND, K.; BODEN, E.; GUSTAFSSON, A.; JONSSON, M.; KARLSSON, R. et al. Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general "primers" in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. **J Clin Microbiol**, 30:987-92, 1992.

GU, X.; MILLER, G.A.; DIEHL, S.R. Comparison of gel and hybridization methods for Detecting and subtyping human papillomaviruses in oral lesions. **Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res**, 38:A1074, 1997.

HELT, A.M.; FUNK, J.O.; GALLOWAY, D.A. Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. **J Virol**, 76: 10559-68, 2002.

HERRERO, R.; HILDESHEIM, A.; BRATTI, C.; SHERMAN, M.E.; HUTCHINSON, M.; MORALES, J. et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. **J Natl Cancer Inst**, 92:464-74, 2000.

HILLS, E.; LAVERTY, C.R. Electron microscopic detection of papilloma virus particles in selected koilocytotic cells in a routine cervical smear. **Acta Cytol**, 23:53-6, 1979.

HO, G.Y.; BIERMAN, R.; BEARDSLEY, L.; CHANG, C.J.; BURK, R.D. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. **N Engl J Med**, 338:423-8, 1998.

HUSNJAK, K.; GRCE, M.; MAGDIC, L.; PAVELIC, K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. **J Virol Methods**, 88:125-34, 2000.

IARC-INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Disponível em: <<http://www.iarc.fr>>. Acesso em: 22 Outubro. 2002.

ICTV-THE UNIVERSAL VIRUS DATABASE OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/vis.html>>. Acesso em: 09 Julho. 2004.

ISHI, K.; SAITO, A.; KINA, K.; KAWASHIMA, T.; SUZUKI, F.; UTSUNO, H. et al. HPV infection of the uterine cervix by cytodiagnosis, histodiagnosis and dot blot hybridization method. **Rinsho Byori**, 43:149-54, 1995.

KARLSEN, F.; KALANTARI, M.; CHITEMERERE, M.; JOHANSSON, B.; HAGMAR, B. Modification of Human and Viral Deoxyribonucleic Acid by Formaldehyde Fixation. **Lab Invest**, 71(4): 604-11, 1994.

KJAER, S.K.; VAN DEN BRULE, A.J.; BOCK, J.E.; POLL, P.A.; ENGHOLM, G.; SHERMAN, M.E. et al. Human papillomavirus: the most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. **Int J Cancer**, 65:601-6, 1996.

KOUTSKY, L.A.; HOLMES, K.K.; CRITCHLOW, C.W.; STEVENS, C.E.; PAAVONEN, J.; BECKMANN, A.M. et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. **N Engl J Med**, 327:1272-8, 1992.

KURMAN, R.J.; MALKASIAN, G.D. JR; SEDLIS, A.; SOLOMON, D. From Papanicolaou to Bethesda: the rationale for a new cervical cytologic classification. **Obstet Gynecol**, 77(5):779-82, 1991.

LAZCANO PONCE, E.C.; DE RUIZ, P.A.; MARTINEZ ARIAS C.; MURGUIA RIECHERS L. Diagnostic concordance in gynecologic cytology. **Rev Invest Clin**, 49(2):111-6, 1997.

LIAW, K.L.; HSING, A.W.; CHEN, C.J.; SCHIFFMAN, M.H.; ZHANG, T.Y.; HSIEH, C.Y. et al. Human papillomavirus and cervical neoplasia: a case-control study in Taiwan. **Int J Cancer**, 62:565-71, 1995.

MUNOZ, N.; BOSCH F.X.; DE SANJOSE, S.; VILADIU, P.; TORMO, J.; MOREO, P. et al. Human Papillomavirus in the etiology of cervico-uterine cancer. **Bol Oficina Sanit Panam**, 115:301-9, 1993.

NCBI-NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 26 Janeiro. 2004.

NOBBENHUIS, M.A.; WALBOOMERS, J.M.; HELMERHORST, T.J.; ROZENDAAL, L.; REMMINK, A.J.; RISSE, E.K. et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. **Lancet**, 354:20-5, 1999.

NORONHA, V.; MELLO, W.; VILLA, BRITO, A.; MACÊDO, R.; BISI, F.; MOTA, R.; ET AL.. Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32:235-40, 1999.

NUOVO, G.J.; BLANCO, J.S.; SILVERSTEIN, S.J.; CRUM, C.P. Histologic correlates of papillomavirus infection of the vagina. **Obstet Gynecol**, 72:770-4, 1988a.

NUOVO, G.J. Correlation of histology with human papillomavirus DNA detection in the female genital tract. **Gynecol Oncol**, 31:176-83, 1988b.

OLSEN, A.O.; GJOEN, K.; SAUER, T.; ORSTAVIK, I.; NAESS, O.; KIERULF, K. et al. Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade II-III: a population based case-control study. **Int J Cancer**, 61:312-5, 1995.

PAPOVAVIRUSES. Disponível em: <<http://www.Tulane.EDU:80/~dmsander/WWW/335/Papovaviruses.html>>. Acesso em 15 de Março. 2004.

PARK, R.B.; ANDROPHY, E.J. Genetic analysis of high-risk E6 in episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes. **J Virol**, 76: 11359-64, 2002.

PEREIRA, J.C.R. **Análise de dados qualitativos**. 3. ed. .São Paulo. Edusp- Editora da Universidade de São Paulo, 2001 p. 21.

QU, W.; JIANG, G.; CRUZ, Y.; CHANG, C.J.; HO, G.Y.; KLEIN, R.S.; BURK, R.D. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. **J Clin Microbiol**, 35:1304-10, 1997.

ROLON, P.A.; SMITH, J.S.; MUNOZ, N.; KLUG, S.J.; HERRERO, R.; BOSCH, X. et al. Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. **Int J Cancer** , 85:486-91, 2000.

ROTELI-MARTIN, C.M.; DERCHAIN, S.F.; MARTINEZ, E.Z.; SIQUEIRA, S.A.; ALVES, V.A.; SYRJANEN, K.J. Morphological diagnosis of HPV lesions and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) is highly reproducible. **Clin Exp Obstet Gynecol**,28(2):78-80, 2001a.

ROTELI-MARTINS, C.M.; ALVES, V.A.; SANTOS, R.T.; MARTINEZ, E.Z.; SYRJANEN, K.J.; DERCHAIN, S.F.. Value of morphological criteria in diagnosing cervical HPV lesions confirmed by in situ hybridization and hybrid capture assay. **Pathol Res Pract**, 197(10):677-82, 2001b.

SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; HILDESHEIM, A.; SHERMAN, M.E.; BRATTI, M.; WACHOLDER, S. et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk provinc of Costa Rica. **JAMA**, 283:87-93, 2000.

SCHIFFMAN, M.H.; BAUER, H.M.; HOOVER, R.N.; GLASS, A.G.; CADELL, D.M.; RUSH, B.B. et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst**, 85:958-64, 1993.

SCHLECHT, N.F.; KULAGA, S.; ROBITAILLE, J.; FERREIRA, S.; SANTOS, M.; MIYAMURA, R.A. et al. . Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. **JAMA**, 286(24):3106-14, 2001.

SCHNEIDER, M.L.; SCHNEIDER, V. **Atlas de diagnóstico diferencial em citologia ginecológica**. Rio de Janeiro: Br. Livraria e editora Revinter Ltda. 1998: p. 60.

SCULLY, R.E.; BONFIGLIO, T.A.; KURMAN, R.J.; SILVERBERG, S.G.; WILKINSON, E.J. et al. **International Histological Classification of Tumors: Histological Typing of Female Genital Tract Tumours. World Health Organization (WHO)**. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1994: 39-42.

SHROYER, K.R.; HOSEY, J.; SWANSON, L.E.; WOODARD, W.D.; FENNELL, R.H.. Cytologic diagnosis of human papillomavirus infection: spindled nuclei. **Diagn Cytopathol**, 6:178-83, 1990.

SNIJDERS, P.J.; VAN DEN BRULE, A.J.; SCHRIJNEMAKERS, H.F.; SNOW, G.; MEIJER, C.J.; WALBOOMERS, J.M. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. **J Gen Virol**, 71:173–81, 1990.

SOLOMON, D.; SCHIFFMAN, M.; TARONE, R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. **J Natl Cancer Inst**, 93: 293-99, 2001.

SPITZER, M.; CHERNYS, A.E.; HIRSCHFIELD, L., SPIEGEL, G.; SEDLIS A.; ZUNA R.E.; et al. Assessment of criteria used in the histologic diagnosis of human papillomavirus-related disease of the female lower genital tract. **Gynecol Oncol**, 38(1):105-9, 1990.

TACHEZY, R.; VAN RANST, M.A.; CRUZ, Y.; BURK, R.D.. Analysis of short novel human papillomavirus sequences. **Biochem Biophys Res Commun**, 204:820-27, 1994.

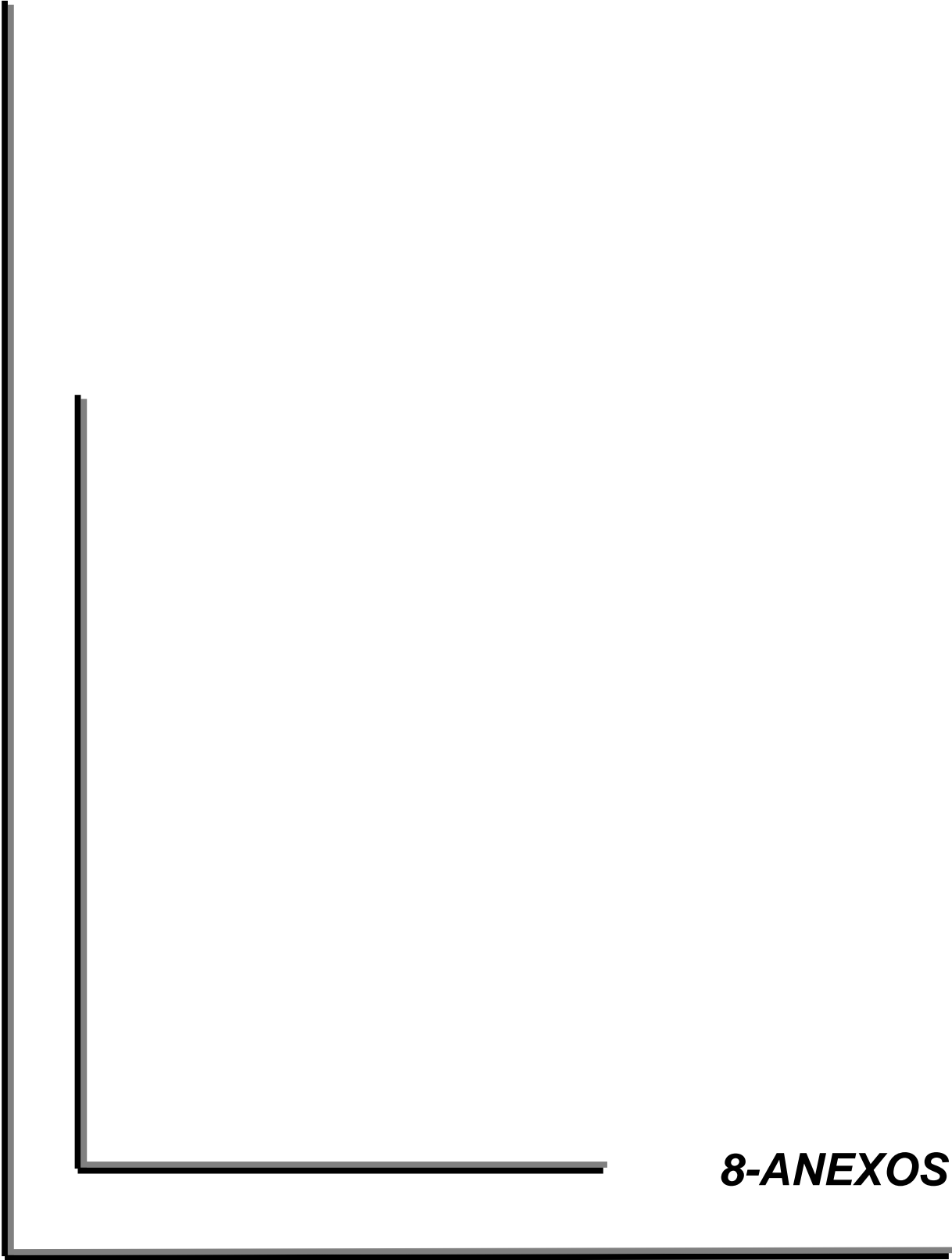
VASSALLO, J.; PINTO, G.A.; ANDRADE, L.A.L.A. PAPILOMAVÍRUS; ALVES, V. A.F.; BACCHI, C.E. **Manual de Imuno-histoquímica**. Sociedade Brasileira de Patologia, São Paulo, 1999, p. 208-15.

VASSALLO, J.; DERCHAIN, S.M.; PINTO, G.A.; SYRJANEN, S.; ANDRADE, L.A.L.A. High risk HPV and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia. **Intern J Gynecol Obst**, 71(1): 45-8, 2000.

WALLIN, K.L.; WIKLUND, F.; ANGSTROM, T.; BERGMAN, F.; STENDAHL, U.; WADELL, G. et al. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. **N Engl J Med**; 341:1633-8; 1999.

YOUNG N.A.; NARYSHKIN S.; ATKINSON B.F.; EHYA H.; GUPTA P.K.; KLINE T.S.; LUFF R.D. Interobserver variability of cervical smears with squamous-cell abnormalities: a Philadelphia study. **Diagn Cytopathol**, 11(4):352-7, 1994.

ZIELINSKI, D.G.; SNIJDERS, P.J.; ROZENDAAL, L.; VOORHORST, F.J.; RUNSINK, A.P.; DE SCHIPPER, F.A. et al. High-risk HPV testing in women with borderline and mild dyskaryosis: long-term follow-up data and clinical relevance. **J Pathol**; 195:300-6; 2001.



8-ANEXOS

DIAGNÓSTICOS

CERVICITE CRÔNICA

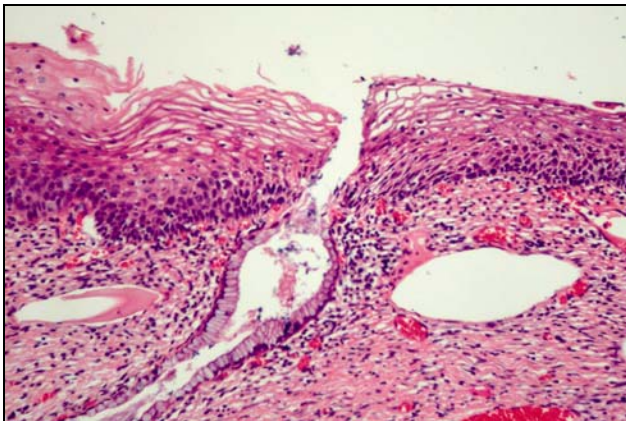


Figura 7: Caso S_046, HPV Negativo.

NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ESCAMOSA GRAU I (NIC I)

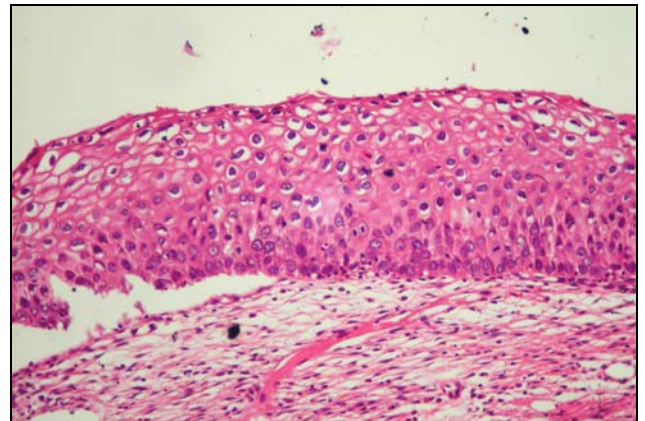


Figura 8: Caso S_010, HPV Positivo.

NIC I

NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ESCAMOSA GRAU II (NIC II)

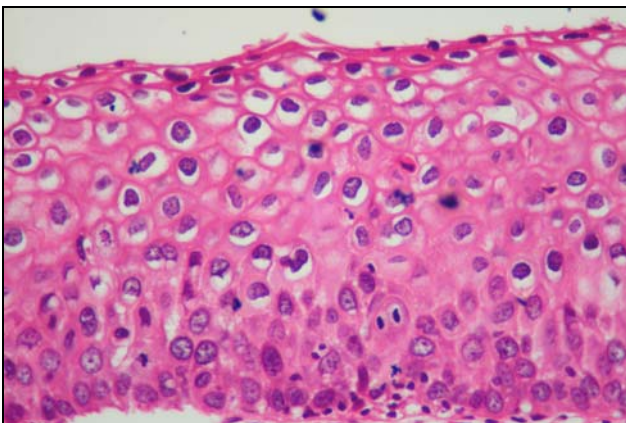


Figura 9: Caso S_010, HPV Positivo.

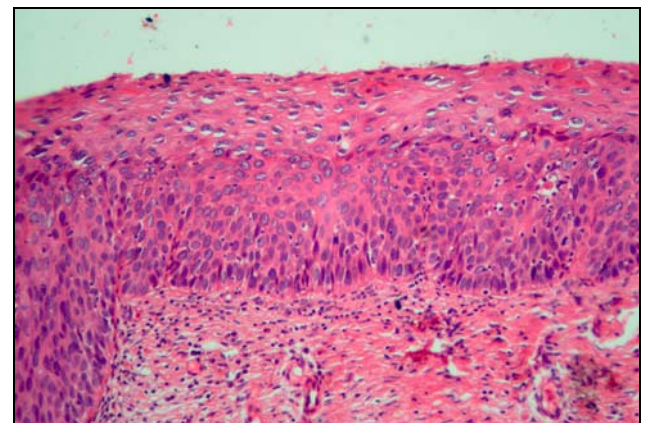


Figura 10: Caso S_068, HPV Negativo.

NIC II

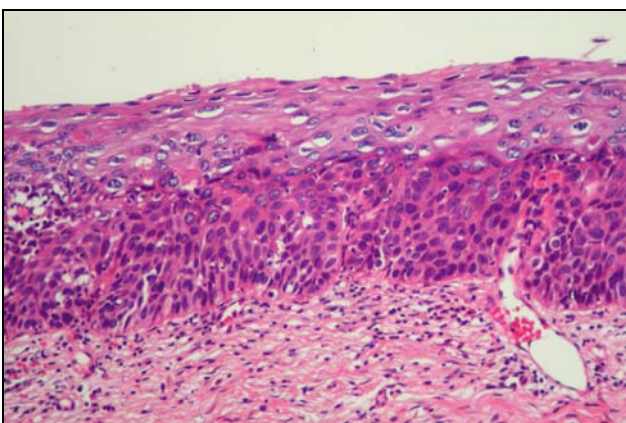


Figura 11: Caso S_068, HPV Negativo.

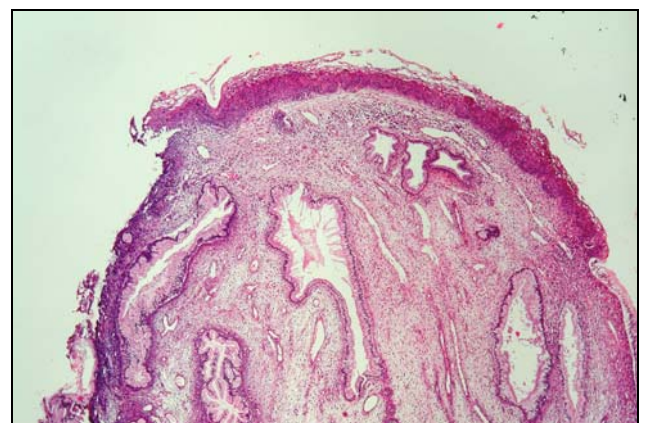


Figura 12: Caso S_011, HPV Positivo Tipo 58.

DIAGNÓSTICOS

NIC II

NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ESCAMOSA GRAU III (NIC III)

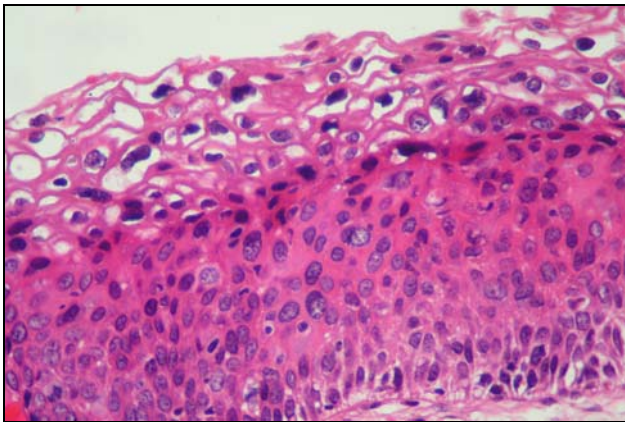


Figura 13: Caso S_017, HPV Positivo.

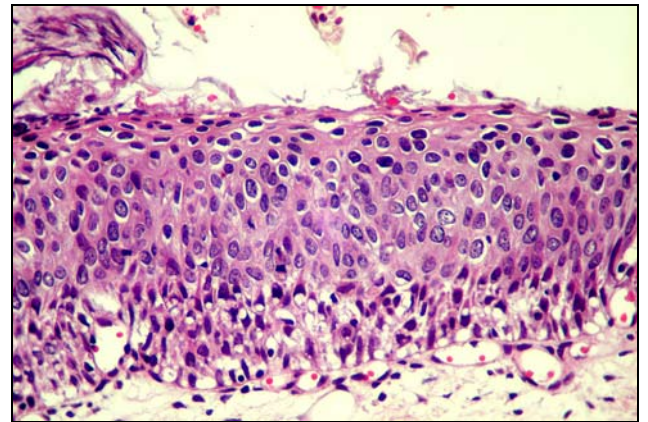


Figura 14: Caso S_059, HPV Positivo Tipo 16.

NIC III

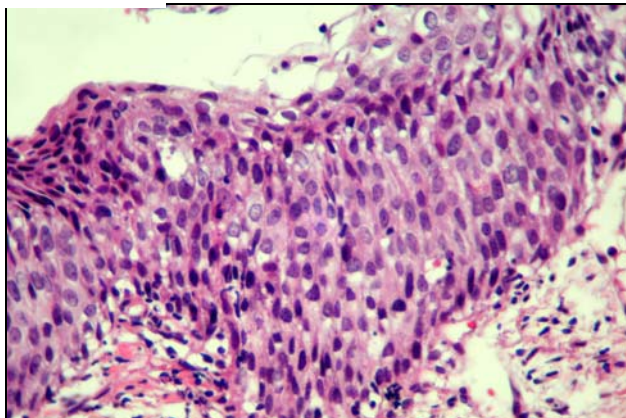


Figura 15: Caso S_059, HPV Positivo Tipo 16.

SUGESTIVO DE INFECÇÃO PELO HPV (SHPV)

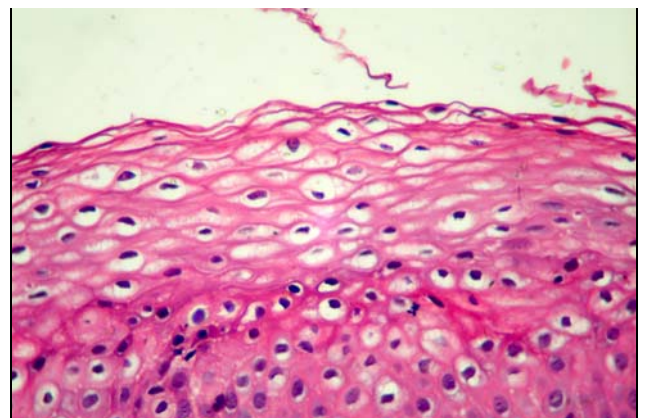


Figura 16: Caso S_044, HPV Positivo Tipo 58.

SHPV

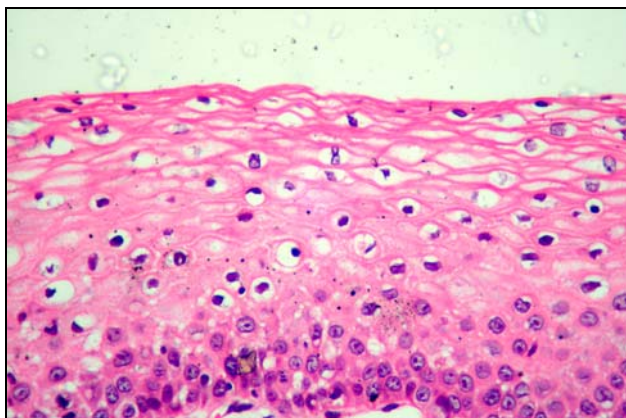


Figura 17: Caso S_047, HPV Negativo.

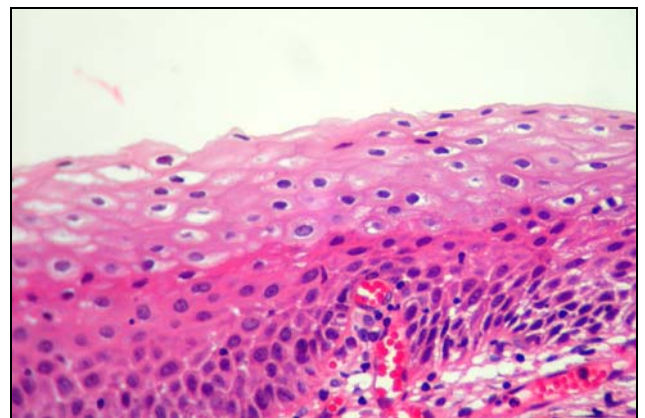


Figura 18: Caso S_002, HPV Positivo.

CRITÉRIOS

ACANTOSE

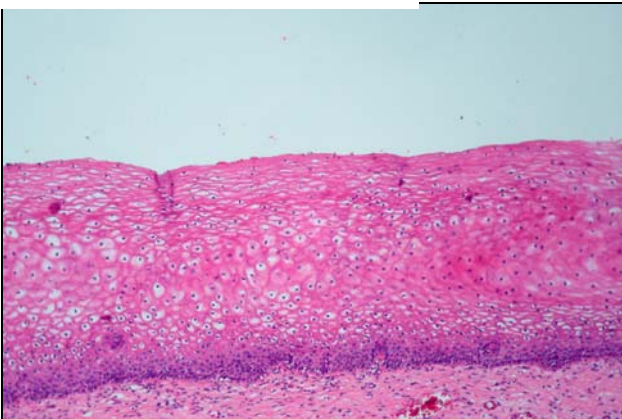


Figura 19: Caso S_052, HPV Negativo.

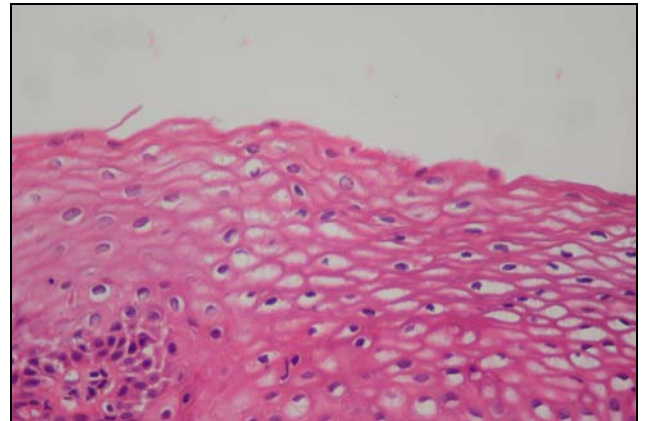


Figura 20: Caso S_044, HPV Positivo Tipo 58.

ATIPIA COILOCITÓTICA

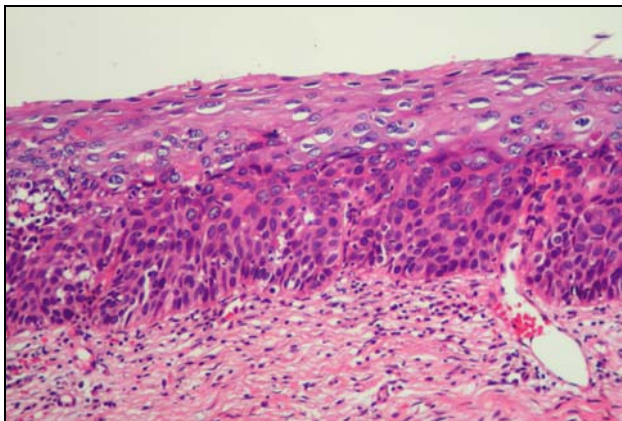


Figura 21: Caso S_068, HPV Negativo.

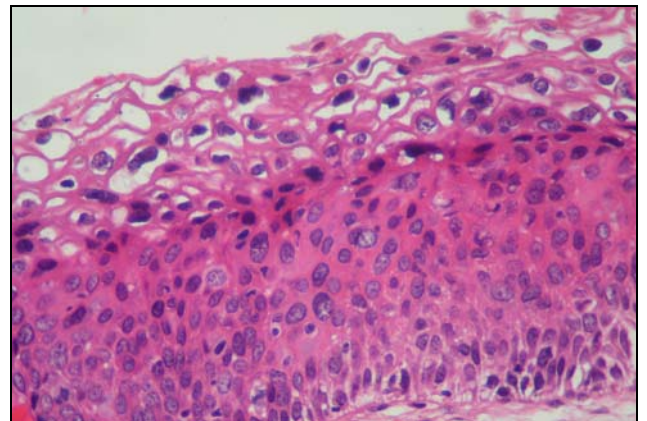


Figura 22: Caso S_011, HPV Positivo Tipo 58.

ATIPIA COILOCITÓTICA

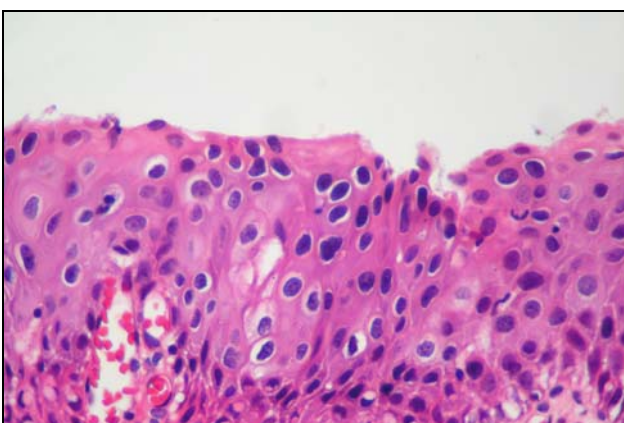


Figura 23: Caso S_011, HPV Positivo Tipo 58.

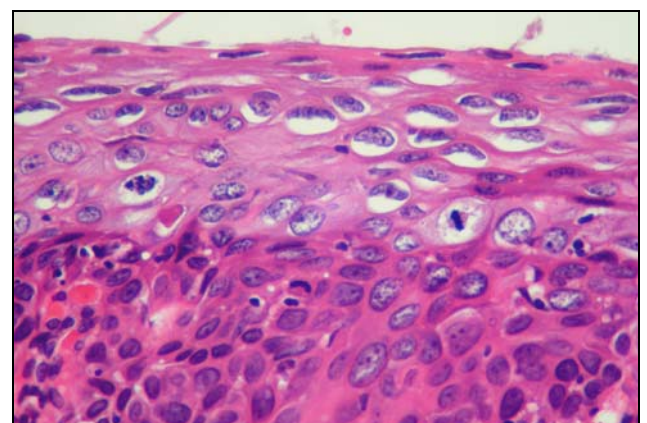


Figura 24: Caso S_068, HPV Negativo.

CRITÉRIOS

BINUCLEAÇÃO

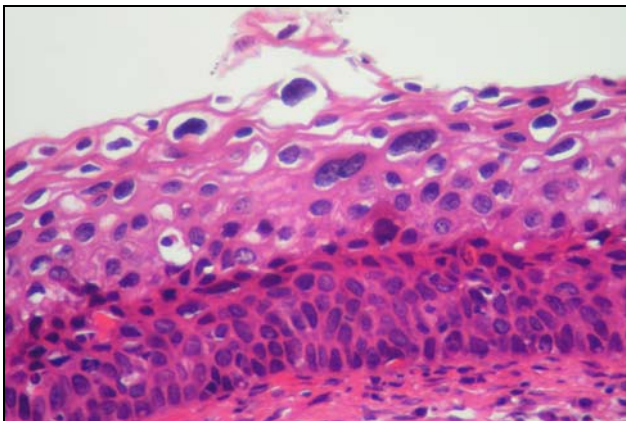


Figura 25: Caso S_017, HPV Positivo.

DISCERATOSE

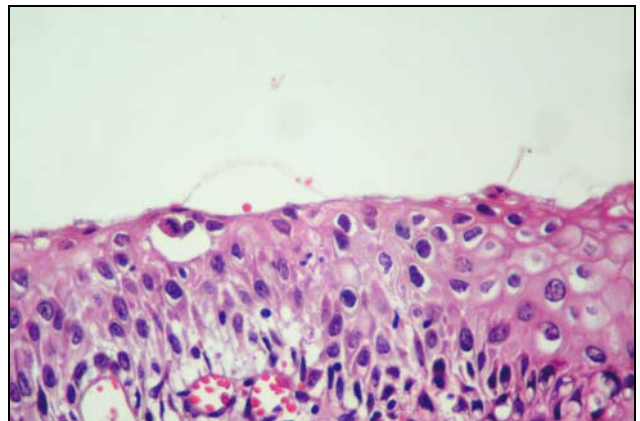


Figura 26: Caso S_059, HPV Positivo Tipo 16.

DISCERATOSE

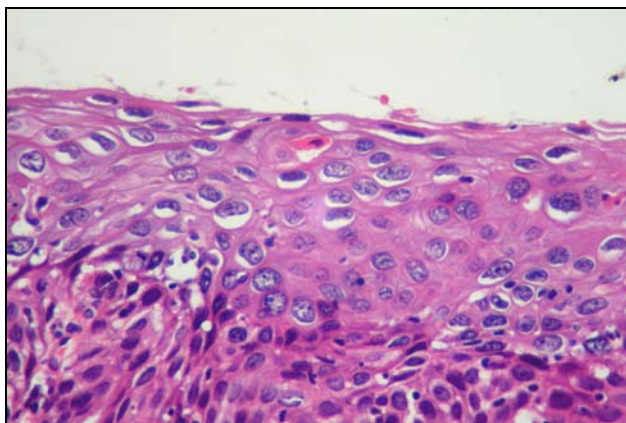


Figura 27: Caso S_068, HPV Negativo.

LEVE ATIPIA COILOCITÓTICA

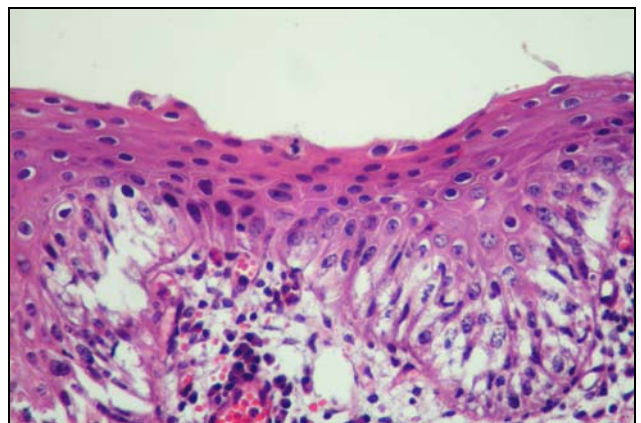


Figura 28: Caso S_050, HPV Negativo.

LEVE ATIPIA COILOCITÓTICA

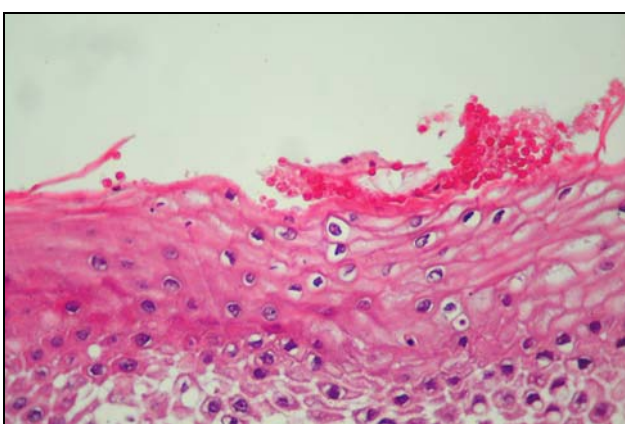


Figura 29: Caso S_036, HPV Negativo.

LEVE ATIPIA COILOCITÓTICA

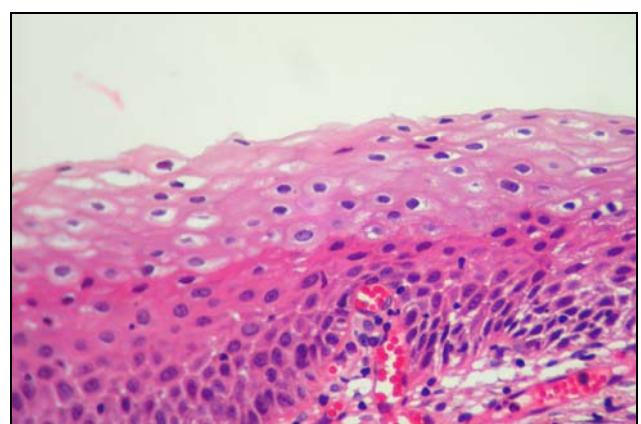


Figura 30: Caso S_002, HPV Positivo.

CRITÉRIOS

MITOSE

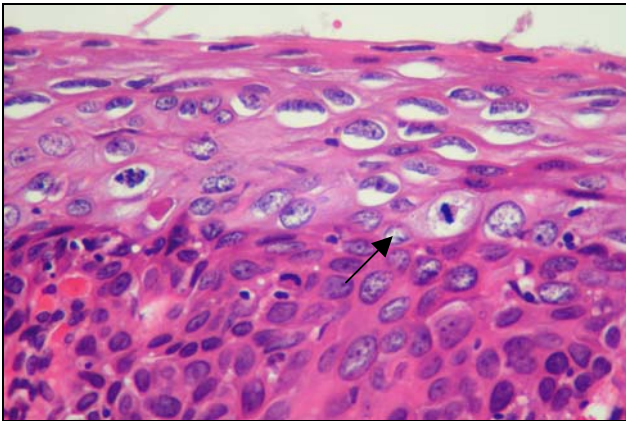


Figura 31: Caso S_068, HPV Negativo.

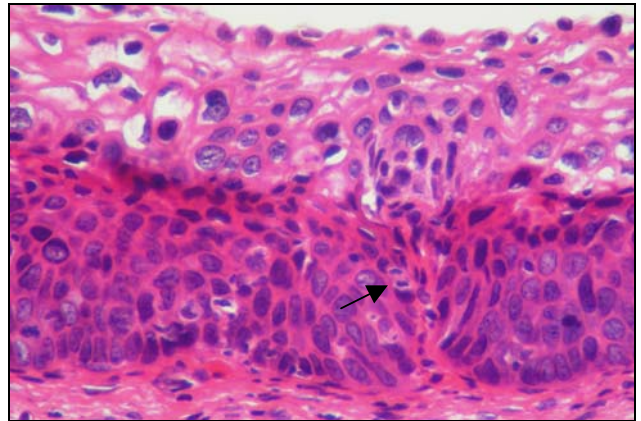


Figura 32: Caso S_017, HPV Positivo.

PARACERATOSE

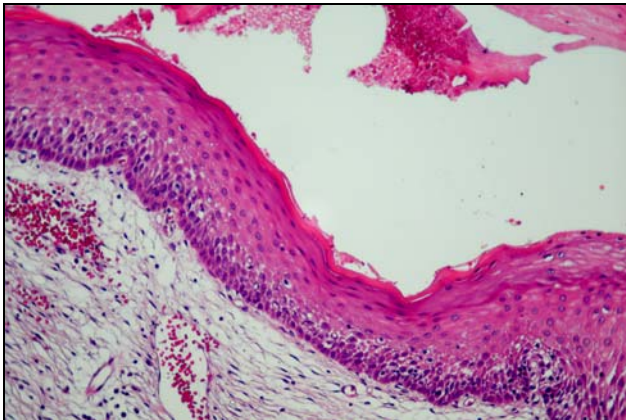


Figura 33: Caso S_036, HPV Negativo.

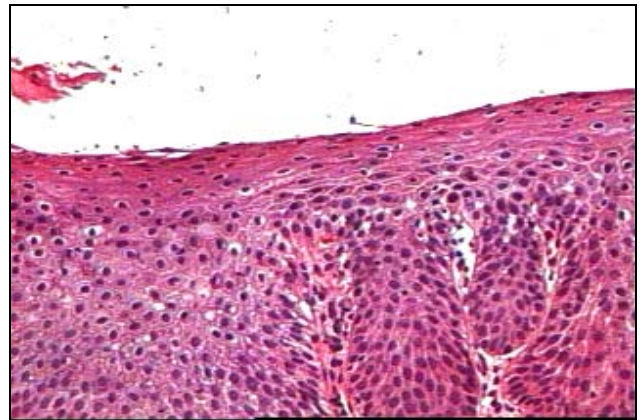


Figura 34: Caso S_44, HPV Negativo.

CRITÉRIOS

DISCERATOSE

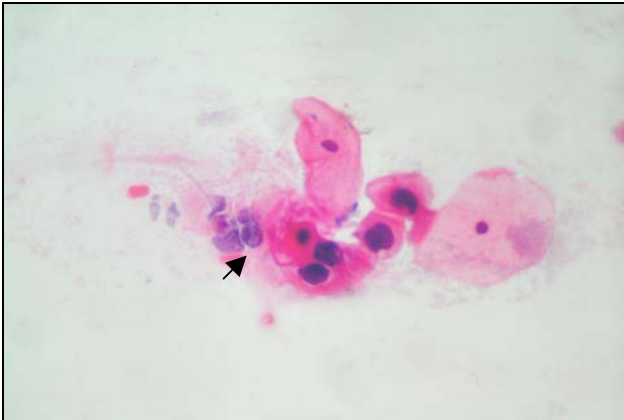


Figura 35: Caso S_059, HPV Positivo, Tipo 16.

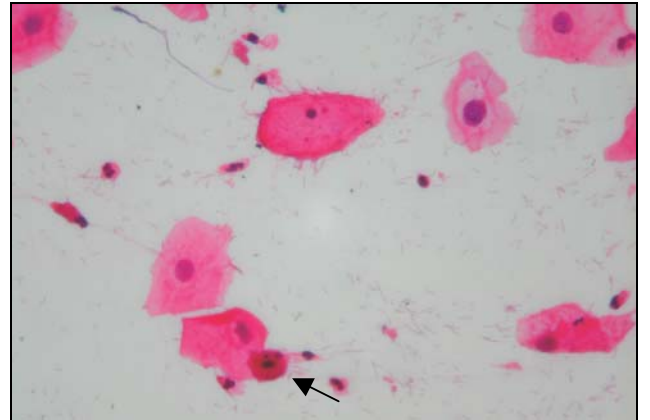


Figura 36: Caso S_083, HPV Positivo, Tipo 16.

HALO CLARO

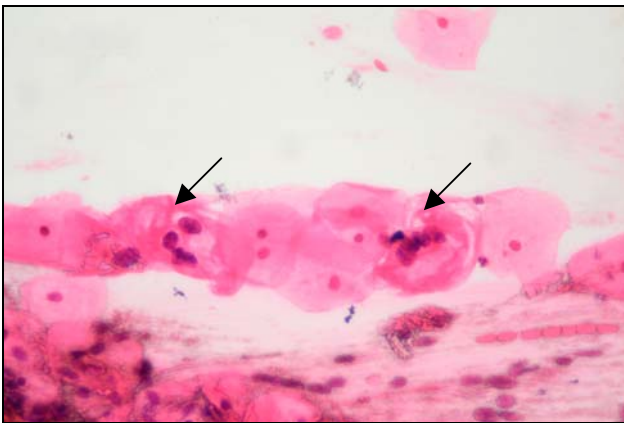


Figura 37: Caso S_017, HPV Positivo.

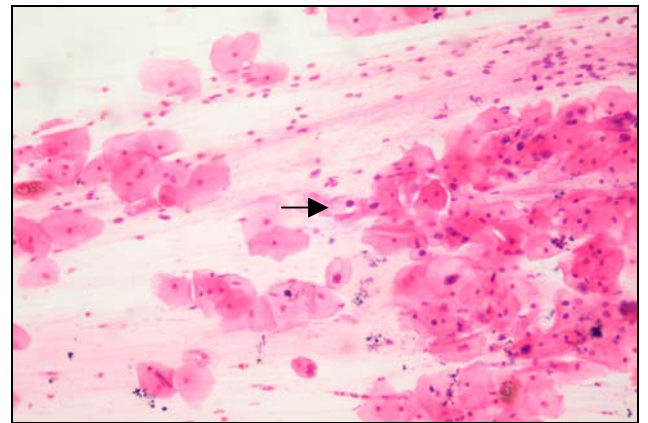


Figura 38: Caso S_017, HPV Positivo.

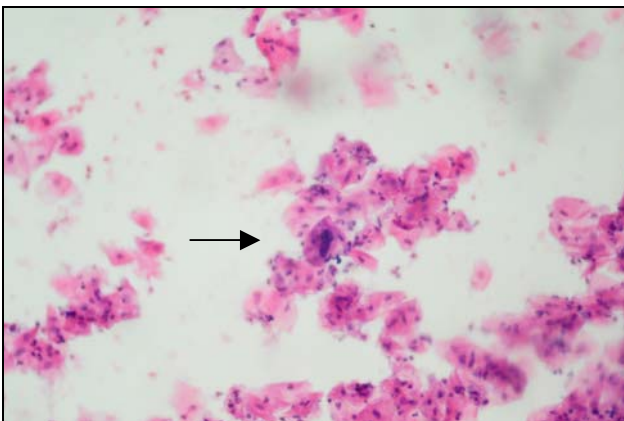


Figura 39: S_042, HPV Negativo.

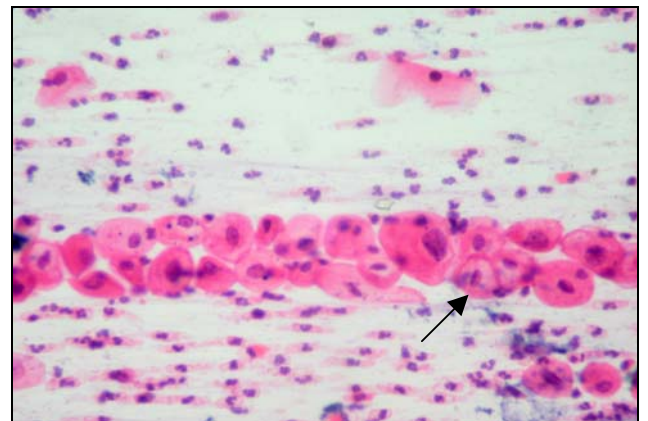


Figura 40: Caso S_08, HPV – exame prejudicado.

CRITÉRIOS DE CÉLULAS IMATURAS

BINUCLEAÇÃO

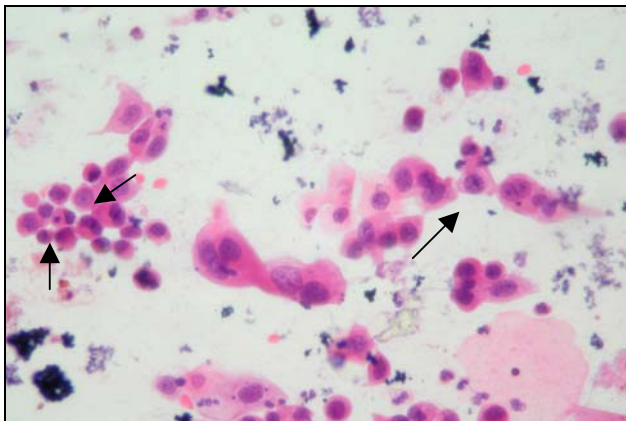


Figura 41: Caso S_067, HPV Positivo.

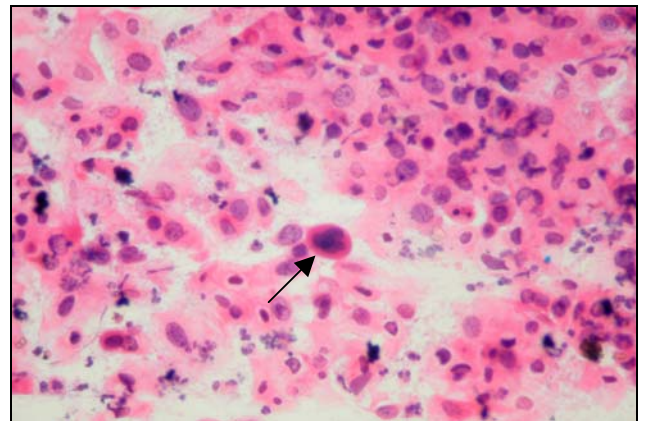


Figura 42: Caso S_067, HPV Positivo.

CONTORNO NUCLEAR IRREGULAR

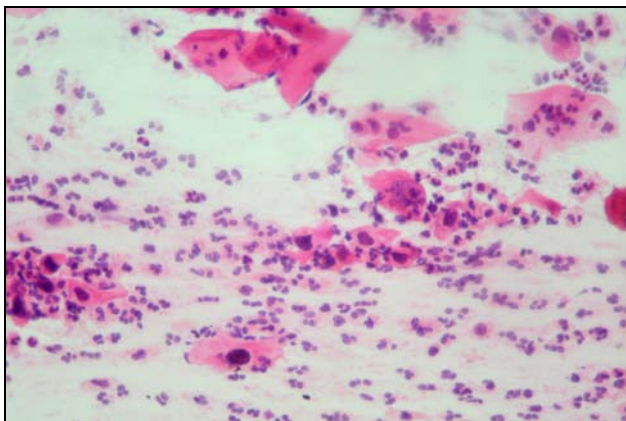


Figura 43: Caso S_083, HPV Positivo Tipo 16.

CROMATINA IRREGULARMENTE DISTRIBUÍDA

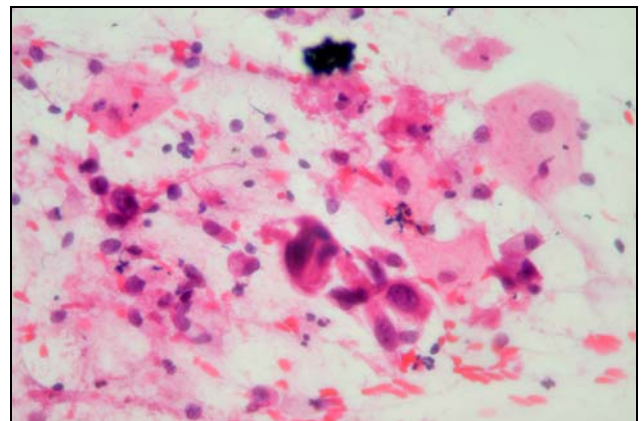


Figura 44: Caso S_084, HPV Positivo.

FILA INDIANA

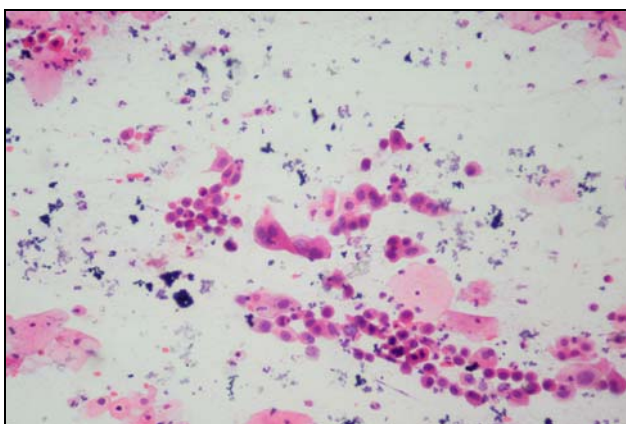


Figura 45: Caso S_067, HPV Positivo.

FILA INDIANA

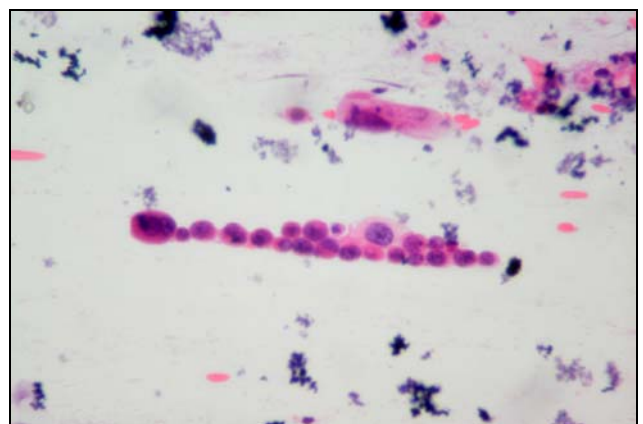


Figura 46: Caso S_067, HPV Positivo.

CRITÉRIOS DE CÉLULAS IMATURAS

FILA INDIANA

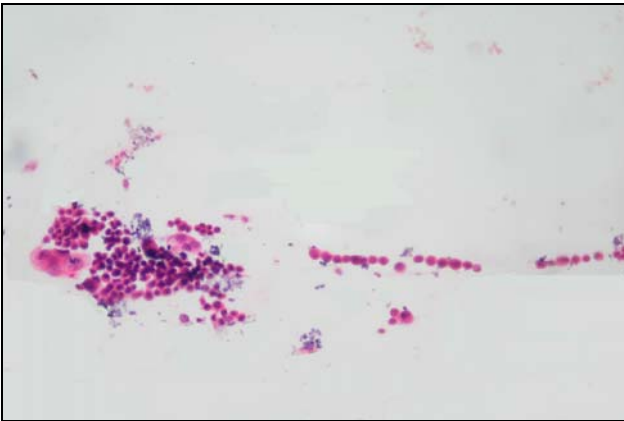


Figura 47: Caso S_067, HPV Positivo.

PERDA DA RELAÇÃO NÚCLEO-CITOPASMÁTICA

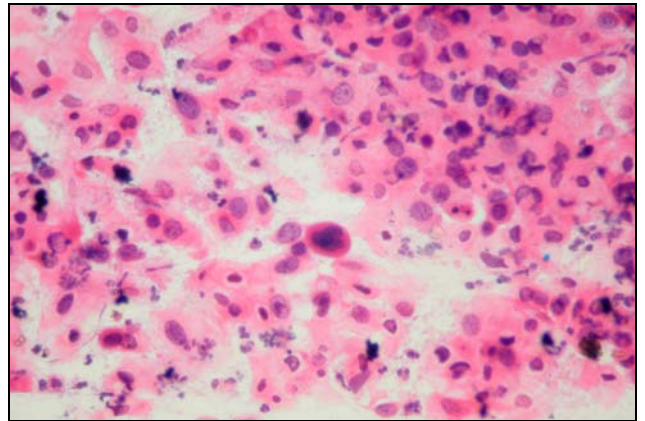


Figura 48: Caso S_067, HPV Positivo.

FORMAÇÃO SINCICIAL COM ATIPIA

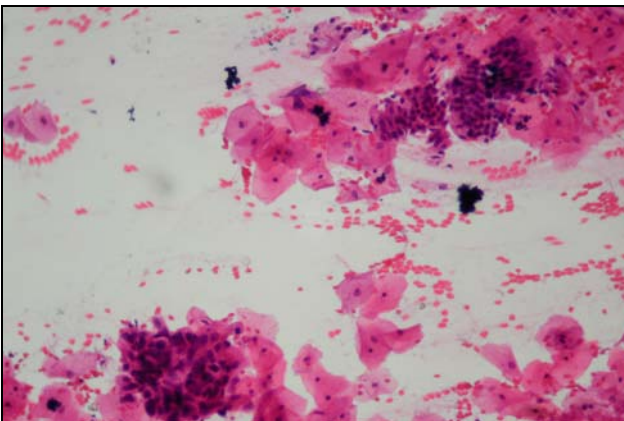


Figura 49: Caso S_082, HPV – Exame não concluído

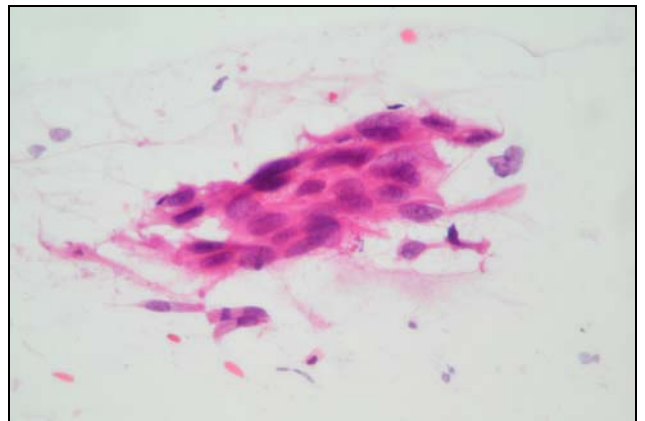


Figura 50: Caso S_084, HPV Positivo.

HIPERCROMATISMO NUCLEAR

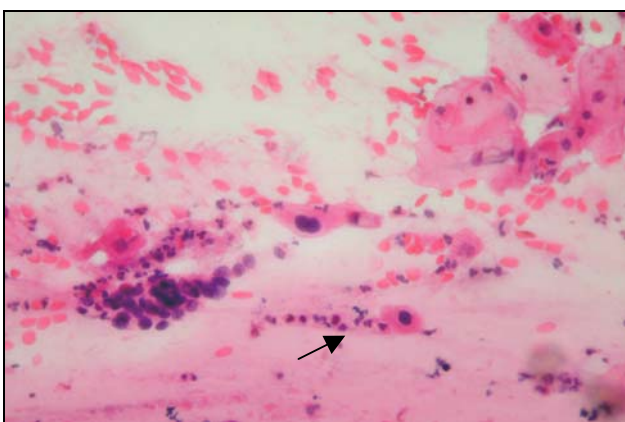


Figura 51: Caso S_018, HPV Positivo.

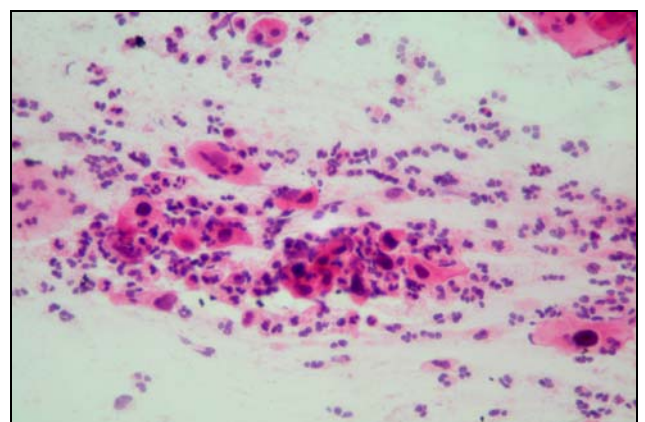


Figura 52: Caso S_083, HPV Positivo Tipo 16.

CRITÉRIOS CÉLULAS SUPERFICIAIS

BINUCLEAÇÃO

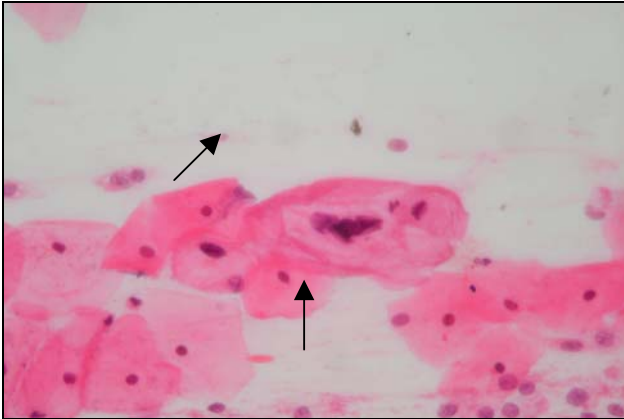


Figura 53: Caso S_017, HPV Positivo.

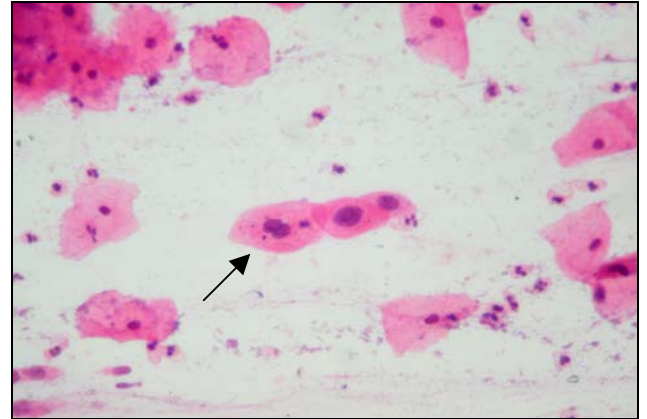


Figura 54: Caso S_018, HPV Positivo.

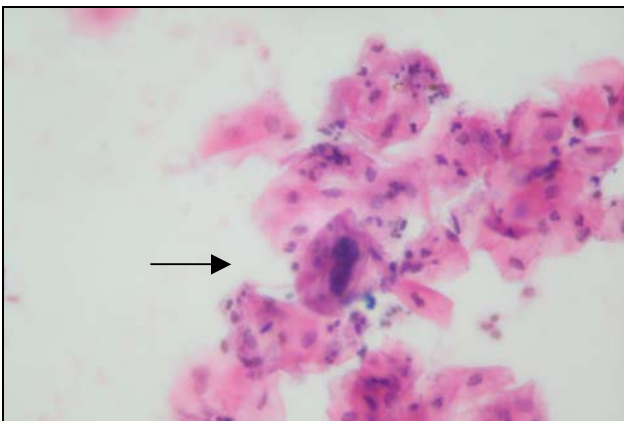


Figura 55: Caso S_042, HPV Negativo.

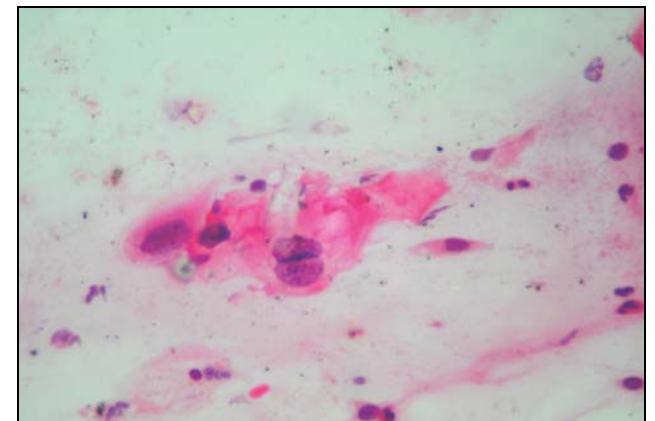


Figura 56: Caso S_075, HPV Negativo.

CROMATINA IRREGULARMENTE DISTRIBUÍDA

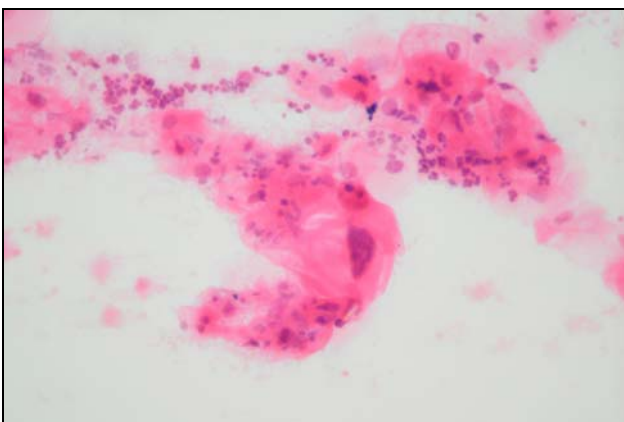


Figura 57: Caso S_037, HPV Positivo Tipo 55.

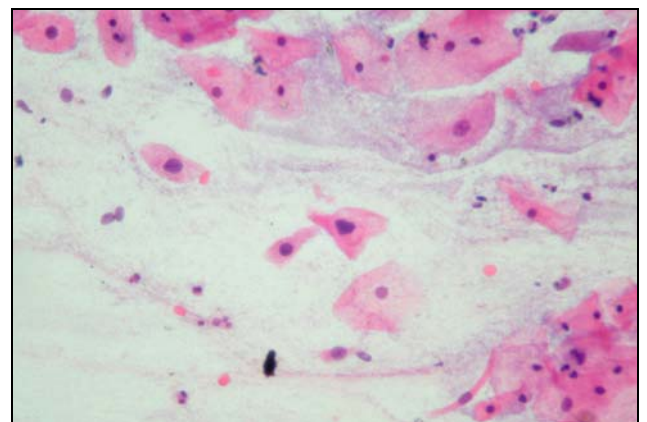


Figura 58: Caso S_059, HPV Positivo Tipo 16.

CRITÉRIOS CÉLULAS SUPERFICIAIS

HIPERCROMATISMO NUCLEAR

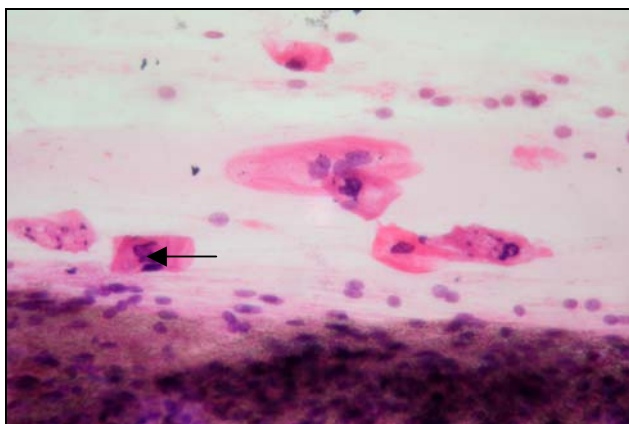


Figura 59: Caso S_017, HPV Positivo.

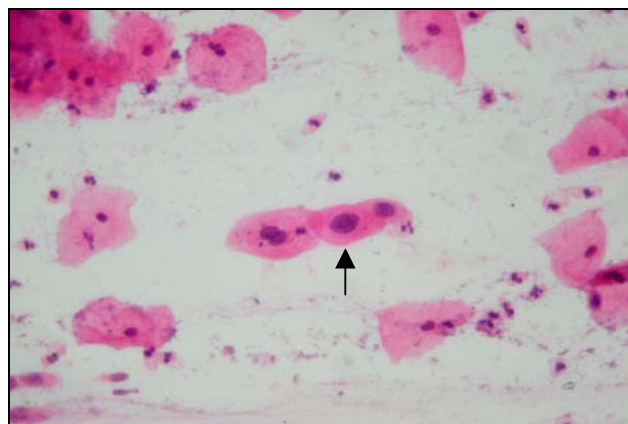


Figura 60: Caso S_018, HPV Positivo.

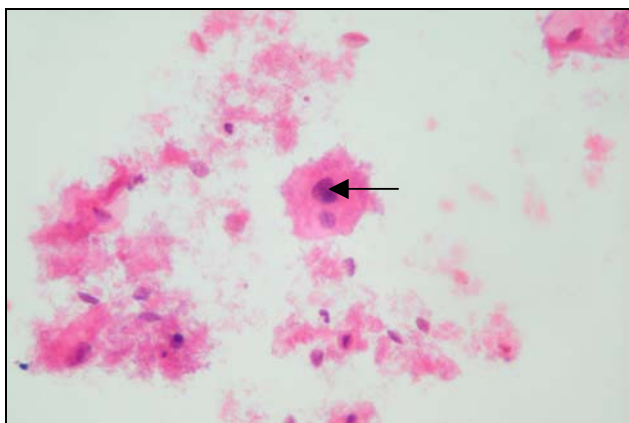


Figura 61: Caso S_040, HPV Positivo.

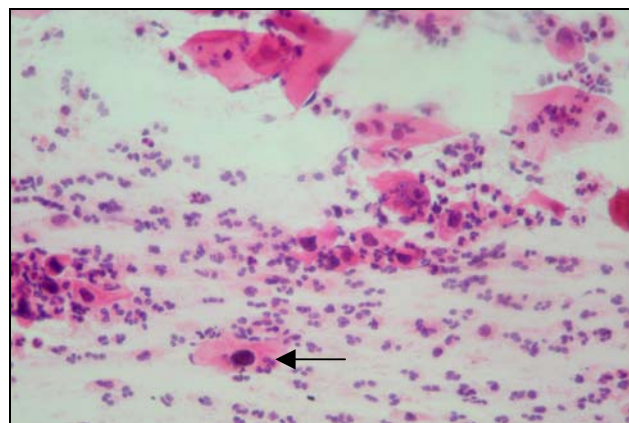


Figura 62: Caso S_083, HPV Positivo Tipo 16.

PERDA DA RELAÇÃO NÚCLEO-CITOPASMÁTICA

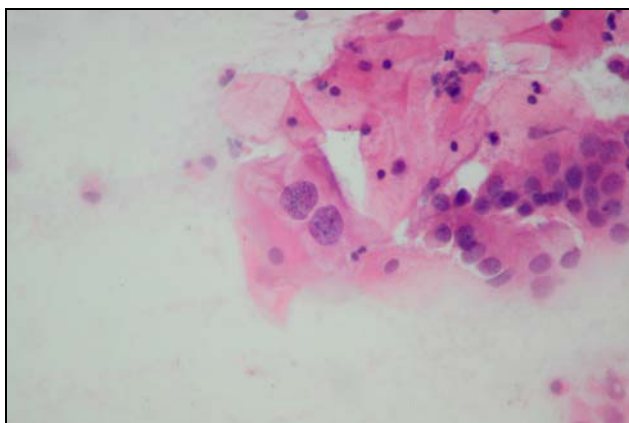


Figura 63: Caso S_059, HPV Positivo Tipo 16.

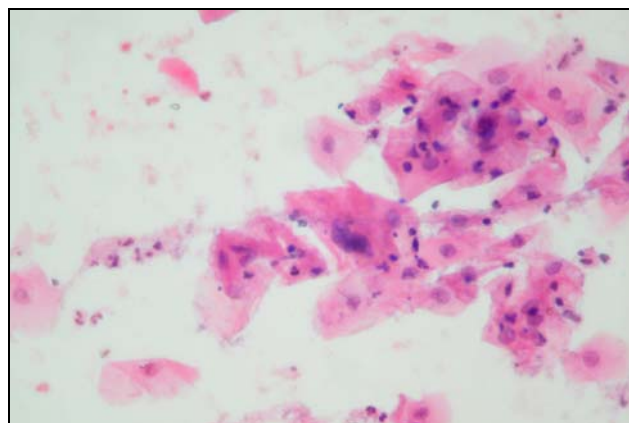


Figura 64: Caso S_042, HPV Negativo.

Correlation between histological criteria and human papillomavirus presence based on PCR assay in cervical biopsies

P. N. D. SALVIA*, S. M. BERGO†, P. I. P. BONESSO-SABADINI‡, E. B. TAGLIARINI‡, C. HACKEL§ & L. A. L. DE ANGELO ANDRADE*

*Department of Pathology, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP; †Public Health Service, Prefeitura Municipal de Campinas; ‡Citocamp Laboratório de Patologia S/C LTDA; and §Department of Medical Genetics, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Abstract. Salvia PND, Bergo SM, Bonesso-Sabadini PIP, Tagliarini EB, Hackel C, De Angelo Andrade LAL. Correlation between histological criteria and human papillomavirus presence based on PCR assay in cervical biopsies. *Int J Gynecol Cancer* 2004;14:126-132.

The aim was to correlate histological findings in cervix lesions to human papillomavirus (HPV), as detected by polymerase chain reaction (PCR). One hundred and seven women with atypical Pap smear were submitted to colposcopic examination, and suspicious images were biopsied. The PCR assay was performed with the primers MY09/11 and GP05/06+ and, as control, the beta-globin gene was amplified. The morphological findings were correlated to HPV positivity: parakeratosis, acanthosis, koilocytotic atypia (KA), binucleation, dyskeratosis, and number of mitoses. From 107 patients, 61 biopsies were taken: 11 chronic cervicitis (CC), 36 cervical intraepithelial neoplasia (CIN) (13 CIN I; 10 CIN II; 13 CIN III), and 14 suggestive for HPV (SHPV). DNA extraction was not possible in eight cases. HPV was found in 35% CC, 77% CIN, and 64% SHPV. The analysis did not indicate any morphological criteria strongly related to HPV. The findings with highest sensitivity for HPV were KA (88.89%) and binucleation (75%), but with low specificity of 29.41 and 52.94%, respectively. The higher predictive positive values (PV⁺) for HPV were also KA (72.73%) and binucleation (77.14%). Considering KA, dyskeratosis and binucleation together, PV⁺ was 72.41%. Conclusion: Although indicative, none of the studied morphological criteria was always related to PCR virus detection, denoting some limitations for histological diagnosis.

KEYWORDS: cervix uteri, diagnosis, histopathology, HPV, PCR.

Human papillomavirus (HPV) is associated to cervical squamous intraepithelial lesions (SIL) which can evolve to cervical cancer^(1,2). Cohort studies have

demonstrated that the persistence of HPV DNA is necessary for the development of cervical neoplasms and its disappearance predicts regression of the neoplastic cells⁽³⁻⁵⁾. Most lesions arise from squamous epithelium or squamous metaplastic endocervical epithelium. When restricted to the epithelium they are named SILs, cervical intraepithelial neoplasia (CIN) or dysplasia-carcinoma *in situ*, in accordance with World Health Organization (WHO)⁽⁶⁾. Grades

Address correspondence and reprint requests to: Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade, Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Ciências Médicas UNICAMP, Caixa Postal: 6111 Campinas, SP, 13083-970, Brazil. Email: lucci@unicamp.br

CIN I, II, and III are recognized depending on extent and severity. Several studies have shown that HPV is related to these precursor lesions as well as to advanced cancer⁽⁷⁻¹²⁾. The natural history of most cervical cancers starts from an infectious disease associated with HPV which leads to intraepithelial cellular abnormalities. As HPV detection methods developed, the prevalence of HPV DNA in low-(LSIL) and high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) has increased to 80–90%⁽¹³⁾.

Most countries use Papanicolaou test as a screening to detect CIN. Positive patients are referred to colposcopy and biopsy of the suspected area. Histological diagnosis of CIN is based on morphological criteria described by WHO⁽⁶⁾. Furthermore, some histological aspects are considered suggestive of HPV (SHPV) infection in epithelial lesions. However, as the latter are liable to subjectivity in evaluation, some disagreement in diagnosis occurs among pathologists.

After the development of primers for HPV detection by the polymerase chain reaction (PCR) assay, it has become clear that HPV has a major role in cervical cancer because almost every sample contains HPV DNA^(14,15). This has led to the widespread use of HPV DNA detection tests in patients with SIL or atypical squamous cells of undetermined significance as a screening method in lieu of colposcopy, a policy that has been questioned⁽¹⁶⁾.

The aim of this study was to evaluate the morphological criteria used in biopsies to diagnose CIN and HPV from cervical samples and to compare them to the presence of HPV DNA by PCR with generic primers MY09/11 and GP05+/06+. It is hoped that this study may improve the reproducibility of morphological HPV diagnosis.

Patients and methods

This study was approved by local Institutional Ethical Committee, and women were enrolled after their written informed consent. One hundred and seven women with atypical Pap smear from a Public Health Center of Campinas, Brazil, were submitted to colposcopic examination. A cervical swab collected with a cytobrush was immersed in a sterile flask containing 1 ml DNAzol (InvitrogenTM) and sent to PCR laboratory. Biopsies were taken from suspicious colposcopic areas.

PCR

The DNAzol buffer was transferred to a 1.5 ml microcentrifuge tube with 500 µl of ethanol 95%. The solu-

tion was centrifuged at 14,000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded; a new aliquot of 500 µl of ethanol 95% was added, followed by a centrifugation step. This procedure was done twice. The DNA was left drying for 15 min at room temperature, and resuspended in 50 µl of Tris-EDTA (10 mM/1 mM, pH 8.0).

To amplify the viral DNA, the generic primers MY09/11 were used^(17,18). As control of the reaction and to confirm a negative result for HPV, the beta-globin gene was amplified with RS42 and KM29 primers^(17,18). The reaction was performed in 50 µl total volume containing 1.5 µl of resuspended DNA, 10 mM dNTPs, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 20 pmol for each primer, 1.5 U of Taq DNA polymerase (InvitrogenTM). The amplification consisted of an initial 5 min denaturation step followed by 40 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, and 1 min at 72 °C. The PCR product was electrophoresed on 1.2% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5 mg/ml) and examined under UV light.

The result was considered positive for viral DNA when two bands were visualized, one with 450 bp, corresponding to HPV DNA and the other with 550 bp, from the beta-globin gene. If only the 550 bp band was visualized, the result was considered negative.

HPV was typed by restriction fragment length polymorphism, with seven restriction enzymes: *Bam* H1, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Pst* I, *Rsa* I, and *Sau*3AI as described previously by Bernard *et al.*⁽¹⁹⁾.

Negative HPV samples with the MY09/11 primers were subjected to amplification with primers GP05+/06+, which are internal to MY09/11 sequence and generated a product of 142 bp. PCR was performed as described by Walboomers *et al.*^(19,20).

We elected both MY and GP-PCR systems together because PCR is the most sensitive method for the detection of HPV DNA and because some previous studies showed that there are differences in the sensitivities of these two PCR systems^(21,22).

Biopsy

The fragment was processed and stained with hematoxylin and eosin (H&E). The diagnosis was established by two pathologists who took into consideration the following six morphologic criteria: parakeratosis, acanthosis, koilocytotic atypia (KA), binucleation, dyskeratosis, and number of mitosis by ten high power fields. When there was strong evidence for true KA defined as enlarged, hyperchromatic, wrinkled nuclei, present in large cells, with

clear cytoplasm and thick cell membranes, the diagnosis was at least CIN I, as proposed by WHO. Mild KA was defined as hyperchromatic nuclei with slight irregularities in shape and outline of the nuclear membrane and perinuclear clear cytoplasm. When there was only mild KA, without binucleated or dyskeratotic cells, the case was classified as SHPV. We considered acanthosis when the epithelium had more than ten squamous layers.

Statistical methodology

The PCR test was considered the gold standard. To compare the histological diagnosis and the PCR results to the morphological criteria listed above, and to verify whether there is association among them, the Chi-square test was used. When the number of cases was less than five, Fisher's exact test was used. To compare the number of mitosis and the histological diagnosis, Mann-Whitney exact non-parametric test (Wilcoxon) was used. To verify the agreement between the diagnosis and the criteria with PCR, *Kappa* coefficient was calculated, which can assume the values from -1 to $+1$. Values close to $+1$ indicate total agreement between the methods, while values close to -1 indicate total disagreement. Values higher than 0.75 show strong agreement; values less than 0.40 show weak, and those between 0.40 and 0.75 show intermediate agreement.

Results

Biopsy diagnoses were separated into three groups: CC, CIN, and SHPV, to verify any association between each specific group and the PCR results.

From 107 patients, 61 biopsies were taken which yielded the following diagnoses: 11 CC, 36 CIN (13 CIN I; 10 CIN II; 13 CIN III), and 14 SHPV. DNA could not be extracted from eight cases, so 53 cases were analyzed.

Evaluating the relation between PCR and biopsy diagnoses, we found HPV positivity in 37.50% of CC, 64.29% of SHPV, and 77.42% of CIN (Table 1). The comparison between morphological criteria and the PCR results did not point to any data strongly related to the HPV DNA presence. The criteria with higher sensitivity for the histological diagnosis of HPV were KA (88.89%) and binucleation (75%), but with low specificity (29.41 and 52.94%, respectively; Tables 2 and 3). The higher predictive positive value (PV^+) for HPV diagnosis was also KA (PV^+ 72.73%) and binucleation (PV^+ 77.14%).

Table 1. Correlation between histological diagnosis and PCR test

Diagnosis	PCR test		Total	Kappa
	HPV positive (%)	HPV negative (%)		
CC	3 (37.50)	5 (62.50)	8	
SHPV	9 (64.29)	5 (35.71)	14	0.2542
CIN	24 (77.42)	7 (22.58)	31	0.3367
Total	36	17	53*	

CC, chronic cervicitis; CIN, cervical intraepithelial neoplasia; HPV, human papillomavirus; PCR, polymerase chain reaction; SHPV, suggestive for HPV.

*In eight cases DNA could not be extracted.

Morphological criteria versus diagnosis

Koilocytotic atypia occurred in all cases diagnosed as CIN, 92.86% of SHPV and has not been seen in CC. Binucleation appeared in 86.11% of CIN, 57.14% of SHPV and was absent in CC. Dyskeratosis was present in 80.56% of CIN, 50% of SHPV, and 9.09% of CC. Mitoses appeared in 58.33% of CIN, 35.71% of SHPV, and 9.09% of CC but no association was found between number of mitoses and diagnosis. Binucleation, dyskeratosis, and mitoses showed a significant positive association with CIN and negative association with CC (P -values = 0.0001, 0.0001, and 0.0024, respectively). There was no association between acanthosis and parakeratosis with any of the three diagnoses.

Presence of HPV by PCR versus biopsy diagnosis

CIN versus PCR

Sensitivity = 88.89%, specificity = 41.67%, PV^+ = 77.42 and predictive negative value = 62.50. It means that 77.42% of CIN will be HPV DNA positive, according to PCR test. However, *kappa* coefficient was 0.3367, indicating low agreement between the positive PCR test and the diagnosis of CIN (Table 1).

SHPV versus PCR

Sensitivity = 75.00%, specificity = 50.00%, PV^+ = 64.29, predictive negative value = 62.50. It means that 64.29% of SHPV will be HPV DNA positive, but the *kappa* coefficient was 0.2542 (Table 1).

Presence of HPV by PCR versus morphological criteria (Tables 2 and 3)

Two morphologic criteria were particularly associated to PCR positive results:

- 1 Koilocytotic atypia with high sensitivity of 88.89%, but low specificity of 29.41%; PV^+ was 72.73 and *Kappa* coefficient 0.2090.
- 2 Binucleation with sensitivity of 75.00%, specificity of 52.94%; PV^+ was 77.14 and *Kappa* coefficient 0.2751.

Both criteria showed an accuracy of about 70%; however, the agreement *kappa* coefficient for these morphological data was very low.

The other criteria: number of mitoses, dyskeratosis, acanthosis, parakeratosis had no agreement with PCR result (*kappa* = -0.0220, 0.0484, 0.0236, and -0.0015, respectively).

Discussion

Morphological criteria versus diagnosis

Koilocytotic atypia was present in all cases diagnosed as CIN. Its presence was expected, mainly in CIN I because it was used to define this lesion. Acanthosis, parakeratosis, and the number of mitoses did not have association with any diagnosis.

PCR versus biopsy diagnosis

PCR versus CIN

The majority of CIN showed HPV positivity (77.42%) and a high sensitivity of 88.89%. It means that among all HPV positive cases, 88.89% were CIN and out of all CIN, 77.42% were HPV positive. These data are in accordance with previous studies. Liaw *et al.*⁽²³⁾ studied HPV and cervical neoplasia in a case-control group. HPV DNA was found in 92% of HGSIL and invasive cancer, 54% of LGSIL, and in 9% of controls. Herrero *et al.*⁽¹¹⁾ in Costa Rica, screened 9175 women to obtain a standard final diagnosis, and tested 3024 women for more than 40 types of HPV with a PCR-based system. Seventy-three percent of LGSIL were HPV positive, with HPV16 being the predominant type (16% of positive subjects). HPV was found in 89% of HGSIL and 88% of cancers, with HPV16

being strongly predominant (51 and 53% of positive subjects). Virtually all HGSIL and cancers had associated HPV types, with high odds ratios (OR) and attributable fractions around 80%. However, our data demonstrated that there was a weak agreement between presence of HPV and CIN diagnosis, with *kappa* coefficient of 0.3367, that means HPV positive does not always mean CIN.

PCR versus SHPV

The histological diagnosis of SHPV was related to 64.29% of positivity for PCR test. But, the *kappa* value of 0.2542 indicates a weak agreement between the virus positivity and histological diagnosis of SHPV. So, we should not diagnose 'suggestive of HPV' based only on the presence of slight, doubtful KA because the probability of misdiagnosis is 35.71%. Instead, we should suggest that the chance of HPV infection is small.

PCR versus morphological criteria

PCR versus KA (Table 2)

When KA is present in the sample, there is a good chance for an HPV infection. However, the low *kappa* coefficient (0.2090) shows that KA does not always mean HPV infection, based on PCR results. We can see KA with negative PCR in 27.23% of the cases. According to our data, if we diagnose HPV exclusively based on this criterion we will be mistaken in 27.23% of the cases. Considering KA, dyskeratosis, and binucleation together, a similar PV^+ for the presence of HPV was obtained (72.41%). It is known that KA is currently considered the major morphological criterion used by pathologists to diagnose HPV infection. However, this finding is not completely trustworthy according to our results and as previously demonstrated by Nuovo⁽²⁴⁾. These authors detected HPV DNA sequences in 63 and 56% of colposcopically visible vaginal and cervical lesions, respectively, that were diagnosed as condyloma or

Table 2. Correlation between KA and PCR test

KA	PCR test		Total
	HPV positive (%)	HPV negative (%)	
Present	32	12	44 (83.02%)
Absent	4	5	9 (16.98%)
Total	36 (67.92%)	17 (32.08%)	53 (100%)

HPV, human papillomavirus; KA, koilocytotic atypia; PCR, polymerase chain reaction.

Agreement coefficient (*kappa*) = 0.2090; predictive positive value (PV^+) = 72.73; predictive negative value (PV^-) = 55.56; sensitivity = 88.89; specificity = 29.41.

intraepithelial neoplasia. HPV DNA sequences were detected in 14 and 47% from other vaginal and cervical lesions that did not fulfill the histologic criteria for condyloma or intraepithelial neoplasia (ie, 'non-diagnostic'). In vaginal lesions, Nuovo *et al.*⁽²⁵⁾ detected HPV in 63% of the cases with KA and in 11.7% without. The presence of the virus has been also demonstrated by electron microscopy^(26,27) and HPV DNA hybridization methods^(28,29).

If the KA is considered as pathognomonic for the presence of HPV, then some factors must be interfering in the sensitivity of PCR:

- 1 There might be some virus sequences that escape from the consensus primers used in this assay or there could be deletions in the L1 sequence flanked by the consensus primers.
- 2 Variation among detection methods: Husnjak *et al.*⁽³⁰⁾ compared five different PCR methods for detection of HPV in cervical scrapes. The first group was tested with three sets of consensus primers located within the L1 region of HPV genome: MY09/MY11 (ie, MY), L1C1/L1C2-1/L1C2-2 (ie, LC), and pI-1/pI-2 (ie, pI) primer sets. The second group of samples, which were all negative with the MY primers, was tested further with the LC primers, as well as with the GP5/GP6 (ie, GP) primers. In the first group ($n = 164$), there were 76.2% positive results obtained with at least one set of consensus primers⁽³⁰⁾. In the second study group ($n = 250$), there were 8.4, 38.8 and 4% samples positive with the LC primers, the nested MY/GP, and the HPV type-specific primer sets, respectively. They conclude that the use of the MY/GP nested PCR increased significantly the positivity rate of HPV DNA detection and should be used for samples with a low copy number of HPV DNA. Evander *et al.*⁽³¹⁾ compared the results obtained with MY, GP, and nested MY/GP primers. There were 56.5% specimens negative with MY and positive only with GP primers. The possible reasons are the smaller size of the PCR product (142 bp GP product against 450 bp MY product) and the fact that GP primers

do not contain degenerated bases. Gu *et al.*⁽³²⁾ found variation among detection methods which use HPV L1 consensus sequence and HPV E6 sequence. They detected HPV L1 consensus sequences only in 29.1% of the samples while HPV E6 was found in 60.7%.

- 3 The conditions for amplification could be not excellent for all HPV sequence.

On the other hand, we found low specificity (29.41%) for the KA, meaning that cases without this criterion could be HPV DNA positives. So, we should consider KA together with other morphological markers for HPV in the biopsy to improve our diagnosis for this virus infection.

PCR versus binucleation (Table 3)

The relation between HPV and binucleation presented high sensitivity (75%) and moderate specificity (52.94%). Nevertheless, *kappa* coefficient (0.2751) indicates a weak agreement meaning that binucleation is a marker with a similar value as KA to indicate HPV infection, but it has a higher power to exclude negative cases when not present.

PCR versus mitosis, dyskeratosis, acanthosis, parakeratosis

There was no agreement between the above criteria and PCR result (*kappa* = -0.0220, 0.0484, 0.0236, and -0.0015, respectively), showing that these elements are non-specific for HPV diagnosis.

Conclusions

Histological diagnosis of CIN was highly associated with the presence of HPV. The highest PV⁺s were: KA and binucleation, with high sensibility but low specificity. Considering KA, dyskeratosis, and binucleation together, a similar positive predictive value for the presence of HPV was obtained (72.41%). According to our data, if we diagnose HPV exclusively based on

Table 3. Frequency of binucleation and its relation to PCR test

Binucleation	PCR test		Total
	HPV positive (%)	HPV negative (%)	
Present	27	8	35 (66.04%)
Absent	9	9	9 (33.96%)
Total	36 (67.92%)	17 (32.08%)	53 (100%)

HPV, human papillomavirus; PCR, polymerase chain reaction.

Agreement coefficient (*kappa*) = 0.2751; predictive positive value (PV⁺) = 77.14; predictive negative value (PV⁻) = 50.00; sensitivity = 75.00; specificity = 52.94.

these morphological criteria, we will be mistaken in 27.59% of the cases. We can conclude that histological data are a good sign of HPV presence; nevertheless, none of the morphological criteria studied was always related to the virus, stressing their limitations when compared to PCR test.

References

- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;**338**:423–8.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) 2002. (available from: <http://www.iarc.fr>) accessed on October 22.
- Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ *et al.* Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999;**354**:20–5.
- Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW *et al.* A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992;**327**:1272–8.
- Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T *et al.* Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med* 1999;**341**:1633–8.
- Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ *et al.* *International Histological Classification of Tumors Histological Typing of Female Genital Tract Tumours*. World Health Organization (WHO), 2nd edn. Berlin: Springer-Verlag 1994, 39–42.
- Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN *et al.* Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993;**85**:958–64.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S *et al.* Human papillomavirus in the etiology of cervico-uterine cancer. *Bol Oficina Sanit Panam* 1993;**115**:301–9.
- Olsen AO, Gjoen K, Sauer T *et al.* Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade II–III. a population based case-control study. *Int J Cancer* 1995;**61**:312–5.
- Kjaer SK, van den Brule AJ, Bock JE *et al.* Human papillomavirus: the most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 1996;**65**:601–6.
- Herrero R, Hildesheim A, Bratti C *et al.* Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000;**92**:464–74.
- Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A *et al.* HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA* 2000;**283**:87–93.
- Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001;**93**:293–9.
- Bosch FX, Manos M, Munoz N *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study. *J Natl Cancer Inst* 1995;**87**:796–802.
- Rolon PA, Smith JS, Munoz N *et al.* Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. *Int J Cancer* 2000;**85**:486–91.
- Denise Zielinski G & Snijders PJ *et al.* High-risk HPV testing in women with borderline and mild dyskaryosis: long-term follow-up data and clinical relevance. *J Pathol* 2001;**195**:300–6.
- Bauer HM, Catherine EGMM, Manos. In: Herrington, CS, McGee, JOD, eds. *Diagnostic Molecular Pathology: a Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1992, 131–52.
- Tachezy R, van Ranst MA, Cruz Y, Burk RD. Analysis of short novel human papillomavirus sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;**204**:820–7.
- Bernard HU, Chan SY, Manos MM *et al.* Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994;**170**:1077–85.
- De Roda-Husman AM, Walboomers JMM, van Den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 39 ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J General Virol* 1995;**76**:1057–62.
- Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J General Virol* 1990;**71**:173–81.
- Qu W, Jiang G, Cruz Y *et al.* PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol* 1997;**35**:1304–10.
- Liaw KL, Hsing AW, Chen CJ *et al.* Human papillomavirus and cervical neoplasia: a case-control study in Taiwan. *Int J Cancer* 1995;**62**:565–71.
- Nuovo GJ. Correlation of histology with human papillomavirus DNA detection in the female genital tract. *Gynecol Oncol* 1988;**31**:176–83.
- Nuovo GJ, Blanco JS, Silverstein SJ, Crum CP. Histologic correlates of papillomavirus infection of the vagina. *Obstet Gynecol* 1988;**72**:770–4.
- Della Torre G, Pilotti S, De Palo G, Rilke F. Viral particles in cervical condylomatous lesions. *Tumori* 1978;**64**:549–53.
- Hills E, Lavery CR. Electron microscopic detection of papilloma virus particles in selected koilocytotic cells in a routine cervical smear. *Acta Cytol* 1979;**23**:53–6.
- Ishi K, Saito A, Kina K *et al.* HPV infection of the uterine cervix by cytodiagnostics, histodiagnosis and dot blot hybridization method. *Rinsho Byori* 1995;**43**:149–54.
- Shroyer KR, Hosey J, Swanson LE, Woodard WD, Fennell RH. Cytologic diagnosis of human papillomavirus infection: spindled nuclei. *Diagn Cytopathol* 1990;**6**:178–83.
- Husnjak K, Grce M, Magdic L, Pavelic K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for

- detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods* 2000;**88**:125–34.
- 31 Evander M, Edlund K, Boden E *et al.* Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol* 1992;**30**:987–92.
- 32 Gu X, Miller GA, Diehl SR. Comparison of gel and hybridization methods for detecting and subtyping human papillomaviruses in oral lesions. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 1997;**38**:A1074.

Accepted for publication October 14, 2003

Aspectos éticos

O projeto será realizado com as lâminas de citologia e biópsia e com o DNA extraído a partir de secreção cérvico-vaginal cuja leitura será realizada no Laboratório Citocamp. Este material está coletado num banco de dados e não será realizada a identificação pessoal mas apenas o número da lâmina. O resultado da pesquisa não irá interferir em nada com a assistência dada à mulher que coletou o exame. Serão respeitadas as diretrizes enunciadas pelo Ministério da Saúde para projetos em seres humanos; lei 196/96.

Os programas de controle de câncer cérvico-uterino têm basicamente duas formas de atuação: oferecer periodicamente a colpocitologia oncótica às mulheres e oferecer a propedêutica complementar para o diagnóstico e tratamento das lesões neoplásicas cervicais pré-invasoras e invasoras. Este protocolo de pesquisa tem como finalidade principal o segundo objetivo descrito. Desta forma pode ser considerado ético visto que se propõe a avaliar a acurácia dos exames utilizados na propedêutica diagnóstica das lesões intraepiteliais escamosas cervicais. Esta investigação exige a colaboração da paciente que deverá submeter-se a um exame ginecológico no Ambulatório de Ginecologia da Prefeitura Municipal de Campinas . No entanto; esta cooperação que possibilitará a coleta dos dados à pesquisa **não coloca a mulher sob risco** nem lhe cria inconveniente; excluindo-se o gasto de tempo e o transporte para o serviço. A pesquisa manterá o anonimato da mulher e a aceitação da paciente em participar do estudo inclui também o direito em ser tratada e seguida por outro ginecologista após o diagnóstico. **A não aceitação na participação no estudo não implicará na perda dos direitos iniciais rotineiramente oferecidos pelo ambulatório.** A participação da paciente será realizada exclusivamente após assinatura do termo de consentimento informado (Anexo). Serão cumpridas as recomendações do “Guiding Medical Doctors in Biomedical Research Involving Human Subjects” da Declaração de Helsinki (1964) com as diversas modificações já ocorridas; sendo a última a de Hong Kong; 1989.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Detecção do DNA Do Papilomavírus Humano (HPV) em pacientes com citologia oncótica alterada.

Responsável: Paulo Newton Danzi Salvia

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidada a participar de um **projeto de pesquisa** envolvendo pacientes mulheres com citologia oncótica do colo uterino (exame de Papanicolaou) alterada. Os objetivos do estudo são:

Estudar os diferentes tipos de vírus (Papilomavírus Humano; também chamado HPV) em material colhido no exame de Papanicolaou de pacientes que apresentaram algum tipo de alteração suspeita e que foram encaminhadas para exame complementar de colposcopia. A colposcopia é um exame realizado com uma Lupa ou lente de aumento.

Correlacionar os tipos deste vírus com os exames realizados de rotina: colposcópico ; citológico e histológico.

Correlacionar a detecção do vírus com : idade; tempo de atividade sexual; número de parceiros sexuais; número de filhos; anticoncepcional oral ; fumo.

Nota : O Papiloma Vírus Humano pode infectar a vagina e o colo do útero e pode ser transmitido através das relações sexuais .Se não for tratada; pode produzir câncer. Existe tratamento que será escolhido pelo médico que acompanha a paciente; pois depende do tipo de vírus e do grau da lesão que ele produziu.

PROCEDIMENTO:

Eu; Sra. _____; atendida no ambulatório de Ambulatório de Ginecologia da Prefeitura Municipal de Campinas fui convidada a participar desta pesquisa porque o resultado do meu exame de prevenção (colpocitologia oncológica) mostrou alterações das células de dentro do colo do útero (células escamosas). Sei que responderei a um questionário sobre informações pessoais mantendo meu anonimato (serão avaliadas somente pelo médico que me atendeu) e que as fichas ficarão de posse do Doutor responsável pela pesquisa; Doutor PAULO NEWTON DANZI SALVIA; que manterá sigilo da fonte destas informações.

Sei que este estudo tem como objetivo comparar as alterações encontradas no exame de prevenção (colpocitologia oncológica) que eu coletei no serviço de origem com o resultado do mesmo exame que será coletado no Ambulatório de Ginecologia da Prefeitura Municipal de Campinas assim como com o resultado da colposcopia (visão do colo do útero com lente de aumento); da biópsia (retirada de um pedaço do colo do útero para estudar a lesão) quando indicada para o meu caso e que poderá ser feita com uma pequena pinça no ambulatório ou então se necessário com anestesia e retirada de um pedaço maior - cone - no centro cirúrgico; e de um teste (PCR) feito com um tipo de cotonete para ver se existem vírus no colo do útero que possa ter causado a alteração do meu exame de prevenção. Todos estes exames estão indicados para o meu caso e o diagnóstico da lesão do colo do útero quando o exame de prevenção mostra as alterações que foram encontradas no meu exame. Sei que ao voltar ao ambulatório para receber os resultados dos meus exames serei tratada de acordo com a necessidade da minha doença. Autorizo o Doutor PAULO NEWTON DANZI SALVIA a realizar uma cópia dos resultados dos exames de laboratório para que sejam anexados às fichas de pesquisa.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de raspado cérvico-vaginal será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos pois não se trata de procedimento invasivo. O desconforto será mínimo pois se trata de uma coleta habitualmente realizada anualmente e conhecida pela maior parte das mulheres para prevenir o câncer uterino . Além disto será realizada por profissional médico altamente qualificado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo; a não ser o fato de conhecer o(s) tipos de vírus que poderão estar infectando meus genitais.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica; assim como os resultados dos testes decorrentes desse projeto de pesquisa; serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica; nenhum nome será utilizado. Caso tenha alguma dúvida deverei procurar o Dr. PAULO NEWTON DANZI SALVIA
Tel.: 2556205.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Em caso de recurso; dúvidas ou reclamações contatar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas UNICAMP; tel. (019) 788-7232.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no ambulatório de Ginecologia da Prefeitura Municipal de Campinas

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) Sílvia Maria Bergo e/ou Dr. Paulo Newton Danzi Salvia explicou-me o objetivo do estudo; os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos; desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado; assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome do participante e do responsável

Assinatura do responsável

Data

RG do responsável

Responsabilidade do pesquisador

Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo; os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e
vantagens que poderão advir do estudo; usando o melhor do meu conhecimento.
Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao
participante ou responsável.

Nome e RG do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Data

FICHA CLÍNICA DE ATENDIMENTO

PATOLOGIA CERVICAL E COLPOSCOPIA

NOME: _____
IDADE: _____ DATA: _____ MATRÍCULA: _____
PROCEDÊNCIA: _____
ENDEREÇO: _____
ESTADO CIVIL: _____ PROFISSÃO: _____

ANAMNESE:

ANTECEDENTES PESSOAIS

A) CONTRACEPÇÃO:

ORAL () RITMO () GELÉIA ()
NÃO FAZ () CONDOM () DIU ()
Há quanto tempo? _____

B) LEUCORRÉIA: SIM () NÃO ()

TIPO: _____

C) DISPAREUNIA: SIM () NÃO ()

D) SINUSIORRAGIA: SIM () NÃO ()

E) METRORRAGIA: SIM () NÃO ()

F) CAUTERIZAÇÃO: SIM () NÃO () D.O ()
CRIO () QUÍMICA ()

3- ANTECEDENTES MENSTRUAIS

CICLO:

DURAÇÃO_____ INTERVALO_____ QUANTIDADE_____

DUM_____

MENARCA_____ANOS MENOPAUSA_____ANOS

4- ANTECEDENTES SEXUAIS

1° COITO_____ANOS

N.º DE PARCEIROS_____

FREQÜÊNCIA DO ATO SEXUAL_____

SEXO ORAL SIM () NÃO ()

SEXO ANAL SIM () NÃO ()

5- ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS

GESTAÇÕES:_____

PARIDADE:_____

TIPO PARTOS: PC () P. EUTÓCICO () FÓRCEPS ()

A EXPONTÂNEO () A PROVOCADO () A INCOMPLETO ()

6- COLPOSCOPIA

CÉRVIX:

EPITELIZADA () HIPOTRÓFICA () NORMOTRÓFICA () HIPERTRÓFICA () AUSÊNCIA

COLO () COLO AMPUTADO ()


O EM FENDA TRANSV. () O EM FENDA PUNTIFORME ()


O EM FENDA CIRCULAR () O EM FENDA ESTENOSADO ()


MUCO: CLARO () TURVO ()

MÁCULA RUBRA () ECTRÓPIO () PÓLIPO ()

HIPEREMIA () ECTOPIA () COLPITE ()

Z.T.N. () Z.T.A.  { DENTRO Z. TRANS. ()
FORA Z. TRANSF. ()

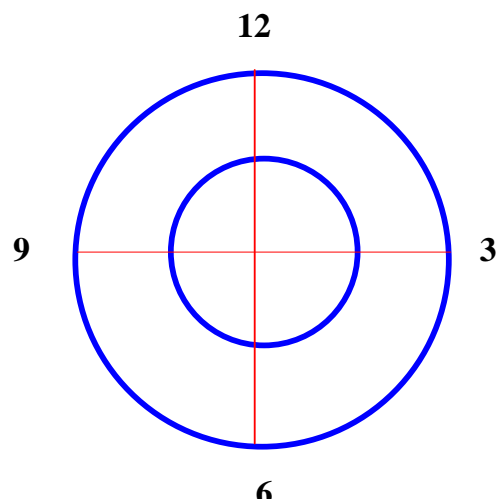
J.E.C.  { SATISF. ()
INSATISF. ()

EPIT. ACETOBranco ()  { PLANO ()
MICROPAPILAR ()

PONTILHADO () → { FINO ()
ÁSPERO ()

MOSAICO () → { FINO ()
ÁSPERO ()

LEUCOPLASIA () → { FINA ()
ÁSPERA ()



ASSOCIAÇÃO IMAGENS: _____

C) T. SCHILLER POSITIVO ()
NEGATIVO ()

7- VAGINOSCOPIA:

T. SCHILLER POSITIVO ()
NEGATIVO ()

8- VULVOSCOPIA:

T.R. COLLINS POSITIVO ()
NEGATIVO ()

9- CITOLOGIA ONCÓTICA: SIM () NÃO ()

DATA: _____ DIAGNÓSTICO: _____

No LÂMINAS: _____

SAÍDA LABORAT.: _____

10- ANÁTOMO-PATOLÓGICO: SIM () NÃO ()

DATA: _____

DIAGNÓSTICO:

11- TERAPÊUTICA INDICADA:

12- FOLLOW UP

