

Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citopatológico de Papillomavirus humano (HPV) previamente detectado por PCR

- Edilson Nobuyoshi Kaneshima¹; Linda Emiko Suzuki²; Mary Mayumi Taguti Irie³; Celina Shizue Yoshida⁴; Sônia Francieli Maia da Silva⁵; Márcia Edilaine Lopes Consolaro²

-
1. Docente de Patologia Geral do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá - PR.
 2. Docentes de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá - PR.
 3. Bioquímica do Laboratório de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá - PR.
 4. Bióloga do Laboratório de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá - PR.
 5. Acadêmica do curso de Farmácia - Habilitação em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá - PR.

* Prêmio UFRJ em Citologia - XXIX CBAC, 2002, Fortaleza, CE

Este trabalho ha sido publicado en la Revista Brasileira de Análises Clínicas 2003; 35 (1): 29-33.

Resumo

Existe atualmente grande preocupação com a melhoria no diagnóstico citopatológico para HPV e para isto tem-se estudado a introdução de critérios morfológicos não-clássicos, tendo em vista a elevada frequência desta infecção viral bem como o seu potencial carcinogênico. Desta forma, este trabalho objetivou uma releitura de 41 casos positivos para HPV por PCR, cujos critérios inicialmente utilizados foram apenas os clássicos, e introduzir os critérios não clássicos. Os critérios citopatológicos mais observados foram os não clássicos, sendo bi ou multinucleação o mais freqüente, com n=37 (90,24%), seguido de núcleo hiper cromático, com n=35 (85,36%) e núcleo em borrão, com n=24 (58,54%). Quanto aos critérios clássicos, a disqueratose foi observada em n=17 casos (41,46%) e a coilocitose n=10 (24,35%), representando o 4º e o 9º critérios em ordem numérica de observação. Foi evidenciado também que quanto mais avançada a lesão diagnosticada pela citopatologia, menor a frequência de critérios clássicos e maior a de não clássicos. Após a inclusão dos critérios não clássicos, o diagnóstico de HPV elevouse de 24,39% dos casos para 75,61%, sendo que 40,0% dos ASCUS e 100,0% dos NIC I, NICII, NIC III e cânceres cervicais passaram a ser positivos para o vírus. Este é um fato de suma importância no aprimoramento dos serviços citopatológicos de rastreamento do câncer cervical. Porém, o único caso normal, os dois inflamatórios,

Como consecuencia de la política de integración de la Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica –COLABIOCLI– en el área científica, el Comité de Redacción de *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* ha concretado la iniciativa creando la Sección Permanente Latinoamericana, con los trabajos más relevantes de las distintas publicaciones de la región. La reimpresión de los mismos ha sido autorizada por el Consejo Editorial de las respectivas publicaciones oficiales.

os 4 de metaplasia escamosa e três dos 5 casos de ASCUS permaneceram negativos para HPV, representando exames citopatológicos falso negativos. Isto fato é bastante preocupante, uma vez que pacientes portadoras deste vírus, independente do estado clínico, possuem maior probabilidade de desenvolver lesões precursoras e até mesmo cânceres cervicais.

Palavras-chave: HPV, PCR, critérios não clássicos.

Summary

THE APPLICATION AND ITS IMPORTANCE IN NON-CLASSIC MORPHOLOGIC APPROACHES TO CYTOPATHOLOGY DIAGNOSTIC OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) PREVIOUSLY DETECTED FOR PCR

There is great concern at present over the improvement in cytopathology diagnosis for HPV, and for this reason we have been studying the introduction of non-classic morphologic approaches, bearing in mind the high frequency of this viral infection as well as its carcinogenic potential. The object of this work is to make a new reading of 41 positive cases for HPV by PCR, introducing non-classic approaches, where as the initial ones were made simply based on the classic ones. The most frequently observed cytopathology approaches were the non-classic, being two or many nucleuses the most frequent, with $n = 37$ (90.24%), followed by hyperchromatic nucleus with $n = 35$ (85.36%) and nucleus in blot, with $n = 24$ (58.54%). In relation to the classic approaches, dyskeratosis was observed in $n = 17$ cases (41.46%) and koilocytosis $n = 10$ (24.35%), representing the fourth and ninth approaches in numeric order of observation. It was also made clear that the more advanced the lesion diagnosed by the cytopathology, the lower the frequency of classic criteria and the higher the frequency of non-classic criteria. After inclusion of the non classic approaches, diagnosis of HPV rose from 24.39% of the cases to 75.61% of the cases, being 40.00% of ASCUS and 100.00% of NIC I, NIC II, NIC III and cervical cancers became positive for the virus. This fact is of the highest importance for the improvement of the cytopathology services used to trace cervical cancers. Even so, the only normal case for the cytology, the two inflammatory cases, the four cases of squamous metaplasia and the three cases out of five cases of ASCUS remained negative for HPV, representing false-negative tests. That is quite preoccupying since, once patient are carriers of virus, independent of the clinical state, they have higher probabilities of developing precursor lesions and even cervical cancers.

Key words: HPV, PCR, non-classics approaches.

Introdução

Nas últimas décadas, a associação do Papillomavírus Humano (HPV) e outros agentes de infecções cérvico-vaginais com a carcinogênese cervical têm sido exaustivamente estudada. Atualmente este vírus é reconhecido como o agente causal inequívoco de condilomas, neoplasias intra-epiteliais e carcinomas cervicais, entre outras lesões genitais^{5,7,34}. O ácido desoxirribonucléico (DNA) específico do HPV pode ser detectado através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em 90 a 95 % dos carcinomas cervicais^{11,12}. Tal fato é agravado quando leva-se em consideração que as infecções anogenitais causadas por HPV são consideradas como uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns e que se apresenta em significativo estado emergente⁵.

Atualmente reconhecem-se mais de 70 genótipos de HPV com base na homologia do seu DNA, sendo que aproximadamente 30 possuem tropismo pelo trato anogenital^{26,32}. Os HPVs genitais podem infectar o epitélio escamoso e as membranas mucosas da cérvix, da vagina, da vulva, do pênis e da região perianal, e podem induzir

ao aparecimento de verrugas genitais (condiloma acuminado), lesões pré-cancerosas ou cancerosas¹⁴. Os genótipos de HPV 6 e 11, principalmente, induzem a condilomas exofíticos que afetam a pele anogenital e a parte inferior da vagina, sendo detectados nas lesões intraepiteliais de baixo grau e são ditos de baixo risco. Os genótipos 16, 18, 30, 31, 33, 34 e 45 são fortemente associados com a neoplasia intraepitelial, sendo considerados de alto risco e prevalecem em cânceres anogenitais. Além destes, mais de 20 genótipos de HPV estão associados ao câncer cervical, porém o mais frequentemente encontrado em carcinomas cervicais e em neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC) em todo o mundo é o genótipo 16¹¹. O genótipo 18 parece predominar em adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos, os quais são responsáveis por aproximadamente 5% dos cânceres cervicais¹².

As lesões oriundas de infecção pelo HPV provocam, geralmente, alterações morfológicas características, detectáveis em citologia de raspados cérvico-vaginais e biópsias. Com isso, é de suma importância a realização dos exames rotineiros de detecção precoce de câncer, através de esfregaços corados pelo método de Papanicolaou

laou²⁵. O exame citopatológico periódico para prevenção do câncer de colo uterino tem sido a melhor estratégia de Saúde Pública para a detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, sendo desta forma muito útil na identificação de alterações citomorfológicas nucleares e citoplasmáticas relacionadas ao HPV⁴⁷.

Historicamente, estas alterações morfológicas para diagnóstico de HPV em citopatologia já haviam sido descritas por Papanicolaou em 1933³³, embora esse autor não reconhecesse nelas a causa de sua expressão. Já em 1956, Koss & Durfee descreveram células com a expressão citopática, utilizando pela primeira vez o termo coilocitose para os halos característicos presentes nas lesões. Em 1960, Ayre aventou pela primeira vez a etiologia viral para a coilocitose, sendo o termo utilizado até hoje.

Atualmente existe grande preocupação em torno da melhoria do diagnóstico citopatológico, pois em países em desenvolvimento a triagem citológica vem falhando em promover a redução na incidência de câncer cervical, sendo uma das causas a limitação de sensibilidade do método^{20,48}. Com isto, têm-se estudado a introdução de novos critérios morfológicos, denominados não clássicos ou secundários para o diagnóstico citológico de HPV em adição aos critérios morfológicos ditos clássicos, ou seja, coilocitose e disqueratose. O intuito disto é ampliar a sensibilidade do método, aproximando a da obtida em amostras histopatológicas e nos métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos, tais como a detecção do DNA viral por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)^{8,25}.

Dada a importância da citologia oncológica no rastreamento populacional de HPV, a maximização da eficiência morfológica é fundamental para atender às expectativas dos controles periódicos para a prevenção e detecção do HPV, dos cânceres de colo uterino e suas lesões precursoras. Desta forma, o presente trabalho objetivou uma reanálise de esfregaços cérvico-vaginais de pacientes com diagnóstico positivo para HPV por PCR, cujos critérios citopatológicos utilizados inicialmente para este vírus foram apenas os clássicos, e introduzir os critérios não clássicos, com o intuito de verificar a importância da aplicação dos mesmos na eficiência diagnóstica.

Material e métodos

Foram utilizadas amostras coletadas de pacientes do município de Maringá- Brasil e região por técnica padrão VCE (Vaginal-Cervical-Endocervical) para a confecção dos esfregaços para citopatologia⁵, sendo que parte do material endocervical foi estocado em tampão T.E. (Tris-HCl 10 mM pH 8.5; EDTA 1 mM) e congelado a -20 °C para posterior extração do DNA e análise pela técnica de PCR³, modificada para um volume final de 25 ml, onde foram utilizados os iniciadores consenso MY09/MY11 (CGTCCMAARGGAWACTGATC/GCM-CAGGGW-CATAAYAATGG), que amplificam especifica-

mente uma parte do gene L1 que é a região mais conservada na sequência de DNA entre os diferentes tipos de HPV. Para cada reação de amplificação utilizouse 5µL da solução do DNA extraído anteriormente; 50mM KCl; 10mM Tris-HCl (pH 8,3); 2,5µM de MgCl₂; 20µM de cada desoxi-nucleotídeo trifosfatado (dNTP); 12,5 pmoles de cada iniciador e 0,75U de Taq DNA polimerase para um volume final de 2µL. As reações de amplificação foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5mL que foram transferidos para o termociclador (MJ Research PTC 150). O programa de PCR consistiu das seguintes etapas: 95 °C por 5 minutos; 40 ciclos de amplificação (95 °C por 1 min.; 55 °C por 1 min.; 72 °C por 1 min.) e 72 °C por 5 minutos para a extensão final da reação de amplificação. Foram consideradas positivas para o DNA de HPV as amostras em que houve a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 450 pares de base.

Uma vez detectado o DNA de HPV, os esfregaços foram corados e lidos em microscópio óptico em objetivas de 10X, 20X e 40X, através da técnica de Papanicolaou⁴⁵. Foram realizadas duas leituras, sendo que a 1ª leitura levou em consideração apenas os critérios citomorfológicos clássicos para diagnóstico de HPV, ou seja, coilocitose e disqueratose^{19,22,28,36,38}. A 2ª leitura considerou além dos critérios clássicos, 14 critérios não clássicos, sendo eles: células em fibra, células gigantes, células parabasais coilocitóticas, bi ou multinucleação, coilocitose leve, condensação em filamentos, cariorrexe, disqueratose leve, escamas anucleadas, grânulos querato-hialinos, halo perinuclear, núcleo em borrão, núcleo em fibra, núcleo hiper Cromático^{9,16, 27,28,29,30,32,38,41}.

Foram considerados como positivos para HPV na 2ª leitura os casos que apresentaram: 1 critério clássico associado a 4 ou mais não clássicos; 2 critérios clássicos associados ou não a critérios não clássicos e aqueles com 4 ou mais critérios não clássicos^{7,8,18,25,47}.

Resultados

Os resultados da primeira leitura da citologia oncológica dos 41 casos positivos para HPV por PCR demonstraram predominância de NIC I sem alterações morfológicas características de HPV, com n=11 (26,83%), seguido de NIC I com alterações morfológicas de HPV, n=10 (24,39%) e assim sucessivamente, conforme Tabela I.

A frequência de observação de critérios citomorfológicos de HPV na 2ª leitura, após a inclusão dos critérios não clássicos, é representada na Tabela II.

O caso normal pela citologia não demonstrou critérios clássicos ou não-clássicos. Em apenas 10 dos 21 casos de NIC I foi observado o critério clássico coilocitose. Os casos de ASCUS, NIC II e câncer cervical, quando apresentaram critério clássico, o mesmo tratava-se de disqueratose.

Tabela I. Resultado da primeira leitura da citologia oncótica cérvico vaginal dos 41 casos positivos para HPV por PCR

Citologia oncótica cérvico vaginal	n°	%
Normal	01	2,44
Inflamatório	02	4,88
Metaplasia escamosa	04	9,76
ASCUS	05	12,19
NIC I com HPV	10	24,39
NIC I sem HPV	11	26,83
NIC II	05	12,19
NIC III	01	2,44
Carcinoma epidermóide	02	4,88
Total	41	100,00

ASCUS - Atipias em células escamosas de significado indeterminado

NIC I - Neoplasia intraepitelial cervical grau I

NIC II - Neoplasia intraepitelial cervical grau II

NIC III - Neoplasia intraepitelial cervical grau III

Carcinoma epidermóide - Carcinoma cervical do tipo epidermóide

Tabela II. Frequência de observação de critérios citomorfológicos após a 2ª leitura, com a utilização dos critérios não clássicos

Critérios morfológicos	Casos (n°)	Frequência de casos (%)
Bi ou multinucleação	37	90,24
Núcleo hiper Cromático	35	85,36
Núcleo em borrão	24	58,54
Células gigantes	18	43,90
Disqueratose	17	41,46
Células em fibra	17	41,46
Condensação em filamentos	16	39,02
Disqueratose leve	15	36,58
Halo perinuclear	15	36,58
Núcleo em fibra	13	31,71
Coilocitose	10	24,39
Coilocitose leve	05	12,19
Grânulos querato-hialinos	05	12,19
Cariorrexe	05	12,19
Células parabasais coilocitóticas	01	2,44
Escamas anucleadas	01	2,44

Dos dois casos inflamatórios, apenas um demonstrou critérios para HPV, tendo sido observado bi ou multinucleação, com n=1 (50,00%) e núcleo hiper Cromático, também com n=1 (50,00). Nos 4 casos de metaplasia escamosa, foi observado: bi ou multinucleação e disqueratose, ambos com n=2 (50,00%), cariorrexe, com n=1 (25,00%) e núcleo hiper Cromático, com n=4 (100,00). Desta forma, para os casos inflamatórios e os de metaplasia escamosa, 100% dos critérios observados foram não clássicos (Tabela IV) e não foram suficientes para sugerir HPV pela citologia oncótica após a 2ª leitura, ou

seja, permaneceram morfológicamente negativos para o vírus (Tabela V).

Nos 5 casos de ASCUS, predominaram os seguintes critérios: bi ou multinucleação, com n=05 (100,00%), núcleo hiper Cromático, com n=04 (80,00%) e disqueratose leve, com n=03 (60,00%) (Tabela III). Desta forma, dos 7 diferentes critérios observados, 1 foi clássico (14,28%) e 6 foram não clássicos (85,71%) (Tabela IV). Os 02 casos demonstraram critérios citomorfológicos suficientes para sugerir infecção por HPV pela citopatologia após a 2ª leitura, o que representa 4,88% do total de casos estudados, sendo que na 1ª leitura os 5 casos de ASCUS foram considerados negativos para o vírus (Tabela V).

Para os 21 casos de NIC I, os critérios predominantes foram: bi ou multinucleação, com n=21 (100,00%), núcleo hiper Cromático, com n= 20 (95,24%), núcleo em borrão, com n=15 (71,43%), células gigantes e condensação em filamentos, ambos com n=14 (66,66%), e disqueratose, com n=13 (61,90%), (Tabela III). Dos 15 diferentes critérios observados, 2 foram clássicos (13,33%) e 13 não clássicos (86,67%) (Tabela IV). Os 21 casos demonstraram critérios citomorfológicos suficientes para sugerir infecção por HPV através da citopatologia após

Tabela III. Critérios citomorfológicos de HPV nos casos de ASCUS, NIC I e NIC II

Critérios	ASCUS		NIC I		NIC II	
	n°	%	n°	%	n°	%
Coilocitose	-	-	10	47,62	01	20,00
Disqueratose	01	20,00	13	61,90	01	20,00
Células em fibra	-	-	10	47,62	04	80,00
Células gigantes	01	20,00	14	66,67	02	40,00
Células parabasais coilocitóticas	-	-	-	-	01	20,00
Bi ou multinucleação	05	100,00	21	100,00	05	100,00
Coilocitose leve	-	-	04	19,05	01	20,00
Condensação em filamentos	01	20,00	14	66,67	01	20,00
Cariorrexe	-	-	03	14,28	01	20,00
Disqueratose leve	03	60,00	07	33,33	03	60,00
Escamas anucleadas	-	-	01	4,76	03	60,00
Grânulos querato-hialinos	-	-	04	19,05	01	20,00
Halo perinuclear	-	-	09	42,86	04	80,00
Núcleo em borrão	01	20,00	15	71,43	05	100,00
Núcleo em fibra	-	-	07	33,33	03	60,00
Núcleo hiper Cromático	04	80,00	20	95,24	05	100,00
Total de casos	05	-	21	-	05	-

Tabela IV. Frequência de critérios morfológicos clássicos e não clássicos de HPV para os diferentes aspectos citopatológicos

Aspectos citopatológicos	Critérios de HPV	
	Clássicos (%)	Não clássicos (%)
Inflamação	–	100,00
Metaplasia escamosa	–	100,00
ASCUS	14,28	85,71
NIC I	13,33	86,67
NIC II	6,67	93,33
NIC III	–	100,00
Câncer cervical	12,5	87,50

a 2ª leitura, o que representa 51,22% do total de casos em estudo, sendo que na primeira leitura apenas 10 casos de NIC I foram considerados citologicamente positivos para o vírus (Tabela V).

Nos 5 casos de NIC II, houve predominância dos seguintes critérios: bi ou multinucleação, núcleo em borão e núcleo hiper Cromático, todos com n=05 (100,00%), seguidos de células em fibra e halo perinuclear, ambos com n=04 (80,00%), e disqueratose leve e escamas anucleadas, ambos com n=03 (60,00%) (Tabela III). Dos 15 diferentes critérios observados, 1 foi clássico (6,67%) e 14 não clássicos (93,33%) (Tabela IV). Estes 05 casos apresentaram critérios citomorfológicos suficientes para sugerir infecção por HPV pela citopatologia, representando 12,19% do total de casos, sendo que na 1ª leitura estes 05 casos foram considerados citologicamente negativos para o vírus (Tabela V).

Para o único caso de NIC III, os critérios observados foram: bi ou multinucleação, células em fibra, disqueratose, núcleo em borão, núcleo em fibra e núcleo hiper Cromático. Portanto, 100% dos critérios para HPV observados foram não clássicos (Tabela IV) e este único ca-

so apresentou critérios morfológicos suficientes para sugerir infecção por HPV pela citopatologia, representando 2,44% do total de casos, sendo que na 1ª leitura este caso foi considerado citologicamente negativo para o vírus (Tabela V).

Nos dois casos de carcinoma epidermóide, foram observados como critérios predominantes: bi ou multinucleação, células em fibra, halo perinuclear, núcleo em borão, núcleo em fibra e núcleo hiper Cromático, todos com n=2 (100,00%), enquanto que células gigantes e disqueratose apresentaram n=1 (50,00%). Assim, dos 8 critérios observados, 1 foi clássico (12,5%) e 7 não clássicos (87,5%) (Tabela IV). Estes dois casos apresentaram critérios suficientes para sugerir infecção por HPV pela citopatologia, representando 4,88% do total de casos, sendo que na 1ª leitura estes dois casos de carcinoma foram considerados citologicamente negativos para o vírus (Tabela V).

A Tabela IV demonstra a frequência de critérios morfológicos clássicos e não clássicos para HPV nos diferentes aspectos citopatológicos analisados.

A Tabela V demonstra o número e a frequência de casos positivos para HPV em cada aspecto citopatológico analisado antes e após a utilização de critérios não clássicos.

Discussão

O diagnóstico citopatológico tem-se mostrado prático para triagem do câncer de colo uterino de grandes populações devido a sua simplicidade, reprodutibilidade, precisão e baixo custo, sendo que desde a sua implantação em Saúde Pública como método de triagem e detecção precoce de neoplasias cérvico-uterinas, a morbidade e a mortalidade decorrentes destes cânceres foram reduzidas significativamente, como pode ser comprovado em países desenvolvidos¹¹. No entanto, conforme a Tabela I, somente 10 casos (24,39%) apresentaram alterações citopáticas características da infecção por HPV. Este fato reforça a importância do aprimoramento no diagnóstico citopatológico da infecção cervical por este vírus, principalmente devido ao potencial oncogênico que apresentam alguns genótipos de HPV e pela crescente incidência deste agente^{2,13,17,31,32,44}.

A Tabela II demonstra que o critério mais observado foi a bi ou multinucleação, com n=37, presente portanto em 90,24% dos casos, seguido de núcleo hiper Cromático, com n=35 (85,36% dos casos), ambos critérios não clássicos. Collaço & Pinto⁸ apontam em seus resultados a bi ou multinucleação como o critério predominante, tendo sido visualizado em 91,00% dos casos, sendo desta forma coincidente com o presente trabalho.

Com relação à frequência dos critérios clássicos, a mesma Tabela II evidencia que a disqueratose foi o 4º critério mais frequente, com n=17, o que representa 41,46% dos

Tabela V. Número e frequência de casos com morfologia positiva na 1ª e na 2ª leitura

Aspectos citopatológicos	Casos em estudo	Critérios clássicos		Critérios clássicos e não clássicos	
		(1ª leitura)		(2ª leitura)	
		nº	%	nº	%
Normal	01	–	–	–	–
Inflamação	02	–	–	–	–
Metaplasia	04	–	–	–	–
ASCUS	05	–	–	02	4,88
NIC I	21	10	24,39	21	51,22
NIC II	05	–	–	05	12,19
NIC III	01	–	–	01	2,44
Câncer cervical	02	–	–	02	4,88
Total	41	10	24,39	31	75,61

casos estudados. A coilocitose representou o 9º critério em ordem de observação, com n=10 e presente portanto em 24,39% dos casos. Collaço & Pinto⁸ relatam que em seu trabalho a disqueratose foi observada em 41,30% dos casos e a coilocitose em 36,00%, sendo o primeiro coincidente com os dados do presente trabalho e o segundo superior. Apesar da literatura ser unânime em apresentar a coilocitose como critério patognomônico para o diagnóstico de HPV e que exprime a atividade viral, muitos autores destacam que este não é o critério mais frequentemente encontrado nos esfregaços^{2,4,14,20,23,39,42,50,51}. O presente estudo confirma o citado por estes autores e destaca a elevada frequência de critérios não clássicos, que são inclusive os mais comumente detectados, como demonstram as Tabelas II, III e IV.

A Tabela IV evidencia ainda que, quanto mais grave o grau da lesão cervical, maior a observação de critérios não clássicos e menor a dos clássicos. Tratando-se especificamente do critério clássico coilocitose, o mesmo somente foi observado nas lesões iniciais tipo NIC I. Em estágios mais avançados como NIC II, NIC III e câncer cervical, este critério não foi observado, ocorrendo o mesmo em alterações prélesionais, como inflamação, metaplasia escamosa e ASCUS. Alguns autores descrevem que, na medida em que a lesão progride, o vírus vai passando a não produzir mais a partícula viral completa e o seu genoma vai integrando-se ao genoma da célula hospedeira. Perde-se o poder infectante, ganhando-se poder oncogênico, o que implica em expressão citopática menos evidente ou inexistente^{14,37}.

A frequência diagnóstica de HPV através da citologia oncológica após a inclusão dos critérios não clássicos passou de 24,39% para 75,61%, ou seja, elevouse em 51,22%, como mostra a Tabela V. Este fato é de suma importância no aprimoramento dos serviços citopatológicos prestados, identificando um grupo muito maior de pacientes com risco para o desenvolvimento de câncer de colo uterino. Cavalieri *et al.*⁷ descrevem que a utilização de critérios não clássicos elevou o diagnóstico de HPV em 37,50%, Carvalho & Oyakawa⁶ também descrevem que a introdução de critérios não clássicos de HPV aumentam a sensibilidade do exame citológico. Franco¹⁰ relata que com a utilização dos critérios não clássicos associados aos clássicos na leitura de esfregaços cervico-vaginais, a detecção de HPV aumentou sensivelmente, sendo que 80,70% dos NIC I, 84,60% dos NIC II, 66,60% dos NIC III e 52,10% dos carcinomas cervicais passaram a apresentar estigmas que sugeriam associação com HPV. A mesma Tabela V deste trabalho demonstra que 40,00% dos ASCUS e 100,00% dos NIC I, NIC II, NIC III e cânceres cervicais passaram a ser positivos para o vírus após a inclusão de critérios não clássicos, apresentando portanto uma otimização diagnóstica superior à descrita por este último autor.

Mesmo introduzindo os critérios não clássicos, a melhora no diagnóstico de HPV pela citopatologia em in-

fecções subclínicas ou latentes não é muito representativa. No único caso normal, nos dois de inflamação, nos 4 de metaplasia escamosa e em três de ASCUS, a citologia apresentou-se falsamente negativa, pois não existem características morfológicas suficientes para a detecção do vírus, sendo que as mesmas são a base para o diagnóstico citopatológico^{15,21,26,46}. Trofater⁴⁶ e Koutsky *et al.*²¹ descrevem que, nos casos em que não há manifestações clínicas, sinais morfológicos de HPV podem ser difíceis de detectar. A citologia possui sucesso diagnóstico principalmente nas lesões clinicamente aparentes, conforme o confirmado por Suzuki⁴³.

Este fato é bastante preocupante, uma vez que pacientes portadoras deste vírus, principalmente de alto potencial carcinogênico, independente de estar em estado clínico, subclínico ou latente, possuem maior probabilidade de desenvolver lesões precursoras e até mesmo cânceres cervicais^{24,35,40,47,49}. Segundo Jacyntho *et al.*¹⁴ as metodologias moleculares são as mais indicadas para o diagnóstico da infecção por HPV nos casos subclínicos ou latentes por detectarem o DNA viral, mesmo que em pequenas quantidades, fato este claramente demonstrado no presente trabalho. Porém, Trofater⁴⁶ cita que o diagnóstico molecular de casos latentes ou assintomáticos tem seu valor incerto, pois a relevância clínica destes tipos de infecção não está ainda determinada.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Dr^a Márcia Edilaine Lopes Consolaro
Av. Colombo, 5.790 - Zona 7 - 87020-900 - Maringá - PR
Tel.: (0xx44)261-4317 - Fax: (0xx44)263-6044
E-mail: melconsolaro@uem.br

Referências

1. Ayre, J. E. Role of the halo cell in cervical carcinogenesis: a virus manifestation of premalignancy? *Obstet. Gynecol.*, 17:175-82, 1960.
2. Azocar, J.; Abad, S. M.j.; Acosta, H.; Hernandez, R.; Gallegos, M.; Pijano, E.; Blanch, R.; Kramar, A. Prevalence of cervical dysplasia and HPV infection according to sexual behavior. *Int. J. Cancer*, 45:622-25, 1990.
3. Bauer, H. B.; Manos, M. M. PCR Detection of genital human papillomavirus. In: Persing, D. H.; Smith, T. F.; Tenover, F. C.; White, T. J. *Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications*. Mayo Foundation Rochester, 1993.
4. Bibbo, M.; Moraes Filho, A. *Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital*. Rio de Janeiro, Revinter, 60-64p, 1998.
5. Bonfiglio, T.; Erozan, Y. S. *Gynecology cytopathology*. Philadelphia, Lippincott- Raven, 1997. p.51-72.

6. Carvalho, J. J. L.; Oyakawa, N. *I Consenso Brasileiro de HPV*. 1ª ed. São Paulo, BG Cultural. p.49, 56, 57, 2000.
7. Cavaliere, M. C.; Longatto Filho, A.; Pereira, G. M. C.; Maeda, M. Y. S.; Loreto C. D. Papilomavirus em saúde pública: importância da aplicação de novos critérios morfológicos para sua detecção em trato genital feminino. *Bol. Inform.Union.*, 15(59-60):24, 1990.
8. Collaço, L. M.; Pinto, A. P. Aspectos citológicos na coloração de Papanicolaou da associação de HPV com displasia e carcinoma de colo uterino. *J. Bras. Ginec.*, 104(11/12):419-421, 1994.
9. De Borges, R. J.; Garcia Tamayo, J.; Zaitzman, M. Cytologic and ultrastructural findings of a peculiar alteration in cervical cells from patients with human Papillomavirus infections. *Acta Cytol.*, 33(3):314-318, 1989.
10. Franco, E. L. Epidemiologia do câncer mamário ginecológico. In.: ABRÃO, F. S. *Tratado de oncologia genital e mamária*. São Paulo, Roca. p. 3-16, 1995.
11. Gompel, C.; Koss, L. *Citologia ginecológica e suas bases anatomo-clínicas*. 1ª ed. São Paulo, Manole, p.79-105, 1997.
12. Gross, G. E.; Barasso, R. *Infecção por Papilomavirus humano. Atlas clínico de HPV*. Porto Alegre, Artmed, p.1-18, 1999.
13. Gupta, J. W.; Gupta, P. K.; Rosenshein, N.; Shah, K. V. Detection of human Papillomavirus in cervical smears. A comparison of in situ hybridization, immunocytochemistry and cytopathology. *Acta Cytol.*, 31:387-96, 1987.
14. Jacyntho, C.; Almeida Filho, G.; Maldonado, P. *HPV Infecção Genital Feminina e Masculina*. 1ª ed., Rio de Janeiro, Revinter. p.5-30, 1996.
15. Hinchliffe, S. A.; Velzen, D.; Korporaal, H.; Kok, P. L.; Boon, M. E. Transience of cervical HPV infection in sexually active, young women with normal cervicovaginal cytology. *Brit. J. Cancer*, 72:943-945, 1999.
16. Kern, S. B. Significance of anucleated squames in Papanicolaou stained cervicovaginal smears. *Acta Cytol.*, 53(1), 1991.
17. Kochel, H. G.; Teichmann, A.; Eckardt, N.; Arendt, P.; Kuhn, W.; Thoomssen R. Occurrence of human Papillomavirus DNA types 16 and 18 (HPV -16/ 18) in cervical smears as compared to cytological findings. *Int. J. Gynecol. Obstet.*, 31:145-52, 1990.
18. Korobowicz, E.; Kwasniewska, A.; Georgiades, I. The diagnostic value of cytomorphological traits in low and high risk type HPV infections. *J. Pathol.*, 48(2):107-112, 1997.
19. Koss, L. G.; Durfee, G. R. Unusual patterns of squamous spithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann. NY Acad. Sci.*, 63:1245-61, 1956.
20. Koss, L. G. The Papanicolaou test for cervical. a triumph and a tragedy. *JAMA*, 261:737-743, 1989.
21. Koutsky, L. A.; Galloway, D. A.; Holmes, K. K. Epidemiology of genital human Papillomavirus infection. *Epidemiol. Revist.*, 10:122-163, 1988.
22. Kurman, R. J.; Solomon, D. *The Bethesda System for reporting cervical vaginal cytologic diagnoses*. New York, Springer-Verlag, 1997.
23. Landrac, L. Koilocytes: valeur diagnostique. In: *Anais. Ière. J. Vén. Mars.*, 1989. p. 2.
24. Levi, J. E. HPV: Por que e quando diagnosticar. *News Lab*, 14: 66-72, 1996.
25. Loreto, C. D.; Maeda, M. Y. S.; Pereira, G. M. C.; Longatto Filho, A.; Cavaliere, M. J. Papilomavirus em saúde pública: importância da aplicação de novos critérios morfológicos para sua detecção em trato genital feminino. *Bol. Inform. Union*, 15 (59-60):24-39, 1992.
26. Lörintcz, A. T.; Reid, R. *Clínicas obstétricas e ginecológicas da América do Norte. Papilomavirus humanos*. Vols. 3 e 4. Rio de Janeiro, Interlivros. p.565- 74, 759-86,1996.
27. Luzzatto, R.; Recktenvald, M.; Portugal, J. P. L. Multinucleation and abortive cellular division in human Papillomavirus infection. *Acta Cytol.*, 34(2):286-287, 1990.
28. Meisels, A.; Fortin, R. Condylomatous of the cervix and vagina: 1) Cytologic patterns. *Acta Cytol.*, 20:505-509, 1976.
29. Meisels, A.; Morin, C.; Casas Cordero, M.; Roy, M.; Fortier, M. Condyloma of the uterine cervix. In: *Compendium on diagnostic cytology*. Chicago, Illinois, 6 th Edition. p.63-8, 1988.
30. Naib, Z. M.; Masukawa, N. Identification of condyloma acuminata cells in routine vaginal smears. *Obstet. & Gynecol.*, 18(6):735-738, 1961.
31. Nuovo, G. J.; Nuovo, M. A.; Contral, S.; Gordon, S.; Silverstein, S. J.; Crum, C. P. Histological correlates of clinically occult human Papillomavirus infection of the uterine cervix. *Am. J. Surg. Pathol.*, 12:198-203, 1988.
32. Nuovo, G. J. Human papillomavirus DNA. In: genital tract lesions histologically negative for condylomata. *Am. J. Surg. Pathol.*, 14:643-51, 1990.
33. Papanicolaou, G. *Atlas of exfoliative cytology*. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press. p.18-19 (suppl. 2), 1960.
34. Pinto, A. P.; Collaço, L. M. Revisão das alterações citomorfológicas da infecção pelo vírus do papiloma humano em citologia cervicovaginal. *J. Bras. Patol.*, 37(1): 57-61, 2001.
35. Poljak, M.; Brencici, A.; Seme, K.; Vince, A.; Marin, I. J. Comparative evaluation of first second generation digene hybrid capture assays of detection of human Papillomavirus associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *J. Clin. Microb.*, 37 (3): 796-797, 1999.
36. Purola, E.; Savia, E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. *Acta Cytol.*, 21:26-31, 1977.
37. Sadoul, G.; Beuret, T. H. La place du laser dans les lésions du col. *La Revue du Practicien.*, 36:876, 1986.
38. Schneider, A.; Meinhardt, G.; Devilliers, E. M.; Gissmann, L. Sensivity of the cytologic diagnosis of

- cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies. *Diagn. Cytopathol.*, 3:250-3, 1987.
39. Schneider, M. L.; Schneider, V. *Citologia ginecológica*. Rio de Janeiro, Revinter. p.59-61, 1998.
 40. Shih, L. W. S.; Yamamoto, L. S. U.; Maeda, M. Y. S.; Alves, V. A. F. Papilomavírus na área metropolitana de São Paulo: aspectos citológicos e imunocitoquímicos. *Acta Oncol. Bras.*, 8(2):59-64, Mai/Ago, 1988.
 41. 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(3):178-183, 1990.
 42. Silva Filho, A. M.; Longatto Filho, A. *Colo uterino & vagina – processos inflamatórios*. Rio de Janeiro, Revinter, 2000. p.123-145.
 43. Suzuki, L. E. *Eficiência da técnica de Papanicolaou na detecção do Papillomavirus Humano*. Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública da Universidade Estadual de Ponta Grossa para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública. Ponta Grossa, 2000.
 44. Syrjänen, K.; Mantyjarvi, R.; Saarikoski, S.; Vayrynen, M.; Syrjanen, S.; Parkkinen, S.; Yliskoski, M.; Saastamoinen, J.; Castren, O. Factors associated with progression in cervical human Papillomavirus (HPV) infections into carcinoma in situ during a long-term prospective follow-up. *Brit. J. Obst. Gynaecol.*, 95:1096-1102, 1988.
 45. Takahashi, M. *Atlas de citologia do câncer*. 2ª ed. São Paulo, Manole. p.74- 8, 1982.
 46. Trofatter, K. F. Diagnosis of human Papillomavirus genital tract infection. *Am. J. Med.*, 5:21-27, 1997.
 47. Utagawa, M. L.; Loreto, C.; Maeda, M. Y. S.; Kanamura, M. T.; Longatto Filho, A. Papillomavirus Humano em esfregaços citológicos de mulheres acima de 50 anos: estudo morfológico e de hibridização “in situ” nas respectivas biópsias. *J. Bras. Gin.*, 107(4):83-87, 1997.
 48. Vince, A.; Ivanisevic, M.; Harni, V.; Skalko, D.; Jeren, T. Molecular detectino of human papillomavirus im women with minor - grade cervical cytology abnormalities. *J. Cli. Vir.*, 20: 91-94, 2001.
 49. Yoshinouchi, M.; Hongo, A.; Nakamura, K.; Kodama, J.; Itoh, S.; Sakai, H.; Kudo, T. Analysis by multiplex PCR of the physical status of human Papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. *J. Clin. Microb.*, 37(11): 3514-3517, 1999.
 50. zür Hausen, H. Condylomata acuminata and huma genital cancer. *Cancer Res.*, 36:530, 1976.
 51. zür Hausen, H. Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. Current topics. *Microbiol. Immunol.*, 78:1, 1977.