

Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citológico de papilomavírus humano

Application of non-classical morphological criteria in the cytological diagnosis of human papillomavirus

Andréa Valderrama Jordão¹
Léo Sérgio Ruggeri²
Giselle Itália Ruggeri Chiucheta³
Sérgio Piva⁴
Marcia Edilaine Lopes Consolaro⁵

unitermos

resumo

Citologia
HPV
Critérios não-clássicos

Existe atualmente grande preocupação com a melhoria no diagnóstico citológico de HPV através da introdução de critérios não-clássicos para o seu diagnóstico, tendo em vista a elevada frequência da infecção viral, bem como o seu potencial carcinogênico. O presente trabalho objetivou uma releitura de 65 casos positivos para HPV por captura híbrida (cujos critérios inicialmente utilizados foram apenas os clássicos), e a introdução dos critérios não-clássicos. Os critérios citológicos mais observados foram os não-clássicos, sendo bi ou multinucleação o mais freqüente, com $n = 39$ (60%), seguido de halo perinuclear, com $n = 37$ (56,9%) e disqueratose leve e núcleo hiper Cromático, ambos com $n = 32$ (49,2%). Para NIC I predominou a disqueratose, com $n = 20$ (100%); para inflamação, disqueratose leve, com $n = 35$ (87,5%) e para Ascus e Agus, halo perinuclear, núcleo hiper Cromático, células gigantes e bi ou multinucleação, todos com $n = 4$ (100%). Todos os 20 casos de NIC I, dez dos 40 casos de inflamação e todos os casos de Ascus ($n = 1$) e Agus ($n = 3$) foram considerados positivos para HPV com a utilização de critérios não-clássicos, passando a 52,3% dos casos positivos pela captura híbrida a apresentarem a infecção viral pela citologia, em detrimento de 23,1% só com os critérios clássicos. Um número razoável de amostras diagnosticadas inicialmente como inflamatórias passaram a apresentar a infecção viral, podendo representar a variedade subclínica do vírus, para a qual o diagnóstico molecular apresentou-se como melhor metodologia. A utilização de critérios não-clássicos de HPV pela citologia parece muito importante para maximizar a eficiência diagnóstica.

abstract

key words

There is currently a great concern with regard to improvements in the cytological diagnosis of HPV through the introduction of non-classical criteria in its diagnosis. This is important owing to the high frequency of viral infection and its cancerigenous potential. The aim of the research was a reinterpretation of 65 positive HPV cases by hybrid capture. Classical criteria had been used in the first instance and eventually non-classical ones have been applied. The cytological criteria most frequently reported were non-classical. Bi or multinucleation with $n = 39$ (60%), perinuclear halo with $n = 37$ (56.9%), light dyskeratosis and hyperchromatic nucleus, both with $n = 32$ (49.2%) were the most frequent. Whereas dyskeratosis was predominant with $n = 20$ (100%) in NIC I and light dyskeratosis with $n = 35$ (87.5%) in inflammation, in Ascus and Agus perinuclear halo, hyperchromatic nucleus, giant cells and bi or multinucleation, with $n = 4$ (100%) each, were predominant. The 20 NIC I cases, ten out of the 40 inflammation cases and all Ascus ($n = 1$) and Agus ($n = 3$) cases were HPV positive when non-classical criteria were employed. Hybrid capture revealed 52.3% of positive cases with viral infection by cytology to the detriment of 23.1% when classical criteria were used. A considerable number of samples initially diagnosed inflammatory showed viral infection which may represent the virus's subclinical variety. In the latter the molecular diagnosis was the best methodology. The use of HPV non-classical criteria by cytology seems to be important to improve efficiency of diagnosis.

Cytology

HPV

Non-classical criteria

1. Especialista em Ciências da Saúde do Setor de Citologia Esfoliativa do Laboratório São Camilo de Maringá-PR.
2. Setor de Citologia Esfoliativa do Laboratório São Camilo de Maringá-PR.
3. Especialista em Citopatologia do Setor de Citologia Esfoliativa do Laboratório São Camilo de Maringá-PR.
4. Médico patologista do Laboratório São Camilo de Maringá-PR.
5. Mestre em Biologia Celular; docente assistente de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá. Trabalho realizado em conjunto pelo Laboratório São Camilo de Maringá-PR e pelo Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá-PR. Baseado em monografia de especialização apresentada ao Curso de Especialização em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá.

Introdução

Foi comprovado atualmente que um fator relevante na gênese do carcinoma cervical está localizado principalmente no genótipo do HPV, favorecido pelos hábitos sexuais da população de risco que pode gerar infecções concomitantes com possível potencial carcinogênico (4, 7). O ácido desoxirribonucléico (DNA) específico do HPV pode ser detectado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em 90% a 95% dos carcinomas cervicais (11). Tal fato é agravado quando leva-se em consideração que a infecção anogenital causada por HPV é considerada como uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns e que se apresenta em significativo estado emergente (4).

As lesões oriundas de infecção pelo HPV provocam, geralmente, alterações morfológicas características, detectáveis em citologia de raspados cervicovaginais e biópsias. Com isso, são de suma importância os exames rotineiros de detecção precoce de câncer através de esfregaços corados pelo método de Papanicolaou (25). O exame citológico periódico para prevenção do câncer de colo uterino tem sido a melhor estratégia de saúde pública para a detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, sendo desta forma também muito útil na identificação de alterações citomorfológicas relacionadas ao HPV (46).

Historicamente, estas alterações morfológicas em citologia já haviam sido descritas por Papanicolaou em 1933 (33), embora esse autor não reconhecesse nelas a causa de sua expressão. Já em 1956, Koss e Durfee (19) descreveram células com a expressão citopática, utilizando pela primeira vez o termo coilocitose para os halos característicos presentes nas lesões. Em 1960, Ayre (1) aventou pela primeira vez a etiologia viral para a coilocitose, sendo o termo utilizado até hoje.

Atualmente existe grande preocupação em torno da detecção citológica precoce desta infecção e também com a melhoria do diagnóstico citológico, pois em países em desenvolvimento a triagem citológica vem falhando em promover a redução na incidência de câncer cervical, sendo uma das causas a limitação de sensibilidade do método (20, 50). Com isto, tem-se estudado a introdução de novos critérios morfológicos, denominados não-clássicos ou secundários para diagnóstico citológico de HPV. O objetivo principal é de que, associados aos clássicos critérios morfológicos, seja ampliada a sensibilidade do método, aproximando-a da obtida em amostras histopatológicas e dos métodos diagnósticos

mais sensíveis e específicos, tais como a detecção do DNA viral por captura híbrida ou reação em cadeia da polimerase (PCR) (8, 25).

A captura híbrida para detecção de HPV é um exame de biologia molecular altamente sensível capaz de detectar 18 dos aproximadamente 30 tipos de HPV que mais comumente infectam o trato anogenital. O grupo A possui sondas para os HPVs de baixo risco (6, 11, 42, 43, 44), e o grupo B, sondas para os HPVs de intermediário/alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). Sua sensibilidade é de 1pg/ml de DNA-HPV, equivalente a 0,1 cópia de vírus/célula. Por essa sensibilidade, os estudos têm mostrado estreita relação entre os resultados e a evolução clínica. Os tipos detectados pela metodologia representam 95% dos vírus que infectam o trato anogenital. Todos os testes de captura híbrida são, ao mesmo tempo, qualitativos e quantitativos (6).

Porém, o grande fator limitante das metodologias moleculares é o elevado custo, tornando-as inviáveis para o exame de grandes populações em programas de saúde governamentais ou até mesmo como procedimento rotineiro em serviços de saúde privados, apesar de alguns autores proporem o teste de DNA para HPV como um complemento para a triagem citológica (49). Estes métodos, para a realidade de países em desenvolvimento, são ainda reservados para casos específicos como: confirmação diagnóstica, resultados conflitantes, genotipagem viral e casos duvidosos à citologia (25).

Dada a importância da citologia oncológica no rastreamento populacional de HPV, a maximização da eficiência morfológica é fundamental para atender às expectativas dos controles periódicos para a prevenção e detecção do HPV, dos cânceres de colo uterino e suas lesões precursoras. Com este intuito, o presente trabalho objetivou uma releitura de esfregaços cervicovaginais de pacientes com diagnóstico de captura híbrida positiva para HPV (cujos critérios citológicos utilizados inicialmente para este vírus foram apenas os clássicos) e a introdução dos critérios não-clássicos, com o intuito de verificar desta forma a validade da aplicação dos mesmos.

Material e métodos

Amostras

Foram selecionados todos os casos positivos de captura híbrida para HPV realizados pelo Laboratório São Camilo de Maringá-PR, no período de 1º de janeiro de 2000 a 1º

de março de 2001, totalizando 65 casos. A captura híbrida foi realizada a pedido médico por motivos clínicos ou laboratoriais. Nestes casos foi levantado o diagnóstico de citologia oncótica cervicovaginal inicial, que levou em consideração apenas critérios citológicos clássicos para diagnóstico de HPV, ou seja, coilocitose e disqueratose, segundo o descrito por Koss e Durfee (19). Foram revisados os esfregaços levando em conta também os critérios citológicos não-clássicos para HPV, como descrito adiante.

Coleta e coloração das amostras para Papanicolaou

As amostras citológicas, quando coletadas no Laboratório São Camilo, foram obtidas através de colheita tríplice sugerida por Wied *et al.* (47), sendo que o material enviado pelos clínicos variou conforme o critério de coleta adotado. Os esfregaços foram fixados em álcool comercial a 95° GL ou com *spray* de polietilenoglicol. A coloração foi realizada pelo método de Papanicolaou modificado conforme Takahashi (44), utilizando corantes e bálsamo sintético Merck.

Classificações utilizadas para diagnóstico colpocitológico: classificação de Richart de 1967 e o Sistema Bethesda para Citodiagnóstico de 1991 (4, 11).

Critérios morfológicos utilizados

Os critérios morfológicos utilizados para identificação de HPV foram divididos em critérios clássicos e não-clássicos, como a seguir:

Critérios clássicos

- Coilocitose: alteração em células escamosas intermediárias maduras contendo um, dois ou mais núcleos discarióticos. Ocorre uma grande cavidade ou área clara que circunda o núcleo proeminente, com bordas bem definidas e a zona periférica amíde apresenta-se em borrão (19, 28);
- disqueratose: células espalhadas ou em grupos tridimensionais que demonstram pleomorfismo celular (formas caudadas ou alongadas) e/ou aumento de tamanho e atipia nuclear (22, 28, 35, 38).

Critérios não-clássicos

- Bi ou multinucleação (28, 30, 38);
- cariorrexe: trata-se da cromatina condensada perifericamente que permanece como massas agregadas depois do desaparecimento da borda ou limite nuclear (32);

- células fantasmas: são células com clareamento citoplasmático, que têm uma evidente falta de substâncias citoplasmáticas, não coradas, entre o núcleo e a borda celular (38);
- células em fibra: o citoplasma é alongado como uma fibra. Representam a forma mais pronunciada da disqueratose e são diferenciadas das células similares encontradas no carcinoma escamoso queratinizante pelo padrão regular da cromatina (38);
- células gigantes: apresentam alterações como binucleação, multinucleação, macronucleose e macrocitose, circundados por halo com borda concêntrica que, aparentemente, separa estes núcleos do citoplasma (9, 27);
- células parabasais coilocitóticas: são células pequenas, contendo núcleo maior, fortemente corado e irregular. O citoplasma é anfófilico ou cianofílico e, às vezes, mostra área clara na proximidade do núcleo (29);
- condensação de filamentos: o citoplasma é visto com fissuras ou com aspecto de vidro quebrado e com coloração fraca (38);
- escamas anucleadas: trata-se de células escamosas com citoplasma queratinizado e ausência de núcleo (16);
- grânulos ceratoialinos: são condensações de coloração basofílicas ou eosinofílicas. Frequentemente as células são anucleadas e, às vezes, todas as substâncias citoplasmáticas estão condensadas em grânulos, formando célula em aspecto de "sarampo" (38);
- halo perinuclear: apresenta-se como uma área clara nítida em volta do núcleo, formando um halo. O núcleo frequentemente perde detalhes do envelope nuclear e a cromatina pode estar agrupada irregularmente (28, 30, 38);
- núcleo em borrão: células com citoplasma orangeofílico, às vezes apresentando núcleo aumentado, irregular, hiperromático, podendo ser único ou duplo. A cromatina, na maioria das vezes, aparece em borrão (29);
- núcleo em fibra: consiste em uma distorção do contorno nuclear a partir da configuração arredondada normal ou ovalada do núcleo. A cromatina aparece grumosa e no citoplasma pode aparecer clareamento perinuclear, com numerosos tonofilamentos (40);
- núcleo hiperromático: representado pelo hiperromatismo nuclear e ausência de irregularidades, tanto na cromatina como na membrana nuclear (28, 38).

Captura híbrida

A coleta foi realizada com *kit* especial fornecido pela Digene Diagnostics, sendo o material colhido introduzido em tubo com solução conservadora para posterior análise. O sistema de captura híbrida em microplaca foi realizado conforme procedimento descrito pela Digene®.

Foram considerados positivos para HPV pela citologia os casos de NIC I, inflamação, Ascus e Agus que apresentaram: um critério clássico associado a quatro ou mais não-clássicos; dois critérios clássicos associados ou não a critérios não-clássicos e aqueles com quatro ou mais critérios não-clássicos (7, 8, 18, 46).

Resultados

Os resultados da citologia oncótica inicial dos 65 casos positivos para HPV por captura híbrida demonstraram predominância de casos inflamatórios, com $n = 40$ (61,5%), seguido de NIC I com HPV, $n = 15$ (23,1%) e assim sucessivamente, conforme Tabela 1.

O critério citológico para HPV mais observado entre os resultados citológicos foi bi ou multinucleação, com $n = 39$ (60%) e como a seguir: halo perinuclear, com $n = 37$ (56,9%); disceratose leve e núcleo hiper Cromático, ambos com $n = 32$ (49,2%); células gigantes e grânulos ceratoialinos, ambos com $n = 25$ (38,5%); núcleo em borrão, com $n = 24$ (36,9%); disceratose, com $n = 22$ (33,8%); cariorrexe, com $n = 20$ (30,7%); coilocitose e células fantasmas, ambos com $n = 15$ (23,1%), como demonstra a Tabela 2.

Para os 20 casos de NIC I, os critérios predominantes foram: disceratose, bi ou multinucleação e núcleo hiper-

Resultado colpocitológico inicial dos 65 casos positivos para HPV por captura híbrida

Colpocitologia	<i>n</i>	%
Normal	1	1,5
Inflamatório	40	61,5
Agus	3	4,6
Ascus	1	1,5
NIC I com HPV	15	23,1
NIC I sem HPV	5	7,7
Total	65	100

NIC I: neoplasia intra-epitelial cervical grau I; Agus: atipias em células glandulares de significado indeterminado; Ascus: atipias em células escamosas de significado indeterminado.

Frequência de critérios citológicos observados nos 65 casos estudados após a utilização dos critérios não-clássicos

Tabela 2

Critério morfológico	Casos (<i>n</i>)	Frequência de casos (%)
Coilocitose	15	23,1
Disceratose	22	33,8
Células fantasmas	15	23,1
Células em fibra	2	3,1
Células gigantes	25	38,5
Células parabasais coilocitóticas	2	3,1
Bi ou multinucleação	39	60
Coilocitose leve	9	13,8
Condensação em filamentos	10	15,4
Cariorrexe	20	30,7
Disceratose leve	32	49,2
Escamas anucleadas	4	6,1
Grânulos ceratoialinos	25	38,5
Halo perinuclear	37	56,9
Núcleo em borrão	24	36,9
Núcleo em fibra	7	10,7
Núcleo hiper Cromático	32	49,2

Cromático, com $n = 20$ (100%) cada, seguidos de núcleo em borrão com $n = 19$ (95%), células gigantes com $n = 18$ (90%), halo perinuclear com $n = 17$ (85%) e coilocitose com $n = 15$ (75%), como demonstra a Tabela 3.

Nos 40 casos inflamatórios, predominaram os seguintes critérios: disceratose leve com $n = 35$ (87,5%), seguido de halo perinuclear com $n = 17$ (42,5%) e bi ou multinucleação com $n = 15$ (37,5%), conforme a mesma Tabela 3.

Nos casos de Ascus ($n = 1$) e Agus ($n = 3$), os critérios predominantes foram: halo perinuclear, núcleo hiper Cromático, células gigante e bi ou multinucleação, todos com $n = 4$ (100%), seguidos de disceratose, com $n = 3$ (75%), e cariorrexe, grânulos ceratoialinos e núcleo em borrão, com $n = 2$ (50%), descritos ainda na Tabela 3.

A Tabela 4 mostra número e tipo de critérios (clássicos ou não-clássicos) observados nos casos de NIC I, inflamação, Ascus e Agus. Para NIC I predominou a presença de dois critérios clássicos associados a cinco ou mais critérios não-clássicos, com $n = 14$ (70%), seguido de um critério clássico associado a cinco ou mais não-clássicos, com $n = 4$ (20%), dois clássicos e quatro não-clássicos,

Tabela 3 Critérios citológicos de HPV nos casos de NIC I, inflamação e Ascus e Agus

Critério	NIC I		Inflamação		Ascus e Agus	
	n	%	n	%	n	%
Coilocitose	15	75	–	–	–	–
Disceratose	20	100	4	10	3	75
Células fantasmas	11	55	2	5	1	25
Células em fibra	2	10	–	–	–	–
Células gigantes	18	90	3	7,5	4	100
Células parabasais coilocitóticas	2	10	–	–	–	–
Bi ou multinucleação	20	100	15	37,5	4	100
Coilocitose leve	4	20	7	17,5	–	–
Condensação em filamentos	9	45	1	2,5	–	–
Cariorrexe	14	70	4	10	2	50
Disceratose leve	–	–	35	87,5	1	25
Escamas anucleadas	1	5	3	7,5	–	–
Grânulos ceratoialinos	12	60	12	30	2	50
Halo perinuclear	17	85	17	42,5	4	100
Núcleo em borrão	19	95	4	10	2	50
Núcleo em fibra	5	25	1	2,5	–	–
Núcleo hiper cromático	20	100	8	20	4	100
Total de casos	20	–	40	–	4	–

com $n = 1$ (5%) e cinco ou mais não-clássicos, com $n = 1$ (5%). Assim, dos 20 casos de NIC I, todos podem ser considerados como sugestivos da presença viral, levando-se em consideração também os critérios não-clássicos para diagnóstico de HPV (Figura 1).

Nos casos de inflamação, predominou a presença de dois critérios não-clássicos com $n = 13$ (32,5%), seguido de um não-clássico com $n = 9$ (22,5%), três não-clássicos com $n = 8$ (20%), cinco ou mais não-clássicos com

$n = 4$ (10%), um clássico e cinco ou mais não-clássicos com $n = 4$ (10%) e quatro não-clássicos com $n = 2$ (5%), como mostra a Tabela 4. Desta forma, dez casos de inflamação podem ser considerados como sugestivos da presença viral, levando-se em consideração também os critérios não-clássicos para diagnóstico de HPV (Figura 1).

Para Ascus e Agus predominou um critério clássico associado a cinco ou mais não-clássicos, com $n = 3$ (75%),

Tabela 4 Número de critérios morfológicos de HPV para os quadros citológicos

Critérios	NIC I		Inflamação		Ascus e Agus		Normal	
	n	%	n	%	n	%	n	%
1 clássico e 5 ou mais não-clássicos	4	20	4	10	3	75	–	–
2 clássicos e 4 ou mais não-clássicos	1	5	–	–	–	–	–	–
2 clássicos e 5 ou mais não-clássicos	14	70	–	–	–	–	–	–
1 não-clássico	–	–	9	22,5	–	–	–	–
2 não-clássicos	–	–	13	32,5	–	–	1	100
3 não-clássicos	–	–	8	20	–	–	–	–
4 não-clássicos	–	–	2	5	–	–	–	–
5 ou mais não-clássicos	1	5	4	10	1	25	–	–
Total de casos	20	100	40	100	4	100	1	100

seguido de cinco ou mais critérios não-clássicos, $n = 1$ (25%), conforme a mesma Tabela 4. Portanto, os quatro casos entre Ascus e Agus podem ser considerados positivos para a infecção viral, levando-se em consideração também os critérios não-clássicos para diagnóstico de HPV (Figura 1).

Conforme Tabela 4 e Figura 1, se considerados apenas os dois critérios clássicos, a presença de HPV poderia ser sugerida em 15 casos, o que representa 23,1% daqueles positivos para o vírus por captura híbrida. Levando-se em consideração também os critérios não-clássicos, em 34 casos poderia ser sugerida a presença viral, representando 52,3% dos casos positivos pela captura híbrida, como representa a Figura 2.

Discussão

O diagnóstico citológico tem-se mostrado prático para triagem do câncer de colo uterino de grandes populações devido a sua simplicidade, reprodutibilidade, precisão e

baixo custo, sendo que desde a sua implantação em saúde pública como método de triagem e detecção precoce de neoplasias cervicouterinas, a frequência de morbidade e de mortalidade decorrentes destes cânceres foram reduzidas significativamente, como pode ser comprovado em países desenvolvidos (11). Porém, o aprimoramento no diagnóstico citológico de infecção cervical por HPV é de grande importância, principalmente devido ao potencial oncogênico que apresentam alguns genótipos de HPV e pela crescente incidência deste agente (2, 13, 17, 31, 31, 42). As dificuldades diagnósticas e o fato de uma parte das infecções por HPV serem assintomáticas e passarem despercebidas pelas pacientes, tornam difíceis as estimativas de prevalência. Acredita-se, no entanto, que aproximadamente 1/3 das mulheres sexualmente ativas abriguem alguma forma de infecção por HPV clinicamente manifesta (26).

A Tabela 2 demonstra que o critério mais observado foi a bi ou multinucleação, com $n = 39$, ou seja, presente em 60% dos casos, seguido de halo perinuclear, com $n = 37$, representando 56,9% dos casos. Collaço e Pinto (8) apontam em seus resultados a bi ou multinucleação como o critério predominante, que foi visualizado em 91% dos casos, sendo um resultado superior ao deste trabalho, porém condizente pelo fato de em ambos os trabalhos este ser o critério mais detectado.

Conforme a mesma Tabela 2, a disceratose foi observada em 22 casos, o que representa 33,8%, e a coilocitose em apenas 15, representando 23,1% dos casos. Collaço e Pinto (8) relatam que em seu trabalho a disceratose foi observada em 41,3% dos casos e a coilocitose em 36%, resultados portanto bem mais elevados que os deste trabalho. Apesar da literatura ser unânime em apresentar a coilocitose como critério patognomônico para o diagnóstico de HPV e que exprime a atividade viral, muitos autores destacam, como o demonstrado também nos resultados deste trabalho, que este não é o critério mais frequentemente encontrado nos esfregaços citológicos (2, 3, 14, 20, 23, 38, 41, 51, 52).

Destaca-se neste estudo a elevada frequência de critérios não-clássicos, que são inclusive os mais detectados. Mesmo nos casos de NIC I, a coilocitose apresenta-se apenas como o 4º critério mais observado, com $n = 15$ ou 75% dos casos. A disceratose, junto com a bi ou multinucleação e núcleo hiper Cromático, são nestes casos os mais detectados, com $n = 20$ ou 100%. A coilocitose não aparece nas citologias inflamatórias nem em Ascus e Agus (Tabela 3). Brown e Fife (5) citam que muitos teci-

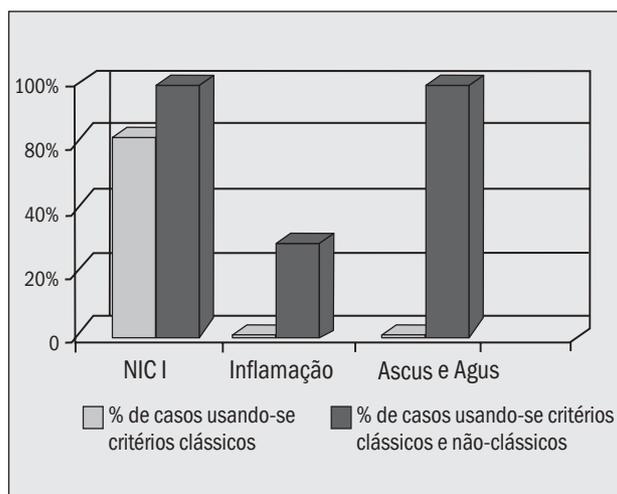


Figura 1 – Frequência de diagnóstico de HPV para NIC I, inflamação e Ascus e Agus

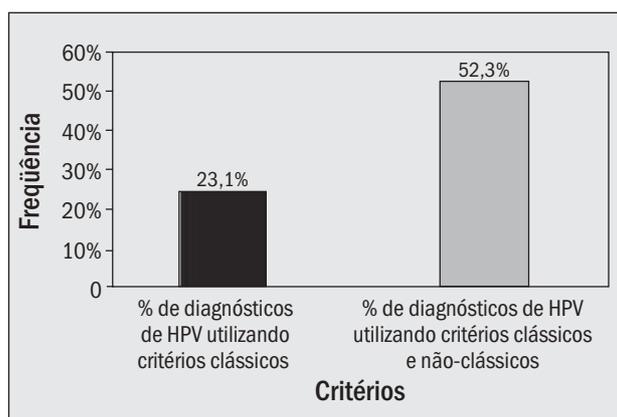


Figura 2 – Frequência diagnóstica de HPV pela citologia

dos infectados, particularmente aqueles com infecção latente, não mostram células coilocitóticas.

Cavaliere *et al.* (7) descrevem que o achado de quatro ou mais critérios não-clássicos é suficiente para concluir infecção por HPV. Collaço e Pinto (8) preconizam que para confirmar a presença do HPV existe a necessidade de pelo menos dois critérios, sendo que um deles deve ser clássico. Korobowicz *et al.* (18) relatam que quando observados mais do que três critérios não-clássicos, pode ser relatada a presença do vírus. Neste trabalho, foram considerados sugestivos de HPV os esfregaços que apresentaram um critério clássico associado a quatro ou mais não-clássicos, dois critérios clássicos associados ou não a critérios não-clássicos ou quatro ou mais critérios não-clássicos. Com isto, nos 20 casos de NIC I (na primeira leitura apenas 15), nos dez casos de inflamação (na primeira leitura nenhum) e em um caso de Ascus e três de Agus (na primeira leitura nenhum) pode ser sugerida a presença de HPV, conforme Tabela 4 e Figura 1.

A Figura 2 evidencia que a frequência diagnóstica de HPV após a inclusão dos critérios não-clássicos passa de 23,1% para 52,3%, ou seja, eleva-se em 29,2%. Cavaliere *et al.* (7) descrevem que a utilização de critérios não-clássicos elevou o diagnóstico de HPV em 37,5%, estando portanto estes resultados e os do presente trabalho bem próximos. Carvalho e Oyakawa (6) também descrevem que a introdução de critérios não-clássicos de HPV aumentam a sensibilidade do exame citológico. Outros autores, em estudos com técnicas biológico-moleculares, entretanto, não conseguiram provar uma relação significativa entre a infecção por HPV e os critérios não-clássicos (31, 48), diferindo deste estudo.

Franco (10) relata que com a utilização dos critérios não-clássicos associados aos clássicos na leitura de esfregaços cervicovaginais, a detecção de HPV aumentou sensivelmente, sendo que 80,7% dos NIC I, 84,6% dos NIC II, 66,6% dos NIC III e 52,1% dos carcinomas cervicais passaram a apresentar estigmas que sugeriam associação com HPV. Pode-se observar que os resultados da Tabela 1, onde não haviam sido utilizados os critérios não-clássicos para HPV e os da Figura 1, onde estes critérios haviam sido aplicados, são bastante diferentes. Desta forma, a concordância entre a citologia oncológica e a captura híbrida elevou-se consideravelmente após a aplicação dos critérios não-clássicos, gerando um aumento na detecção de HPV pela triagem citológica. Este fato é de suma importância no aprimoramento dos serviços prestados, identificando um grupo de pacientes de maior risco para o de-

envolvimento de câncer de colo uterino, como o descrito por Cavaliere *et al.* (7).

Como a citologia é um método que se baseia nas alterações celulares usualmente associadas a infecção por HPV, às vezes não suficientemente específicas para este agente, casos da infecção viral podem não diferir morfológicamente de reações não-específicas ou alterações inflamatórias (22, 50). Deve-se com isto relacionar que um número razoável de casos previamente selecionados como inflamatórios podem ser considerados, aplicando os critérios não-clássicos, como infecção subclínica ou latente por HPV, conforme o descrito por Cavaliere *et al.* (7) e Carvalho e Oyakawa (6). Neste trabalho, dez (25%) dos 40 casos classificados inicialmente como inflamatórios demonstraram critérios principalmente não-clássicos de HPV, suficientes para sugerir o diagnóstico deste vírus. Considerando que os médicos haviam pedido o exame de captura híbrida nestes 40 casos, provavelmente havia suspeita clínica prévia de infecção por HPV e portanto estes dez casos, sugestivos de HPV na segunda leitura, representam possivelmente a variedade subclínica da infecção viral. Vince *et al.* (50) detectaram o DNA de HPV em 25% dos casos diagnosticados pela citologia como alterações reativas, coincidindo com o presente trabalho.

Mesmo introduzindo os critérios não-clássicos, a elevação diagnóstica pela citologia em infecções subclínicas ou latentes não é muito representativa. Nos demais 30 casos onde não há características morfológicas para sugerir HPV, a citologia apresenta-se falsamente negativa, pois não existem as características morfológicas virais, que são a base para o diagnóstico citológico (15, 26). Trofatter (45) e Koutsky *et al.* (21) descrevem que, nos casos em que não há manifestações clínicas, sinais morfológicos de HPV podem ser difíceis de detectar. A citologia possui sucesso diagnóstico principalmente nas lesões clinicamente aparentes, conforme o confirmado por Suzuki (42).

Este fato é bastante preocupante, uma vez que pacientes portadoras deste vírus, principalmente de alto potencial carcinogênico, independente de estar em estado clínico, subclínico ou latente, possuem maior probabilidade de desenvolver lesões precursoras e até mesmo cânceres cervicais (24, 34, 39, 46, 50). Para estes casos, as metodologias moleculares são as mais indicadas por detectarem o DNA viral, mesmo que em pequenas quantidades, fato este claramente demonstrado no presente trabalho (14). Porém, Trofatter (45) cita que o diagnóstico molecular de casos latentes ou assintomáticos tem seu valor incerto, pois a relevância clínica destes tipos de infecção não está ainda determinada.

Conclusões

- Houve elevada freqüência de critérios não-clássicos para diagnóstico de HPV neste trabalho. A coilocitose e a disqueratose não foram os critérios mais comumente observados, sendo a bi ou mutinucleação e halos perinucleares os mais prevalentes;
- a detecção citológica de HPV mais que dobrou com a utilização de critérios não-clássicos em adição aos clássicos;
- um número razoável de casos previamente diagnosticados como inflamatórios demonstraram a presença do vírus com a utilização dos critérios não-clássicos. Estes podem representar a variedade subclínica da infecção e não seriam anteriormente diagnosticados pela citologia;

- para as modalidades latente e subclínica da infecção por HPV, a melhor metodologia diagnóstica parece ser a molecular, uma vez que a mesma detectou 31 casos da infecção, sendo 30 inflamatórios e um normal, nos quais a citologia não demonstrou a presença viral mesmo com a aplicação dos critérios não-clássicos;
- a utilização de critérios não-clássicos para diagnóstico citológico de HPV parece muito importante se levado em conta o poder carcinogênico de genótipos de HPV bem como a sua crescente incidência;
- este trabalho deve continuar com o objetivo de aumentar a sua amostragem e desta forma estabelecer mais precisamente a importância da introdução dos critérios citológicos não-clássicos para o diagnóstico citológico de HPV.

Referências

1. Ayre, J.E. Role of the halo cell in cervical carcinogenesis: a virus manifestation of premalignancy? *Obstet. Gynecol.*, 17: 175-82, 1960.
2. Azocar, J. et al. Prevalence of cervical dysplasia and HPV infection according to sexual behavior. *Int. J. Cancer*, 45: 622-5, 1990.
3. Bibbo, M. & Moraes Filho, A. *Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital*. Rio de Janeiro: Revinter, 1998, p. 60-4.
4. Bonfiglio, T.; Erozan, Y.S. *Gynecology cytopathology*. Philadelphia: Lippincott Raven, 1997, p. 51-72.
5. Brown, D.R. & Fife, K.H. Human papillomavirus infections of the genital tract. *Med. Clin. North. Am.*, 74: 1455-85, 1990.
6. Carvalho, J.J.L. & Oyakawa, N. *I Consenso Brasileiro de HPV*. 1ª ed. São Paulo: BG Cultural, 2000, p. 49-57.
7. Cavaliere, M.C. et al. Papilomavírus em saúde pública: importância da aplicação de novos critérios morfológicos para sua detecção em trato genital feminino. *Bol. Inform. Union*, 15(59/60): 24, 1990.
8. Collaço, L.M. & Pinto, A.P. Aspectos citológicos na coloração de Papanicolaou da Associação de HPV com displasia e carcinoma de colo uterino. *J. Bras. Ginec.*, 104(11/12): 419-21, 1994.
9. De Borges, R.J. et al. Cytologic and ultrastructural findings of a peculiar alteration in cervical cells from patients with human Papillomavirus infections. *Acta Cytol.*, 33(3): 314-8, 1989.
10. Franco, E.L. Epidemiologia do câncer mamário ginecológico. In: Arao, F.S. *Tratado de Oncologia Genital e Mamária*. São Paulo: Roca, 1995, p. 3-16.
11. Gompel, C. & Koss, L. *Citologia ginecológica e suas bases anatomoclinicas*. 1ª ed. São Paulo: Manole, 1997, p. 79-105.
12. Gross, G.E. & Barrasso, R. *Infecção por papilomavírus humano. Atlas clínico de HPV*. Porto Alegre: Artmed, 1999, p.1-18.
13. Gupta, J.W. et al. Detection of human Papillomavirus in cervical smears. A comparison of *in situ* hybridization, immunocytochemistry and cytopathology. *Acta Cytol.*, 31: 387-96, 1987.
14. Jacyntho, C. et al. *HPV Infecção genital feminina e masculina*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1996, p. 5-30.
15. Hinchliffe, S.A. et al. Transience of cervical HPV infection in sexually active, young women with normal cervicovaginal cytology. *Brit. J. Cancer*, 72: 943-5, 1999.
16. Kern, S.B. Significance of anucleated squames in Papanicolaou stained cervicovaginal smears. *Acta Cytol.*, 53(1), 1991.
17. Kochel, H. G. et al. Occurrence of human papillomavirus DNA types 16 and 18 (HPV-16/18) in cervical smears as compared to cytological findings. *Int. J. Gynecol. Obstet.*, 31: 145-52, 1990.
18. Korobowicz, E. et al. The diagnostic value of cytomorphological traits in low and high risk type HPV infections. *J. Pathol.*, 48(2): 107-12, 1997.
19. Koss, L.G. & Durfee, G.R. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann. NY Acad. Sci.*, 63: 1245-61, 1956.
20. Koss, L.G. The Papanicolaou test for cervical. A triumph and a tragedy. *JAMA*, 261: 737-43, 1989.
21. Koutsky, L.A. et al. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol. Revist.*, 10: 122-63, 1988.
22. Kurman, R.J. & Solomon, D. *The Bethesda System for reporting cervical vaginal cytologic diagnoses*. New York: Springer-Verlag, 1994.
23. Landrac, L. Koilocytes: valeur diagnostique. 1ère. *J. Vén. Mars.*: 2, 1989.
24. Levi, J.E. HPV: Por que e quando diagnosticar. *News Lab*, 14: 66-72, 1996.
25. Loreto, C.D. et al. Papilomavírus em saúde pública: importância da aplicação de novos critérios morfológicos para sua detecção em trato genital feminino. *Bol. Inform. Union*, 15 (59/60): 24-39, 1992.

26. Lörincz, A.T. & Reid, R.. *Clinicas obstétricas e ginecológicas da América do Norte. Papillomavirus humanos*. Vol. 3 e 4. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996, p. 565-74, 759-86.
27. Luzzatto, R. et al. Multinucleation and abortive cellular division in human papillomavirus infection. *Acta Cytol*, 34(2): 286-7, 1990.
28. Meisels, A. & Fortin, R. Condylomatous of the cervix and vagina: 1) Cytologic patterns. *Acta Cytol.*, 20: 505-9, 1976.
29. Meisels, A. et al. Condyloma of the uterine cervix. In: *Compendium on diagnostic cytology*. 6. ed. Chicago: Illinois, 1988, p. 63-8.
30. Naib, Z.M. & Masukawa, N. Identification of condyloma acuminata cells in routine vaginal smears. *Obstet. & Gynecol.*, 18(6): 735-8, 1961.
31. Nuovo, G.J. et al. Histological correlates of clinically occult human papillomavirus infection of the uterine cervix. *Am. J. Surg. Pathol.*, 12: 198-203, 1988.
32. Nuovo, G.J. Human papillomavirus DNA. In: genital tract lesions histologically negative for condylomata. *Am. J. Surg. Pathol.*, 14: 643-51, 1990.
33. Papanicolaou, G. *Atlas of exfoliative cytology*. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press, 1960, p. 18-9 (suppl. 2).
34. Poljak, M. et al. Comparative evaluation of first second generation digene hybrid capture assays of detection of human papillomavirus associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *J. Clin. Microb.*, 37(3): 796-7, 1999.
35. Purola, E. & Savia, E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. *Acta Cytol.*, 1: 26-31, 1977.
36. Sadoul, G. & Beuret, T.H. La place du laser dans les lésions du col. *La Revue du Practicien.*, 36: 876, 1986.
37. Schneider, A. et al. Sensivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies. *Diagn. Cytopathol.*, 3: 250-3, 1987.
38. Schneider, M.L. & Schneider, V. *Citologia ginecológica*. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. p. 59-61.
39. Shih, L.W.S. et al. Papilomavírus na área metropolitana de São Paulo: aspectos citológicos e imunocitoquímicos. *Acta Oncol Bras.*, 8(2): 59-64, Mai/Ago, 1988.
40. Shroyer, K.R. et al. Cytologic diagnosis of human papillomavirus infection: spindled nuclei. *Diagn. Cytopathol.*, 6(3): 178-3, 1990.
41. Silva Filho, A.M. & Longatto Filho, A. *Colo uterino & vagina – processos inflamatórios*. Rio de Janeiro: Revinter, 2000, p. 123-45.
42. Suzuki, L.E. *Eficiência da técnica de Papanicolaou na detecção do papillomavirus humano*. Dissertação (mestrado) – curso de Saúde Pública – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2000.
43. Syrjänen, K. et al. Factors associated with progression in cervical human papillomavirus (HPV) infections into carcinoma *in situ* during a long-term prospective follow-up. *Brit. J. Obst. Gynaecol.*, 95: 1096-102, 1988.
44. Takahashi, M. *Atlas de Citologia do câncer*. 2ª ed. São Paulo: Manole, 1982, p. 74-82.
45. Trofatter, K.F. Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. *Am. J. Med.*, 5: 21-7, 1997.
46. Utogawa, M.L. et al. *Papillomavirus humano em esfregaços citológicos de mulheres acima de 50 anos: estudo morfológico e de hibridização in situ nas respectivas biópsias*. *J. Bras. Gin.*, 107(4): 83-7, 1997.
47. Wied, G.L. et al. Taxonomic intracellular analytic system (TICAS) for cell identification. *Acta cytol.*, 12: 180-204, 1959.
48. Ward, B.E. et al. Cytologic correlates of cervical pappillomavirus infection. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 9: 297-305, 1990.
49. Van Ballegooijen, M. et al. Present evidence on the value of HPV-testing for cervical cancer screening: a model-based exploration of coast-effectiveness. *Br. J. Cancer*, 76: 651-7, 1997.
50. Vince, A. et al. Molecular detection of human papillomavirus in women with minor grade cervical cytology abnormalities. *J. Cli. Vir.*, 20: 91-4, 2001.
51. Yoshinouchi, M. et al. Analysis by multiplex PCR of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. *J. Clin. Microb.*, 37(11): 3514-7, 1999.
52. Zür Hausen, H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res.*, 36: 530, 1976.
53. Zür Hausen, H. Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. Current topics. *Microbiol. Immunol.*, 78: 1, 1977.

Endereço para correspondência

Sérgio Piva
 Laboratório São Camilo
 Rua Santos Dumont 3.430
 CEP 87013-050 – Maringá-PR
 e-mail: labsaocamilo@wnet.com.br