



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA

GEILSON GOMES DE OLIVEIRA

**ACHADOS CITO-HISTOLÓGICOS E
GENÓTIPOS DE HPV OBSERVADOS NAS
CÉLULAS ESCAMOSAS ATÍPICAS DE
SIGNIFICADO INDETERMINADO.**

Fortaleza
2017

GEILSON GOMES DE OLIVEIRA

**ACHADOS CITO-HISTOLÓGICOS E GENÓTIPOS DE HPV
OBSERVADOS NAS CÉLULAS ESCAMOSAS ATÍPICAS DE
SIGNIFICADO INDETERMINADO.**

Dissertação submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eleutério Júnior.

Linha de pesquisa: Oncologia.

Fortaleza
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

O47a Oliveira, Geilson Gomes de.
Achados Cito-Histológicos e Genótipos de HPV Observados nas Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado/ Geilson Gomes de Oliveira. – 2017.
74 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. José Eleutério Jr.

1. Células Escamosas Atípicas do Colo do Útero. 2. Displasia do Colo do Útero. 3. Neoplasias do Colo do Útero. I. Título.

CDD 571.9

GEILSON GOMES DE OLIVEIRA

**ACHADOS CITO-HISTOLÓGICOS E GENÓTIPOS DE HPV OBSERVADOS NAS
CÉLULAS ESCAMOSAS ATÍPICAS DE SIGNIFICADO INDETERMINADO.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Medicina II.

Aprovada em: 21 de novembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Eleutério Jr. (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Rita de Cássia Carvalho Barbosa
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dra. Ana Katherine da Silveira Gonçalves
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Dedico este trabalho à minha família. Nada nos é mais caro que os nossos momentos, tantas vezes sacrificados pelas necessidades deste ofício que ora se completa. Não haveria este trabalho sem a compreensão e o carinho de minha esposa Judite e filhos, Caio, Sophia, Heitor e nossa pequena Letícia que está por vir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me tornar digno de enfrentar os desafios da vida acadêmica, quase duas décadas após concluir a faculdade de Medicina. Neste árduo retorno a esta casa, nem sempre a caminhada foi tranquila, mas nunca me senti desacompanhado.

À ciência e à medicina, por exercê-las e por me propiciarem, graças a seus avanços, superar o primeiro grave obstáculo à minha existência.

Ao professor Dr. José Eleutério Jr. pelo exemplo de amor e devoção à educação e à ciência.

À professora Dra. Margarida Pompeu por ter orientado minha esposa e depois ter me incentivado a fazer esta pós-graduação.

Aos meus colegas de curso por dividirmos tantos momentos especiais com grande companheirismo.

A todos os professores do mestrado de Patologia da UFC, tão importantes neste lapidar contínuo de novos pesquisadores, que mesmo lutando contra todas as limitações estruturais de nosso ensino público persistem neste labutar.

Aos servidores do Departamento de Patologia e Medicina Legal, pela disposição e simpatia na resolução dos problemas do dia-a-dia.

Ao Laboratório LABPEC e ao seu corpo clínico e de funcionários, pela magnífica acolhida e pelo auxílio que me deram.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

OLIVEIRA, G. G. Achados Cito-Histológicos e Genótipos de HPV Observados nas Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado. 2017, 74 p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce, 2017.

Apesar de um diagnóstico temporário e de exclusão, as Células Escamosas Atípicas (ASC) se tornaram a anormalidade mais frequente em citologias e tanto a sua caracterização quanto a conduta mais adequada permanecem controversas. O objetivo deste estudo é verificar a correlação de citologias ASC com o resultado histopatológico e detecção de HPV. Para isso, realizou-se um estudo retrospectivo analisando dados de citologias em banco de dados de laboratório de citopatologia da cidade de Fortaleza, entre 2010 e 2016, comparando-os aos achados morfológicos da citologia, microbiologia, detecção do HPV de alto risco, histopatológicos e evolução. Gestantes e mulheres com imunoincompetência foram excluídas. A amostra obtida foi de 2457 pacientes, sendo 2207 casos de ASC de significado indeterminado (ASC-US) e 250 casos de ASC, não podendo descartar lesão de alto grau (ASC-H). Os resultados mostraram uma maior associação ASC-H com lesão de alto grau histológica (56%) e com uma maior positividade para um teste de HPV de alto risco em relação ao grupo ASC-US. Dos achados citomorfológicos que levaram ao diagnóstico de ASC-US se destacou a relação de tamanho do núcleo, quando comparada a uma célula normal (78%). Hiperqueratose, se correlaciona com um pior prognóstico histológico ($p=0,0439$), ao contrário da binucleação ($p=0,0047$). Não houve significância estatística entre um teste DNA-HPV positivo e prognóstico histopatológico ($p=0,0743$). Um grupo de 12 outros genótipos de HPV de alto risco foi mais prevalente nos dois grupos (ASC-US 86%/ASC-H 100%) em vez dos genótipos 16 e 18.

Palavras-chave: Células Escamosas Atípicas do Colo do Útero. Displasia do Colo do Útero. Neoplasias do Colo do Útero.

ABSTRACT

OLIVEIRA, G. G. Cytohistologic findings and HPV Genotype observed in Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance. 2017. 74 p. Dissertation (master's degree). Medical School of Federal University of Ceará, Fortaleza-Ce, 2017.

Even though it is a temporary and exclusion diagnosis, the Atypical Squamous Cells (ASC) cytologies became the most frequent abnormality in smears, and both their characterization and the most appropriate management remain controversial. The aim of this study was to verify the correlation of ASC cytologies with the histopathological result and detection of HPV (human papillomavirus). For this purpose, a retrospective study was carried out analyzing cytology data in a cytopathology laboratory database of the city of Fortaleza between 2010 and 2016, comparing those data with the morphological findings of cytology, microbiology, high-risk HPV detection, histopathological findings, and evolution. Patients who were immunocompromised or pregnant were excluded. A total of 2457 patient was included, 2207 for ASC-undetermined significance (ASC-US) and 250 for ASC-cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H). The results showed a higher association between ASC-H and a worst histological result in most biopsies (56%) and a higher DNA-HPV test positivity than in the ASC-US group. From the cytomorphological findings that led to the diagnosis of ASC-US, the relation of nucleus size was highlighted when compared to a normal cell (78%). Hyperkeratosis correlates with worse histological prognosis ($p=0,0439$), unlike binucleation ($p=0,0047$). There was no statistical significance between a positive DNA-HPV test and the histopathological prognosis ($p=0,0743$). Other high-risk HPV were more prevalent than HPV 16 and HPV 18 in both groups (ASC-US 86%/ASC-H 100%) when real-time PCR was performed.

Key words: Atypical Squamous Cells of the Cervix. Uterine Cervical Dysplasia. Uterine Cervical Neoplasms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Citologia pelo método convencional mostrando um ASC-US.....	24
Figura 2:	Citologia em meio líquido. Células pequenas agrupadas com grande relação núcleo/citoplasma, características de atipias ASC-H.....	28

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1:	Histórico das nomenclaturas citopatológicas e histopatológicas utilizadas para o diagnóstico das lesões cervicais e suas equivalências.....	17
Tabela 1:	Achados do exame ginecológico/colposcopia em pacientes com resultado citológico ASC (n=1010).....	39
Tabela 2:	Achados descritivos gerais em citologias com resultado ASC (n=2447).....	41
Tabela 3:	Grau de inflamação em citologias ASC (n=1006).....	42
Tabela 4:	Presença de patógenos específicos em citologias ASC (n=650)	42
Tabela 5:	Critérios citológicos indicativos de diagnóstico ASC-US, frequência (n=2207) e resultado histopatológico (n=112).....	44
Tabela 6:	Achados citológicos associados mas não definidores de atipias em citologias ASC (n=2457).....	45
Tabela 7:	Comparação de achados citológicos associados à atipias por métodos de coleta em citologias ASC (n=2457).....	46
Tabela 8:	Achados citológicos associados à atípias em citologias ASC comparadas com histopatológico prevalente (n=137).....	47
Tabela 9:	Positividade de HPV de alto risco por PCR (n=71) e por HC2 (n=214), prevalentes em citologias ASC.....	48
Tabela 10:	Associação entre positividade para HPV de alto risco e histopatológico, em citologias ASC.....	49
Tabela 11:	Associação entre positividade em teste de HPV de alto risco e microbiota em citologias ASC-US (n=259).....	50
Tabela 12:	Resultados das citologias subsequentes a um resultado ASC como seguimento escolhido pelo médico assistente (n=1071).....	52
Tabela 13:	Resultado histopatológico como seguimento de citologia ASC anterior (n=182).....	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1:	Métodos citológicos utilizados para coleta de citologias com resultados ASC (n=2457).....	40
Gráfico 2:	Representação da zona de transformação (ZT) em citologias ASC (n=2457).....	43
Gráfico 3:	Distribuição de achados citológicos definidores de ASC-US pelos métodos citológicos utilizados para coleta em citologias ASC (n=2207).....	45
Gráfico 4:	Resultado citológico ASC e prevalência histopatológica (n=139).....	51
Gráfico 5:	Resultados agregados de testes de DNA-HPV de alto risco (HC2 e PCR) como seguimento de citologia ASC anterior (n=499).....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AGC	Células Glandulares Atípicas
ALTS	<i>ASC-US / LSIL Triage Study</i>
AR	Alto risco
ASC	Células escamosas atípicas
ASCCP	<i>American Society for Colposcopy and Cervical Pathology</i>
ASC-H	Células escamosas atípicas não podendo descartar lesão de alto grau
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
CAF	Cirurgia de alta frequência
CC	Citologia cervical convencional de Papanicolaou
DIU	Dispositivo intrauterino
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNA-HPV	Teste de detecção do DNA do HPV
DP	Desvio padrão
DTC	Diatermocoagulação
E6/E7	Proteínas precoce do Papilomavírus humano-6 e 7
HC2	Teste de captura híbrida II
HPV	Papilomavírus humano (<i>human papillomavirus</i>)
HSV	Vírus da Herpes Simples
HSIL	<i>High grade squamous intraepithelial lesion</i>
HSIL ou +	Resultado HSIL ou superior
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
LABPEC	Laboratório Professor Eleutério da Costa
LBC	<i>Liquid-based cytology</i>
LSIL	<i>Low grade squamous intraepithelial lesion</i>
LSIL ou -	Resultado LSIL ou inferior
MS	Ministério da Saúde
NBLC	Nomenclatura Brasileira para Laudos de Citopatologia
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
p16Ink 4a	Inibidor de cinase dependente de ciclina
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RLU	<i>Relative light unit</i>
RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
RR	Risco Relativo
SIL	Lesões intra-epiteliais escamosas
SIU	Sistema intrauterino
TBS	<i>The Bethesda System</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
ZT	Zona de Transformação
ZTA	Zona de Transformação Atípica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	O Câncer de Colo Uterino.....	15
1.2	O Exame Citológico.....	17
1.3	Detecção do DNA-HPV.....	20
1.4	Células Escamosas Atípicas.....	22
1.4.1	<i>Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado</i>	23
1.4.2	<i>Células Escamosas Atípicas, não Podendo Descartar HSIL</i>	27
2	JUSTIFICATIVA.....	29
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Objetivo geral.....	30
3.2	Objetivos específicos.....	30
4	MATERIAL E MÉTODO.....	31
4.1	Delineamento do estudo.....	31
4.2	População do estudo.....	31
4.3	Crterios de inclusão e exclusão.....	31
4.3.1	<i>Crterios de inclusão</i>	31
4.3.2	<i>Crterios de exclusão</i>	31
4.4	Coleta de dados.....	31
4.4.1	<i>Citologia</i>	32
4.4.2	<i>Exames Biomoleculares</i>	33
4.4.3	<i>Histopatologia</i>	35
4.5	Considerações éticas.....	35
4.6	Análise estatística.....	35
5	RESULTADOS.....	37
6	DISCUSSÃO.....	55
7	CONCLUSÃO.....	66
8	REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer de Colo Uterino

O câncer de colo uterino, a despeito de ser o tumor maligno mais facilmente evitável por métodos de triagem (ARBYN *et al.*, 2013), permanece com taxas de incidência e mortalidade significativas. Esse panorama persiste apesar dos avanços na detecção precoce de lesões pré-cancerosas do colo uterino através da triagem, colposcopia, biologia molecular e diversas descobertas de marcadores do processo de oncogênese e de novos métodos para tratamento, além do advento da vacina (TSU e JERÓNIMO, 2016).

A infecção persistente por um tipo oncogênico do Papilomavírus Humano (HPV) é causa necessária para o desenvolvimento deste tipo de neoplasia, sendo o ácido desoxiribonucléico (DNA) do HPV identificado em 99,7% dos casos de câncer do colo uterino (FAKHRELDIN; ELMASRY, 2016; GONFRIER *et al.*, 2014). O papilomavirus é comum entre mamíferos e a maioria dos indivíduos se contaminam já na infância, por contato direto, permanecendo o vírus parte da microbiota da pele saudável. Praticamente todos os humanos são simultaneamente colonizados por diferentes tipos de HPV, causando infecções assintomáticas ou não, de pele e mucosas (SCHIFFMAN *et al.*, 2016; BRAVO; FELEZ-SANCHEZ, 2015).

Dos cerca de mais de 200 tipos já encontrados deste vírus (WEI *et al.*, 2014; GONFRIER *et al.*, 2014), considera-se que treze estão associados a maior risco de malignização para câncer cervical (GUAN *et al.*, 2012) e, assim, classificados como HPV de alto risco (WILSON *et al.*, 2013). Os tipos de HPV classificados como de baixo risco, como o HPV 6 e 11, são mais envolvidos com lesões condilomatosas e displasia cervical leve (QUEIROZ *et al.*, 2015). Todavia, mesmo subtipos considerados de baixo risco podem ser carcinogênicos (SCHIFFMAN *et al.*, 2009).

A infecção causada pelo HPV pode resultar em alterações no epitélio cervical, favorecendo o aparecimento de lesões precursoras pré-malignas, progressão de um clone de células epiteliais transformadas e, mais tardiamente, câncer e invasão (SCHIFFMAN *et al.*, 2015; QUEIROZ *et al.*, 2015). Esse processo é lento e pode levar 10 anos ou mais para ocorrer (SASLOW *et al.*, 2012). A persistência do HPV requer imunotolerância local no ambiente, favorecendo a

evasão viral e a supressão das respostas imunes inatas e adaptativas (FERNANDES *et al.*, 2015; WILSON *et al.*, 2013).

Histologicamente, a quase totalidade dos tumores malignos do colo do útero são de dois tipos, os adenocarcinomas, que se desenvolvem na endocérvice e os carcinomas de células escamosas, que proliferam a partir da ectocérvice e são amplamente majoritários (HUSAIN e RAMAKRISHNAN, 2015; STEENBERGEN *et al.*, 2014).

Protocolos de classificação com nomenclaturas foram desenvolvidas para os achados citológicos e histopatológicos cervicais anormais (Quadro 1). A primeira nomenclatura foi desenvolvida em 1941, pelo próprio Papanicolaou, graduando em classes de I a V as células normais e as alterações citológicas. Em 1953, Reagan baseou-se na proporção do acometimento da espessura do epitélio para classificá-los em displasias leve, moderada, acentuada e carcinoma *in situ* como lesões precursoras do carcinoma invasor. Em 1967, Richart substituiu o termo displasia por Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), numerando-as de 1 a 3, acrescentando à última os carcinomas *in situ*, devido suas semelhanças (INCA, 2016; AGUIAR *et al.*, 2011).

Todas estas terminologias foram preconizadas antes da descoberta do HPV como agente etiológico necessário para a carcinogênese. Em 1988, um conclave de especialistas reunidos no *National Institutes of Health* na cidade de Bethesda, em Maryland, nos Estados Unidos, elaborou a nomenclatura conhecida como Sistema de Bethesda (TBS), classificação que dividiu os achados citológicos e histológicos anormais em quatro grupos. Dois destes se referem às lesões intraepiteliais, que podem ser de baixo grau (LSIL), correspondendo ao NIC 1 de Richart, e de alto grau (HSIL), correspondendo aos NIC 2 e 3. Tal divisão deriva do conceito de que a lesão intraepitelial cervical não é um processo contínuo, mas duas doenças distintas com prognósticos diferentes (INCA, 2016; AGUIAR *et al.*, 2011).

O terceiro grupo de achados anormais classificadas pelo TBS é composto pelas até então genericamente chamadas de atípias. Esses achados citológicos de natureza inconclusiva receberam uma classificação e foram chamados de Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (ASCUS), que na revisão ocorrida em 2001, passou a ser chamada de Células Escamosas Atípicas (ASC). Ao quarto grupo de anormalidades elencadas pelo TBS, pertencem os carcinomas de células escamosas (NAYAR; WILBUR, 2015; BARCELOS *et al.*, 2011).

Classificação citológica de Papanicolaou (1941)	Classificação histológica da OMS (1952)	Classificação histológica de Richart (1967)	Sistema Bethesda (2001)	Classificação Citológica Brasileira (2006)
Classe I	-	-	-	-
Classe II	-	-	Alterações benignas	Alterações benignas
-	-	-	Atipias de significado indeterminado	Atipias de significado indeterminado
Classe III	Displasia leve	NIC I	LSIL	LSIL
	Displasia moderada e acentuada	NIC II e NIC III	HSIL	HSIL
Classe IV	Carcinoma <i>in situ</i>	NIC III	HSIL Adenocarcinoma <i>in situ</i> (AIS)	HSIL AIS
Classe V	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

Quadro-1 Histórico das Nomenclaturas citopatológicas e histopatológicas utilizadas para o diagnóstico das lesões cervicais e suas equivalências
Fonte: INCA (2016), pg 16.

Em 1990, Richart baseou-se nas conclusões de Bethesda para modificar sua terminologia, direcionando-a para o manejo clínico. Assim, o NIC 1 e as alterações celulares ligadas ao HPV foram ditas NIC de baixo grau, enquanto as lesões que têm as características morfológicas de precursoras de câncer como NIC de alto grau (AGUIAR *et al.*, 2011).

A classificação citológica usada no Brasil pelos laboratórios que prestam serviços ao Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo de Útero e Mama é a Nomenclatura Brasileira para Laudos de Citopatologia (NBLC), sendo definida por especialistas da área, na década passada. Sua semelhança com a nomenclatura do Sistema de Bethesda deve-se ao fato desta ter baseado a sua elaboração, em razão de se favorecer a comparação de dados nacionais com a literatura estrangeira (AGUIAR *et al.*, 2011).

1.2 O Exame Citológico

O objetivo dos programas de prevenção do câncer cervical é detectar e tratar todos os precursores de câncer antes que a invasão se desenvolva (SASLOW, *et al.*, 2012). Neste sentido, a citologia oncótica do colo uterino tem reduzido a incidência e a mortalidade desde a sua adoção (PERSSON *et al.*, 2015). Por ser

barato e simples, é o método de triagem para câncer cervical e suas lesões precursoras mais utilizado em todo o mundo (JAHIC; JAHIC, 2016; TOKMAK *et al.*, 2014), além de ser considerado o mais bem sucedido exame para detecção entre todos os tipos de cânceres, em todos os tempos (BOUNTRIS *et al.*, 2014).

Existem dois tipos de citologia cervical, a convencional ou exame de Papanicolaou (CC) e a citologia em meio líquido (LBC). Consistem na avaliação microscópica de material coletado de células oriundas da zona de transformação cervical após preparo com coloração. Diferem tanto na forma de conservação e transporte, quanto no processo de confecção de lâminas (KITUNCHAROEN *et al.*, 2015).

A LBC tem a vantagem de poder contar com 100% do material coletado no líquido fixador, possibilitando a realização de exames complementares com a possibilidade de guarda de material. Permite ainda uma leitura com menos artefatos, proporcionando menor taxa de falso-negativos ou de esfregaços insatisfatórios (KITUNCHAROEN *et al.*, 2015; STABILE *et al.*, 2015).

A Citologia foi introduzida no início dos anos 1950 como um método de rastreio primário e a redução das taxas de incidência de câncer cervical proporcionadas na América do Norte, Europa e Austrália bastaram para sua aceitação, apesar de nunca ter sido submetida a avaliação de eficácia em ensaios randomizados (SASLOW *et al.*, 2012; SAHASRABUDDHE *et al.*, 2011).

Embora tenha o fito de detectar lesões pré-malignas a citologia apresenta a possibilidade de identificar de forma complementar: infecções genitais; variações não neoplásicas como atrofia e metaplasias escamosas; alterações cito-hormonais; alterações reativas celulares por inflamação, radioterapia ou uso de dispositivo intra-uterino (DIU); alterações celulares da gestação e presença de células endometriais (NAYAR; WILBUR, 2015; BRASIL, 2012).

O epitélio escamoso cervical submetido a condições de estresse biológico, físico ou químico, responde com mudanças reacionais adaptativas que se refletem em alterações celulares, citoplasmáticas e nucleares que podem ser identificadas através da citologia (BRASIL, 2012).

Os efeitos patogênicos da replicação do HPV nas células escamosas resultam em alterações morfológicas características desta infecção e que podem ser detectados em citologias ou biópsias com alto grau de precisão (LHEE *et al.*, 2014). A coilocitose clássica e a disqueratose são consideradas patognomônicas para a

infecção por HPV (ETCHEBEHERE *et al.*, 2016, NIJHAWAN *et al.*, 2010). Coilocitos são células epiteliais escamosas com um núcleo hiper cromático, deslocado do centro da célula por um grande halo peri-nuclear, podendo, ocasionalmente, apresentar multinucleação (LHEE *et al.*, 2014).

Esboço de coilocitose, disqueratose leve (paraqueratose atípica), citoplasma vazio, grânulos cerato-hialinos, condensação de filamentos no citoplasma, células fusiformes, *balloon cells*, hiper cromasia nuclear, bi ou multinucleação e halo perinuclear são considerados critérios secundários, mas não definidores de infecção por HPV (ETCHEBEHERE *et al.*, 2016). Outros achados associados a uma possível infecção pelo HPV são as Células em Fibra e as Células Gigantes (JORDÃO *et al.*, 2003).

A hiperqueratose é o achado de espessamento no estrato córneo superficial do epitélio escamoso. São células maduras anucleadas com citoplasma orangiófilo. Quando uma hiperqueratose apresenta células com os núcleos presentes são chamadas de paraqueratose. Podem estar associadas às distopias uterinas, irritação crônica e inflamação (XIAO; EMANUEL, 2009).

Binucleação é o achado citológico de dois núcleos na mesma célula escamosa. Alguns autores consideram essas alterações nucleares característicos de papilomas benignos e que esses achados se devam à síntese de DNA não programada por células diferenciadas, na ausência ou falha da citocinese induzida por oncoproteínas (WALLACE; ROBINSON; GALLOWAY, 2014).

A citologia padece de uma alta variação da sensibilidade e reprodutibilidade para a detecção de patologias precursoras de câncer cervical, com sensibilidade variando entre 30% a 87% e especificidade variando de 86% a 100% (KITUNCHAROEN *et al.*, 2015; PERSSON *et al.*, 2015; QUEIROZ *et al.*, 2015). A sensibilidade e especificidade para detecção de lesão intraepitelial de alto grau também é limitada (KECECIOGLU *et al.*, 2014).

Além das desvantagens de lidar com altas taxas de falso-negativos, subjetividade do exame e a necessidade de repetição frequente do teste, podem ocorrer erros no diagnóstico de neoplasia cervical e lesões precursoras por métodos citológicos. Isso decorreria da ausência de melhor padronização de alguns critérios morfológicos e de coletas sem a suficiente representação da junção escamo-colunar na amostra (NOMELINI *et al.*, 2012). A presença de inflamação é outro empecilho para a interpretação de achados citológicos anormais (JAHIC; JAHIC, 2016).

O sucesso do rastreio do cancer do colo do útero pode ser imputado a evolução lenta, ao cabo de anos, com que infecções do colo pelo HPV evoluem para lesões pre-malignas e Câncer Cervical Invasivo (STEENBERGEN *et al.*, 2014), além da disponibilidade de métodos relativamente seguros e eficazes para tratamento das lesões precursoras. No entanto, o custo substancial associado aos programas de rastreio, a precisão limitada da citologia e as complicações do sobretratamento levaram à investigação e ao desenvolvimento de outras técnicas de prevenção ao câncer do colo do útero (SAHASRABUDDHE *et al.*, 2011).

1.3 Detecção do DNA-HPV

Os achados citomorfológicos das lesões ditas menores, como ASC-US e LSIL, não predizem o curso da doença, que frequentemente regredirá espontaneamente sem tratamento. Portanto, referenciar todas as mulheres com estes achados para um novo exame ginecológico pode levar a exagero diagnóstico e de tratamento (ARBYN *et al.*, 2013).

O padrão-ouro atual para avaliação de lesões cervicais é o exame histológico de uma biópsia guiada sob visão colposcópica. Todavia, além de suas limitações de ordem logística e a sujeição à variabilidade interobservador, este exame não permite inferir sobre risco de persistência, progressão ou regressão das lesões (NOMELINI *et al.*, 2012).

Avanços da biologia molecular trouxeram um novo panorama para a detecção deste tipo de câncer. A constatação da presença do DNA do vírus nos tecidos hospedeiros impulsionou o conhecimento científico da fisiopatologia da infecção. Assim, pode-se constatar que 70% das novas infecções se resolviam dentro de 1 ano e 91% se resolveriam no prazo de 2 anos. Contudo o conhecimento atual não permite dizer se a negatificação do vírus indica plena eliminação, ou se este ainda está presente em níveis abaixo aos do limite de detecção (DUNNE; MARKOWITZ, 2006).

Um desafio importante reside na classificação de casos de infecção por HPV que, para ser efetivo, deve prever de forma segura se aquela infecção é transitória, potencialmente maligna ou definitivamente maligna. Aceita-se que a infecção persistente com ao menos um de 13 genótipos HPV identificados como carcinogênicos (HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51,

HPV52, HPV56, HPV58, HPV59 e HPV68) pode causar câncer cervical (NAKAMURA *et al.*, 2015), daí a importância da detecção e genotipagem do HPV. Enquanto HPV 16 e 18 predominam em lesões de alto grau, as lesões menores concentram uma grande diversidade de tipos diferentes de HPV (ELFSTROM *et al.*, 2015).

O biomarcador mais estudado e utilizado para a triagem do câncer cervical é o teste do DNA-HPV. Atualmente dispõe-se de várias técnicas para detectar a presença do HPV, como a captura híbrida e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (NOMELINI *et al.*, 2012).

Há claros benefícios no uso de um teste de HPV na detecção de células escamosas anormais para o câncer cervical (KECECIOGLU *et al.*, 2014). Trabalhos mostraram que a adição de um teste biomolecular para o HPV aumenta a sensibilidade de detecção para NIC em mulheres com diagnóstico de atipia em células escamosas em relação à citologia repetida, ao passo que, um teste negativo para HPV em mulheres com este diagnóstico poderia reduzir o número de vezes em que se faz necessário a colposcopia, reduzindo eventuais biópsias desnecessárias (BARCELOS *et al.*, 2011).

Presume-se que o teste de HPV possa, um dia, substituir a citologia na triagem cervical primária devido a maior sensibilidade dos testes do HPV para a detecção de neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau em comparação com a citologia (PREISLER *et al.*, 2012).

Combinar o teste citológico com o teste de DNA do HPV é uma alternativa eficaz para minorar as desvantagens de cada teste. Uma metanálise mostrou que a sensibilidade do conjunto é maior do que a sensibilidade de cada método individualmente (BOUNTRIS *et al.*, 2014).

Novos biomarcadores com maior especificidade para os eventos de transformação associado ao HPV têm sido estudados. A detecção do RNA mensageiro de E6/E7 se baseia no fato de que uma maior expressão destas proteínas demarca a mudança de lesão transiente para uma lesão persistente transformadora. O p16ink4a, um inibidor de cinase dependente de ciclina, é marcadamente superexpresso em imunohistoquímica de tecido cervical canceroso e pré-canceroso, podendo ser utilizado como marcador destas lesões e como fator preditor prognóstico (ELEUTÉRIO JR. *et al.*, 2017; SAHASRABUDDHE *et al.*, 2011).

1.4 Células Escamosas Atípicas

Células escamosas atípicas (ASC) é um termo que se refere a processos citológicos atípicos, que possuem critérios de maior gravidade do que aqueles de natureza inflamatória, reativa ou reparativa, mas insuficientes quantitativamente e qualitativamente para serem definidos com lesões intraepiteliais cervicais (JAHIC; JAHIC, 2016). A maior parte destas alterações são passageiras e irão desaparecer sem tratamento, mas alguns podem indicar uma condição pré-maligna incipiente ou instalada ou, de forma mais rara, câncer invasivo (LEE; LEE, 2016).

A terminologia propugnada pelo Sistema Bethesda, em 1988, primeiramente as descreveu como ASCUS (*Atypical squamous cells of undetermined significance*) (APGAR; ZOSCHNICK; WRIGHT JR, 2003), englobando todas as lesões limítrofes das lesões intraepiteliais. Tinha-se o intuito de reduzir as falhas de comunicação entre os laboratórios e os clínicos que usavam variadas nomenclaturas (BIGRAS *et al.*, 2013).

O desconforto causado ao clínico em se conduzir da mesma forma com alterações tão variadas gerou debates, propiciando uma nova revisão da nomenclatura de Bethesda, em 1991, em que foi recomendado se classificar ASCUS com qualificadores como: "ASCUS não especificado de outra forma", "ASCUS favorecendo reativo" e "ASCUS favorecendo lesão intraepitelial escamosa-displasia" (MORAIS *et al.*, 2011).

Pesquisas demonstraram que, dependendo do tipo celular em que ocorria a atipia, o risco de lesão intraepitelial subjacente se modificava. Em células escamosas maduras (atipia escamosa madura) o risco de lesão intraepitelial escamosa era de 10%, enquanto em células metaplásicas escamosas (metaplasia escamosa atípica) o risco seria de 24% e em células metaplásicas imaturas (atipia metaplásica imatura) o risco atingiria 41% (ELEUTÉRIO Jr. *et al.*, 2000).

O termo ASCUS, com suas múltiplas qualificações causava tanto uma dificuldade de padronização de diagnóstico e seguimento, como gerava incerteza e ansiedade para o médico assistente que, por sua vez, se estendia à paciente (MORAIS *et al.*, 2011).

Após sofrer nova revisão em 2001, as citologias ASC ora se apresentam sob este termo, com duas subdivisões: células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), que refletiriam as dificuldades de distinção entre as mudanças reativas e LSIL; e células escamosas atípicas, não podendo descartar

uma lesão de alto grau (ASC-H), o que refletiria um diagnóstico diferencial entre metaplasia imatura e reativa e HSIL (JAHIC; JAHIC, 2016; BARCELOS *et al.*, 2011).

O objetivo desta padronização dualista para ASC era possibilitar ao clínico a noção de que, mesmo diante de um diagnóstico indefinido, havia diferença apontando para um menor (ASC-US) ou maior (ASC-H) risco para lesões intraepiteliais de alto grau (MORAIS *et al.*, 2011).

A nomenclatura atual não trouxe paz à questão, sobretudo devido as dificuldades de reprodutibilidade das citologias cervicais, e da reconhecida baixa concordância interobservador acerca da citomorfologia (BIGRAS *et al.*, 2013). Dados nacionais colhidos entre 2002 e 2005, mostrou aumento de 8,6% na frequência de atipias de células escamosas entre os exames alterados no Brasil (FERNANDES *et al.*, 2012).

Por ser a ASC um diagnóstico de incerteza, postergando uma definição (ARBYN *et al.*; 2013), tornou-se fundamental determinar parâmetros mensuráveis para evitar um excesso desta classificação citopatológica. Assim, estabeleceu-se que sua frequência não deva ultrapassar 5% de todas as citologias. Definiu-se também que razão ASC/SIL diagnosticadas dentro de um mesmo laboratório deve estar compreendido entre dois e três (FERNANDES *et al.*, 2012; MORAIS *et al.*, 2011).

Poucos são os dados nacionais em revistas especializadas sobre o tema (RUSSOMANO; MONTEIRO; MOUSINHO, 2008), em especial sobre a prevalência de HPV positivo e os genótipos mais frequentes em achados de significado indeterminado e sua correlação histopatológica, tornando o assunto campo fértil para pesquisa (QUEIROZ *et al.*, 2015).

1.4.1 Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado

ASC-US é a anormalidade citológica do *screening* de câncer cervical mais frequente (SCHIFFMAN *et al.*, 2015; WON *et al.*, 2015; LÓPEZ-ALEGRÍA *et al.*, 2015), variando de 2 a 5% de todas as citologias anuais americanas (GAGE *et al.*, 2014) e de 1,6 a 9% no Brasil (BARCELOS *et al.*, 2011), mas o risco de câncer cervical invasivo é baixo, variando de 0,1 a 0,2%, de acordo com a literatura (KOLNIKOVA *et al.*, 2014).

Os achados diagnósticos de ASC-US ocorrem em células escamosas maduras, ou seja células escamosas intermediárias e superficiais (MORAIS *et al.*, 2011). Os critérios para a interpretação de ASC-US, de acordo com Solomon e Nayar publicadas em 2004, incluem: 1) Tamanho do núcleo de aproximadamente dois e meio a três vezes a área do núcleo de uma célula escamosa intermediária normal; 2) Relação ligeiramente aumentada entre a área nuclear e citoplasmática; 3) hiperchromasia nuclear mínima e irregularidade na distribuição da cromatina ou na forma nuclear e 4) Anormalidade nuclear associada à presença de denso citoplasma de coloração laranja, ou a chamada "paraqueratose atípica" (figura 5) (KIETPEERAKOOL *et al.*, 2014).

Podem ainda ser categorizadas como ASC-US, o achado de células redondas ou ovais com aproximadamente 1/3 do tamanho das células superficiais, comparáveis à células metaplásicas grandes ou células intermediárias de camadas mais profundas (BRASIL, 2012).

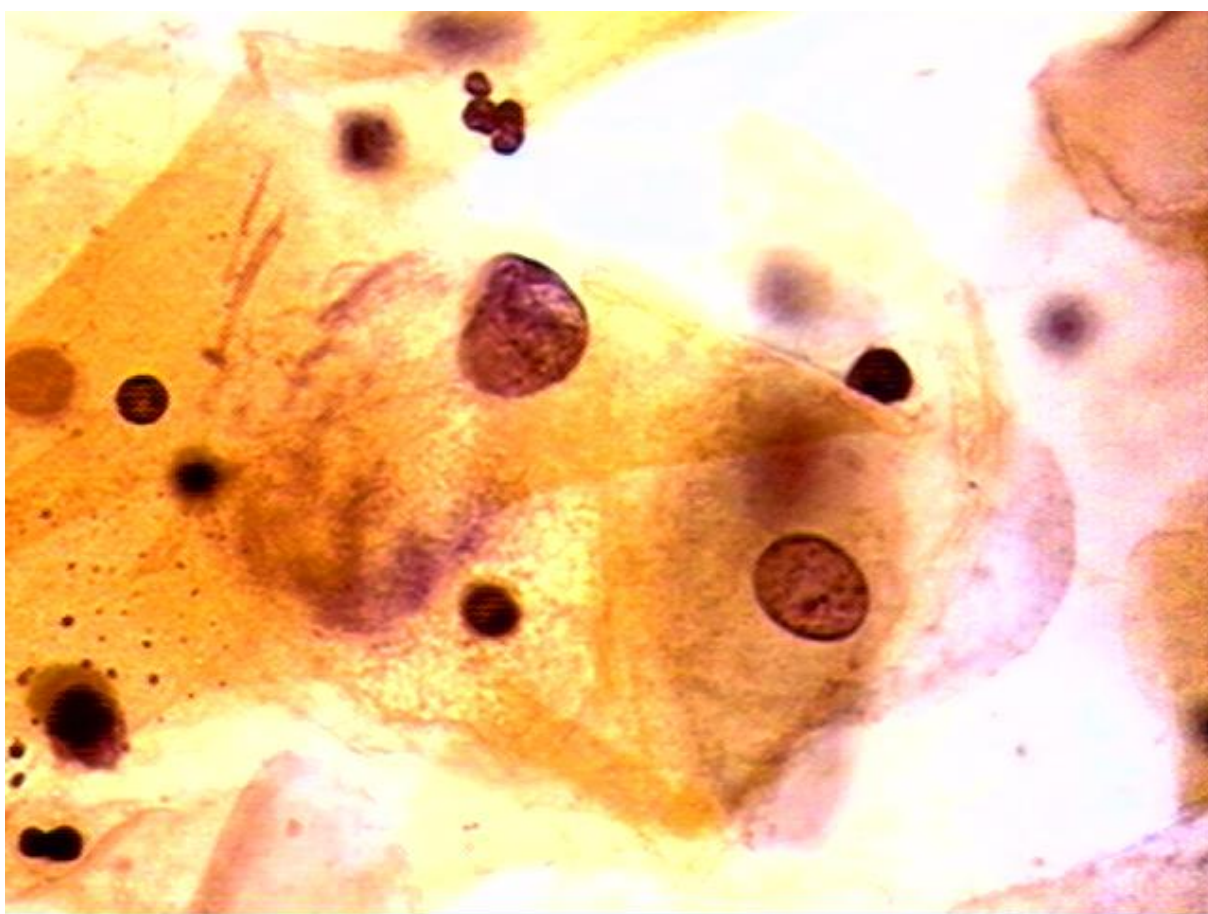


Figura 1 - Citologia pelo método convencional mostrando um ASC-US (1000 x).
Fonte: Arquivo pessoal Prof. Dr. José Eleutério Jr.

Citologias com alterações sugestivas mas não definitivas de infecção pelo HPV, como esboço de coilócito, bi ou multinucleação, células fusiformes, células gigantes e halo perinuclear, quando não presentes critérios para outras anormalidades, devem ser classificadas como ASC-US (ETCHEBEHERE *et al.*, 2016; BRASIL, 2012). Muitas destas alterações podem representar estágios de uma coilocitose clássica em regressão (LHEE, *et al.*, 2014).

O achado de binucleação pode estar associado ao ASC-US e, quando somado a outros critérios, auxilia o diagnóstico (MORAIS *et al.*, 2011). Existem estudos demonstrando associação de células binucleadas com compressão positiva (quando os núcleos exercem efeito de massa um sobre o outro) com infecção por HPV e células ASC (OKODO *et al.*, 2016; WASHIYA *et al.*, 2013).

A maioria dos resultados citológicos de ASC-US não correspondem a nenhuma doença clinicamente significativa, porém uma proporção substancial delas apresentam resultado histopatológico de HSIL. Estima-se que um terço das NIC, nos EUA, foram descobertas após o seguimento de um esfregaço anterior com ASC-US (ARBYN *et al.*, 2013). Um estudo de metanálise, pesquisando o desfecho de citologias ASC-US após dois anos, revelou que esta evoluía para câncer cervical invasivo em 0,25%, para lesão de alto grau em 7,1%, enquanto a regressão ocorria em 68,2%. De 1000 mulheres com lesões escamosas atípicas, uma terá diagnóstico de câncer cervical invasivo (JAHIC; JAHIC, 2016).

Controvérsias cercam estes achados de natureza incerta (ARBYN *et al.*, 2013). ASC-US não é uma entidade biológica, que progride ou regride, mas a expressão de uma incerteza diagnóstica entre o grau normal e LSIL (GAGE *et al.*, 2014; SCHIFFMAN *et al.*, 2015).

Além de sua interpretação citomorfológica envolver subjetividade e depender da interpretação do patologista (WATSON *et al.*, 2015), fato demonstrado pela ampla variedade de taxas reportadas por diferentes laboratórios (COX, 2009; GAGE *et al.*, 2014), divergentes opiniões quanto a sua condução são apresentadas sem que exista um manejo clínico mundialmente aceito para estes casos (LÓPEZ-ALEGRÍA *et al.*, 2015; ABREU *et al.*, 2016), variando em diferentes instituições e regiões, de um espectro que vai desde a repetição da citologia como seguimento até o encaminhamento para colposcopia (TOKMAK *et al.*, 2014).

Barcelos *et al.* (2011) cita em sua pesquisa frequências de diagnósticos entre laboratórios nacionais mostrando que citologias com diagnóstico de ASC-US

variavam amplamente, de 1,6% a 9%. O seguimento citológico como estratégia de triagem para ASC-US, pode ainda resultar em um diagnóstico tardio em algumas pacientes (ARBYN *et al.* 2013).

O teste do HPV pode ser aplicado para triagem de pacientes com esfregaços classificados como ASC-US, onde um grande estudo norte-americano observou genótipo de HPV de alto risco, em cerca de 55% das mulheres com esse diagnóstico (SOLOMON *et al.*, 2001). O estudo em questão foi chamado de *ASCUS-LSIL Triage Study Group (ALTS)* e comparou estratégias alternativas para o manejo inicial de um diagnóstico citológico de ASC-US (KOLNIKOVA *et al.*, 2014).

Neste ensaio, 3488 mulheres com citologia ASCUS foram randomizadas para seguimento de colposcopia imediata, pesquisa de HPV-DNA ou repetição da citologia. O desfecho do estudo foi medir o diagnóstico cumulativo de NIC em cada grupo após dois anos. Para comparar os testes de triagem, mediu-se a taxa de sucesso do teste do HPV e da citologia em referir pacientes com NIC 3 subjacentes. Um único teste do HPV identificou 92,4% das lesões NIC 3. A citologia seriada, teria requerido duas visitas para atingir sensibilidade semelhante (95,4%) e teria referido 67,1% à colposcopia (KOLNIKOVA *et al.*, 2014).

Um resultado de teste positivo ao HPV após um resultado ASC-US podem indicar um lesão pré-maligna, devendo ser seguidas por colposcopia imediata, enquanto que os resultados negativos do HPV praticamente garantem que as atipias encontradas são de natureza benigna (WATSON *et al.*, 2015).

Releva lembrar da importância de uma precisa indicação colposcópica, que além de menos acessível em determinadas regiões, o tratamento excisional que se segue a uma colposcopia, pode levar a dor pélvica, dispareunia, disfunção sexual, dificuldades obstétricas, redução da qualidade de vida e custos para o sistema de saúde (CHARLTON *et al.*, 2013).

Uma estratégia que se revelou de alta sensibilidade para o diagnóstico das NIC subjacentes, em portadores de ASC-US entre as idades de 30 e 60 anos, foi a execução do teste de HPV reflexo, que consiste na realização simultânea, quando indicada, de citologia cervical e teste de HPV, sendo superior em comparação com uma repetição da citologia (BARCELOS *et al.*, 2011).

Em 2012, a Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical (ASCCP) emitiu suas recomendações acerca do manejo de mulheres com citologia ASC-US. Dentre elas está a preferência pelo teste de HPV reflexo, repetição de

coteste em três anos para as pacientes com teste do HPV negativo e colposcopia, para aquelas com teste do HPV positivo. Para mulheres sem resultado de HPV, deve-se repetir a citologia em um ano (MASSAD *et al.*, 2013).

Hoje, no Brasil, o Ministério da Saúde (MS) e o Instituto Nacional do Câncer (INCA) recomendam que para achados citológicos indefinidos ASC-US, deve-se repetir a citologia, dependendo da faixa de idade. Menores de 25 anos repetem em três anos, de 25 a 29 anos repetem com 12 meses e mulheres com 30 anos ou mais repetem com seis meses. Não é preconizado o teste do HPV (INCA, 2016).

1.4.2 Células Escamosas Atípicas, não Podendo Descartar HSIL

As células escamosas atípicas não podendo excluir lesão escamosa intraepitelial de alto grau (ASC-H) são definidas como alterações sugestivas, mas não diagnósticas, de lesão escamosa intraepitelial de alto grau (SELVAGGI, 2013). Possuem características intermediárias entre ASC-US e HSIL (XU *et al.*, 2016).

Ao contrário da citomorfologia dos ASC-US, que se assemelham a células escamosas maduras, as atipias características de ASC-H costumam ocorrer em camadas de células de metaplasia escamosa imatura ou em células de reserva (BIBBO; WILBUR, 2014).

Critérios para ASC-H incluem fragmentos de tecido ou grupos desorganizados de células hiper Cromáticas e células metaplásicas escamosas atípicas (imaturas e maduras), pequenas células atípicas com uma relação nuclear/citoplasmática elevada, reparação atípica e atipia atrófica. Os critérios mais frequentes são a metaplasia escamosa atípica e os fragmentos de tecido/grupos desorganizados de células, com relativa dificuldade para distingui-las de um HSIL (SELVAGGI, 2013; OKODO *et al.*, 2016) (figura 6).

Alguns autores têm sugerido como critério citológico alternativo para ASC-H o achado de pequenas células escamosas binucleadas comprimidas (OKODO *et al.*, 2016).

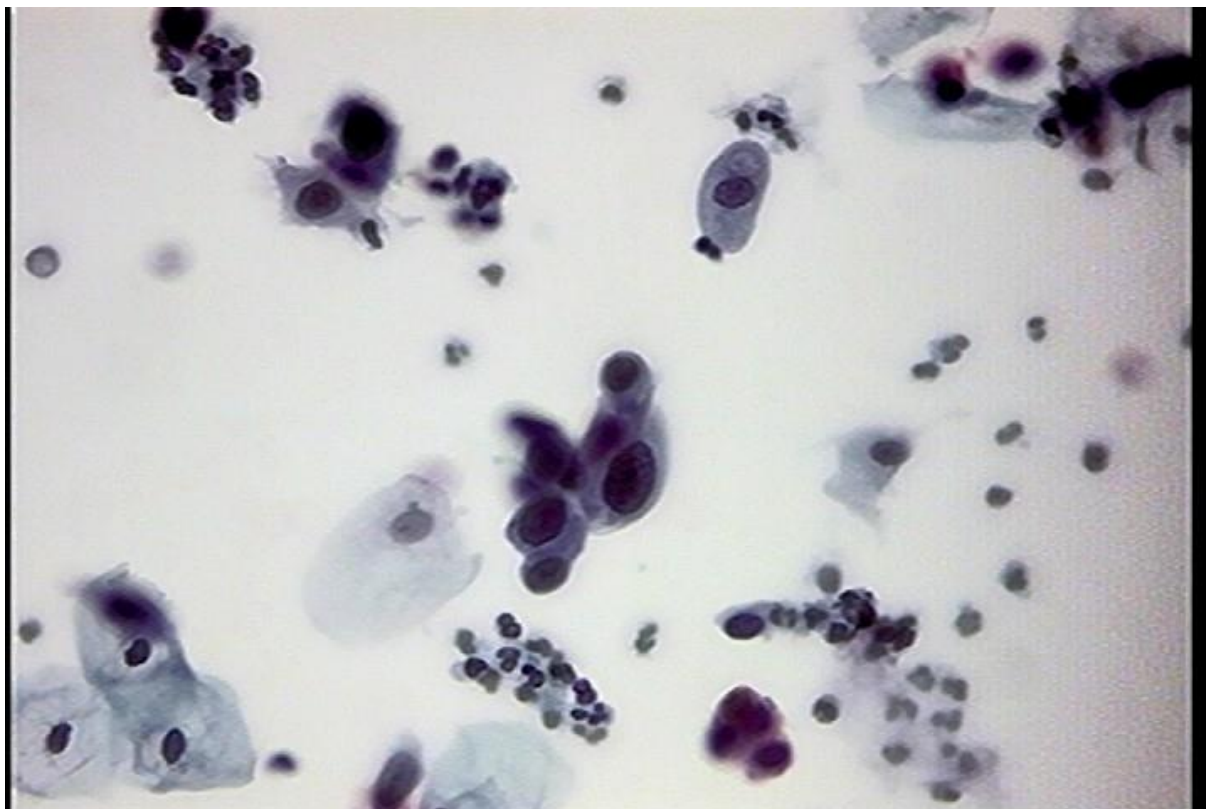


Figura 2- Citologia em meio líquido. Células pequenas agrupadas ao centro com grande relação núcleo/citoplasma, características de atipias ASC-H (400 x).

Fonte: Arquivo pessoal Prof. Dr. José Eleutério Jr.

Por causa de um critério frouxo para interpretação de esfregaços classificados como ASC-H, a concordância interobservador é baixa e isso explica, parcialmente, a ampla variação da taxa desta anormalidade cervical observados por alguns autores (KIETPEERAKOOL *et al.*, 2014). O seguimento inicial, para estes casos, demanda pronta colposcopia (SELVAGGI, 2013).

Uma revisão com estudos de seguimentos histopatológicos de casos ASC-H mostrou resultados de NIC 2 ou superior variando de 32 a 66% (SELVAGGI, 2013). Citologias com resultado ASC-H também possuem alta positividade para um teste de HPV de alto risco, mas devido a este risco relativamente alto de HSIL subjacente, um teste negativo para HPV de alto risco não permitiria excluir uma paciente com citologia ASC-H do rastreio, como tem sido proposto para resultados ASC-US com teste do HPV negativo concomitantes (XU *et al.*, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

Levando-se em conta que o câncer cervical é ainda um grave problema de saúde pública em todo mundo; que a classificação de células escamosas atípicas, embora tenha preenchido uma lacuna existente entre os achados citológicos claramente não neoplásicos e os pré-neoplásicos e hoje represente a anormalidade citológica mais frequente, permanece controverso no tocante a sua caracterização e conduta, e considerando a escassez de dados nacionais sobre o tema, justifica-se este estudo pela necessidade de se obter dados que permitam ampliar o conhecimento acerca destas anormalidades citológicas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Averiguar a possível associação dos achados citológicos com células escamosas atípicas e o resultado histopatológico e genótipos de HPV.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar os achados citomorfológicos que levaram ao diagnóstico de ASC.
- Comparar os achados citomorfológicos com o método citológico empregado.
- Identificar a relação ASC-US/ASC-H.
- Identificar a frequência de HPV e os genótipos mais prevalentes em casos de ASC-US e ASC-H.
- Correlacionar os achados da citologia e genotipagem com o diagnóstico histopatológico final.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo observacional, analítico e retrospectivo, através da pesquisa em banco de dados de laboratório de serviço privado, das correlações citomorfológicas de casos diagnosticados como ASC (ASC-US e ASC-H) em citologias, com detecção do DNA-HPV e histopatológico, quando indicadas e realizadas.

4.2 População do estudo

Os dados coletados do estudo provêm de pacientes oriundas de clínicas privadas da cidade de Fortaleza-Ceará, em que seus ginecologistas encaminharam a lâmina ou material do conteúdo cervical para o laboratório privado Laboratório Professor Eleutério Costa-LABPEC, coletados entre os meses de janeiro de 2010 a julho de 2016, obtendo-se 2458 registros.

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

4.3.1 Critérios de inclusão

Incluiu-se todas os resultados de citologia ASC-US e ASC-H do período, independentemente da idade e paridade.

4.3.2 Critérios de exclusão

Excluiu-se as citologias com descrição clínica de gestação em curso, uso de imunossupressor e/ou doença que cursa com redução da competência imunológica. Após aplicar os critérios de exclusão, obteve-se 2457 amostras.

4.4 Coleta de dados

Os dados coletados no sistema informatizado do laboratório alimentaram planilha do Excel com informações sobre sociodemografia, antecedentes ginecológicos, queixas clínicas, achados do exame ginecológico, método de coleta citológica, achados morfológicos da citologia, patógenos associados, critérios

diagnósticos de ASC, exames biomoleculares para HPV, exames histopatológicos e evolução.

As frequências destes achados foram discriminadas em dois grupos: grupo ASC-US e grupo ASC-H.

4.4.1 Citologia

As citologias das amostras foram realizadas pelo método convencional de Papanicolaou ou pelo método citológico em meio líquido de SurePath (BD, Franklin Lakes, N.J., Estados Unidos). A leitura das lâminas seguiu os critérios para achados atípicos do Sistema de Bethesda de nomenclatura citológica.

Os critérios diagnósticos que levaram ao diagnóstico ASC-US foram medidas em suas frequências e comparadas ao método citológico e histopatologia prevalente. Os critérios identificados foram aumento nuclear, esboço de coilócito, ASC-US quantitativo, paraqueratose atípica e células em fibra.

O aumento nuclear considerado foi o aumento de 2,5 a 3 vezes o tamanho do núcleo em relação a uma célula intermediária normal (KIETPEERAKOOL *et al.*, 2014).

Esboços de coilócitos foi determinada de acordo com a presença de células superficiais ou intermediárias que preenchiam até dois dos três critérios para coilocitose clássica, que são: aumento nuclear pelo menos três vezes o tamanho do núcleo das células intermediárias adjacentes; hipercromasia e halo perinuclear bem demarcado (LHEE *et al.*, 2014).

Um resultado ASC-US foi considerado quantitativo quando uma avaliação citológica possui algumas células com características semelhantes a LSIL, mas em número insuficiente para se afirmar este diagnóstico (BIBBO; WILBUR, 2014).

Paraqueratose atípica foi caracterizada como alteração nuclear associada à presença de denso citoplasma de coloração alaranjada (KIETPEERAKOOL *et al.*, 2014).

Células em fibra foram definidas como células com o citoplasma alongado e com padrão regular da cromatina (JORDÃO *et al.*, 2003).

Outros achados citomorfológicos que sugerem alterações celulares reativas à infecção pelo HPV ou relacionadas a outras etiologias foram identificadas, medida suas frequências e comparadas ao método de coleta e histopatologia.

Foram identificadas citologias contendo, binucleação, placa de queratina, pérola córnea, hiperqueratose, paraqueratose, células gigantes, *Polka Dot Cells* e *Ballon Cells*.

Binucleação foi diagnosticado pela presença de dois núcleos na mesma célula escamosa (WALLACE; ROBINSON; GALLOWAY, 2014).

Pérola Córnea foi definido como uma formação composta por células escamosas dispostas concentricamente a um núcleo de queratina, com forma semelhante a uma cebola, ocorrendo em células intermediárias e superficiais (KOSS; MELAMED, 2006).

A hiperqueratose é o achado de espessamento no estrato córneo superficial do epitélio escamoso. São células maduras anucleadas com citoplasma orangiófilo (XIAO; EMANUEL, 2009). Paraqueratose foi definido como células escamosas pequenas e queratinizadas, densamente orangiófilas, mas com pequenos núcleos picnóticos (KIR; SARBAY; SENELDIR, 2017).

Células Gigantes são células que podem apresentar bi ou multinucleação, macronucleose e macrocitose, com núcleos separados do citoplasma por um halo de borda concêntrica (JORDÃO *et al.*, 2003).

Polka Dot Cells são células que possuem várias inclusões citoplasmáticas esféricas de variados tamanhos e coloração marrom pálido (KOSS; MELAMED, 2006).

4.4.2 Exames Biomoleculares

Os testes biomoleculares constantes das bases foram realizados por Captura Híbrida (HC2) ou pelo método de PCR em tempo real de Cobas®.

A Captura Híbrida de segunda geração (Qiagen AG, Hombrechtikon, Suíça) é um teste qualitativo e quantitativo que utiliza sondas de RNA com alta especificidade para detecção tanto de HPV de baixo risco (6, 11, 42, 43, 44) quanto para 13 genótipos de HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). Esta técnica se utiliza de anticorpos específicos dispostos na superfície de uma microplaca que capturam híbridos RNA/DNA que são detectados por quimioluminescência através da amplificação de sinal (PARK *et al.*, 2012).

O material coletado através do *kit* Digene® e conservado em meio apropriado (solução de STM®) pelo ginecologista foi encaminhado ao laboratório e

processado. Após processo de desnaturação, a amostra foi submetida a hibridização com o coquetel de sonda específico de RNA-HPV. A captura dos híbridos se processou em microplaca e depois seguiu-se a reação dos híbridos com o conjugado de fosfatase alcalina com o fito de amplificar o sinal. Por fim a detecção dos híbridos foi executada por quimioluminescência.

Para este estudo apenas os resultados executados para HPV de alto risco foram considerados. A expressão da carga viral foi medida como unidade de luz relativa (RLU). Foi considerado positivo o teste quando a medida de unidade luz relativa foi igual ou superior a 1.

A PCR em tempo real de Cobas® 4800 (Roche Diagnostics, Pleasanton, CA, Estados Unidos) é um sistema automático que permite a extração simultânea do DNA viral a partir do extrato celular em um único tubo de ensaio. É um ensaio qualitativo *multiplex in vitro* para a detecção de 14 diferentes tipos de HPV de alto risco. Uma vez sendo extraído o DNA do HPV, ele é então amplificado por reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores específicos para HPV e β -globina, este último funcionando como controle interno da presença celular, reduzindo a possibilidade de um falso-negativo. A mistura principal de PCR contém *primers* e sondas específicas, discriminando individualmente os tipos 16 e 18 e de forma conjunta os outros 12 tipos de HPV de alto risco (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68), denominados de AR (TORRES-IBARRA *et al.* 2016).

O teste cobas 4800 HPV foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. A amostra de material coletado para o PCR era proveniente do material coletado para as citologias em meio líquido, utilizando-se 1 ml desta amostra. Após o preparo do tubo este era levado para processamento no conjunto analisador Cobas 4800 System. O DNA foi extraído, purificado e preparado para PCR pelo Cobas X480 *Instrument*. A amplificação e detecção do DNA HR-HPV foram realizadas no analisador Cobas Z480 *Analyzer*. Sondas TaqMan® fluorescentes foram utilizadas para a detecção dos amplicons de DNA durante os ciclos de PCR.

Considerou-se como sendo demonstrativo de prevalência da infecção por HPV em citologias ASC, a positividade em exames realizados até 1 mês da colheita citológica.

4.4.3 Histopatologia

Os exames histopatológicos foram laudados conforme a classificação de Richart, seguindo os critérios adotados pela Sociedade Brasileira de Patologia. Para efeitos de comparação entre grupos, com o fito de aproximar o desfecho histopatológico com a classificação citológica e o respectivo manejo clínico e prognóstico, os resultados histopatológicos normais ou com NIC 1 foram agrupados no grupo LSIL ou inferior, enquanto NIC 2 e 3 e carcinomas invasivos de colo uterino foram agrupados no grupo HSIL ou superior.

Foi considerado para fins de correlação histopatológica com a citologia ASC, as biópsias obtidas até 6 meses após a colheita citológica.

4.5 Considerações éticas

A pesquisa atende aos requisitos da Resolução 466 de 2012. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC) e aprovado na data de 23 de maio de 2016 em parecer colegiado de número 1556307.

Foram utilizados dados secundários de prontuários e sistemas e, portanto, solicitada dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido, elaborado termo de fiel depositário e anexada autorização de responsável técnico do laboratório onde se desenvolveu a pesquisa.

4.6 Análise estatística

O tratamento estatístico utilizou-se do programa GraphPad Prism®, versão 6.0 e os dados coletados foram dispostos em planilhas do Excel® (Microsoft). Média e desvio padrão foram utilizados para variáveis quantitativas.

Foram aplicados testes exato de Fisher e do qui-quadrado nas comparações entre os grupos com duas variáveis, conforme sugestão do programa. Antes de comparar variáveis contínuas, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk; sendo a distribuição normal seria utilizado um teste t de Student e caso não se observasse normalidade, um teste de Mann-Whitney seria utilizado.

Considerou-se como estatisticamente significativa quando a diferença entre os grupos pesquisados possuía um $p < 0,05$, com intervalo de confiança (IC) de 95%. Foi calculado, quando possível, o risco relativo (RR).

5 RESULTADOS

5.1 A amostra:

O estudo foi realizado através de dados secundários colhidos a partir da pesquisa de 2458 citologias com diagnósticos ASC, colhidas e analisadas no período de 01.01.2010 até 01.08.2016 e disponíveis no banco de dados do Laboratório LABPEC.

Aplicados os critérios de inclusão e exclusão, do total de 2458 citologias ASC, apenas um resultado foi descartado por uso de corticoide e relato clínico de síndrome de Cushing, em conformidade com os critérios de exclusão.

Do total de 2457 citologias elegíveis para a pesquisa, obteve-se 2207 citologias com diagnóstico ASC-US, representando 89,8% dos resultados ASC e 250 citologias com resultado ASC-H, representando 10,2% dos resultados ASC.

5.2 Aspectos Sociodemográfico:

A análise dos resultados sociodemográficos baseou-se nas anotações descritas na solicitação do exame citológico pelos ginecologistas, portanto anterior ao diagnóstico de ASC.

A idade média das pacientes com resultado ASC-US foi de 33,1 anos, com desvio padrão (DP) de 11,3 e intervalo de idade variando de 14 a 83 anos. Para o grupo com resultados ASC-H a idade média foi de 37 anos, com DP de 12,9 e intervalos variando de 17 a 82 anos.

O número de parturições para o grupo ASC-US variou no intervalo de 0 a 17 partos com média de 1,2 e DP de 1,8, enquanto para o grupo ASC-H a variação ocorreu no intervalo de 0 a 14 partos com média de 2,1 e DP de 2,4.

Da totalidade de registros, 426 mulheres declararam o método contraceptivo de escolha. Para o grupo ASC-US (n=387), a contracepção hormonal era o método para 68,48%, seguido pela ligadura tubária (12,4%), uso de dispositivo intrauterino (DIU) ou sistema intrauterino com levonorgestrel (SIU) (10,3%), uso de condom (8,5%) e vasectomia (0,3%). Para o grupo ASC-H (n=39), a contracepção hormonal era também mais frequente (69,2%), seguido pela ligadura tubária

(20,5%), uso de DIU (5,1%) e uso de condom (5,1%). Observou-se que, estatisticamente, as diferenças entre os grupos ASC não foram significativas.

Para o grupo ASC-US 16 pacientes declararam usar medicamentos de manutenção: 13 declararam fazer terapia de reposição hormonal, uma referiu fazer uso de atenolol e duas com uso de levotiroxina. Para o grupo ASC-H, apenas duas pacientes declararam uso de reposição hormonal.

Das 2457 citologias no total da amostra, apenas em 1143 pacientes havia descrição do motivo da realização da citologia, sendo 1015 para o grupo ASC-US e 128 para o grupo ASC-H. Para o primeiro grupo, em 57,8% a motivação foi triagem de rotina, 32% por apresentarem algum sintoma e 10,2% por ser seguimento de algum exame prévio alterado. Para o grupo ASC-H, 53,1% fizeram a citologia preventivamente, 33,6% por apresentarem sintomas e 13,3% como seguimento de exame anterior alterado. Não existiu diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Das 368 pacientes em que na solicitação do exame havia o relato de uma queixa principal, houve 383 sintomas informados, 337 para o Grupo ASC-US e 46 para o grupo ASC-H. Corrimento era o sintoma mais frequente para 62,9% e 54,4%, respectivamente. Prurido (12,2% para grupo ASC-US e 13% para o grupo ASC-H), odor (12,2% para grupo ASC-US e 10,9% para o grupo ASC-H), dor pélvica (6,8% para grupo ASC-US e 8,7% para o grupo ASC-H), sinusiorragia (2,7% para grupo ASC-US e 8,7% para o grupo ASC-H) e sangramento transvaginal (0,6% para o grupo ASC-US e 4,4% para o grupo ASC-H). Ardor/irritação e dispareunia foram descritas apenas no grupo ASC-US, em 1,5% e 1,2%, respectivamente. Não foi encontrado diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

No total, 120 pacientes possuíam solicitação de exame que descrevia o motivo da realização deste como sendo seguimento de algum procedimento ginecológico anterior. A distribuição para o grupo ASC-US (n=104) mostrou maior frequência para citologia LSIL anterior, com 38,5%, seguido pós citologia com atipia 25%, seguimento pós-infecção HPV/condiloma com 19,2% e seguimento pós-citologia HSIL com 11,5%. Menos frequente era seguimento pós-HSV (3,9%) e seguimento pós cone/cirurgia de alta frequência (CAF)/diatermocoagulação (DTC) (1,9%). Para o grupo ASC-H (n=16) o seguimento pós-LSIL também era mais frequente (37,5%), seguido por seguimento por citologia com atipia (31,3%), seguimento pós- infecção HPV/condiloma (12,5%), seguimento pós cone/CAF/DTC

(12,5%) e seguimento pós-citologia HSIL (6,3%).

Da 2457 amostras de resultados ASC, somente em 1010 citologias havia disponível informações sobre a inspeção visual direta do exame ginecológico e/ou colposcopia, quando realizada, sem nenhuma informação em 1447 exames. Para o grupo ASC-US (n=900) um colo uterino normal era visualizado em 65,4%, uma zona de transformação atípica (ZTA) em 14,4%, ectrópio em 12,6%, colpíte em 6,1% e achados de condiloma (0,9%) e pólipos (0,6%) foram menos frequentes. Para o grupo ASC-H, 69,1% dos relatos de aspecto visual do colo uterino eram descritos como normal, seguidos de ectrópio em 14,6%, ZTA relatados em 6,4%, colpíte em 5,5%, condilomas e úlceras ambos com 1,8% e 0,9% para pólipos. Os resultados mostraram que a presença de zona de transformação atípica era significativa estatisticamente no subgrupo ASC-US em relação ao grupo ASC-H, com um p de 0,0026, enquanto o achado de ulceração apresentou significância estatística em relação ao subgrupo ASC-H (Tabela 1).

Tabela 1. Achados do exame ginecológico/colposcopia em pacientes com resultado citológico ASC (n=1010).

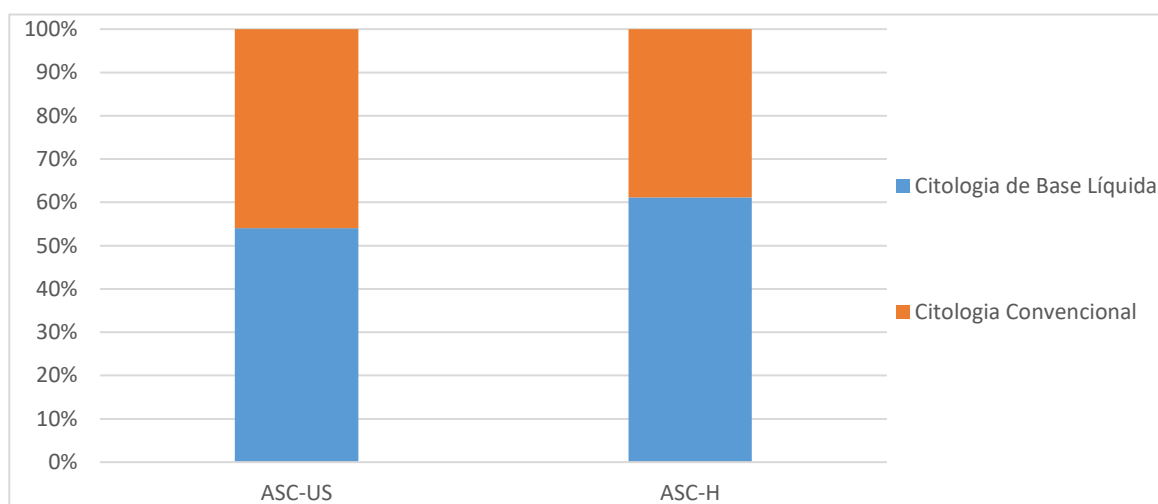
	ASC-US n (%)	ASC-H n (%)	p
Normal	589 (65,4)	76 (69,1)	0,5229
Ectrópio	113 (12,6)	16 (14,5)	0,5458
Zona de Transformação Atípica	130 (14,4)	7 (6,4)	0,0026
Pólipo	5 (0,6)	1 (0,9)	0,5003
Colpíte	55 (6,1)	6 (5,5)	1,0000
Condiloma	8 (0,9)	2 (1,8)	0,2985
Úlcera	0 (0,00)	2 (1,8)	0,0118
Total	900 (100,0)	110 (100,0)	

Teste exato de Fisher com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95%.

5.3 Achados Citológicos:

Das 2457 citologias realizadas, 1346 foram colhidas para citologia em base líquida (54,8%), enquanto 1111 foram colhidas pelo método convencional (45,2%). Das citologias de base líquida, 1192 foram ASC-US e 154 foram ASC-H, enquanto para as citologias convencionais, 1015 eram ASC-US e 96 eram ASC-H. Esses dados mostram que há uma frequência mais significativa de observação de ASC-H em citologias de base líquida do que ASC-US, com p de 0,0265 (Gráfico 1).

Gráfico 1. Métodos citológicos utilizados para coleta de citologias com resultados ASC (n=2457).



Teste de Qui-Quadrado com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95%. $p=0,0265$.

O quadro citológico geral, reunindo trofismo e alterações celulares benignas reativas ou reparativas, foi descrito em 2447 exames, em três foram considerados limitados ou insatisfatórios e, portanto, excluídos dos achados, enquanto em sete pacientes não havia nenhuma descrição do quadro. Assim, restaram 2203 registros para ASC-US e 244 para ASC-H.

O achado de inflamação era mais frequente, tanto para o grupo ASC-US (88,1%), quanto para ASC-H (91,4%). Para o grupo ASC-US seguiam em frequência as vaginoses bacterianas com 5,4%, epitélio eutrófico em 4,3%, predomínio de citólise em 1,5% e proporções menores de epitélio atrófico (0,4%), hipotrófico (0,3%) e purulento (0,1%). Para o grupo ASC-H seguiam em frequência epitélio atrófico (2,5%), eutrófico (1,6%), hipotrófico (1,6%), vaginose bacteriana (1,6%), citolítico (0,4%) e purulento (0,4%).

Os esfregaços citológicos com epitélio hipotrófico ou atrófico eram mais frequentes no grupo ASC-H com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ASC-US, que por sua vez teve maior frequência de vaginose bacteriana mascarando o trofismo, também de forma estatisticamente significativa (Tabela 2).

Tabela 2. Achados descritivos gerais em citologias com resultado ASC (n=2447).

	ASC-US	ASC-H	p
	n (%)	n (%)	
Eutrófico	95 (4,3)	4 (1,6)	0,0645
Citolítico	32 (1,5)	1 (0,4)	0,2924
Hipotrófico	6 (0,3)	4 (1,6)	0,0083
Atrófico	9 (0,4)	6 (2,5)	0,0006
Inflamatório	1940 (88,1)	224 (91,4)	0,1454
Purulento	2 (0,1)	1 (0,4)	0,7006
Vaginose bacteriana	119 (5,4)	4 (1,6)	0,0160
Total	2203 (100,0)	244 (100,0)	

Teste do Qui Quadrado com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95%.

No banco de dados, os resultados citológicos inflamatórios só aparecem subdivididos de forma graduada em leve, moderado e acentuado a partir dos exames colhidos de 2013 em diante, resultando em 1006 exames citológicos graduados. Para o grupo ASC-US (n=880), um inflamatório moderado foi mais frequente (37,6%), seguido de grau acentuado (33,1%) e leve (29,3%), enquanto que para o grupo ASC-H (n=126) o grau acentuado foi o mais frequente (50,8%), seguido de inflamatório moderado (34,9%) e leve (14,3%). Houve diferenças de significância estatística associando citologia inflamatória acentuada e ASC-H, com p de 0,0001, e inflamatório leve associado ao grupo ASC-US, com p de 0,0003 (Tabela 3).

Excluindo-se os achados microbiológicos não patogênicos, como cocos e lactobacilos, nas 2457 citologias ASC, observou-se a presença de 650 infecções por patógenos do trato genital descritos na microbiologia. Ocorreram em 32% das vezes para ASC-H e em 25,8% para ASC-US, sendo a maior frequência, em ambos, de bacilos supracitoplasmáticos (*Gardnerella/Mobiluncus*), com 77,5% e 75,1%,

respectivamente. Para o grupo ASC-US, seguiu-se em frequência *Candida sp.* (22,1%), *Chlamydia sp.* (1,1%), *Actinomyces sp.* (0,7%), *HSV* (0,5%) e *Trichomonas sp.* (0,5%). Para ASC-H, seguiu-se *Candida sp.* (15%), *Trichomonas sp.* (6,3%) e *Actinomyces sp.* (1,3%). Foi verificada a associação destes patógenos encontrados com os subgrupos ASC e observou-se uma diferença estatística significativa para o patógeno *Trichomonas sp.* isolado para o grupo ASC-H, com p de 0,0010 e um risco relativo de 5,350 com intervalo de confiança de 95% variando de 3,003-9,53. Algumas infecções eram concomitantes (Tabela 4).

Tabela 3. Grau de inflamação em citologias ASC (n=1006).

	ASC-US n (%)	ASC-H n (%)	p	Risco Relativo (IC 95%)
Acentuado	291 (33,1)	64 (50,8)	0,0001	1,536 (1,263-1,868)
Moderado	331(37,6)	44 (34,9)	0,6226	1,015 (0,9673-1,064)
Leve	258 (29,3)	18 (14,3)	0,0003	2,052 (1,322-3,186)
Total	880 (100,0)	126 (100,0)		

Teste exato de Fisher com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95%.

Tabela 4. Presença de patógenos específicos em citologias ASC (n=650).

	ASC-US n (%)	ASC-H n (%)	p
<i>Actinomyces sp.</i>	4 (0,7)	1 (1,3)	0,4826
<i>Candida sp.</i>	126 (22,1)	12 (15,0)	0,1880
<i>Chlamydia sp.</i>	6 (1,1)	0 (0,0)	1,0000
HSV	3 (0,5)	0 (0,0)	1,0000
<i>Trichomonas sp.</i>	3 (0,5)	5 (6,3)	0,0010 ¹
Bacilos supracitoplasmáticos ²	428 (75,1)	62 (77,5)	0,6803
Total	570 (100,0)	80(100,00)	

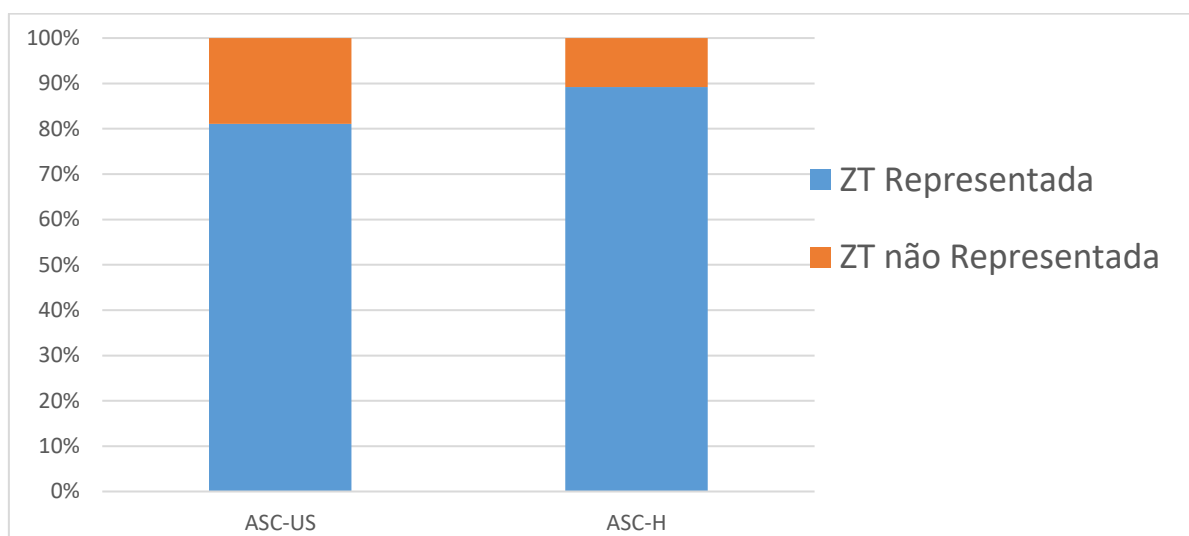
Teste exato de Fisher com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95%.

¹ Risco Relativo (IC 95%) =5,350 (3,003-9,53)

² (Gardnerella/Mobiluncus)

Elementos celulares da zona de transformação (ZT) estavam presentes em 2013 citologias ASC, sendo 1790 (81,1%) em resultados ASC-US e 223 (89,2%) em resultados ASC-H. A presença de ZT mostrou significância estatística para o grupo ASC-H em relação ao grupo ASC-US com p de 0,0022, Risco Relativo de 1,100 e intervalo de confiança (IC 95%) entre 1,049-1,153 (Gráfico 2).

Gráfico 2. Representação da zona de transformação (ZT) em citologias ASC (n=2457).



Teste exato de Fisher com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95%. p= 0,0022

5.4 Critérios Citológicos para Diagnóstico ASC

De 2207 amostras cujos achados sugerem diagnóstico ASC-US, o critério descrito mais frequente foi o aumento de 2,5 a 3 vezes do tamanho do núcleo em relação a uma célula normal, em 78,4% das vezes. Esboço de coilócito foi encontrado em 13,6%, em 7,8% o critério foi quantitativo, em 0,1% foi o achado de paraqueratose atípica e em 0,1% o critério foi o de células em fibra (Tabela 5).

Quando se comparou estes achados citológicos com o desfecho histopatológico de 112 casos que preenchiam os critérios de prevalência, observou-se que um grau histopatológico de LSIL ou inferior era o desfecho do critério núcleo entre 2,5 a 3 vezes o tamanho de uma célula intermediária normal em 77,6% das vezes, em 12,3% para esboço de coilócito, em 9,2% para o critério quantitativo e 1,0% para paraqueratose atípica. Dos desfechos HSIL ou superior, 85,7% foram classificados pelo critério do tamanho nuclear e em 14,3% utilizou-se o critério

quantitativo. Não se observou nenhuma diferença com significância estatística entre os grupos (Tabela 5).

Tabela 5. Critérios citológicos indicativos de diagnóstico ASC-US, frequência (n=2207) e resultado histopatológico (n=112).

	Frequência n (%)	Histopatológico		
		LSIL ou - n (%)	HSIL ou + n (%)	p
Núcleo 2,5-3x	1730 (78,4)	76 (77,6)	12 (85,7)	0,7304
Esboço de Coilocito	301 (13,6)	12 (12,3)	0 (0,0)	0,3563
Quantitativo	173 (7,8)	9 (9,2)	2 (14,3)	0,6264
Paraqueratose Atípica	2 (0,1)	1 (1,0)	0 (0,0)	1,0000
Célula em Fibra	1 (0,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Total	2207 (100,0)	98 (100,0)	14 (100,0)	

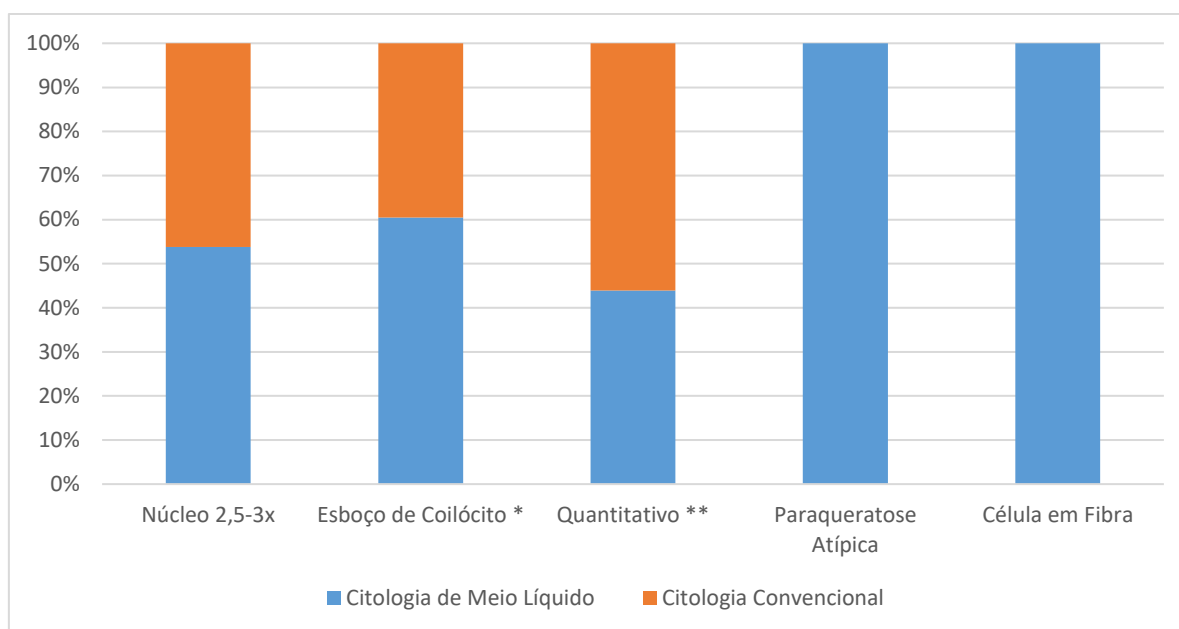
Teste exato de Fisher com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95%.

Quando se associou o método de coleta cervical usado para os achados definidores do diagnóstico ASC-US, observou-se que o critério de núcleo 2,5-3x (53,9%), paraqueratose atípica (100%) e células em fibra (100%) eram mais frequentes para citologia de meio líquido, mas sem diferença estatisticamente significativa entre os dois métodos. Por sua vez, uma maior frequência em citologias de meio líquido do achado de esboço coilocitário (60,5%) apresentou uma diferença estatisticamente significativa para a citologia de base líquida, com p de 0,0185, enquanto que um critério quantitativo (56,1%) para ASC-US foi mais frequentemente reportado em citologias convencionais, com p de 0,0071 (gráfico 3).

Achados citológicos de algumas alterações proliferativas benignas, reparativas ou reativas associadas a atipias foram descritos para os dois grupos. Estes achados foram, algumas vezes, simultâneos. A maior frequência encontrada foi de binucleação para os dois grupos (76,8% para ASC-US e 36% para ASC-H), seguida de placa de queratina (29,7% para ASC-US e 8,4% para ASC-H) e Células Gigantes (28,6% para ASC-US e 7,2% para ASC-H). Para ASC-US seguiram-se em frequência as paraqueratoses (18,9%), pérola córnea (6,8%), hiperqueratoses (1,6%), *Polka Dot Cells* (0,3%) e *Ballon Cells* (0,1%), enquanto que para ASC-H

seguiram-se em frequência as paraqueratoses (4%), pérola córnea (2%) e *Ballon Cells* (0,1%) (Tabela 6).

Gráfico 3. Distribuição de achados citológicos definidores de ASC-US pelos métodos citológicos utilizados para coleta em citologias ASC (n=2207).



Teste do Qui Quadrado com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95%.

* p de 0,0185. ** p de 0,0071.

Tabela 6. Achados citológicos associados, mas não definidores de atipias em citologias ASC (n=2457).

	ASC-US n (%)	ASC-H n (%)	p	Risco Relativo (IC 95%)
Paraqueratose	418 (18,9)	10 (4,0)	< 0,0001	4,735 (2,564-8,745)
Hiperqueratose	35 (1,6)	0 (0,0)	0,0449	
Pérola Córnea	151 (6,8)	5 (2,0)	0,0029	3,421 (1,417-8,260)
Placa de Queratina	656 (29,7)	21 (8,4)	< 0,0001	3,539 (2,338-5,356)
<i>Polka Dot Cell</i>	6 (0,3)	0 (0,0)	0,4091	
Celulas Gigantes	632 (28,6)	18 (7,2)	< 0,0001	3,977 (2,536-6,237)
<i>Balloon Cell</i>	3 (0,1)	1 (0,4)	0,3263	2,466 (0,4496-13,52)
Binucleação	1695 (76,8)	90 (36,0)	< 0,0001	2,133 (1,805-2,521)
Total	2207 (100,0)	250 (100,0)		

Teste do Qui Quadrado com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança (IC) de 95%.

As reações de superfície como paraqueratose ($p < 0,0001$), hiperqueratose ($p = 0,0449$), pérola córnea ($0,0029$) e placa de queratina ($p < 0,0001$) eram significativamente mais frequentes em ASC-US, bem como a formação de células gigantes ($p < 0,0001$) e a binucleação ($p < 0,0001$). Para os demais achados não houve diferença com significância estatística.

Quando se comparou estes mesmos achados pela técnica de coleta de material, observou-se que a citologia de base líquida obteve maior frequência com diferença estatisticamente significativa para binucleação, placa de queratina e pérola córnea, todos com $p < 0,0001$, enquanto que a citologia convencional mostrou maior frequência com diferença estatisticamente significativa para as paraqueratoses ($p = 0,0287$) e células gigantes ($p = 0,0005$). Para os demais achados as diferenças não mostraram significância estatística (tabela 7).

Tabela 7. Comparação de achados citológicos associados à atipias por métodos de coleta em citologias ASC (n=2457).

	Citologia Base Líquida n (%)	Citologia Convencional n (%)	p	Risco Relativo (IC 95%)
Paraqueratose	214 (15,9)	214 (19,3)	0,0287	1,131 (1,017-1,258)
Hiperqueratose	21 (1,6)	14 (1,3)	0,0651	1,097 (0,8347-1,441)
Pérola Córnea	132 (9,8)	24 (2,2)	< 0,0001	1,604 (1,484-1,733)
Placa de Queratina	508 (37,7)	169 (15,2)	< 0,0001	1,594 (1,493-1,702)
<i>Polka Dot Cell</i>	5 (0,4)	1 (0,1)	0,3191	1,523 (1,063-2,183)
Celulas Gigantes	318 (23,6)	332 (29,9)	0,0005	1,185 (1,081-1,299)
<i>Balloon Cell</i>	3 (0,2)	1 (0,1)	0,7563	1,370 (0,7770-2,415)
Binucleação	1021 (75,9)	764 (68,8)	< 0,0001	1,183 (1,083-1,291)
Total	1346 (100,0)	1111 (100,0)		

Teste do Qui Quadrado com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95%.

Comparando estes mesmos achados citológicos com o desfecho histopatológico de LSIL ou inferior e HSIL ou superior, observou-se que existe uma diferença significativa presente em achados de citologias ASC para binucleação (p

= 0,0047), que se associa com menor grau de lesão histológica. A hiperqueratose se associou com um maior grau de lesão histológica (Tabela 8).

Tabela 8. Achados citológicos associados à atípias em citologias ASC comparadas com histopatológico prevalente (n=137).

	LSIL ou -	HSIL ou +	
	n (%)	n (%)	p
Paraqueratose	25 (22,7)	5 (18,5)	0,7970
Hiperqueratose	2 (1,8)	3 (11,1)	0,0439
Pérola Córnea	4(3,6)	1 (3,7)	1,0000
Placa de Queratina	29 (26,4)	4 (14,8)	0,3147
Celulas Gigantes	29 (26,4)	4 (14,8)	0,3147
Binucleação	82 (74,5)	12 (44,4)	0,0047
Total	110 (100,00)	27 (100,0)	

Teste exato de Fisher com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95%.

5.5 Biologia Molecular

Por ocasião da execução do exame citológico, para algumas pacientes, testes indicativos da presença de HPV de alto risco foram solicitados e constavam do banco de dados. Estes testes haviam sido realizados por Captura Híbrida ou PCR em tempo real.

Em 71 pacientes, houve a realização de genotipagem por PCR em tempo real em até um mês da coleta citológica, com positividade de 56,3% em ASC-US (n=64) e 71,4% em ASC-H (n=7). Não se constatou diferença estatisticamente significativa de positividade para um dos grupos ASC (Tabela 9).

O resultado de PCR (Cobas®) foi positivo em exames realizado em até um mês da citologia ASC em 41 oportunidades. Para o grupo ASC-US (n=36) o genótipo mais encontrado foi o AR (12 outros genótipos HPV de alto risco) em 58,3% das vezes e em 25% ele estava associado ao HPV 16 e em 2,8% associado ao tipo 18. Os HPV 16 (11,1%) e 18 (2,8%) isoladamente eram menos frequentes. Para o grupo ASC-H o genótipo AR foi encontrado em 80% isoladamente, e em 20%

associado ao HPV 16. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

Tabela 9. Positividade de HPV de alto risco por PCR (n=71) e por HC2 (n=214), prevalentes em citologias ASC.

Teste	Resultado	ASC-US n (%)	ASC-H n (%)	p	Risco Relativo (IC 95%)
PCR	Negativo	28 (43,8)	2 (28,6)	0,6908	1,063 (0,9159-1,234)
	Positivo	36 (56,3)	5 (71,4)		
	Total	64 (100,0)	7 (100,0)		
HC2	Negativo	62 (32,5)	7 (30,4)	1,0000	11,088 (0,5653-2,102)
	Positivo	129 (67,5)	16 (69,6)		
	Total	191 (100,0)	23 (100,0)		

Teste exato de Fisher com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança (IC) de 95%.

Em 214 citologias ASC, foi procedido um exame de captura híbrida para HPV, concomitantemente ou em até um mês da coleta da citologia. A positividade para o grupo ASC-US foi de 67,5% enquanto para o grupo ASC-H a positividade foi de 69,6%. Não há diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ASC-US e ASC-H quanto ao resultado da captura híbrida (Tabela 9).

Foi realizado a contagem da carga viral média das capturas híbridas para HPV de alto risco e as médias separadas por tipo de ASC. Para o grupo ASC-US a carga viral média foi de 173,4 e desvio padrão de 344,1, enquanto a média para o grupo ASC-H foi de 64,0, com desvio padrão de 77,1. O teste de Shapiro-Wilk mostrou que os dados não seguiam uma distribuição normal e por isso foi comparada as medianas dos dois grupos pelo teste de Mann-Whitney. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com p de 0,7274.

Foi realizada uma comparação entre a carga viral das capturas híbridas para HPV de alto risco e o desfecho histopatológico para as citologias ASC para verificar se a carga viral pode predizer um desfecho mais grave, nestes casos. Dez testes de HPV foram negativos com nove desfechos normais e um LSIL. Foi possível associar 24 biópsias LSIL ou inferior, com a média da carga viral de 276,4 e DP de

670,0. Nove biópsias com desfecho HSIL ou superior, tiveram carga viral média de 158,0 e DP de 354,0. Um teste prévio de Shapiro-Wilk mostrou que os dados não eram paramétricos e as medianas dos dois grupos foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. Na amostra estudada de citologias ASC, a carga viral não se associou com o desfecho histopatológico ($p=0,7763$).

Com base em estudos anteriores tentou-se verificar se um ponto de corte maior de carga viral poderia se associar com uma prevalência histopatológica de maior grau de lesão. Usou-se como parâmetro uma carga viral de 10 RLU e não se observou diferença estatisticamente significativa entre normalidade, LSIL e HSIL, com p de 0,6120.

Buscou-se estudar associação entre positividade de um teste de DNA-HPV e desfecho histopatológico prevalente, em citologias ASC. De 40 biópsias precedidas de teste para HPV de alto risco, 34 foram positivas, sendo 20 para LSIL ou inferior (76,9%) e 14 para HSIL ou superior (100%), e seis negativas, todas para LSIL ou inferior. Este achado não mostrou diferença estatisticamente significativa entre positividade de HPV de alto risco e grau histopatológico (Tabela 10).

Tabela 10. Associação entre positividade para HPV de alto risco e histopatológico, em citologias ASC (n=40).

	LSIL ou - n (%)	HSIL ou + n (%)	p
Positivo	20 (76,9)	14 (100,0)	0,0743
Negativo	6 (23,1)	0 (0,0)	
Total	26 (100,0)	14 (100,0)	

Teste exato de Fisher com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança (IC) de 95%.

Quando separamos apenas o grupo ASC-US por positividade do HPV na captura híbrida e PCR e comparando com a microbiologia observou-se que havia concomitância de teste de HPV positivo e algum agente microbiológico patogênico ou predominante na flora em 165 registros. Excluindo os micro-organismos não patogênicos, cuja associação com positividade ocorreu em 70,9% dos registros de microbiologia, a positividade do HPV de alto risco foi mais frequente para bacilos supracitoplasmáticos (20,6%), seguidos de *Candida sp.* (7,3%), *Chlamydia sp.* (0,6%) e HSV (0,6%). Em 16,0% dos exames HPV negativos, foi encontrado bacilos

supracitoplasmáticos; os demais estavam associados à microbiota não-patogênica. Não se encontrou registros para *Trichomonas sp.* Houve diferença estatisticamente significativa para uma associação entre positividade de um teste de HPV de alto risco e o diagnóstico citológico de *Candida sp.* e teste negativo com microbiota não patogênica (Tabela 11).

Tabela 11. Associação entre positividade em teste de HPV de alto risco e microbiota em citologias ASC-US (n=259)

	HPV positivo n (%)	HPV negativo n (%)	p*	RR (IC 95%)
Bacilos supracitoplasmáticos	34 (20,6)	15 (16,0)	0,4116	1,112 (0,8984-1,377)
<i>Candida sp.</i>	12 (7,3)	0 (0,0)	0,0048	1,614 (1,464-1,780)
<i>Chlamydia sp.</i>	1 (0,6)	0 (0,0)	1,0000	1,573 (1,434-1,725)
HSV	1 (0,6)	0 (0,0)	1,0000	1,573 (1,434-1,725)
Microrganismos não patogênicos	117 (70,9)	79 (84,0)	0,0234	1,693 (1,054-2,718)
Total	165 (100,0)	94 (100,0)		

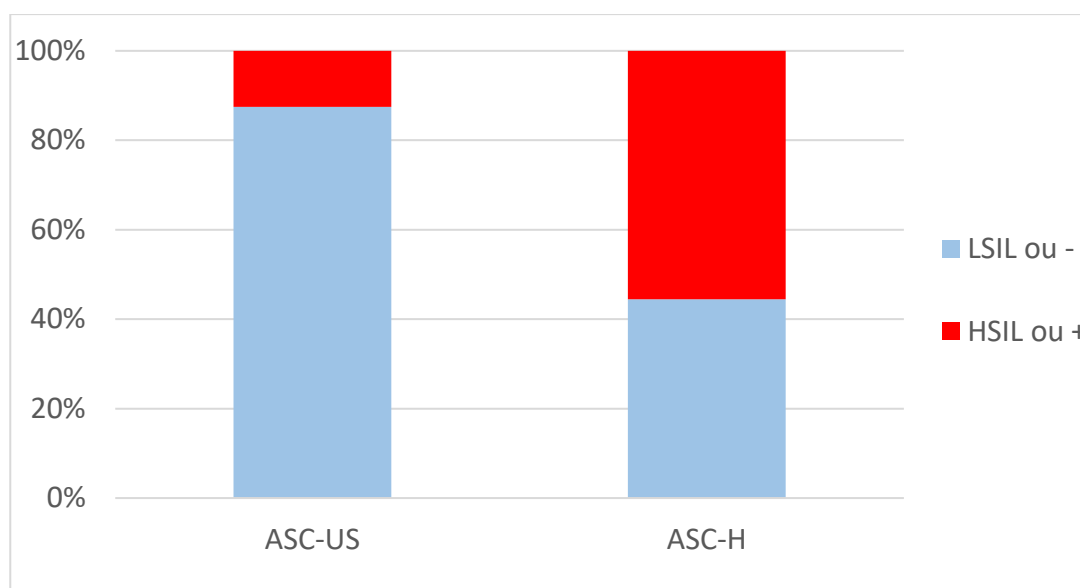
Teste exato de Fisher com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança (IC) de 95%.

5.6 Histopatológico

Das 2457 pacientes que obtiveram resultado citológico ASC, 139 possuíam registro de resultado histopatológico concomitante ou realizada até 6 meses após a coleta da citologia ASC. Dos resultados ASC-US, 98 (87,5%) eram LSIL ou inferior, enquanto 14 (12,5%) eram HSIL ou superior. Para ASC-H, enquanto 14 (44,4%) eram LSIL ou inferior prevalente, 15 (55,6%) eram HSIL ou superior.

Obteve-se uma diferença estatisticamente significativa que aponta uma predominância de ASC-US para resultados histopatológicos LSIL ou menos, enquanto há maior predominância de ASC-H naqueles histopatológicos cujo resultado foram HSIL ou superior, com um p menor que 0,0001 e uma Risco Relativo de 1,845 e intervalo de confiança de 95% variando de 1,259-2,705 (Gráfico 4).

Gráfico 4. Resultado citológico ASC e prevalência histopatológica (n=139).



Teste exato de Fisher com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95% (IC 95%). $p < 0,0001$; Risco Relativo de 1,845 e IC 95% (1,259-2,705).

5.7 Evolução

Para o grupo ASC-US, dentre 2207 citologias, 948 não havia nenhum resultado de exame de evolução, no banco de dados, para avaliar qual conduta o médico assistente tomou diante de uma citologia ASC-US. Como se colheu dados de 01.01.2010 a 01.08.2016, não é razoável se esperar que exames colhidos na base do último ano contassem com algum registro de seguimento. Com bases nas Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero, do Instituto Nacional de Câncer de 2011, excluiu-se os registros de pacientes cujo resultado ASC-US tenha sido colhido até 6 meses da data limite da pesquisa para aquelas com 30 anos ou mais e de 12 meses, para aquelas com menos de 30 anos. Assim, excluiu-se 209 registros nestas condições, obtendo-se um total de 1998 pacientes com seguimento de um ASC-US avaliável e destas 739 (37,0%) possuíam registros que não informavam nenhuma conduta de seguimento.

Para avaliar a evolução de citológicos ASC-H, que demanda colposcopia de acordo com as diretrizes nacionais, excluiu-se os registros colhidos até 6 meses da data limite da consulta do banco de dados. Assim 8 registros foram excluídos de um total de 250. Desta forma, não houve nenhum seguimento para ASC-H em 98 de 242 registros (40,5%).

Das amostras que dispunham de seguimento, a repetição citológica foi a conduta mais frequente para o grupo ASC-US (66,7%), com uma média, em meses, entre os exames de 13,5 (DP = 10,95), variando de 1 a 72 meses. A citologia também foi a evolução mais frequente do ASC-H, com 85 registros (59,0%). Em seguida, o teste do HPV isolado, com frequência respectiva de 16,0% e 19,4%. Apenas a biópsia isolada mostrou diferença com significância estatística entre os grupos com 11,8% registros de ASC-H e valor p de 0,0112.

Para o grupo ASC-US, do total de 973 pacientes seguidas por citologia, 856 foram normais (88,0%), 50 permaneceram ASC-US (5,1%) e 57 (5,9%) apresentaram diagnóstico citológico de LSIL. Seguiu-se ainda, para este grupo, 0,5% de HSIL, 0,3% de AGC e 0,2% de ASC-H. Para o grupo ASC-H de 98 citologias, 75 (76,2%) foram normais, 4 (4,1%) foram ASC-US, 3 (3,1%) permaneceram ASC-H, em 2 (2,5%) mostrou-se AGC, 5 (5,1%) apresentaram LSIL e 9 (9,2%) foram HSIL. Um seguimento citológico normal para o grupo ASC-US é significativamente mais frequente do que para o grupo ASC-H ($p = 0,0026$). Foram significativamente mais frequentes no grupo ASC-H que citologias permanecessem ASC-H ($p = 0,0065$) ou evoluíssem para HSIL ($p < 0,0001$), sendo esta muito significativa (Tabela 12).

Tabela 12. Resultados das citologias subsequentes a um resultado ASC como seguimento escolhido pelo médico assistente (n=1071).

Resultado Citológico	ASC-US n (%)	ASC-H n (%)	p*	Risco Relativo (IC 95%)
Normal	856 (88,0)	75 (76,5)	0,0026	1,100 (1,020 -1,187)
ASC-US	50 (5,1)	4 (4,1)	0,8110	1,020 (0,9437-1,103)
ASC-H	2 (0,2)	3 (3,1)	0,0065	6,733 (3,209-14,13)
AGC	3 (0,3)	2 (2,0)	0,0690	4,442(1,492-13,22)
LSIL	57 (5,8)	5 (5,1)	1,0000	1,013 (0,9383-1,093)
HSIL	5 (0,5)	9 (9,2)	<0,0001	7,635 (4,926-11,83)
Total	973 (100,0)	98 (100,0)		

Teste exato de Fisher com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95% (IC 95%).

Das 148 biópsias encontradas e realizadas como seguimento de uma citologia ASC-US, observou-se um predomínio de resultados normais (65,5%) e LSIL (22,3%), sendo aquele bastante mais significativo do que no grupo ASC-H, com p de 0,0017. Encontrou-se ainda 18 (12,2%) registros de HSIL como seguimento destas citologias.

Ao todo, 34 pacientes realizaram biópsia como seguimento pós-citologia ASC-H e em metade dos casos o histopatológico mostrou HSIL ou superior, sendo 44,1% para HSIL e 5,9% de câncer escamoso invasivo. Contou-se ainda 35,4% de resultados normais e 14,7% de resultados LSIL. O achado histopatológico HSIL e carcinoma invasivo mostrou-se significativamente mais frequente para o grupo ASC-H com seus respectivos p de menor que 0,0001 e 0,0341 (Tabela 13).

Tabela 13. Resultado histopatológico como seguimento de citologia ASC anterior (n=182).

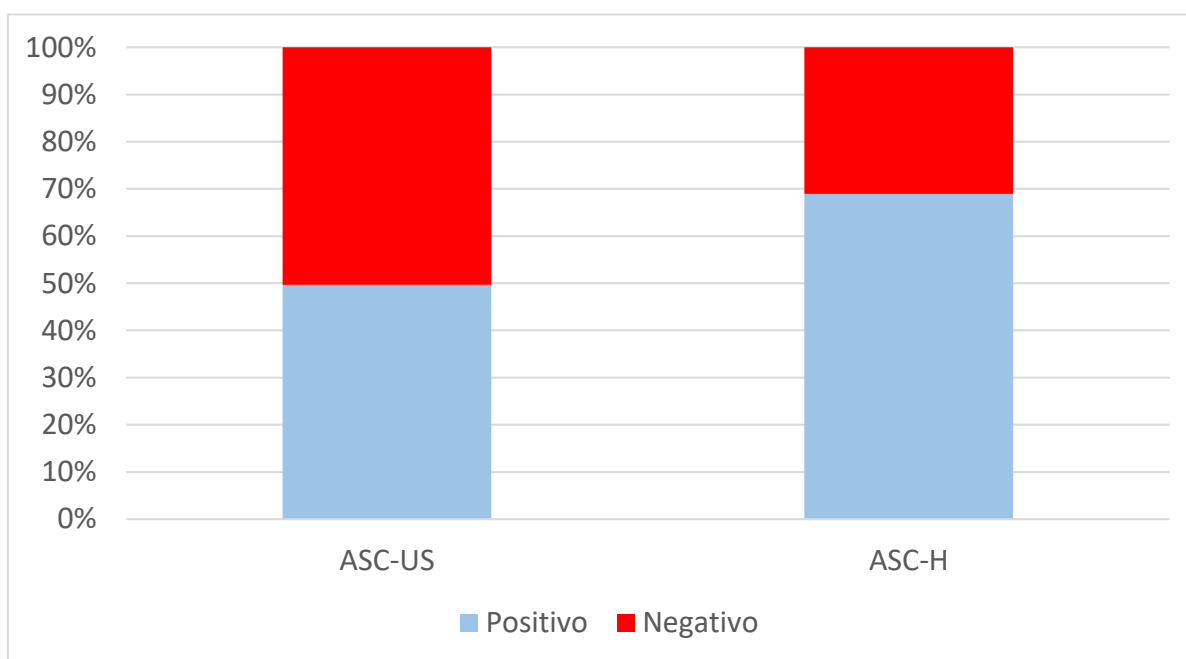
Histopatológico	ASC-US n (%)	ASC-H n (%)	p	Risco Relativo (IC 95%)
Normal	97(65,5)	12(35,3)	0,0017	1,274 (1,081-1,502)
LSIL	33 (22,3)	5 (14,7)	0,4825	1,087 (0,9373-1,262)
HSIL	18 (12,1)	15 (44,1)	<0,0001	3,565 (2,031-6,255)
Câncer Invasivo	0 (0,0)	2 (5,9)	0,0341	5,625 (4,108-7,702)
Total	148 (100,0)	34 (100,0)		

Teste exato de Fisher com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95% (IC 95%).

Do total, 441 citologias ASC-US apresentaram um teste biomolecular (Captura Híbrida ou PCR de Cobas®) para o HPV de alto risco como exame de seguimento e 219 (49,7%) tinham HPV de alto risco positivo. Das 58 citologias ASC-H que possuíam seguimento de um teste molecular de HPV de alto risco (Captura Híbrida ou PCR de Cobas®), em 69,0% destas o teste era positivo. A positividade para um tipo de HPV de alto risco mostrou-se superior de forma significativa para o grupo ASC-H, com p de 0,0075 e risco relativo de 2,059, com intervalo de confiança de 95% variando de 1,215-3,491 (Gráfico 5).

Por fim, estudou-se o intervalo de tempo em que um teste de HPV de alto risco positivo em citologias ASC prévias tornava-se negativa, com o fito de se estimar o tempo de depuração de uma infecção por HPV de alto risco na amostra. Foram encontrados 43 testes negativos de Captura Híbrida e sete de PCR negativos, após um teste HPV-DNA positivo prévio, nestas amostras. Com isso, foi possível identificar que o tempo médio de negatificação de um teste de HPV foi de 14,8 meses (DP = 8,4), quando se agregou os dois testes. Para Captura Híbrida a média foi de 15,6 meses (DP = 9,3), enquanto que o tempo médio para o PCR foi de 14,6 meses (DP = 8,3).

Gráfico 5. Resultados agregados de testes de DNA-HPV de alto risco (HC2 e PCR) como seguimento de citologia ASC anterior (n=499).



Teste exato de Fisher com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95% (IC 95%). $p=0,0075$. Risco Relativo=2,059 (1,215-3,491). HC2=Captura Híbrida. PCR=Reação de Cadeia da Polimerase (em tempo real).

6 DISCUSSÃO

Este estudo incluiu 2457 citologias, sendo 2207 citologias classificadas como ASC-US e 250 citologias classificadas como ASC-H. A proporção ASC-US/ASC-H foi de 9 para 1, muito próxima a recomendada pelo TBS para avaliar padrão de qualidade laboratorial (AGUIAR *et al.*, 2011). Esta proporção é similar a apontada por Fernandes *et al.* (2012) em pesquisa com dados nacionais do INCA de 2007 a 2010. Por outro lado, Lertvutivivat *et al.* (2016) encontrou uma frequência maior de ASC-H, com uma relação de 6 para 1 em sua pesquisa.

A idade média das pacientes do estudo com citologia ASC-US foi de 33,1 anos (DP de 11,3) com uma variação de 14 a 85 anos. Para o grupo ASC-H a idade média foi de 37,1 anos (DP de 12,9) e intervalos variando de 17 a 82 anos. Esse dado mostra que estes achados podem ocorrer em qualquer faixa etária. López-Alegría *et al.* (2015) reportou semelhante variação de idade em sua pesquisa, assim como Pity, Shamdeen e Wais (2012), ambos, porém, com uma média de idade um pouco superior. Dados de estudo nacional de Discacciati, Barboza e Zeferino (2014) apontam que citologias ASC-US são mais diagnosticadas em faixas de idade um pouco menores do que as observadas para ASC-H.

A média de parturições para o grupo ASC-US de 1,2 (DP de 1,8) ficou abaixo da média para o grupo ASC-H de 2,1 (DP de 2,4) e isso pode ser explicado, em parte, pela menor média de idade daquele grupo, mas, sobretudo, uma maior paridade está associada a uma maior incidência de lesões intraepiteliais (SCHIFFMAN, 2016), por sua vez mais esperadas no grupo ASC-H. Tafurt-Cardona *et al.* (2012) reportou em sua pesquisa que anormalidades citológicas são significativamente mais presentes nas múltiparas.

A contracepção hormonal foi aventada como fator de risco para câncer cervical e suas lesões precursoras (HUSAIN; RAMAKRISHNAN, 2015). Nesta pesquisa, ela preponderou nos dois grupos em proporção algo superior a dois terços. Barcelos *et al.* (2012) em pesquisa com pacientes do triângulo mineiro encontrou, para o grupo ASC-US, um predomínio de ligadura tubária, seguido de métodos hormonais. Torres-Ibarra *et al.* (2016), em um amplo estudo no México observou predomínio de DIU. De fato, a opção por método contraceptivo segue fatores culturais e o viés de seleção de pacientes de clínica particular desta pesquisa pode explicar porque este dado não se reproduz em outros estudos, mesmo em trabalho

nacional. Nenhum método, contudo, foi mais frequente de forma significativa nos grupos do estudo.

No tocante ao uso de medicamentos, as informações colhidas são poucas, com relato de uso de medicamentos em 16 registros de ASC-US e dois de ASC-H. Para o tamanho da amostra selecionada esta variável provavelmente conta com um sub-registro importante, o que dificulta a análise destes dados imprescindíveis, pois alguns medicamentos são capazes de interferir com a flora vaginal e o padrão citológico (BRASIL, 2012).

A rotina de exames de prevenção foi o principal motivo de realização da citologia para mais da metade (655 pacientes) das 1143 pacientes da amostra cujos registros continham o motivo principal do exame, um terço por apresentarem algum sintoma físico (368 pacientes) e pouco mais de 10% o realizando devido a algum seguimento de exame alterado ou procedimento anterior (120 pacientes), revelando bastante similitude de proporções entre os grupos estudados.

Dos registros de pacientes em que constavam sintomas como motivo, o corrimento era mais frequente em mais da metade, em ambos os grupos. Corrimento vaginal decorrente de vulvovaginites, figura entre os principais fatores de confusão para o diagnóstico das atipias celulares (SILVA *et al.*, 2013). Bukhari *et al.* (2010) também encontrou descarga vaginal como principal sintoma em sua amostra. Nenhum sintoma, como motivo da citologia, mostrou diferença significativa que permita correlacioná-los a um dos grupos ASC.

Para os registros com indicação de que o presente exame era seguimento de diagnóstico ou procedimento anterior, também não foi possível obter alguma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ASC, se destacando o seguimento pós diagnóstico de LSIL para ambos os grupos. Todavia isso tem significados clínicos diferentes, pois para o grupo ASC-US o seguimento sugeriu uma regressão da gravidade, enquanto no grupo ASC-H, sugere-se o oposto.

Em 1010 citologias pôde-se obter a descrição de achados do exame ginecológico e/ou colposcopia no momento da coleta. A inspeção sob visão colposcópica ou não do colo uterino mostrou normalidade em mais de dois terços das vezes, sendo um pouco mais frequente no grupo ASC-H, mas sem significância. As duas únicas oportunidades de diferença estatística significativa obtidas na análise dos dados pré-exame são a descrição de Zona de Transformação Atípica, significativa para o subgrupo ASC-US e a descrição de ulceração em relação ao

subgrupo ASC-H, mas não foram encontrados dados na literatura que corroborem ou refutem esses achados.

Este estudo pôde comparar a frequência de achados citológicos ASC com o método utilizado de coleta. Citologia de base líquida (LBC) propiciou uma maior frequência de diagnóstico ASC-H de forma significativa em relação ao grupo ASC-US, com p de 0,0265. A literatura mostra divergência de resultados, porém a maioria dos trabalhos demonstram que uma citologia de base líquida melhora a detecção de ASC-US em relação à citologia convencional (TANABODEE *et al.*, 2015; MORAIS *et al.*, 2011). Lee *et al.* (2012) destaca que poucos estudos tem se debruçado sobre o assunto e que as metaplasias escamosas atípicas associadas a ASC-H eram mais frequentemente visualizadas em LBC, aparecendo como negativas nas citologias convencionais.

A análise dos dados descritivos das citologias que diagnosticaram ASC, contudo foi mais rico de diferenças. De 2447 descrições de quadros citológicos gerais, a inflamação preponderava em torno de 90% para ambos os grupos. Os quadros hipo e atróficos eram mais significantes para o grupo ASC-H, enquanto um quadro associado a vaginose era mais significativamente frequente no grupo ASC-US.

Dissecando as citologias descritas como inflamatórias, observou-se que os processos inflamatórios acentuados são bem mais significativos para o grupo ASC-H, enquanto os inflamatórios leves o são para o grupo ASC-US. Estes dados sugerem que a graduação do processo inflamatório para atípicas podem servir de auxílio diagnóstico, em casos duvidosos. Em sua pesquisa, Duarte, Romero e Schmalbach (2004) discordaram da abordagem excludente da classificação de Bethesda no tocante ao componente inflamatório e sua gradação nas citologias ao apresentar dados que em metade das citologias inflamatórias de grau acentuado havia lesão intraepitelial histopatológica.

A representação de elementos celulares da zona de transformação, na citologia, diz respeito à avaliação da qualidade da coleta (PINHO-FRANÇA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2013). Amaral *et al.* (2008) enfatiza que a frequência de diagnóstico de ASC-H e HSIL era de três a quatro vezes maiores quando a adequabilidade da amostra foi considerada satisfatória para análise quando comparada aos esfregaços com adequabilidade prejudicada. A frequência de

diagnóstico de ASC-US e LSIL, por sua vez, era 1,6 vezes maior quando havia adequabilidade.

O presente estudo encontrou índices de representatividade de ZT em 80% para ASC-US e quase 90% para ASC-H. Tanabodee *et al.* (2015), em um estudo para comparar métodos citológicos encontrou representatividade na quase totalidade dos casos. Pinho-França *et al.* (2016) em estudo transversal para avaliar anormalidades citológicas cervicais e índice de desenvolvimento humano de municípios, obteve representação média da ZT em menos de 60% das amostras. Embora na ampla maioria das vezes a sua representação era encontrada em ambos os grupos, houve uma significância estatística para o grupo ASC-H. Essa diferença não pode ser explicada biologicamente, mas devido a um possível viés da coleta por se tratar de casos clinicamente mais graves ou crônicos ou em idades mais propensas ao diagnóstico de câncer cervical, já que a média de idade das pacientes com representação para ASC-H foi quatro anos superior ao do outro grupo (35,9 contra 31,9 anos, respectivamente).

Ainda dentro do diagnóstico citológico descritivo, estudou-se a associação da microbiota patogênica genital com as atipias escamosas. Processos infecciosos podem mascarar atipias celulares (SILVA *et al.*, 2013). Uma microbiota com a presença de bacilos supracitoplasmáticos foi descrita em mais de 75% das vezes em que houve registro de patógenos, nos dois grupos. Tafurt-Cardona *et al.* (2012), em citologias inflamatórias, também encontrou uma predominância de vaginose bacteriana em seu estudo.

Apenas o achado de infecção por *Trichomonas sp.* mostrou diferença com significância estatística para o grupo ASC-H. Donders *et al.* (2013) comparando outras anormalidades encontrou associação estatisticamente significativa entre *Trichomonas vaginalis* em ASC-US e HSIL, mas não para ASC-H. No presente estudo não foi encontrada associação de *Candida sp.*, mas Nasser *et al.* (2011) descreveu, em seu trabalho, uma predominância deste patógeno em citologias ASC-US.

A infecção pelo HPV promove uma série de alterações citomorfológicas, citoplasmáticas e nucleares que podem ser encontradas em citologias e que denunciam a sua presença (LHEE *et al.*, 2014). A coilocitose e a disceratose são patognomônicos de infecção pelo HPV, mas diferentes estudos apontam que a

inclusão de sinais citomorfológicos alternativos aumenta a sensibilidade da citologia para a detecção do HPV (ETCHEBEHERE *et al.*, 2016).

O critério citológico descrito mais frequente para o diagnóstico ASC-US foi o critério clássico de aumento do tamanho do núcleo de 2,5 a 3 vezes em relação a uma célula normal, em 78,4% das vezes, seguido por esboço de coilócito (13,6%) e pelo critério quantitativo (7,8%). Isto indica que em mais de 20% destes diagnósticos foi usado um critério alternativo àquele proposto pelo Sistema de Bethesda (TBS).

Esboço de coilócito é um achado citológico que sugere, mas não define infecção pelo HPV, pois outras condições inflamatórias propiciam este achado como candidíase (NIJHAWAN *et al.*, 2010) e estudos tem demonstrado que sua presença está associada com alguns genótipos HPV específicos (CHOI *et al.*, 2011).

Paraqueratose atípica, embora um critério tradicional descrito pelo TBS para ASC-US, é um achado bastante infrequente e isto foi o observado neste trabalho, com apenas dois casos encontrados em 2207 amostras. Ele é considerado uma disqueratose leve, podendo representar ASC-US ou lesão intraepitelial escamosa (BRASIL, 2012).

O método de coleta cervical usado foi comparado para verificar associação com os critérios que definiram o diagnóstico ASC-US, posto que alguns estudos têm demonstrado que a citologia de base líquida aumenta o diagnóstico de ASC-US (LEE *et al.*, 2012). O achado mais frequente do tamanho nuclear aumentado em 2,5 a 3 vezes o tamanho esperado para o núcleo de uma célula normal foi mais evidenciado proporcionalmente em uma citologia de base líquida, mas não apresentou diferença estatisticamente significativa. Todavia, um diagnóstico baseado em esboço coilocitário apresentou diferença estatisticamente significativa para a citologia de base líquida, enquanto que um critério quantitativo para ASC-US foi mais frequente de forma significativa em citologias convencionais. Nenhum estudo da literatura apresenta este tipo de associação para efeito de comparação.

Comparando-se estes critérios citológicos alternativos para ASC-US com o resultado de biópsias de 112 casos, não se observou associação com diferença estatisticamente significativa para um maior grau histopatológico subjacente. Também não foram encontrados dados na literatura para comparação.

A descrição de alguns achados que não são critérios diagnósticos, mas que compõem o grupo de alterações histológicas e celulares normalmente benignas,

reparativas e reativas, comumente encontrados em esfregaços e muitas vezes associadas a uma infecção por HPV foram estudados para os subgrupos ASC.

Binucleação é um forte indicativo, mas não definidor de infecção pelo HPV (CORTÉS-GUTIERRÉS *et al.*, 2010) e foi o achado mais frequente para ambos os grupos, presente em 75% das citologias ASC-US, valor próximo à positividade por HPV de alto risco encontrado, como se verá adiante. Bukhari *et al.* (2010) encontrou Células Gigantes em 50% de citologias diagnósticas para HPV, mas não as observava em citologias normais.

Estes achados estavam frequentemente mais abundantes no grupo ASC-US, mostrando a maior riqueza celular deste grupo. Etchebehere *et al.* (2016) encontrou em sua pesquisa que achados citomorfológicos suspeitos de infecção pelo HPV eram significativamente mascarados pela presença de inflamação de grau moderado e acentuado e, conforme os dados encontrados no presente estudo, 91% das citologias ASC-H eram inflamatórias e 85% delas eram moderadas ou acentuadas.

Achados de paraqueratose, placa de queratina, células gigantes e binucleação foram sobejamente mais frequentes no grupo ASC-US, com diferença estatística muito significativa em relação ao outro grupo. Também significativa foram as diferenças de maior frequência para ASC-US em hiperqueratose e pérola córnea.

Quando se comparou estes achados citomorfológicos secundários às atipias e/ou sugestivos de infecção pelo HPV com o método citológico escolhido, observou-se que os achados de placa de queratina, binucleação e pérola córnea eram mais frequentemente visualizados por citologia de base líquida com diferença estatisticamente significativa para a citologia convencional, enquanto esta mostrou maior frequência com diferença estatisticamente significativa para as paraqueratoses e células gigantes. Mais uma vez, devido ao ineditismo desta comparação, não foi encontrado paralelo com outros estudos para fomento da discussão.

Ao verificar se algum destes achados estaria correlacionado com um resultado de maior ou menor grau histopatológico, o estudo mostrou que o achado de binucleação era mais significativo em resultados LSIL ou menos, enquanto a hiperqueratose mostrou maior frequência estatisticamente significativa para a prevalência de um resultado histopatológico mais grave.

As alterações de superfície, como a hiperqueratose e a paraqueratose, são respostas de defesa do epitélio exposto cronicamente a efeitos irritativos ou

infeciosos, como a infecção pelo HPV. A literatura tem falhado em apontar se estas lesões possuem relação com lesões intraepiteliais de alto grau, com resultados díspares, mas trabalhos tem demonstrado uma associação significativa com lesões de baixo grau e efeito citopático pelo HPV (XIAO; EMANUEL, 2009).

Constavam do banco de dados, citologias ASC com teste biomolecular de DNA-HPV de alto risco realizados pelos métodos de PCR Cobas® (n= 71) e Captura Híbrida (n=214). Somando os dois testes, a positividade para ASC-US foi de 64,71% e para ASC-H foi de 70%. Não há diferença significativa entre os grupos, tanto conjuntamente, como para os testes em separado. Saslow *et al.* (2012) publicou que a detecção biomolecular de DNA para HPV em citologias ASC-US levava a um diagnóstico histológico posterior de HSIL em 15-17% dos casos, sendo um ótimo método de rastreio.

Este dado mostra um índice de positividade para ASC-US no limite superior ao encontrado na literatura. Watson *et al.* (2015) analisou o seguimento de 45.049 citologias ASC-US e reportou 42% de positividade de detecção do HPV de alto risco, frequência muito próxima à metanálise de Arbyn *et al.* reportada em 2009, enquanto o estudo ALTS reportou uma taxa um pouco superior a 50% (VEIJALAINEN *et al.*, 2015).

Para citologias com resultado ASC-H, o estudo ALTS reportou uma taxa de positividade de HPV de 84% (XU *et al.*, 2016). Srodon, Parry e Ronnett (2006) reportaram positividade para o DNA-HPV presente em 67% das mulheres com ASC-H e em 45% das mulheres com ASC-US.

Os tipos de HPV 16 e 18 são responsáveis por algo em torno de 70% dos casos de câncer cervical (WILSON *et al.*, 2013). As infecções por estes tipos virais também são mais persistentes, sendo o HPV 16, aquele que persiste por maior tempo e isso concorre consideravelmente para a sua infectividade (FEDRIZZI, 2011). Devido a isso o PCR em tempo real de Cobas® para o HPV procura identificar os genótipos 16 e 18 de forma isolada e um conjunto de 12 outros genótipos de alto risco, que são indistinguíveis pelo método, chamados de AR.

Um dado interessante deste estudo, foi o achado da maior prevalência de outros genótipos de HPV de alto risco, em vez do esperado genótipo HPV 16 (HUSAIN e RAMAKRISHNAN, 2015). A frequência deste genótipo AR identificado nos grupos ASC, isolado ou associado a outros genótipos, foi de 86,1% dos testes

positivos para ASC-US e 100% para ASC-H. Em 36,1% o DNA do HPV 16 foi positivo para ASC-US e 20% para ASC-H, enquanto o HPV 18 foi encontrado em 5,56% e zero, respectivamente. A ordem desta distribuição genotípica está de acordo com outro estudo com PCR Cobas® para ASC-US, porém com frequências diferentes (PREISLER *et al.*, 2013).

Estes dados revelam a necessidade de se criar estudos com a finalidade de identificar qual a atual distribuição de prevalência genotípica de HPV da região, pois o conhecimento atual não assevera que a vacina contra o HPV exiba proteção cruzada eficaz para outros genótipos, que podem ser até mais prevalentes que o 16 e 18 preconizados nas campanhas de imunização. Schiffman *et al.* (2015) publicou um trabalho em que aponta que o risco de NIC 3 ou superior em 3 anos para citologias ASC-US foi de 14,5% para o HPV 16, 4,8% para o HPV 18 e 3,5% para o HPV AR.

A captura híbrida permite que se obtenha a medida da carga viral. O presente estudo, mostrou que ao se comparar a mediana da carga viral entre os grupos ASC e o resultado histopatológico não se obteve nenhuma diferença com significância estatística, mesmo após estabelecer um ponto de corte de 10 RLU. Estes dados reforçam a tese de que uma maior carga viral não se correlaciona proporcionalmente com um desfecho mais grave.

Alguns trabalhos tentaram correlacionar a carga viral com gravidade da lesão, com distintos resultados. Lee *et al.* (2015) observou que a carga viral se correlacionava com um maior achado de NIC, todavia não com a gravidade. Origoni (2014) estabeleceu um ponto de corte e obteve uma significativa correlação entre gravidade histopatológica e carga viral maior que 10 RLU.

Não apenas a carga viral, mas a positividade de um teste de DNA-HPV não se correlacionou com a prevalência de um resultado histopatológico mais grave para citologias ASC de forma significativa. A frequência de teste de HPV positivo em biópsias com resultado HSIL ou mais grave foi de 100% e de 77% para LSIL ou inferior.

A coexistência de infecções genitais é bem conhecida e leva à recomendação de testar outras infecções genitais simultaneamente (DONDEERS *et al.*, 2013). A frequência de positividade do teste DNA-HPV para citologias ASC, no presente estudo, era maior quando associado algum patógeno infeccioso genital.

Nasser *et al.* (2011) observou semelhante associação em seu estudo com ASC-US que possuíam alguma infecção presente.

A positividade de um teste de HPV comparado com a descrição microbiológica das citologias ASC, mostrou uma frequência significativamente maior para *Candida sp.* Rebouças *et al.* (2014), por outro lado, em estudo transversal da influência do HPV em vaginites de citologias com resultado LSIL, reportou que a presença de *Candida sp.* se correlacionava com mais frequência a um teste de DNA-HPV negativo. Silva *et al.* (2014) reportou pesquisas contraditórias em que tanto a *Candida sp.* era apresentada como fator protetivo contra progressão pela infecção pelo HPV, como publicações em que essa infecção fúngica poderia ativar uma infecção latente por este vírus. Contudo, a amostra da presente pesquisa foi insuficiente e novos estudos devem ser realizados para afirmar alguma relação entre patógenos cervicais e positividade para HPV.

Ainda na comparação da microbiologia com um teste de detecção do HPV outro resultado com diferença estatisticamente significativa ($p=0,0234$) foi a associação de um HPV de alto risco negativo e uma microbiota não-patogênica. Zhang *et al.* (2017) publicou uma extensa pesquisa em que mostra uma frequência maior de negatividade para o HPV de alto risco em uma microbiota não patogênica, porém sem diferença estatisticamente significativa.

Quando realizado histopatológico concomitante a um exame ASC ou posterior em até seis meses foi possível identificar uma forte significância estatística entre os grupos, com LSIL ou inferior bastante mais frequente para o grupo ASC-US, enquanto o resultado HSIL ou superior estava correlacionado ao grupo ASC-H. Cytryn *et al.* (2009), em seu estudo de prevalência obteve a mesma constatação.

No presente estudo, 12,5% das biópsias de citologias ASC-US e 55,6% daquelas de citologias ASC-H resultaram HSIL ou superior. Lee e Lee (2016) citaram um estudo prospectivo randomizado que apontou risco acumulado para HSIL de 12,3% para ASC-US, enquanto Schiffman *et al.* (2015) reportou taxa de 5,2% naquelas que eram também HPV positivo em seu estudo.

Selvaggi (2013) cita em sua publicação seis estudos, incluindo um próprio, em que o desfecho histopatológico de uma citologia ASC-H apresentou NIC 2 ou superior, variando entre 32 a 66%, ou seja, entre um e dois terços das vezes. Essa frequência mostra a importância de se encaminhar estas situações para colposcopia seguida de biópsia.

Xu *et al.* (2016) em uma metanálise de 4000 casos de ASC-H mostrou grande variedade de positividade de DNA-HPV de alto risco (51-90%) e de prevalência histopatológica subjacente de HSIL (13-66%), provavelmente ligado a subjetividade no diagnóstico citológico de ASC-H.

O banco de dados propiciou a análise da evolução destas pacientes com citologias ASC, quando disponíveis. Chama, inicialmente, atenção a frequência de 40,5% de pacientes sem qualquer tipo de seguimento, após realizarem uma citologia com resultado ASC-H e 37% para ASC-US. Leyden *et al.* (2005) em sua pesquisa apontou que 13% de todos os insucessos de detecção e triagem de um câncer cervical eram causados por falha de seguimento e destas, 21% não possuíam nenhum retorno entre a detecção da anormalidade citológica e o diagnóstico de câncer cervical invasivo.

Das pacientes com resultado ASC e seguimento constante do banco de dados observou-se que a repetição da citologia era o método de escolha preferencial, mesmo para aquelas cujo resultado citológico de ASC-H demandavam outra conduta, com frequência aproximada de 60% para os dois grupos.

No Brasil, para citologias ASC-US, a conduta preconizada é a repetição em 6 meses, para a maioria das pacientes (INCA, 2016). O tempo médio entre as citologias, em meses, para o grupo ASC-US foi de 13,51 (DP de 10,95), variando de 1 a 72 meses. Tanto a média de tempo da realização quanto a larga variação de tempo entre os exames denotam um baixo índice de seguimento do referido protocolo.

Para o grupo ASC-US, 88% tiveram citologias de seguimento normais, e apenas 0,5% foi HSIL, número muito semelhante ao obtido por Pity, Shamdeen e Wais (2012), mostrando que, amplamente, a evolução mais comum destes casos é a resolução, excepcionalmente, a progressão. Apenas 5% permaneceram ASC-US e 6% resultaram LSIL, resultado muito semelhante ao obtido em seguimento por López-Alegría *et al.* (2015).

Para o grupo ASC-H, de 98 citologias, 75 (76,2%) foram normais e 9 (9,2%) foram HSIL. Pity, Shamdeen e Wais (2012) encontrou uma maior severidade no seguimento de citologias ASC-H, com 62% de resultados citológicos posteriores normais e 16% de resultados HSIL.

Biópsias como exame de seguimento em citologias ASC-US pode ser realizada por dois motivos: como seguimento de citologia prévia anormal ou por opção do médico assistente e indicado por orientação colposcópica, ou seja,

certamente submetidas a um rigor maior por demanda do caso específico do que para os demais casos, traduzindo-se num viés de seleção. Isso explica os resultados encontrados que mostram um achado de 12% de resultados histopatológicos HSIL, bastante superior ao encontrado na repetição de uma citologia, também superior ao observado em biópsias posteriores por Tokmak *et al.* (2014) e Barcelos *et al.* (2011). Este último trabalho mostrou, para citologias prévias ASC-H um total de 62% de seguimento histopatológico HSIL também bastante superior aos 44% encontrados na presente pesquisa.

Releva destacar que em dois casos ou 5,9% das citologias ASC-H, o seguimento histopatológico revelou carcinoma invasivo de células escamosas, apontando a necessidade de encaminhamento destes casos de citologias atípicas para biópsia indicada por colposcopia. Pity, Shamdeen e Wais (2012), em seu trabalho mostrou que, dentre os seguimentos de citologias ASC, o achado de carcinoma invasor era significativamente mais associado ao grupo ASC-H.

Alguns países adotam a realização de um teste biomolecular para detecção de HPV de alto risco como rastreamento ou conduta (WENTZENSEN; ARBYN, 2017). Os dados coletados mostraram que um teste de DNA-HPV foi realizado como conduta inicial isoladamente em menos de 20% nos dois grupos e mostrou positividade para HPV de alto risco em 50% dos seguimentos de citologias ASC-US e 70% dos seguimentos de citologias ASC-H, dado compatível com o que reporta a literatura (MASSAD *et al.*, 2013).

O tempo médio de depuração de uma infecção pelo HPV constatada por ocasião de uma citologia ASC por meio de Captura Híbrida ou PCR e observada após uma nova testagem no segmento, neste estudo foi de 15 (\pm 8) meses. A literatura tem demonstrado que a vasta maioria das infecções por HPV estarão depuradas laboratorialmente no prazo de 24 meses (ZHANG *et al.*, 2017).

7 CONCLUSÃO

Muitos parâmetros deste estudo mostraram que ASC-US e ASC-H são duas categorias bem distintas, tanto na morfologia quanto no prognóstico.

O critério diagnóstico de ASC-US mais frequente foi o critério clássico de aumento do tamanho do núcleo. Outras alterações celulares como binucleação, células gigantes, hiperqueratose e placa de queratina eram associadas a este grupo, enquanto se mostraram relativamente escassos no grupo ASC-H.

Esboço de coilócito, binucleação, pérola córnea e placa de queratina se associaram a uma citologia de base líquida, enquanto um ASC-US quantitativo, paraqueratose e células gigantes estavam associadas a citologia convencional.

A razão de frequências ASC-US/ASC-H está de acordo com a literatura.

O DNA-HPV foi mais frequente no grupo ASC-H, porém sem associação. Pelo método de PCR foi possível demonstrar uma maior prevalência de genótipos de HPV do tipo AR nos dois grupos, em vez dos genótipos 16 e 18 esperados em conformidade com a literatura. Não houve significância estatística entre um teste DNA-HPV positivo e grau de lesão histopatológico.

Outros achados da citologia correlacionados com o diagnóstico histopatológico mostraram que hiperqueratose, quando presente, estava correlacionado a um pior prognóstico, enquanto o achado de binucleação se correlacionava estatisticamente com um melhor prognóstico.

A associação dos achados citológicos com células escamosas atípicas e o resultado de biópsias mostrou uma maior gravidade histopatológica prevalente no grupo ASC-H.

8 REFERÊNCIAS

ABREU, A. *et al.* **Detection of Human Papillomavirus among Women with Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance Referred to Colposcopy**: Implications for Clinical Management in Low- and Middle-Income Countries. *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 17, n.7, p. 3637-3641, 2016.

AGUIAR, L. *et al.* **Avaliação crítica das nomenclaturas diagnósticas dos exames citopatológicos cervicais utilizadas no Sistema Único de Saúde (SUS)**. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, Rio de Janeiro, v. 33, n. 3, p. 144-149, Mar. 2011.

AMARAL, R. *et al.* **Influência da adequabilidade da amostra sobre a detecção das lesões precursoras do câncer cervical**. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 30, n. 11, p. 556-60, 2008.

APGAR, B.; ZOSCHNICK, L.; WRIGHT JR, T. **The 2001 Bethesda System Terminology**. *American Family Physician*, v. 68, n.10, p. 1992-1998, 2003.

ARBYN, M. *et al.* **Human papillomavirus testing versus repeat cytology for triage of minor cytological cervical lesions**. *Cochrane Database of Systematic Reviews Issue 3*. Art.No.: CD008054., 2013.

BARCELOS, A. *et al.* **Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance: Bethesda Classification and Association with Human Papillomavirus**. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, a. ID 904674, 2011.

BIBBO, M.; WILBUR, D. **Comprehensive Cytopathology**. 4^a ed. Elsevier Health Sciences, 2014.

BIGRAS, G. *et al.* **Interobserver concordance in the assessment of features used for the diagnosis of cervical atypical squamous cells and squamous intraepithelial lesions (ASC-US, ASC-H, LSIL and HSIL)**. *Cytopathology*, v. 24, p. 44-51, 2013.

BOUNTRIS, P. *et al.* **An Intelligent Clinical Decision Support System for Patient-Specific Predictions to Improve Cervical Intraepithelial Neoplasia Detection**. *BioMed Research International*, v. 2014, Article ID 341483, 20 pages, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Caderno de referência 1: Citopatologia Ginecológica**/ André Luiz de Souza Barros, Daisy Nunes de Oliveira Lima, Michelle Dantas Azevedo, Micheline de Lucena Oliveira – Brasília: Ministério da Saúde; Rio de Janeiro: CEPESC, 2012.

BRAVO, I. G.; FELEZ-SANCHEZ, M. **Papillomaviruses: viral evolution, cancer and evolutionary medicine**. *Evolution, Medicine, and Public Health*, p. 32-51, 2015.

CHARLTON, A. *et al.* **A cervical abnormalities risk prediction model: can we use clinical information to predict which patients with ASCUS/LSIL Pap tests will develop CIN2/3 or AIS?** *J Low Genit Tract Dis*, v. 17, n. 3, p. 242-247, Jul. 2013.

CHOI, I *et al.* **Cytomorphologic Features According to HPV DNA Type in Histologically Proven Cases of the Uterine Cervix.** Korean J Pathol, v. 45, n. 6, p. 612-620, 2011.

COX, T. **History of the use of HPV testing in cervical screening and in the management of abnormal cervical screening results.** Journal of Clinical Virology, v. 45, p. 53-512, 2009.

CYTRYN, A. *et al.* **Prevalence of cervical intraepithelial neoplasia grades II/III and cervical cancer in patients with cytological diagnosis of atypical squamous cells when high-grade intraepithelial lesions (ASC-H) cannot be ruled out.** São Paulo Med J, v.127, n. 5, p. 283-287, 2009.

DISCACCIATI, M.; BARBOZA, B.; ZEFERINO, L. **Por que a prevalência de resultados citopatológicos do rastreamento do câncer do colo do útero pode variar significativamente entre duas regiões do Brasil?** Rev Bras Ginecol Obstet. v. 36, n. 5, p. 192-197, 2014.

DONDERS G, *et al.* **Association of Trichomonas vaginalis and Cytological Abnormalities of the Cervix in Low Risk Women.** PLoS ONE, v. 8, n. 12, Dec. 2013.

DUARTE, H.; ROMERO, J.; SCHMALBACH, J. **Asociación de la citología cervico-vaginal inflamatoria con la lesión intraepitelial cervical en pacientes de una clínica de salud sexual y reproductiva en Bogotá, Colombia 1999-2003.** Rev. salud pública, v. 6, n.3, Nov. 2004.

DUNNE, E.F., MARKOWITZ L.E. **Genital Human Papillomavirus Infection.** Clinical Infectious Disease, v. 43, n. 5, p 624-629, 2006.

ELEUTERIO JR, J. *et al.* **Atipias de Células Escamosas de Significado Indeterminado (ASCUS) – Estudo de 208 Casos.** Rev. Bras. Ginecol. Obstet., Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 135-139, 2000.

ELEUTERIO JR, J. *et al.* **Immunohistochemical Expression of the Tumor Suppressor Protein p16 INK4a in Cervical Adenocarcinoma.** Rev. Bras. Ginecol. Obstet., Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 21-25, Jan. 2017 .

ELFSTROM, K. *et al.* **Long-term HPV type-specific risks for ASCUS and LSIL: A 14-year follow-up of a randomized primary HPV screening trial.** Int. J. Cancer, v. 136, p. 350-359, 2015.

ETCHEBEHERE, R. *et al.* **Comparison of Classical and Secondary Cytologic Criteria Relative to Hybrid Capture for Diagnosing Cervical-vaginal Infection by Human Papillomavirus.** Rev Bras Ginec Obst, v. 38, p. 41-46, 2016.

FAKHRELDIN, M., ELMASRY, K. **Improving the performance of reflex Human Papilloma Virus (HPV)testing in triaging women with atypical squamous cells ofundetermined significance (ASCUS): A restrospective study in a tertiary hospital in United Arab Emirates (UAE).** Vaccine, v. 34, p. 823-830, 2016.

FEDRIZZI, E. **Epidemiologia da infecção genital pelo HPV.** Rev Bras Pat Trato

Gen Inf, v.1, n. 1, p. 3-8, 2011.

FERNANDES, F. *et al.* **Diagnóstico Citopatológico de ASC-US e ASC-H no Serviço Integrado Tecnológico em Citologia do INCA.** Revista Brasileira de Cancerologia, v. 58, n. 3, p. 453-459, 2012.

FERNANDES, J. *et al.* **Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis.** Oncology Letters v. 9, p. 1015-1026, 2015.

GAGE, J. *et al.* **The Low Risk of Precancer After a Screening Result of Human Papillomavirus-Negative/Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance Papanicolaou and Implications for Clinical Management.** Cancer Cytopathology, p. 842-849, Nov. 2014.

GONFRIER, G. *et al.* **Répartition des génotypes de papillomavirus humain dans les frottis ASC-US de patientes infectées ou non par le VIH-1. Résultats préliminaires d'une enquête rétrospective locale.** Gynécologie Obstétrique & Fertilité, v. 42, p. 692-695, 2014.

GUAN, P. *et al.* **Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer** Int. J. Cancer, v. 131, p. 2349-2359, 2012.

HUSAIN, A.; RAMAKRISHNAN, V. **Global Variation of Human Papillomavirus Genotypes and Selected Genes Involved in Cervical Malignancies.** Annals of Global Health, v. 81, n. 5, p. 675-683, Sep-Oct, 2015.

INCA-INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero / Instituto Nacional de Câncer.** Rio de Janeiro: INCA, 2016, 3ª ed.

JAHIC, M; JAHIC, E. **Diagnostic Approach to Patients with Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance Cytologic Findings on Cervix.** Med Arch, v. 70, n. 4, p. 296-298, Aug. 2016.

JORDÃO, A. *et al.* **Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citológico de papilomavírus humano.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 39, n. 1, 2003.

KECECIOGLU, M. *et al.* **Cost and Effectiveness Comparison of Immediate Colposcopy Versus Human Papillomavirus DNA Testing in Management of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance in Turkish Women.** Asian Pacific J Cancer Prev, v. 14, n. 1, p. 511-514, 2013.

KIETPEERAKOOL, C.; TANGJITGAMOL, S.; SRISOMBOON, J. **Histopathological Outcomes of Women with Abnormal Cervical Cytology: a Review of Literature in Thailand.** Asian Pac J Cancer Prev, v. 15, n.16, p. 6489-6494, 2014.

KIR, G.; SARBAY, B.; SENELDIR, H. **The significance of parakeratosis alone in cervicovaginal cytology of turkish women.** Diagn Cytopathol, v. 45, n.4, p. 297-302, 2017.

KITUNCHAROEN, S.; TANTBIROJN, P; NIRUTHISARD, S. **Comparison of Unsatisfactory Rates and Detection of Abnormal Cervical Cytology Between Conventional Papanicolaou Smear and Liquid-Based Cytology (Sure Path®).** Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, v. 16, n.18, p. 8491-8494, 2015.

KOLNIKOVA, G. *et al.* **Current possibilities of cervical precancerous lesions screening in Slovakia:** prevalence of high risk human papillomavirus in patients with cytological diagnoses of atypical squamous cells of unknown significance. Bratisl Lek Listy, v. 115, n. 8, p. 469-473, 2014.

KOSS, L.; MELAMED, M. (eds). **Koss' Diagnostic Cytology & Its Histopathologic Bases.** 5^a ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

LEE, H.; LEE, E. **HPV Infection and p16 Promoter Methylation as Predictors of ASC-US/LSIL Progression.** Cancer Cytopathology, p. 58-65, Jan. 2016.

LEE, J. *et al.* **Comparison of Diagnostic Cytomorphology of Atypical Squamous Cells in Liquid-Based Preparations and Conventional Smears.** Korean J Pathol, v. 46, n. 4, p. 365-369, 2012.

LEE, S. *et al.* **Semi-quantitative HPV viral load in patients with ASC-US cytology:** viral load correlates strongly with the presence of CIN but only weakly with its severity. Cytopathology, v. 26, n. 1, p. 19-25, 2015.

LERTVUTIVIVAT, S. *et al.* **Silent High Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Atypical Smears from Liquid Based Cervical Cytology - Three Years Experience in Thammasat University Hospital.** Asian Pac J Cancer Prev, v. 17, n. 9, p. 4353-4356, 2016.

LEYDEN, W. *et al.* **Cervical Cancer in Women With Comprehensive Health Care Access:** Attributable Factors in the Screening Process. Journal of the National Cancer Institute, v. 97, n. 9, p. 675-683, May 2005.

LHEE, M. *et al.* **Diagnostic Algorithm to Reflect Regressive Changes of Human Papilloma Virus in Tissue Biopsies.** Yonsei Medical Journal, v. 55, n. 2, p. 331-338, 2014.

LÓPEZ-ALEGRÍA, F. *et al.* **Clinical management of the first ASCUS report in Chile.** Prospective single-cohort study. Sao Paulo Med J, v. 133, n. 6, p.480-487, 2015.

MASSAD, L. *et al.* **2012 Updated Consensus Guidelines for the Management of Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors.** For the 2012 ASCCP Consensus Guidelines Conference. Obstet Gynecol, v. 121, p. 829-846, 2013.

MORAIS, A; MORAIS, C. F.; MORAIS, C. E.; ANGHEBEM-OLIVEIRA, M.; MERLIN; J. **ASC-US:** uma revisão da literatura para responder aos problemas práticos do dia a dia do citologista. RBAC, v. 43, n. 4, p. 309-320, 2011.

NAKAMURA, N. *et al.* **HPV genotyping for triage of women with abnormal cervical cancer screening results:** a multicenter prospective study. Int J Clin Oncol,

v. 20, p. 974-981, 2015.

NASSER, H. *et al.* **Infectious Organisms on Papanicolaou Smears Should Not Influence the Diagnosis of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance.** *Acta Cytologica*. v. 55, p. 251-254, Apr. 2011.

NAYAR, R.; WILBUR, D. C. **The Pap test and Bethesda 2014.** *Cancer Cytopathology*, v. 123, n. 5, p. 271-81, 2015.

NIJHAWAN, R., *et al.* **Enhancing the scope of conventional cervical cytology for detecting HPV infection.** *Diagn. Cytopathol.*, v. 38, p. 645–651, 2010.

NOMELINI, R. *et al.* **Prevention of cervical cancer in women with ASCUS in the Brazilian Unified National Health System: cost-effectiveness of the molecular biology method for HPV detection.** *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 28, n. 11, p. 2043-2052, Nov, 2012.

OGEMBO, R. *et al.* **Prevalence of Human Papillomavirus Genotypes among African Women with Normal Cervical Cytology and Neoplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis.** *PLoS ONE*, v. 10, n. 4, 2015.

OKODO, M. *et al.* **Evaluating the Existence of Small Compressed Binucleated Squamous Cells in ASC-H.** *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 17, n. 10, p. 4665-4669, 2016.

ORIGONI, M. **Semi-quantitative HPV viral load in patients with ASC-US cytology: viral load correlates strongly with the presence of CIN, but only weakly with its severity.** Letter to the Editor. *Cytopathology*, v. 26, p.126-133, 2014.

PARK, Y. *et al.* **Comparison of the Abbott RealTime High-Risk Human Papillomavirus (HPV), Roche Cobas HPV, and Hybrid Capture 2 Assays to Direct Sequencing and Genotyping of HPV DNA.** *Jour Clin Microbiology*, v 50, n 7, p 2359-2365, 2012.

PARKHURST, J.; VULIMIRI, M. **Cervical cancer and the global health agenda: Insights from multiple policy-analysis frameworks.** *Global Public Health*, v. 8, n. 10, p. 1093-1108, 2013.

PERSSON, M. *et al.* **Minor Cytological Abnormalities and up to 7-Year Risk for Subsequent High-Grade Lesions by HPV Type.** *PLoS ONE*, v. 10, n. 6, 2015.

PINHO-FRANÇA, J.; CHEIN, M.; THULER, L. **Patterns of cervical cytological abnormalities according to the Human Development Index in the northeast region of Brazil.** *BMC Women's Health* v. 16, n. 54, 2016.

PITY, I.; SHAMDEEN, M.; WAIS S. **Follow up of atypical squamous cell Pap smears in Iraqi women.** *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 13, n. 7, p. 3455-3460, 2012.

PREISLER, S. *et al.* **Prevalence of Human Papillomavirus in 5,072 Consecutive Cervical SurePath Samples Evaluated with the Roche Cobas HPV Real-Time PCR Assay.** *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, 2013.

QUEIROZ, F. *et al.* **Detection and genotyping of HPV in women with indeterminate cytology and low-grade squamous intraepithelial lesions.** J Bras Patol Med Lab, v. 51, n. 3, p. 166-172, Jun. 2015.

REBOUÇAS, K. *et al.* **Influence of human papillomavirus infection on the vaginal microbiome of women with immunocompetency.** DST - J bras Doenças Sex Transm, v. 26, n.1-4, p. 5-9, 2014.

RUSSOMANO, F.; MONTEIRO, A.; MOUSINHO, R. **O diagnóstico citológico de células escamosas atípicas** – uma avaliação crítica das recomendações diagnósticas. Rev Bras Ginecol Obstet, v. 30, n. 11, p. 573-582, 2008.

SAHASRABUDDHE, V.; LUHN, P.; WENTZENSEN, N. **Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts.** Future microbiology, v. 6, n. 9, 2011.

SASLOW, D. *et al.* **American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer.** J Low Genit Tract Dis, v. 16, n. 3, p. 175–204, jul. 2012.

SCHIFFMAN, M.; CLIFFORD, G.; BUONAGURO, F. **Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline.** Infectious Agents and Cancer, v.4, n. 8, 2009.

SCHIFFMAN, M. *et al.* **A study of HPV typing for the management of HPV-positive ASC-US cervical cytologic results.** Gynecologic Oncology, v. 138, p. 573-578, 2015.

SCHIFFMAN, M. *et al.* **Carcinogenic human papillomavirus infection.** Nature Reviews Disease Primers, v. 2, 2016.

SELVAGGI, S. **Clinical Significance of Atypical Squamous Cells Cannot Exclude High Grade Squamous Intraepithelial Lesion With Histologic Correlation: A 9-Year Experience.** Diagnostic Cytopathology, v. 41, n. 11, 2013.

SILVA, C. *et al.* **A retrospective study on cervical intraepithelial lesions of low-grade and undetermined significance: evolution, associated factors and cytohistological correlation.** Sao Paulo Medical Journal, v. 132, n. 2, p. 92-96, 2014.

SILVA, M. *et al.* **Determinantes da detecção de atipias celulares no programa de rastreamento do câncer do colo do útero no Rio de Janeiro, Brasil.** Rev Panam Salud Publica, v. 34, n. 2, p. 107-113, 2013.

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,** Journal of the National Cancer Institute, v. 92, n. 12,, p. 293-299, Feb, 2001.

SRODON, M.; PARRY, D.; RONNETT, B. **Atypical squamos cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion: diagnostic performance, human papillomavirus testing, and follow-up results.** Cancer, v. 108, n. 1, p. 32-38, 2006.

STABILE, S. *et al.* **Estudo comparativo dos resultados obtidos pela citologia oncótica cérvico-vaginal convencional e pela citologia em meio líquido.** Einstein, v. 10, n. 4, p. 466-472, 2012.

STEENBERGEN, R. *et al.* **Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions.** Nature Reviews. Cancer, v.14, n. 6, p.395-405, 2014.

TAFURT-CARDONA, Y.; ACOSTA-ASTAIZA, C.; SIERRA-TORRES, C. **Prevalencia de citología anormal e inflamación y su asociación con factores de riesgo para neoplasias del cuello uterino en el Cauca, Colombia.** Rev. Salud Pública, Colombia, v.14, n.1, p. 53-66, jan./feb. 2012.

TANABODEE, J. *et al.* **Comparison of Efficacy in Abnormal Cervical Cell Detection between Liquid-based Cytology and Conventional Cytology.** Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, v. 16, p. 7381-7384, 2015.

TOKMAK, A. *et al.* **Clinical Significance of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance in Detecting Preinvasive Cervical Lesions in Post-Menopausal Turkish Women.** Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, v. 15, 2014.

TORRES-IBARRA, L. *et al.* **Triage strategies in cervical cancer detection in Mexico: methods of the FRIDA Study.** Salud Pública de México, v. 58, n. 2, mar-abr, 2016.

TSU, V.; JERÓNIMO, J. **Saving the World's Women from Cervical Cancer.** New England Journal of Medicine, v. 374, n. 26, 2509-2511, Jun, 2016.

VEIJALAINEN, O. *et al.* **High risk HPV testing in the triage of repeat ASC-US and LSIL.** Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica, v. 94, p. 931-936, 2015.

WATSON, M. *et al.* **Provider management of equivocal cervical cancer screening results among underserved women, 2009–2011: follow-up of atypical squamous cells of undetermined significance.** Cancer Causes Control, v. 26, n. 5, p. 759-764, May, 2015.

WASHIYA, K. *et al.* **Significance of Binucleated Cells with Compression in Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance.** Acta Cytologica. v. 57, p. 599–603, 2013.

WEI, H. *et al.* **Distribution of various types of low-risk human papillomavirus according to cervical cytology and histology in northern Chinese women.** International Journal of Gynecology and Obstetrics, v. 126, p. 28-32, 2014.

WENTZENSEN, N.; ARBYN, M. **HPV-based cervical cancer screening- facts, fiction, and misperceptions.** Preventive Medicine, v. 98, p. 33-35, 2017.

WILSON, L. *et al.* **Natural immune responses against eight oncogenic human papillomaviruses in the ASCUS-LSIL triage study.** Int J Cancer, v. 133, n. 9, p. 2172-2181, Nov, 2013.

WON, K. *et al.* **Impact of age on the false negative rate of human papillomavirus DNA test in patients with atypical squamous cells of undetermined significance.** *Obstet Gynecol Sci*, v. 58, n. 2, p.117-123, 2015.

XIAO, G.; EMANUEL, P. **Cervical parakeratosis/hyperkeratosis as an important cause for false negative results of Pap smear and human papillomavirus test.** *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 49, p. 302-306, 2009

XU, L. *et al.* **Triage of ASC-H: a meta-analysis of the accuracy of hr HPV testing and other markers to detect cervical precancer.** *Cancer Cytopathology*, v. 124, n. 4, p. 261-272, 2016.

ZHANG, D. *et al.* **Epidemiological investigation of the relationship between common lower genital tract infections and high-risk human papillomavirus infections among women in Beijing, China.** *PLoS ONE*, v.12, n. 5, 2017.