

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS, MORFOLÓGICOS E BIOMOLECULARES EM MULHERES ENCAMINHADAS COM CITOLOGIA ALTERADA

THE DIAGNOSTIC EFFICACY OF MORPHOLOGIC AND MOLECULAR METHODS IN WOMEN WITH ABNORMAL CITOLOGY

Denise G Drumond¹, João Lúcio dos Santos Jr.², Gerson B Dôres³, Ângela Maria Gollner⁴, Sônia Maria N Cupolilo⁴, Maria do Carmo J Coelho⁴, Adauto Castelo Filho⁵

RESUMO

Introdução: o câncer do colo uterino é a neoplasia mais frequente em mulheres de países em desenvolvimento. Doença causada pela infecção persistente com diferentes tipos de papilomavírus humano (HPV) classificados em baixo e alto risco, de acordo com o potencial oncogênico. **Objetivo:** em mulheres com diagnóstico citopatológico anormal por ocasião de exame de rastreamento do câncer cervical, encaminhadas por diferentes postos de atendimento do Sistema Único de Saúde para serviço universitário de referência e com diagnóstico definitivo de lesão intraepitelial de alto grau ou câncer cervical, avaliar a eficácia diagnóstica de métodos morfológicos e biomoleculares utilizados de maneira isolada ou em associação; e a prevalência, estratificada em duas faixas etárias, abaixo de 30 e igual ou superior a 30 anos, do HPV tipos 16, 18 e 45. **Métodos:** estudaram-se 167 mulheres encaminhadas ao Ambulatório de Patologia Cervical e Colposcopia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, no período de novembro de 2002 e dezembro de 2003, com colo uterino íntegro, não grávidas e sem história de câncer no trato genital inferior. Coletaram-se, de todas as mulheres, amostras para estudo citológico, convencional e em meio líquido, e para os testes de DNA-HPV. Considerou-se como diagnóstico histopatológico final a avaliação mais grave dentre os possíveis espécimes, biópsia, conização ou peça cirúrgica, que a paciente pudesse ter. **Resultados:** não há qualquer diferença no tocante à sensibilidade, ao valor preditivo positivo e negativo e à acurácia dentre os métodos diagnósticos estudados, porém a associação da citologia com o teste DNA-HPV tem menor especificidade que o exame citológico isolado, quer convencional ou em meio líquido. A prevalência do HPV 16, 18 e 45 cai de 88,9% para 50,0% nas mulheres com 30 anos ou mais ($p = 0,02$). **Conclusão:** nas mulheres encaminhadas ao ambulatório de PTGIC do HU-UFJF com colpocitologia alterada não se justifica a realização de qualquer exame confirmatório, devendo realizar-se imediatamente a colposcopia para se ter o desfecho diagnóstico.

Palavras-chave: HPV, lesão intraepitelial cervical, câncer cervical, citologia convencional, citologia em meio líquido, teste DNA-HPV, DST

ABSTRACT

Introduction: cervical cancer is the most frequent neoplasia among the women of countries in development. Great part of these cases is caused by persistent infection with different types of human papillomavirus (HPV) classified as low and high risk, according to the risk of cervical cancer development. **Objectives:** based on women with abnormal cytology when screening for cervical cancer who were led from different units of the Public Health System to the reference university service and with a definite diagnosis of high cervical intraepithelial neoplasia or cancer, was to evaluate the diagnostic efficacy of morphologic and molecular methods used alone or together and the prevalence of HPV types 16, 18, 45, stratified into two age brackets. **Methods:** 167 women went to the Cervical Pathology and colposcopy clinic of the University Hospital of the Universidade Federal de Juiz de Fora, during the period from November 2002 to December 2003, with intact uterine cervix, not pregnant and without previous chemical and/or radiotherapy treatment for the inferior genital tract. Samples for cytology study were collected from all women, with conventional and liquid-based preparations, for CH2 for high risk virus, for DNA PAP and for Probe Pack test. The worst histologic diagnosis among the possible histologic studies through biopsy, conization or cirurgical pieces was considered as "gold standard". **Results:** there is no difference regarding sensibility, positive predict value and negative predict value for all methods studied, However, the DNA PAP method has less specificities than the citology exam, either with conventional or based-liquid preparation. The prevalence of HPV 16, 18, 45 decreases from 88,9% to 50% in women of 30 years old or more, being this decrease statistically significant. **Conclusion:** in those women led to the PTGIC of the HU-UFJF with abnormal cytology it is not necessary to repeat any tests, just colposcopy in order to reach the final diagnosis.

Keywords: HPV, cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer, conventional cytology, liquid-based cytology, HPV-DNA test, STD

INTRODUÇÃO

O câncer do colo uterino, por se tratar de uma doença de distribuição mundial e de grande prevalência entre os países menos desenvolvidos, tem sido considerado como um dos indicadores de desenvolvimento da saúde de um povo. Isto porque, sendo o colo uterino um órgão de fácil acesso ao exame especular, considera-se inadmissível o diagnóstico tardio desta doença, sendo a proporção

de casos invasores um parâmetro da qualidade do serviço de saúde da população¹. Os dados sugerem que em todo o planeta ocorram cerca de 500 mil casos novos anuais de câncer de colo com 270 mil mortes¹. Em nosso País, informações do Instituto Nacional do Câncer (Inca) indicam cerca de 18.680 casos novos para o ano de 2008².

A citologia cervicovaginal é poderosa arma na detecção do câncer e de suas lesões precursoras. Porém numerosos estudos têm demonstrado taxas de falso-negativos e mais de um terço das pacientes que desenvolvem câncer invasivo têm em seu histórico uma colpocitologia normal anterior^{3,4}.

Para facilitar o rastreio do câncer de colo uterino foi desenvolvida a citologia em meio líquido, que foi aprovada em maio de 1996 pela FDA-USA. Vários autores ressaltam as vantagens potenciais da citologia em amostra líquida como sendo a simplificação na coleta, segurança no transporte e redução das amostras insatisfatórias

¹ Professora adjunta da disciplina de Ginecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

² Divisão de Ginecologia Universidade Federal de Minas Gerais.

³ D5 Consult Pesquisa e Desenvolvimento, São Paulo.

⁴ Divisão de Patologia Universidade Federal de Juiz de Fora.

⁵ Divisão de Infectologia UNIFESP-EPM.

Trabalho realizado no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU-UFJF).

Financiamento: Bolsa de doutorado (UFMG) – CNPq.

rias, das amostras com restrições e do tempo de análise microscópica, além de possibilitar a reserva de material para preparo de novas lâminas, novo estudo citológico, análises citoquímicas e imunocitoquímicas e, especialmente, de ácidos nucleicos, DNA e RNA³.

A infecção pelo papilomavírus humano é responsável por 95% a 100% dos casos de câncer cervical^{1,5}. Em estudos epidemiológicos, dos 40 tipos de HPV sexualmente transmissíveis conhecidos, aproximadamente 15 foram estabelecidos como tipos oncogênicos de alto risco. Pesquisas internacionais caso-controle demonstraram a proporção aproximada de cada tipo de HPV com o câncer de colo de útero: HPV 16 causa mais de 50% dos cânceres; HPV 18 causa entre 10 a 15%; HPV 45, em aproximadamente 7% e o HPV 31 é responsável por 3% dos tumores. Outros tipos de HPV oncogênicos são associados a menos de 2% dos carcinomas escamosos cervicais. Além disso, o HPV 18 é responsável por mais de 35% dos adenocarcinomas. Observa-se, também, que os tipos de HPV 16 e 18 são os mais comuns de serem encontrados em mulheres sem câncer⁶.

Estudos moleculares mostram que o DNA do HPV de alto risco foi descoberto em 99,7% de uma série internacional de cânceres cervicais com PCR altamente sensível e, em 100% dos casos, foi confirmado por revisão histológica especializada⁷.

Em uma coorte com 1.075 mulheres de 15 a 19 anos, Woodman *et al.* (2001) demonstraram que comparadas as mulheres HPV-negativo, aquelas infectadas com HPV 16 e 18 têm razão de risco relativo de 8,5% (95% IC = 3,7-19,2) e 3,3% (95% IC = 1,4-8,1), respectivamente, para o desenvolvimento de NIC II ou III em três anos após a infecção primária⁸. Winer *et al.* (2005), em estudo prospectivo com 603 estudantes universitárias, relataram taxa de incidência acumulada para HSIL de 27,2% (95% IC = 16,3 – 43,3) após infecção por HPV 16 e 18⁹.

No serviço de Patologia Cervical da UFJF as mulheres, quando encaminhadas pelas Unidades Básicas de Saúde com qualquer alteração citológica não inflamatória, submetiam-se a nova coleta citológica (endo e ectocervical) e a seguir submetiam-se a exame colposcópico. Quando da visualização de qualquer atipia colposcópica, realiza-se biópsia para análise histopatológica. Os aspectos colposcópicos encontrados são classificados de acordo com a Nomenclatura Internacional dos Achados Colposcópicos da Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia (Barcelona, 2002). O resultado do exame citológico é classificado com base no Sistema de Bethesda, 2001. O diagnóstico histopatológico de neoplasia intraepitelial baseia-se nos critérios de Richardt (1990) em sem neoplasia; lesão de baixo grau (NIC I); lesão de alto grau (NIC II, NIC III ou ca *in situ*); e câncer^{10,11}.

OBJETIVO

Objetivando avaliar o desempenho da citologia convencional, da citologia em meio líquido, da CH2[®], do DNA PAP[®] e do Probe Pack[®], foi proposto estudo cuja população-alvo seria de mulheres encaminhadas ao serviço de referência em Patologia Cervical do Hospital Universitário da UFJF, onde se desconhecem as características da prevalência de tipos virais do HPV em lesões intraepiteliais.

MÉTODOS

No presente estudo, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), parecer nº 824/2002, prospectivo, comparativo e descritivo, entre novembro de 2002 e dezembro de 2003, 167 mulheres, provenientes do Sistema Único de Saúde, com idades entre 17 e 73 anos, com citologia alterada, com colo uterino íntegro, não grávidas e sem história de câncer do trato genital inferior, submeteram-se à avaliação no ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia do Serviço de Ginecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora – Hospital Universitário (HU –UFJF). A inclusão da paciente neste trabalho foi realizada após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Colheu-se, primeiramente, material para a realização do preparado convencional, pelo raspado da ectocérvice com espátula de AYRE e da endocérvice, por escova apropriada. Após esse procedimento, efetuou-se esfregação em lâmina de vidro única, sendo essa fixada em solução de álcool absoluto. Em seguida à primeira colheita, obteve-se segunda amostra por meio de escova apropriada para colheita cervical que acompanha o *kit* UCM (Digene). Após a colheita, a escova era introduzida em frasco contendo 1 mL de líquido preservante. O processamento do preparado em meio líquido seguiu a metodologia preconizada para o sistema DNA-Citoliq[®] (Digene).

Todas as mulheres foram submetidas à colposcopia com biópsia dirigida quando da observação de atipia cervical. Utilizou-se o protocolo de conduta do Serviço de Ginecologia do HU-UFJF para a complementação diagnóstica e o tratamento.

As lâminas de ambos os preparados foram manualmente coradas segundo a técnica de Papanicolaou e analisadas ao microscópio óptico. As lâminas foram escrutinadas de forma cega por duas citopatologistas que não tinham conhecimento dos casos, como também do par de lâminas. Quando do encontro de discordância diagnóstica, uma terceira profissional era convocada para nova leitura, também de maneira cega. Nesta eventualidade, considerou-se como diagnóstico verdadeiro aquele dado por dois profissionais.

O resultado do exame citológico foi classificado com base no Sistema de Bethesda, 2001¹⁰. As alterações inflamatórias, para os propósitos deste estudo, foram consideradas em conjunto com as citologias normais.

O material remanescente do tubo com UCM, de 800 a 600 µL, foi encaminhado para análise biomolecular do HPV. A detecção da presença do DNA-HPV de alto risco oncogênico nas amostras cervicovaginais foi feita pela técnica da Captura Híbrida 2[®] (Digene) com *pool* de sondas para os seguintes tipos virais: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68. As amostras positivas para esse teste foram submetidas a nova reação com o *kit* diagnóstico HPV *Special Types* (Digene). Este é composto por *pool* de sondas de RNA específicas para os três tipos de HPV mais prevalentes nos tumores invasivos do colo uterino, 16, 18 e 45.

Todo o material obtido para avaliação histológica foi fixado em formol a 10% e encaminhado para o Serviço de Patologia e Citopatologia Prof. Paulo Torres, do Hospital Universitário da UFJF para avaliação diagnóstica. O diagnóstico histopatológico de neoplasia intraepitelial baseou-se nos critérios de Richart¹¹.

Os parâmetros estatísticos sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia foram calculados para citologia convencional, citologia em meio líquido, associação de citologia em meio líquido com teste DNA-HPV e teste DNA-HPV isolado, em relação ao achado histológico final, considerado como sendo o diagnóstico mais grave que a paciente pudesse ter, dentre espécimes oriundos de biópsia ou cirurgia, em razão de procedimentos diagnósticos e terapêuticos.

Considerou-se como preparado citológico negativo os espécimes com resultado de normal e ASC-US e, como positivo a observação de ASC-H, AGUS, LSIL, HSIL e câncer. Por sua vez, os diagnósticos anatomopatológicos foram agrupados em negativo, compreendendo normal e CIN 1 e positivo quando do encontro de CIN 2, 3, adenocarcinoma *in situ* e câncer. O teste DNA-HPV foi considerado positivo quando a leitura expressa em RLU/CO foi superior ou igual a 1. A associação da citologia e do teste DNA-HPV foi considerada positiva quando ou a citologia em meio líquido ou o teste DNA-HPV fossem positivos, como anteriormente descrito.

Com a finalidade de avaliar possível diferença na prevalência dos tipos virais 16, 18 e 45, analisados em conjunto, as pacientes foram divididas em dois grupos de acordo com a faixa etária: menos de 30 e 30 ou mais anos de idade.

Os dados foram armazenados em Excel e analisados no programa estatístico SPSS, versão 1.2 para Windows. Os parâmetros diagnósticos das quatro estratégias de diagnóstico e rastreamento, assim como as prevalências dos tipos 16, 18 e 45 por faixa etária, foram comparados através do teste do Qui-Quadrado e significância quando do encontro de erro tipo I inferior a 5%. Os intervalos de confiança foram calculados com um nível de confiança de 95%.

RESULTADOS

Nas 167 mulheres incluídas no estudo, a idade variou entre 14 e 73 anos, com média de 34. Sessenta e nove mulheres (41,3%) tinham até 30 anos e, as restantes, 98, acima dessa idade. Apesar de as mulheres terem sido encaminhadas por apresentarem exame citológico com algum grau de anormalidade, notou-se que 31,7% das amostras convencionais e 32,9% daquelas fixadas em meio líquido apresentavam células sem qualquer alteração. Vinte e sete pacientes (16,2%) tinham colposcopia normal e, por isso, não foram submetidas à biópsia de colo uterino.

Nos 12 casos (18,8%) em que a citologia convencional era normal, o padrão-ouro mostrou tratar-se de HSIL ou câncer, portanto trata-se de resultados falso-negativos. Ressalta-se a importância do diagnóstico de ASC-H, pois dos cinco casos catalogados como tal, todos se referiam a HSIL ou câncer. Por sua vez,

entre as pacientes com ASC-US (18), somente um caso era de lesão grave. Nos cinco casos com resultado insatisfatório, os estudos anatomopatológicos mostraram dois casos de LSIL, dois de HSIL e um câncer.

No que respeita ao preparado em meio líquido, dos 44 casos catalogados como normais, 16 (26,2%) eram falso-negativos, pois o resultado anatomopatológico revelou HSIL ou câncer. De modo análogo aos resultados do preparado convencional, 80% das citologias com células de ASC-H tinham HSIL ou câncer no anatomopatológico, sendo que isso não ocorreu em qualquer caso que evidenciasse ASC-US. Tal como computado para o preparado convencional, para o preparado em meio líquido excluíram-se os 12 casos com resultado insatisfatório. Nesses, não se efetuou a biópsia por ausência de imagem colposcópica atípica em dois casos; quatro tiveram resultado anatomopatológico de LSIL; cinco com HSIL e um caso de câncer.

Observaram-se 15 casos de teste DNA-HPV negativo nos pacientes em que o estudo anatomopatológico evidenciou HSIL ou câncer. Por sua vez, nas pacientes com a associação do preparado em meio líquido e do teste de DNA-HPV negativo, o encontro de HSIL e câncer ocorreu em 5,1%. As **Tabelas 1 e 2** apresentam os resultados de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia dos métodos diagnósticos estudados.

Tabela 1 – Performance diagnóstica (sensibilidade e especificidade) dos preparados citológicos, convencional e em meio líquido, da CH2® e do DNA PAP®.

	Sensibilidade % IC 95%	Especificidade % IC 95%
Convencional	79,7 (0,7359-0,8580)	64,8* (0,575-0,7204)
Meio líquido	73,8 (0,6713-0,8047)	66,7* (0,5955-0,7384)
CH2®	77,6 (0,7069-0,8451)	58,9 (0,5075-0,6705)
DNA PAP®	89,2 (0,8398-0,9491)	42,3* (0,3399-0,5060)

Dentre as 30 mulheres com padrão-ouro negativo e teste DNA-HPV positivo, somente quatro (13,3%) casos eram positivas para os tipos virais 16, 18 e 45. Dessas, três eram de pacientes acima dos 30 anos. Por outro lado, nos 52 casos de padrão-ouro e teste DNA-HPV positivos, 33 mulheres (63,5%) eram positivas para os tipos 16, 18 e 45. Todavia a percentagem não é similar quando se varia a faixa etária. De fato, 88,9% das pacientes com menos de 30 anos eram portadoras dos HPV tipos 16, 18 ou 45, número significativamente maior que o encontrado nas mulheres com 30 ou mais anos (50,0%).

Tabela 2 – Performance diagnóstica (VPP, VPN e acurácia) dos preparados citológicos, convencional e em meio líquido, da CH2® e do DNA PAP®.

	VPP % IC 95%	VPN % IC 95%	Acurácia % IC 95%
Convencional	67,1 (0,5990-0,7422)	78,0 (0,7171-0,8422)	71,85 (0,6440-0,7929)
Meio líquido	66,2 (0,5902-0,7337)	74,2 (0,6756-0,8084)	70,77 (0,6295-0,7858)
CH2®	63,4 (0,5542-0,7155)	74,1 (0,6689-0,8136)	62,86 (0,5485-0,7086)
DNA PAP®	58,6 (0,5032-0,6688)	81,1 (0,7052-0,8768)	64,70 (0,5667-0,7273)

DISCUSSÃO

O câncer de colo uterino é doença que pode ser evitada e tratada adequadamente, quando diagnosticado precocemente, mas ainda se deixa, por razões sobejamente conhecidas, como a limitação da colpocitologia oncótica, de fazer muitos diagnósticos. Por isso, procura-se aperfeiçoar as técnicas de colheita, fixação e preparo das lâminas, na tentativa de diminuir os falso-negativos, e uma das técnicas para esse fim é o preparado em meio líquido.

Além do aperfeiçoamento no preparo da amostra cervical, novos métodos diagnósticos na patologia cervical já estão sendo utilizados e foram aqui avaliados. Esses levam em consideração os conhecimentos atuais sobre a gênese do câncer do colo uterino, as assim chamadas lesões ou doenças HPV-induzidas. Dentre os testes que buscam o encontro do DNA do HPV em espécimes cervicais, encontram-se a captura híbrida 2[®], o DNA PAP[®] e o recente Probe Pack[®], ainda não disponível para uso clínico em nosso meio.

A literatura está repleta de publicações que objetivam analisar esses ensaios sob o ponto de vista do rastreamento primário do câncer cervical¹²⁻¹⁶. Todavia, pouca ênfase tem sido dada quanto à *performance* desses exames em população já submetida ao escrutínio e que apresenta exame citopatológico anormal^{17,18}.

Caso se leve em consideração que, em nosso País, anualmente se fazem cerca de oito milhões de exames citopatológicos e que destes, 7 a 10% são anormais, pode-se ver que o número de mulheres nessa situação é alto, perfazendo, aproximadamente, 600.000. Como o serviço público é responsável pela maioria dos atendimentos médicos, essas são as pacientes rotineiramente encaminhadas aos centros de referência em patologia cervical, como o da Universidade Federal de Juiz de Fora, e representa o grande contingente de atendimentos.

O presente trabalho procurou avaliar a eficácia diagnóstica da metodologia tradicional e das novas, quer sejam morfológicas ou biomoleculares, usadas isoladamente ou em associação, naquele grupo de mulheres encaminhadas com citologia anormal.

Para que se julgue a eficácia dos procedimentos, há necessidade de se ter um padrão-ouro e, para isto, nas doenças do trato genital inferior, o estudo histopatológico é aceito pela grande maioria dos pesquisadores. Todavia ele pode ser feito com diversos espécimes, desde o material advindo de biópsia dirigida pela colposcopia, até aquele feito na peça cirúrgica de histerectomia ou cirurgia mais ampla. Sabe-se que no atendimento da mulher com colpocitologia alterada, uma das primeiras condutas é fazer o exame colposcópico. Quando do encontro de atipia, é mister realizar a biópsia dirigida. O estudo histopatológico deste espécime pode levar a que se tenha que realizar uma conização ou, no encontro de maior gravidade da lesão, da retirada do útero. Com isso, uma mesma paciente pode ter dois resultados histopatológicos. Além disso, não é incomum que se tenha que fazer a histerectomia ou até cirurgia mais ampla, após o resultado anatomopatológico da peça de conização. Então, uma mesma mulher terá três resultados, que podem ou não ser distintos.

Por isso, a nosso ver, os estudos que utilizam o resultado da biópsia do colo como desfecho final podem apresentar viés de interpretação e análise. Foi por essa razão, e para minimizar essa possibilidade, que nesta pesquisa se considerou como diagnóstico definitivo para o padrão-ouro, o mais grave dentre os prováveis estudos histopatológicos que a mulher poderia ter.

Como referido, as pacientes desse estudo apresentavam citologias alteradas no encaminhamento e, com isso, constituíram-se em população de alto risco para neoplasia de colo de útero, o que foi aqui comprovado. De fato, das 140 mulheres submetidas a exame anatomopatológico, somente em 5,7%, oito casos, não se evidenciou a presença de lesão HPV-induzida.

A comparação dos achados citológicos entre preparado convencional e em meio líquido mostra números não muito discrepantes, o que não seria de se esperar. Estudos de literatura indicam que o preparado em meio líquido reduz o número de insatisfatórios e melhora a sensibilidade diagnóstica da citologia, o que aqui não foi evidenciado^{19,20}. Observou-se aumento no número de insatisfatórios e sensibilidade equivalente.

Dois razões poderiam explicar esse achado. Para que a conduta padrão não fosse alterada e a paciente não tivesse prejuízo no atendimento em sua saúde, conforme enfatizado no consentimento pós-informado, o primeiro espécime colhido, em todos os casos, foi utilizado para realizar o preparado citológico convencional, ficando, a segunda colheita, destinada aos novos exames, preparado citológico em meio líquido e testes biomoleculares. Esse viés já era esperado, pois há referência sobre a pior qualidade da segunda amostra para análise citológica já em estudos anteriores, pela presença de hemorragia ou pequeno número de células para análise^{21,22}.

A segunda razão estaria relacionada à experiência dos citopatologistas com o novo preparado citológico. Apesar de os padrões de anormalidade serem os mesmos, assim como a classificação, o preparado em meio líquido tem certas nuances na apresentação celular, distintas do convencional. Além disso, alguns sinais presentes neste último, como a diástese tumoral, em virtude do fundo limpo da lâmina, podem não aparecer e, com isso, deixar de orientar o citopatologista^{22,23}. Por isso é imperioso fazer novo treinamento, intenso e eficaz, para aqueles que gostariam de trabalhar com a citologia em meio líquido.

Em razão desses fatos, a nosso ver, o desempenho do preparado em meio líquido foi eficaz, além de trazer vantagem adicional sobre o convencional. A amostra colhida nesse meio pode servir tanto para a realização de nova lâmina citológica, se necessário, como nos casos de invalidação pré-analítica ou durante a análise, insatisfatoriedade, como para a realização de testes biomoleculares³. Isso não pode ser feito com a lâmina convencional e, se os fatos anteriormente referidos vierem a ocorrer, a paciente terá que ser convocada para nova colheita, acarretando gama de dissabores e custos já conhecidos.

Com referência ao teste de biologia molecular por Captura Híbrida 2[®] para os vírus HPV de alto risco, a sensibilidade na detecção de lesão de alto grau ou câncer foi de 77,6%, valor inferior àquele referido na literatura^{24,25}. Observaram-se 15 casos negativos para vírus de alto grau, e que se tratavam de mulheres com lesão de alto grau ou câncer (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Relação entre os resultados dos exames de Captura Híbrida 2[®] para vírus de alto risco e o padrão-ouro.

Captura Híbrida	Padrão-ouro		
	Positivo	Negativo	Total
+	52	30	82
-	15	43	58
Total	67	73	140

Tabela 4 – Comparação entre os resultados do DNA PAP[®] e o padrão-ouro.

DNA PAP	Padrão-ouro		
	Positivo	Negativo	Total
+	58	41	99
-	7	30	37
Total	65	71	136

Pode-se explicar esse achado devido à segunda amostra obtida ter sido aquela utilizada para a realização da citologia pelo preparado em meio líquido e dos testes biomoleculares, o que pode ter acarretado um número pequeno de células para análise e a consequente não presença de DNA viral.

Ao se analisar, lado a lado, as diferentes metodologias diagnósticas (**Tabelas 3 e 4**), nota-se que todas apresentam parâmetros diagnósticos similares. Faz exceção a especificidade do DNA-PAP[®], menor que aquela observada para a citologia, quer seja processada pelo método convencional ou com o meio líquido.

Sob este importante aspecto do atendimento em patologia cervical, há necessidade de se tecer três observações pertinentes, para que não ocorra vício de interpretação, visto que, como pode ser facilmente observado, os resultados obtidos diferem da maioria dos trabalhos publicados. A população objeto deste estudo, como referido no início deste capítulo, é de mulheres com suspeita de doença, já com citologia alterada e, por isso, distinta daquelas que procuram os serviços médicos para o rastreamento primário que, em cerca de 90 a 95% das vezes, são saudáveis. A sensibilidade da colpocitologia apresenta índices baixos, da ordem de apenas 51 a 58% em rigorosas revisões¹⁹.

Por sua vez, os falso-negativos ocorrem em dois terços das vezes por erros na colheita, quando não se colhe ou não se transferem as células doentes para as lâminas citológicas¹⁹. Também é sobejamente conhecido que à medida que a doença se torna mais grave, a descamação celular aumenta e, com isso, há melhora da sensibilidade do exame citológico. Portanto, existe maior possibilidade de erro do exame de escrutínio clássico em populações saudáveis do que em populações já doentes. O fato de o exame morfológico celular ser efetivo nas lesões mais graves também é a razão que justifica a terceira observação sobre os achados. O ponto de corte utilizado para definir o padrão-ouro como positivo foi o encontro histopatológico de lesão de alto grau ou câncer, situação na qual a sensibilidade citológica chega próxima a 90%²⁶.

Constata-se então que, na população estudada, a melhora diagnóstica e o auxílio no manejo clínico que a tipificação do DNA-HPV traz não se fez sentir. Dos tipos de HPV que infectam o trato genital, os mais comuns e com potencial oncogênico maior são o 16 e o 18, sendo essa a razão pela qual estão presentes nas vacinas ora em estudo. O teste denominado Probe Pack[®] foi desenhado especialmente para a determinação dos HPV 16, 18 e 45, visando ser exame reflexo para os casos com Captura Híbrida[®] positiva, pois a infecção por esses tipos apresenta maior risco relativo de evolução para o câncer, como também, para se aquilatar a presença desses vírus nas mulheres candidatas a receber a vacina anti-HPV; visto que, até o momento, não se comprovou sua eficácia quando da presença de infecção viral prévia²⁷.

Como pôde ser visto, o teste foi negativo em 19 das 34 pacientes com HSIL ou câncer. Isso significa que, na média e na população estudada, 55,8% das lesões graves não são causadas por aqueles tipos virais. Todavia, há diferença significativa quando se observa a prevalência desses tipos virais em faixas etárias distintas, menor que 30 e maior ou igual a 30 anos. Na faixa etária mais jovem, esses vírus estavam presentes em 88,9% das lesões graves e em 50% no outro grupo (**Tabela 5**). Este achado não causa surpresa, pois Herrero *et al.* (2005)²⁸ já referem grande prevalência de outros tipos virais em mulheres acima de 65 anos.

Finalmente, seria bom enfatizar, mais uma vez, que os resultados obtidos devem ser considerados no âmbito do atendimento clínico referendado, não podendo ser extrapolados para o que se espera quando do rastreamento primário, situação em que vários estudos já foram realizados. Além de ter contribuído para a introdução das novas metodologias no serviço, acredita-se que este estudo trouxe importante informação no atendimento do dia a dia, que levará à melhor otimização, com redução de custo, variável extremamente importante em nosso meio.

Como um novo achado leva a novo estudo científico, é pertinente continuar nesta linha de pesquisa a fim de verificar, por meio das novas tecnologias de genotipagem, quais são os tipos virais de importância e que representam a metade dos casos de HSIL ou câncer em mulheres de 30 anos ou mais, atendidas no HU-UFJF.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesses no desenvolvimento deste estudo.

Tabela 5 – Distribuição dos resultados do teste de Probe Pack[®] em pacientes com padrão-ouro positivo estratificado por faixa etária.

Faixa Etária	Padrão-ouro positivo		
	N	%	
< 30 anos	+	16	88,9*
	-	2	11,1
	Total	18	
≥ 30 anos	+	17	50,0
	-	17	50,0
	Total	34	

(p = 0,02).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. *Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2008.
3. Alves VAF, Bibbo M, Schmitt FCL, Milanezi F, Longato Filho A. Comparison of Manual and Automated Methods of liquid-based cytology. *Acta Cytologica* 2004; 48(2): 187-1193.
4. Manrique EJC, Tavares SBN, Albuquerque ZBP, Guimarães JV, Azara CZS, Martins MR et al. Fatores que comprometem a adequabilidade da amostra cervical. *Femina* 2009; 37(5): 283-287.
5. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Klummer A, Shah KV et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol* 1999; 189: 12-19.
6. Munoz N, Bosch FX, Sanjose S, Herrero R, Castellsaque X, Shah KV et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(6): 518-527.
7. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 88: 63-73.
8. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Antes P et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001; 357: 1831-1836.
9. Winer RL, Kiviat RN, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM et al. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J. Infect Dis* 2005; 191(5): 731-738.
10. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M et al. The 2001 Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JAMA* 2002; 287(16): 2114-2119.
11. Richart RM. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet. Gynecol.* 1990; 75: 131-133.
12. Kuhn L, Lynette D, Pollack A, Lorincz A, Richart RM, Wrigyt TC. HPV DNA testing for cervical cancer screening in low-resource settings. *J Nat Cancer Inst* 2000; 92 (10): 818-825.
13. Goldie JS, Kuhn L, Denny L, Pollack A, Wright TC. Policy analysis of cervical cancer screening strategies in low-resource settings. *JAMA* 2001; 285(24): 3107-3115.
14. Mandelblatt SJ, Lawrence WF, Gaffikin L, Limpahayorn KK, Lumbiganon P, Warakamin S et al. Costs and benefits of different strategies to screen for cervical cancer in less-developed countries. *J Nat Cancer Inst* 2002; 94(19): 1469-1483.
15. Goldie SJ, Kim JJ, Wright TC. Cost-effectiveness of Human Papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening in women aged 30 years or more. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 103(4): 619-631.
16. Sarian LO, Derchain SF, Naud P, Roteli-Martins C, Longatto-Filho A, Tatti S et al. Evaluation of visual inspection with acetic acid, lugol's iodine, cervical cytology and HPV testing as cervical screening tools in Latin America. *J Med Screen* 2005; 12(3): 142-149.
17. 17- Nobbenhuis MAE, Meijer CJLM, Van den Brule AJC, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Risse EKJ et al. Addition of high risk HPV testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2001; 84(6): 796-801.
18. ALTS Group (the ASCUS-LSIL Triage Study). Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188(6): 1383-1392.
19. Cohn DE, Herzog TJ. New innovations in cervical cancer screening. *Clin Obstet Gynecol* 2001; 44 (3): 538-549.
20. Longatto Filho A, Pereira SMM, Di Loreto C, Utagawa ML, Makaba S, Maeda MYS et al. DCS liquid-based system is more effective than conventional smears to diagnosis of cervical lesions: Study in high-risk population with biopsy-based confirmation. *Gynecologic Oncology* 2005; 97: 497-500.
21. Gay JD, Donaldson LD, Goellner JR. False-negative results in cervical cytologic studies. *Acta Cytol* 2005; 29 (6):1043-1046.
22. Demay RM. Common problems in Papanicolaou smear interpretation. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121(3): 229-238.
23. Howell LP, Davis RL, Belk TI, Agdigos R, Lowe J. The AutoCyte Preparation System for gynecologic cytology. *Acta Cytol* 1998; 42: 171-177.
24. Cuzick J. Time to consider HPV testing in cervical screening. *Am Oncol* 2000; 12: 1511-1514.
25. Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti M, Wacholder S et al. HPV DNA testing for cervical cancer screening. *JAMA* 2000; 283(1): 87-93.
26. Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 1995; 141: 680-689.
27. Villa LL. Prophylactic HPV vaccines: reducing the burden of HPV-related diseases. *Vaccine* 2006; 30(24): 23-28.
28. Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti C, Hildesheim A, Morales J et al. Epidemiologic Profile of type-specific HPV infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2005; 191: 1796-1807.

Endereço para correspondência:

DENISE GASPARETTI DRUMOND

Hospital Universitário – UFJF Divisão de Ginecologia

Rua Catulo Breviglieri, s/n, Santa Catarina

CEP: 36010-110 – Juiz de Fora – MG

E-mail: denise.drumond@bol.com.br

Recebido em: 23.06.2011

Aprovado em: 26.09.2011