

Hospital do Servidor Público Estadual

“Francisco Morato de Oliveira”

**Diferenças Diagnósticas da Citologia Anal em Meio Líquido
pelos Métodos Manual e Automatizado na Detecção de Lesões
Anais**

Renato dos Santos Henriques

São Paulo

2015

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE- SES -SP COORDENADORIA DE
RECURSOS HUMANOS-CRH GRUPO DE DESENVOLVIMENTO DE
RECURSOS HUMANOS-GDRH CENTRO DE FORMAÇÃO DE RECURSOS
HUMANOS PARA O SUS “Dr. Antonio Guilherme de Souza” SECRETARIA
DE ESTADO DA GESTÃO PÚBLICA FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO
ADMINISTRATIVO – FUNDAP PROGRAMA DE APRIMORAMENTO
PROFISSIONAL - PAP**

RENATO DOS SANTOS HENRIQUES

**DIFERENÇAS DIAGNÓSTICAS DA CITOLOGIA ANAL EM MEIO LÍQUIDO
PELOS MÉTODOS MANUAL E AUTOMATIZADO NA DETECÇÃO DE
LESÕES ANAIS**

Monografia apresentada ao Programa de
Aprimoramento Profissional - SES-SP,
elaborada no **(HSPE/Anatomia Patológica)**.

Área: Citologia Oncótica

São Paulo

2015

ii

Diferenças Diagnósticas da Citologia Anal em Meio Líquido pelos
Métodos Manual e Automatizado na Detecção de Lesões Anais

Renato dos Santos Henriques

Aprovada em ___/___/___

Luiz Marcelo Warnecke Espoladore
Biomédico e Orientador

Ester Nei Aparecida Martins Coletta
Médica e co-orientadora

“O MELHOR” É onde eu decido colocar os limites de cada dia.

- Draven

RESUMO

Introdução - A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é uma das Doenças Sexualmente Transmissíveis de maior incidência e prevalência no mundo. O vírus está envolvido na carcinogênese de cânceres. Mulheres com lesões no trato genital causadas pelo HPV têm maior risco de câncer anal. A avaliação microscópica do epitélio anal desempenha papel fundamental nas lesões pré-cancerosas e cancerosas. **Objetivo** - Comparar as diferenças diagnósticas obtidas através dos métodos manual e automatizado em amostras de citologia anal em meio líquido na caracterização de lesões intraepiteliais escamosas. **Métodos** - A coleta de citologia anal foi realizada através da escova Cytobrush da Kolplast®. Foram confeccionadas três lâminas previamente silanizadas por paciente. As pacientes com casos suspeitos e positivos foram convocadas para a Anuscopia. As lesões suspeitas foram biopsiadas e encaminhadas ao diagnóstico histopatológico. As citologias processadas de forma manual através do sistema Liqui-Prep®, foram fixadas em álcool etílico a 95% e, posteriormente, coradas pelo método de Papanicolaou. Já as citologias processadas de forma automatizada utilizaram o sistema ThinPrep®. As amostras citológicas foram encaminhadas para o exame de biologia molecular pela técnica de PCR HPV-Nested, desenvolvida pela empresa Exactgene Análise em DNA®, empregando-se 13 tipos de alto risco e 5 de baixo risco. **Resultado** – Dos 80 casos avaliados no método manual e automatizado, respectivamente, os diagnósticos foram: 63 (78,75%) e 52 (65%) foram negativos para lesão intra-epitelial; 6 (7,5%) e 20 (25%) foram insatisfatórios para avaliação; ASC-US foram 9 (11,25%) e 6 (7,5%); LSIL apresentou 1 (1,25%) e 2 (2,5%); e HSIL em 1 (1,25%) e 0 (0%). **Conclusão** - o trabalho mostrou que a citologia feita de forma preventiva contra o câncer anal pode detectar lesões precursoras de malignidade na mucosa anal antes mesmo de qualquer sintoma clínico, possibilitando uma intervenção mais rápida e menos invasiva que nos casos de lesões em estágio mais avançado.

Palavras-Chave: Citologia Anal; Método Manual; Método automatizado.

ABSTRACT

Introduction - The infection of Human Papillomavirus (HPV) is one of the sexually transmissible diseases with the highest incidence and prevalence in the world. . The virus is involved in the carcinogenesis of cancers. Women with a lesion in the genital tract caused by HPV have a higher risk of anal cancer. Microscopic evaluation of anal epithelium plays a important role in precancerous and cancerous lesions. **Objective** - Compare the diagnostic differences obtained through the manual and automated methods for anal cytology samples in liquid based in the characterization of squamous intraepithelial lesions. **Methods** - The collection of anal cytology was performed by cytobrush equipament for Kolplast®. Three slides were made previously silanized per patient. Patients with suspected and positive cases were called for anoscopy. Suspicious lesions were biopsied and sent to the histopathological diagnostic. The manually processed cytology through the Liqui-Prep® system, were fixed in 95% ethyl alcohol and then stained by Papanicolaou method. The automated processed cytology were passed through the ThinPrep® system. The cytological samples were sent for examination of molecular biology by PCR HPV-nested, developed by the company Exactgene Analysis DNA®, employing 13 high-risk types and 5 low risk. **Results** - From the 80 cases evaluated in manual and automated method, respectively, the diagnoses were: 63 (78.75%) and 52 (65%) were negative for intraepithelial lesion; 6 (7.5%) and 20 (25%) were unsatisfactory for evaluation; ASC-US were 9 (11.25%) and 6 (7.5%); LSIL showed 1 (1.25%) and 2 (2.5%); and HSIL in 1 (1.25%) and 0 (0%). **Conclusion** - the study showed that preventive cytology against anal cancer can detect precursor lesions of malignancy in the anal mucosa even before any clinical symptoms, allowing a faster response and less invasive than in cases of lesions in advanced stage.

Keywords: Anal Cytology; Manual method; Automated method.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Representação do Genoma Viral (CARVALHO, 2009).-----	5
Figura 02 – Anatomia do Canal Anal (CHAVES, 2011). -----	9
Figura 03 – ASC-US em Diagnóstico Citológico e em Diagnóstico Histopatológico como LSIL com Coilocitose (Acervo Pessoal). -----	29
Figura 04 - LSIL em Diagnóstico Citológico e em Diagnóstico Histopatológico como Papiloma Escamoso com Presença de Coilocitose (Acervo Pessoal). --	30
Figura 05 - LSIL em Diagnóstico Citológico e em Diagnóstico Histopatológico como Papiloma Escamoso Com Presença de Coilocitose (Acervo Pessoal). -	30
Figura 06 – HSIL em Diagnóstico Citológico e em Diagnóstico Histopatológico como Condiloma Acuminado (Acervo Pessoal). -----	31
Figura 07 - HSIL em Diagnóstico Citológico e em Diagnóstico Histopatológico como Condiloma Acuminado (Acervo Pessoal). -----	31
Figura 08 – Exame Anuscópico com Presença de Condiloma Acuminado (Acervo Pessoal). -----	33
Figura 09 - ASC-US em Diagnóstico Citológico (Acervo Pessoal). -----	36
Figura 10 - LSIL em Diagnóstico Citológico (Acervo Pessoal). -----	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 – Ilustração do Diagnóstico Citológico Realizado no Método Manual nos 80 Casos Estudados. -----	29
Gráfico 02 – Ordem de Coleta Realizada nos 80 Casos Estudados em Método Manual. -----	32
Gráfico 03 – Ilustração do Diagnóstico Citológico Realizado no Método Automatizado nos 80 Casos Estudados. -----	35
Gráfico 04 – Ordem de Coleta Realizada nos 80 Casos Estudados em Método Automatizado. -----	37
Gráfico 05 - Presença de Células de Linha Pectínea nas Amostras Processadas em Método Manual e Automatizado. -----	38
Gráficos 06 - Presença de Células Atípicas nos 2 Tipos de Métodos.-----	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Diagnósticos Citológicos Realizados nos 80 Casos Estudados em Método Manual. -----	28
Tabela 02 – Ordem de Coleta Realizada nos 80 Casos Estudados em Método Manual. -----	32
Tabela 03 - Diagnósticos Citológicos Realizados nos 80 Casos Estudados em Método Automatizado. -----	35
Tabela 04 – Ordem de Coleta Realizada nos 80 Casos Estudados em Método Automatizado. -----	37
Tabela 05 - Presença de Células da Linha Pectínea nas Amostras Processadas em Método Manual e Automatizado. -----	38
Tabela 06 - Presença de Células Atípicas nos 2 Tipos de Métodos.-----	39

LISTA DE ABREVIATURAS

HPV – Papiloma Vírus Humano

DSTs – Doenças Sexualmente Transmissíveis

NIA – Neoplasia Intraepitelial Anal

NIABG – Neoplasia Intraepitelial Anal de Baixo Grau

NIAAG – Neoplasia Intraepitelial Anal de Alto Grau

NILM – Negativo para Lesão Intraepitelial e Malignidade

ASC-US - Atipia Escamosa de Significado Indeterminado

LSIL - Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau

HSIL - Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau

FSIH – Hibridização *in situ* fluorescente

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PCRc – PCR Convencional

PCR-TR - PCR em Tempo Real

Q-PCR - PCR Quantitativa

RT-PCR - PCR por Transcrição Reversa

INCA – Instituto Nacional do Câncer

GSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa Genital

ATG – Sequências de DNA Compreendidas entre um Cordão de Iniciação

ORFs – Open Reading Frames

LCR – Long Control Region

URR – Upper Regulatory Region

NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

Sumário

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. HISTÓRICO	2
1.2. GENOMA DO HPV	3
1.3. CICLO DE VIDA DO HPV	5
1.4. CARCINOGENESE.....	6
1.5. CANAL ANAL.....	8
1.6. FATORES DE RISCO PARA DESENVOLVIMENTO DE LESÕES E NEOPLASIAS EM EPITÉLIO ANAL.....	9
1.7. COMPORTAMENTO E EVOLUÇÃO DE LESÕES INTRAEPITELIAIS ANAIIS	10
1.8. CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS EM CITOLOGIA ANAL.....	11
1.9. CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO	13
1.9.1. Vantagens da Citologia em Meio Líquido	13
1.9.2. Desvantagens da Citologia em Meio Líquido.....	15
1.10. EXAMES COMPLEMENTARES, CONFIRMATÓRIOS E CONCLUSIVOS.....	17
1.10.1. Anuscopia	17
1.10.2. Exame Histopatológico	18
1.10.3. Técnicas de Biologia Molecular	18
2. OBJETIVOS	22

3. METODOLOGIA.....	23
4. RESULTADOS	26
4.1 MANUAL	26
4.2 AUTOMATIZADO.....	34
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO.....	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXO A	49
ANEXO B	51

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é uma das Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs) de maior incidência e prevalência no mundo. O vírus está envolvido na carcinogênese de cânceres de alta prevalência e mortalidade. No colo uterino, vários tipos de HPVs de alto risco são diagnosticados na maioria dos cânceres invasivos (AZEVEDO, 2012 e HOSSNE, 2008).

Diversos tipos de HPV (mais de 200) foram identificados e divididos em dois grupos de acordo com seu potencial carcinogênico: HPVs de alto risco e HPVs de baixo risco. A doença causada pelo HPV pode se manifestar em sua forma proliferativa ou condilomatosa de maneira clínica e subclínica de lesão intraepitelial escamosa genital (GSIL), acometendo colo, vagina, vulva e áreas extragenitais como ânus, boca, laringe e conjuntiva (JACYNTHO, 2005).

Até a década de 70 o câncer anal era considerado raro, mas no período de 1977 a 1986, houve um aumento significativo na quantidade de casos, especialmente entre homens homo e bissexuais, porém a prática do sexo anal receptivo é um importante fator de risco para essa doença em ambos os sexos (JACYNTHO, 2005 e SILVA *et al.*, 2005).

De acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer), no Brasil a incidência de câncer de cólon e ânus, em 2010, foi de aproximadamente 28.110 pessoas, sendo 13.310 homens e 14.800 mulheres. Já nos Estados Unidos a incidência do câncer anal é em média de 8 casos a cada 100.000 indivíduos por ano (CHAVES *et al.*, 2011).

Dos tumores do aparelho digestivo, o câncer anal corresponde a 1,5% e entre 2 e 4% de todos os neoplasmas malignos do intestino grosso. Em portadores de carcinoma anal, a incidência de HPV varia de 35% a 60% na literatura (NADAL e MANZIONE, 2005).

Mulheres com lesões no trato genital causadas pelo HPV ou carcinoma cervical, têm maior risco de câncer anal e de suas lesões precursoras, por isso,

são consideradas grupo de risco para esse tipo de tumor. Entretanto, outros fatores também estão associados, tais como trauma, inflamação local, imunossupressão e tabagismo. Em diversos estudos, as pacientes que além da infecção pelo HPV são HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) positivas têm apresentado uma maior incidência de lesões anais quando comparadas às HIV negativas (CHAVES **et al.**, 2011 e SILVA **et al.**, 2005).

Diversos estudos foram realizados em mulheres que apresentam lesões intraepiteliais cervicais, tentando encontrar a correlação do câncer cervical com o câncer escamoso anal. Muitos deles obtiveram êxito e a grande maioria das amostras analisadas foram positivas para HPV (JACYNTHO, 2005).

O câncer anal é uma doença que pode ser prevenida através de exames preventivos realizados em pessoas que se enquadram nos grupos de risco para essa doença. A citologia anal pode ser classificada como um método de grande potencial para a detecção de neoplasias intraepiteliais, pois é um procedimento simples, indolor e de grande eficácia diagnóstica, pois o vírus modifica a morfologia normal da célula, sendo essas alterações bem expressas nos esfregaços citológicos. A interpretação desses esfregaços pode ser realizada através da classificação de Bethesda reformulada em 2001. Em casos de alterações citológicas, a paciente deve ser encaminhada para a anoscopia com biópsia dirigida para obtenção do diagnóstico final e podem ser adotadas técnicas moleculares complementares para a confirmação da presença do vírus (COUTINHO, 2006; CHAVES, 2011).

1.1. HISTÓRICO

As primeiras descobertas sobre o HPV foram feitas por *Shope e Hurst*, quando observaram a transmissão de papilomas da pele através de um extrato acelular entre uma espécie de coelhos selvagens ao suspeitarem que a doença pudesse ser causada por um vírus (CARVALHO, 2009).

Com a aplicação prévia de alcatrão, *Rous e Kidd* conseguiram infectar coelhos domésticos, na maioria das vezes resistentes ao vírus, reconhecendo

então o HPV como um agente co-carcinogênico de lesões cutâneas invasivas e metastáticas.

No início, os pesquisadores atribuíram a ocorrência da neoplasia cervical ao vírus Herpes Simples tipo 2. O entendimento da etiologia do câncer cervical foi um grande desafio para os cientistas (CAMARA **et al.**, 2008)

Koss e Durfee, em 1956, observaram grandes células pavimentosas, de núcleo aumentado, hipercromático e com grande zona peri-nuclear clara ou “halo” e nomearam essas alterações de atipias coilocíticas (PITOL, 2012).

Com a presença de atipias coilocíticas nos esfregaços, *Koss e Durfee* começaram a correlacionar com anomalias histológicas de lesões pavimentosas semelhantes às verrugas cutâneas. Foram observados coilócitos em papilomas pavimentosos do colo uterino e classificados como condilomas.

Meisels e Fortin, posteriormente, observaram que os coilócitos encontrados em esfregaços cervicais de pacientes com displasias leves, seriam sugestivos de alteração celular provocada pela infecção pelo HPV.

Entre 1974 e 1976, zur Hausen e colaboradores mostraram a importância do HPV na evolução de tumores e, em 1983 e 1984, descobriram que o HPV 16 e o HPV 18, respectivamente, estavam presentes no câncer de colo uterino (CAMARA **et al.**, 2008).

Posteriormente, zur Hausen descobriu que apenas alguns tipos desse vírus causam câncer de colo uterino, pois o HPV é de uma família heterogênea. O primeiro estudo epidemiológico relacionando HPV e câncer cervical foi publicado em 1987.

1.2. GENOMA DO HPV

O HPV é um vírus não envelopado, cujo genoma é composto por dupla cadeia de DNA (Ácido Desoxirribonucleico) circular e é compreendido por um capsídeo viral icosaédrico com 50-55nm de diâmetro composto por 72 capsómeros formados por duas proteínas estruturais, L1 e L2. A proteína L1 corresponde a 90% do conteúdo proteico do vírus. O seu genoma é dividido em uma região não codificante e duas codificantes. As duas regiões codificantes

são formadas por sequências de DNA compreendidas entre um cordão de iniciação (ATG) da tradução e um cordão de terminação. Essas sequências são denominadas *Open Reading Frames (ORFs)* (AGOSTINHO, 2012 e CARVALHO, 2009).

As proteínas de E1 a E8 são chamadas *ORFs* de genes funcionais precoces. Essas proteínas são capazes de codificar proteínas envolvidas na transcrição, replicação, maturação viral e transformação celular (CARVALHO, 2009).

As *ORFs* E1 e E2 codificam proteínas que regulam a replicação do DNA do vírus; sendo que E2 também está relacionada com a transcrição do DNA viral. A proteína E4 desestabiliza as redes de citoqueratina das células, com isso, auxilia a liberação de novas partículas virais na superfície do epitélio. Já as E5, E6 e E7 codificam oncoproteínas responsáveis pela transformação celular acarretada pela infecção viral (PITOL, 2012).

São responsáveis pela produção de proteínas estruturais imprescindíveis para a produção do capsídeo as *ORFs* dos dois genes que se expressam tardiamente, L1 e L2. Entre os diferentes tipos de HPVs, o gene L1 é extremamente conservado, enquanto o gene L2 apresenta mais sequências variáveis, pois é menos conservado (CARVALHO, 2009).

O genoma do HPV ainda contém uma região regulatória, a *Long Control Region (LCR)*, também denominada *Upper Regulatory Region (URR)*. Esta região é responsável pela regulação da expressão e transcrição dos genes virais e também possui sítios de ligação para as proteínas virais E1 e E2 e diversos sítios de ligação para fatores de transcrição celular (PITOL, 2012).

De acordo com a figura 01, podemos observar de maneira ilustrativa a posição das *ORFs* na estrutura total do genoma viral.

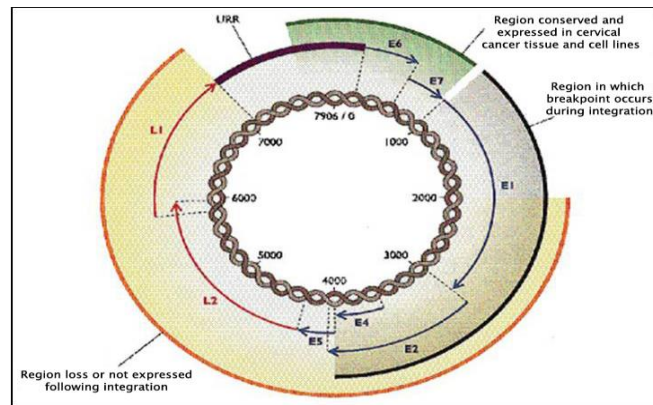


Figura 01 – Representação do Genoma Viral (CARVALHO, 2009)

1.3. CICLO DE VIDA DO HPV

A infecção pelo HPV infecta somente células epiteliais que podem se localizar na pele ou nas mucosas anogenital ou orofaríngea, por isso, o vírus se relaciona fortemente com o tecido epitelial (AGOSTINHO, 2012).

O tipo do vírus é associado ao tipo de lesão que se desenvolve. Por exemplo, em humanos, na maioria das vezes, os HPVs 1, 2 e 4 ocasionam verrugas nas mãos e nos pés. Já os HPVs 6 e 11 estão associados a verrugas genitais e os HPVs 16 e 18 são diagnosticados em lesões intra-epiteliais e em carcinomas de pênis (CAMARA et al., 2008)

Na pele ou mucosas, o início do ciclo biológico dos HPVs ocorre quando as partículas do vírus penetram nas células basais (camada profunda), que ainda possuem atividade mitótica e são células menos diferenciadas do epitélio escamoso. Na mucosa cervical, as partículas virais adentram as células basais com a perda da integridade do epitélio através de micro-traumatismos (CARVALHO, 2009).

O genoma viral atinge o núcleo da célula e se estabelece de forma episossomal quando os vírions perdem o seu invólucro proteico. A partir da infecção da célula pelo vírus, três evoluções são possíveis: a) o sistema imunológico elimina o vírus; b) a infecção permanece de forma latente, onde o DNA viral reside no núcleo e a replicação fica ligada ao ciclo celular e c) a infecção se torna subclínica ou clínica (CORRÊA, 2005).

As infecções ativas clínicas que são representadas pelas verrugas genitais, também denominadas condilomas acuminados. As subclínicas, geralmente associadas aos tipos de HPV de alto risco, responsáveis pelas alterações celulares que podem progredir para neoplasias intraepiteliais, são também chamadas de condilomas planos e visualizadas pelo colposcópico após aplicação de ácido acético (VELA, 2006).

É nos núcleos das células que constituem a camada superficial do epitélio pavimentoso que os vírus adquirem sua completa maturação, sendo esse fenômeno denominado de infecção permissiva. A expressão da infecção permissiva são os coilócitos, pois os seus núcleos possuem grande quantidade de partículas virais maduras (virions). Os vírus não adquirem a sua forma madura na camada profunda do epitélio pavimentoso e nem em outros tipos de epitélio, nesses casos, a detecção do HPV é possível apenas pelo seu DNA (infecção latente) (AGOSTINHO, 2012 e CARVALHO, 2009).

Nas lesões pré-cancerosas e no carcinoma invasivo, existe uma diferença na infecção pelo HPV. Essa diferença ocorre através da não integração ou integração do DNA do vírus no DNA da célula hospedeira.

Nas lesões pré-cancerosas o vírus, na maioria das vezes, não se encontra integrado no DNA das células hospedeiras (episomal), então, realiza o seu ciclo de vida de forma autônoma. Já no carcinoma invasivo, o DNA viral se encontra integrado com o DNA da célula hospedeira, por essa razão, o seu ciclo de vida depende do ciclo de vida das células hospedeiras (AGOSTINHO, 2012).

Uma infecção persistente por um tipo de HPV de alto risco tem grande probabilidade de evolução para o câncer, porém, geralmente, a infecção pelo vírus regride espontaneamente (CARVALHO, 2009).

1.4. CARCINOGENESE

Os tipos de HPV são divididos em subgrupos que infectam a mucosa e os vírus individuais são classificados em alto e baixo risco oncogênico, de acordo com a propensão das células infectadas à evolução maligna. Os tipos

de HPV considerados de baixo risco oncogênico, geralmente associados à lesão intra-epitelial de baixo grau e condilomas acuminados, são os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72, 81. Aqueles considerados de alto risco oncogênico, por estarem geralmente associados às lesões intra-epiteliais de alto grau e às neoplasias invasoras são representados pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82. Cerca de 90% de verrugas genitais são causadas pelos tipos não oncogênicos de HPV 6 ou 11, e cerca de 70% dos cânceres cervicais invasivos pelos tipos de HPV oncogênicos 16 ou 18 (PINTO, TULIO e CRUZ, 2002).

A carcinogênese envolve modificações genéticas e epigenéticas, sendo um processo de diversas etapas que ocasiona a ativação de protooncogenes e/ou inativação dos genes supressores de tumor (AZEVEDO, 2012)

A codificação das proteínas necessárias para a replicação do DNA viral ocorre através das proteínas E1 e E2 do HPV, logo após o primeiro contato do vírus com as células hospedeiras (AGOSTINHO, 2012).

As proteínas transformadoras E6 e E7 são relacionadas ao processo de oncogênese do HPV. Essas proteínas, presentes em HPVs de alto risco, interagem com os genes supressores de tumor, p53 e pRb, respectivamente. Quando os genes supressores sofrem mutações ocorre o aparecimento de tumores, pois esses genes tem como finalidade regular o crescimento celular (HAVRECHAK, 2002).

A p53 tem a função de codificar uma proteína indispensável no controle do ciclo celular. A proteína p53 age nos pontos de controle G1/S e G2/M do ciclo celular, assim, ocorre uma paralisação nesses pontos e, então, possíveis danos no DNA são reparados. Nos HPVs de alto risco a proteína E6 tem grande afinidade com a p53. Essa ligação resulta na rápida degradação da p53 através da via ubiquitina proteossoma. A perda das funções dessa proteína pela degradação promove um aumento da divisão celular, com instabilidade cromossômica e acumulação de várias mutações na célula infectada (ALVES, 2012 e 1).

A função do gene supressor tumoral pRb é controlar a passagem do ciclo celular da fase G1 para a fase S, e o fator de transcrição celular E2F. A

proteína E7 do vírus dissocia a ligação pRb/E2F, com isso, ocorre a degradação da pRb e a liberação do fator de transcrição E2F que passa a ser ativo em todas as fases do ciclo celular, o que explica o encurtamento da fase G1 e o crescimento descontrolado de células tumorais infectadas pelo HPV (AGOSTINHO, 2012 e CORRÊA, 2005).

Alguns estudos demonstraram que a proteína viral E5 também pode ter algumas propriedades oncogênicas, através da inibição da apoptose após lesão no DNA. Porém, à medida que as lesões causadas pela infecção evoluem até o câncer, o DNA do vírus se integra ao DNA da célula hospedeira, e há deleção de uma fração do genoma viral, incluindo a sequência codificadora da E5. Então, essa proteína não é necessária para os processos tardios da oncogênese (ALVES, 2012).

1.5. CANAL ANAL

Este canal apresenta início no ânus ou orifício anal, sendo revestido por pele provida de pêlos e passa a ser recoberto, em direção cranial, por pele desprovida de pêlos até o nível da linha pectínea. O tecido mucoso, denominado também como mucosa retal pode ser encontrada logo acima da linha pectínea. Dessa forma, o canal anal descrito de maneira anatômica começa à altura da linha pectínea e tem como fim o rebordo anal (como representado na Figura 02). Porém, o canal anal cirúrgico inicia-se à altura do anel anorretal (o qual é composto pela alça do músculo puborretal) e termina no rebordo anal. Diversas doenças proctológicas atingem o canal anal acima da linha pectínea. O canal anal ou ânus tem cerca de 5 cm de comprimento e engloba a musculatura responsável pelo controle da evacuação fecal.

O epitélio anal e a cérvix uterina apresentam propriedades embriológicas, histológicas e patológicas semelhantes, devido ao fato de se desenvolverem a partir da membrana embriônica e apresentam sítios de fusão do tecido endodérmico e ectodérmico para formar a junção escamo-colunar (CHAVES, 2011).

Do ponto de vista histológico, na região anal, a camada mucosa forma

uma série de dobras longitudinais, as chamadas colunas retais. Cerca de 2 cm acima da abertura anal, a mucosa intestinal é substituída por epitélio pavimentoso estratificado (JUNQUEIRA E CANEIRO, 2008).

Essas áreas podem apresentar mudanças metaplásicas normais, bem como alterações displásicas principalmente relacionadas à infecção pelo HPV, podendo ser descritas como porta de entrada para o vírus. Dessa maneira, o câncer anal se assemelha em muitos aspectos aos cânceres genitais (CHAVES, 2011).

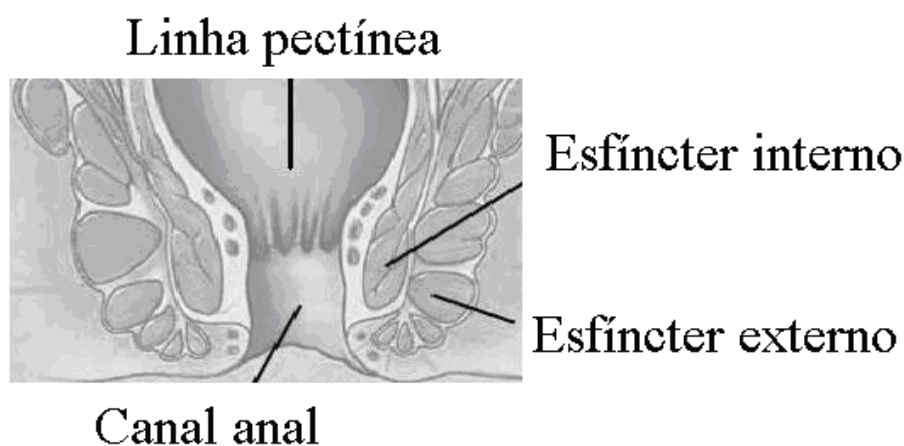


Figura 02 – Anatomia do Canal Anal (CHAVES, 2011).

1.6. FATORES DE RISCO PARA DESENVOLVIMENTO DE LESÕES E NEOPLASIAS EM EPITÉLIO ANAL

Os fatores de risco para o desenvolvimento de lesões e neoplasias em epitélio anal são praticamente os mesmos relacionados à infecção por HPV em qualquer outro tipo de mucosa. Dentre eles, destacam-se: início precoce da atividade sexual, vários parceiros sexuais ao longo da vida, prática de sexo anal receptivo, prática de sexo vaginal e anal sem utilização de meios contraceptivos, contato sexual sem penetração, promiscuidade, tabagista,

baixo nível socioeconômico, uso de anticoncepcional oral por muitos anos, deficiências nutricionais, soropositividade para o HIV, imunodepressão, fases avançadas da infecção pelo HIV, contagem de linfócitos T CD4 inferiores a 500/mm³ e outras infecções genitais causadas por agentes sexualmente transmissíveis, como *Chlamydia trachomatis* e *Herpes simplex vírus* (NONNENMACHER **et al.**, 2011; NADAL **et al.**, 2009; CHAVES **et al.**; 2011).

Além de todos esses fatores, portadores de lesões anais crônicas benignas que cursam com inflamação (hemorróidas, fístulas, fissuras anais), indivíduos transplantados, usuários de drogas injetáveis e influência de fatores genéticos são outros fatores que impõe risco para o acometimento de câncer em epitélio anal (SILVA **et al.**, 2005).

1.7. COMPORTAMENTO E EVOLUÇÃO DE LESÕES INTRAEPITELIAIS ANAIS

As Neoplasias Intraepiteliais Anais de Alto Grau (NIAA) são precursoras do tumor invasivo, em associação com os tipos de HPV de alto risco. O risco de progressão está intimamente relacionado à severidade e o grau de displasia, sabendo-se que quanto mais precoce o diagnóstico e aplicação do tratamento dessas lesões, maior a possibilidade de não progressão para carcinoma (NADAL E MANSIONE, 2005).

A Neoplasia Intraepitelial Anal (NIA) e câncer anal são localizados frequentemente na junção escamo-colunar (linha pectínea). O comportamento e a evolução para carcinoma invasivo no epitélio anal é exatamente o mesmo como quando acometido em cérvix. Se houver infecção por HPV de baixo risco, não existe possibilidade de evolução para lesão de alto grau, e há regressão da lesão nestes casos. Em relação à infecção por HPV de alto risco, existem grandes possibilidades de evolução da displasia para carcinoma *in situ* e até mesmo invasivo, e a possibilidade de regressão espontânea da lesão é muito pequena.

Programas padronizados de rastreamento para prevenção de câncer anal e protocolos de tratamento para NIA estão sendo empregados em pacientes infectados pelo vírus HPV, devido à possibilidade de detecção das lesões precursoras e ao risco do surgimento do tumor anal. Para o diagnóstico de lesão precursora subclínica, a citologia demonstra-se uma ferramenta de grande utilidade e de eficácia semelhante das coletas cervicais, apresentando sensibilidade variando entre 42% a 98% e especificidade entre 38% a 96%.

Os achados mais frequentes nas lesões escamosas intraepiteliais anais (NIA) no exame citológico são: células displásicas, disqueratóticas, aumento da relação nuclear maior que 3 vezes o tamanho do núcleo de uma célula escamosa com padrões morfológicos normais, bi ou multinucleação, hipercromasia nuclear, e presença incomum de coilócitos. Em relação a esfregaços com diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Anal de Baixo grau (NIABG), observa-se maior incidência de células escamosas levemente displásicas, com aumento da relação nuclear em mais que 3 vezes, bi ou multinucleadas, com hipercromasia leve a moderada, e citoplasma queratinizado, podendo haver presença de coilócitos. Na NIAAG, notam-se células com características de displasia moderada a acentuada, aumento da relação nuclear mais que 4 vezes o tamanho do núcleo de uma célula escamosa com padrão morfológico normal, hipercromasia moderada a severa, células com citoplasma disqueratótico, pleomorfismo celular acompanhado do grau da displasia. Quando o resultado da amostra citológica demonstra-se alterado, é indicado a realização da anoscopia com biopsia dirigida (NADAL *et al.*, 2007; NADAL E MANZIONE, 2005).

1.8. CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS EM CITOLOGIA ANAL

As amostras obtidas do epitélio anal podem ser classificadas da mesma maneira que os esfregaços cérvico-vaginais, por meio do Sistema Bethesda criado em 2001. Através dele, pode-se classificar como satisfatória as amostras

que apresentam mais que 10% de células escamosas cobrindo o esfregaço, e a presença ou ausência de células da junção escamo-colunar e glandular devem ser notificadas no laudo. Amostras insatisfatórias são determinadas aquelas que não indicam confiabilidade na identificação de anormalidades epiteliais. São consideradas dessa maneira se houver: falta de identificação do paciente; lâmina quebrada que não possa ser reparada; células escamosas insuficientes (menos de 10% do esfregaço); presença de hemácias em excesso, prejudicando a qualidade do esfregaço; exsudato inflamatório que impossibilita confiabilidade na visualização do esfregaço; má fixação; artefatos; contaminações ou outros componentes que possam prejudicar a visualização e interpretação de aproximadamente 75% ou mais das células epiteliais. Na presença de qualquer anormalidade epitelial de grande importância, a mesma deve ser relatada indiferentemente da abrangência da amostra adequada, dessa forma, se houver a presença de células anormais, a amostra nunca deve ser classificada como “insatisfatória” (SOLOMON E NAYAR, 2004).

A abreviação NILM (Negativo para Lesão Intraepitelial e Malignidade) deve ser usada no diagnóstico de amostras que não apresentam anormalidades epiteliais, mas pode haver a presença de agentes infecciosos.

Em relação às anormalidades das células epiteliais, as lesões são diferenciadas em baixo grau e alto grau. ASC-US (Atipia Escamosa de Significado Indeterminado) pode ser utilizado em amostras onde o padrão de anormalidades celulares eram mais evidentes do que as atribuídas às alterações reativas, mas que, quantitativa ou qualitativamente não asseguravam o diagnóstico e não se podia descartar uma possível lesão. Utiliza-se LSIL (Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau) em casos que indicam infecções causadas por HPV com presença de alterações morfológicas compatíveis com lesão de baixo grau. HSIL (Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau) pode ser utilizado em amostras que indicam também infecções causadas por HPV, porém com presença de alterações morfológicas compatíveis com lesão de alto grau (SOLOMON E NAYAR, 2004).

Carcinoma Escamoso Invasor deve ser atribuído às lesões que apresentam alterações que, em comparação com HSIL, excedem as assim classificadas, com presença de diáteses e células tumorais.

1.9. CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO

A primeira metodologia a ser lançada foi o ThinPrep® Pap test (Cytic Corporation), aprovado pelo Food and Drug Administration em 1996, como um teste que poderia substituir a citologia convencional. O uso do THINPREP® PAP TEST em estudos de populações diferentes tem resultado em um aumento significativo na detecção de lesão intraepitelial de baixo grau e lesão intraepitelial de alto grau e melhorado a adequabilidade da amostra quando comparado à citologia convencional (CARPENTER & DAVEY, 1999; WEINTRAUB & MORABIA, 2000). Três anos depois, outro método denominado AutoCyte PREPTM (TriPath Imaging) foi também aprovado pelo Food and Drug Administration, e numerosos estudos publicados comparando esta técnica e o THINPREP® PAP TEST com o método convencional geralmente têm indicado um aumento na detecção de lesões intraepiteliais escamosas com o uso da citologia em meio líquido (BAKER, 2002).

1.9.1. Vantagens da Citologia em Meio Líquido

Na citologia em meio líquido, há maior possibilidade de uniformidade da amostra, uma vez que esta é transferida para a lâmina de maneira randomizada (MCGOOGAN, 1998). Além disso, virtualmente, todas as células colhidas podem estar presentes na amostra a ser examinada, ou seja, parte da amostra coletada não permanece retida na espátula, como pode acontecer na citologia convencional. MCGOOGAN (1998) descreve que, a princípio, é um método mais oneroso para o laboratório e também para a paciente; mas, este

aumento no custo pode ser contrabalanceado com a redução do número de exames repetidos, além do encaminhamento desnecessário de pacientes para a colposcopia. Segundo BOLICK & HELLMAN (1998), a longo prazo, este método terá um impacto positivo de custo através da redução na morbidade e mortalidade, na redução de visitas repetidas aos consultórios médicos devido à má preparação do espécime ou diagnóstico equivocado. Outra vantagem relatada por BUR et al. (1995) é a diminuição do tempo gasto com o escrutínio dos esfregaços, provavelmente devido à redução da área observada e da disposição das células. Diversos trabalhos (TEZUKA et al., 1996; LINDER & ZAHNISER, 1997; BOLICK & HELLMAN, 1998) têm comparado a eficácia da citologia em meio líquido com a citologia convencional demonstrando que a detecção de ASCUS, LIEBG ou lesão mais grave é maior na citologia em meio líquido, resultando em maior precisão no diagnóstico das lesões epiteliais precursoras e neoplásicas do colo uterino. WEINTRAUB & MORABIA (2000) encontraram uma chance 2,2 vezes maior de a citologia em meio líquido diagnosticar lesões do que a citologia convencional. por outro lado, a eficácia no diagnóstico de alterações inflamatórias é reduzida, uma vez que a área de leitura na lâmina é menor, com menor número de leucócitos, hemácias e de microorganismos (TEZUKA et al., 1996). Comparando 10.694 amostras de células em suspensão com 39.408 esfregaços convencionais, BOLICK & HELLMAN (1998) demonstraram que o novo método aumenta em mais de duas vezes o número de casos corretamente diagnosticados como LESÃO intra-epitelial e que a relação ASCUS/LESÃO INTRA-EPITELIAL é reduzida em 55%. Segundo GUIDOS & SELVAGGI (1999), o THINPREP® PAP TEST mostra um aumento de 70% na detecção de casos indeterminados quando comparada com a citologia convencional; a taxa de ASCUS/LESÃO INTRA-EPITELIAL para o grupo do THINPREP® PAP TEST (0.73%) foi 54% menor do que o grupo do método convencional (1,57%). A adequação do espécime está significativamente aumentada em relação à citologia convencional. CARPENTER & DAVEY (1999), em um estudo realizado comparando 2.727 THINPREP® PAP TEST com 5.000 esfregaços convencionais, encontraram um aumento de 80% para 89,2% em relação à adequabilidade total da amostra

com a implementação da citologia em meio líquido, com melhora de 11,5%. Os autores relatam uma diminuição na taxa de "satisfatório porém limitado" de 46%, e isto provavelmente é devido à diminuição da presença de fatores obscuros. Além de potencialmente diminuir a taxa de casos falsos negativos, as células em meio líquido permitem testes adicionais, como a pesquisa de HPV através de diversos métodos moleculares, tais como a PCR e captura híbrida (LINDER & ZAHNISER, 1997; PEYTON et al., 1998, WEINTRAUB & MORABIA, 2000).

1.9.2. Desvantagens da Citologia em Meio Líquido

MCGOOGAN (1998) descreveu que a avaliação de preparados citológicos em meio líquido requer familiaridade com muitos parâmetros morfológicos diferentes da citologia convencional. Além de sugerir também que os colhedores devem receber treinamento apropriado para coletar a amostra cervical, garantindo que toda a JEC foi atingida, bem como parte da ectocervice e endocervice. Alguns estudos recentes indicam que a transferência de células do instrumento de coleta para o líquido pode ser variável e incompleto. Este processo crítico de transferência de células requer mais estudos, pois este processo foi creditado como um dos grandes benefícios em relação ao método convencional (BAANDRUP, 2000). Outro fator observado foi a ausência de componentes da junção escamo-colunar quando se realizava a citologia em meio líquido. CARPENTER & DAVEY (1999) relataram que a taxa de amostras satisfatórias, porém limitadas por ausência de elementos da JEC, foi maior na THINPREP® PAP TEST do que na citologia convencional (9,8% versus 5,5%). MCGOOGAN (1998) avaliou que a citologia em meio líquido apresenta custo superior ao método convencional, podendo ser este um dos principais fatores que impeçam sua utilização na rotina de um laboratório. Em um estudo de metanálise realizado por ABULAFIA et al. (2003) foram avaliados dez trabalhos (de 1995 a 2001) que comparavam a citologia convencional com a citologia em meio líquido em termos de

sensibilidade e especificidade, considerando o resultado de biópsia como padrão-ouro. Foi observada uma grande variação de sensibilidade (de 50 a 90%) entre os estudos para ambos os métodos, com uma sensibilidade total maior (76%) na citologia em meio líquido do que na citologia convencional (68%). A citologia em meio líquido também foi mais específica (86%) que a citologia convencional (79%), com especificidade variando de 80 a 90%. Na comparação de ambos métodos citológicos, a literatura tem relatado dois tipos de estudo: split-sample (amostras pareadas) e direct-to-vial (coletas separadas). No estudo do tipo split-sample, as duas citologias são colhidas da paciente em um mesmo momento. No outro, são avaliadas amostras de dois grupos distintos de pacientes (um de citologia convencional e o outro, citologia em meio líquido). Segundo BERNSTEIN et al. (2001), com a coleta de amostras pareadas pode ocorrer uma diminuição potencial da transferência de células suficientemente necessárias para se realizar um diagnóstico correto. Apesar dos estudos do tipo direct-to-vial serem incapazes de comparar diretamente amostras da mesma paciente, têm indicado uma melhora estatisticamente significativa na detecção de células endocervicais. Em um estudo do tipo split-sample realizado por HUTCHINSON et al. (1999), foram avaliadas a sensibilidade e a especificidade dos dois métodos citológicos. A citologia em meio líquido se mostrou mais sensível (55,6%) que a citologia convencional (44,3%). Entretanto, a especificidade da citologia convencional foi ligeiramente maior (98%) que a da em meio líquido (93%), mas pôde-se observar que ambos os métodos são bastante específicos. Alguns autores também relatam uma superioridade da sensibilidade da citologia em meio líquido em relação à citologia convencional, em estudos realizados a partir da análise de amostras de pacientes diferentes (GUIDOS & SELVAGGI, 1999; VASSILAKOS et al., 2000; WEINTRAUB & MORABIA, 2000; BAKER, 2002).

1.10. EXAMES COMPLEMENTARES, CONFIRMATÓRIOS E CONCLUSIVOS

A avaliação microscópica dos esfregaços provenientes de epitélio anal desempenha papel fundamental na detecção e rastreamento de lesões pré-cancerosas e cancerosas, porém não pode ser denominada como diagnóstico confirmatório, devido ao fato de que realizada de maneira isolada não apresenta acurácia para detectar lesões de alto grau em doentes com condilomas anais, tendo sensibilidade de 42% e especificidade de 96%. Um fato que justifica esses dados está presente na realização da técnica de coleta do material, além da maneira pela qual é realizada a fixação do esfregaço, variando de acordo com a conduta adotada por cada profissional, o preenchimento correto da requisição, a coloração e a técnica empregada para a sua realização. Outro fato marcante que caracteriza esses dados é a maneira pela qual deve ser interpretado os esfregaços, uma vez que as lesões instaladas em células escamosas provenientes do epitélio anal são muito mais sutis do que as apresentadas em células escamosas provenientes do epitélio cérvico-vaginal, sendo necessário maior preparo, treino e qualificação do observador (KOSS E GOMPEL, 2006; NADAL E MANZIONE, 2006).

Dessa maneira, existe a necessidade da realização de alguns exames complementares e confirmatórios na presença de diagnóstico suspeito ou positivo em citologia anal. Os métodos indicados para essa confirmação são: Anuscopia com Biópsia dirigida na presença da lesão em fase subclínica e clínica, e diagnóstico por biologia molecular.

1.10.1. Anuscopia

O exame anuscópico consiste em examinar o canal anal e a região perianal (perianuscopia) com a utilização de um anuscópio, colposcópio ou outro aparelho que permita o aumento da imagem, com o objetivo de identificar

e classificar novas lesões HPV-induzidas no canal anal, diante de doença-HPV anogenital (JACYNTHO, 2005).

Essa técnica consiste em introduzir uma gaze embebida em solução de ácido acético a 4% e observar em aumento de 6 a 40 vezes com o auxílio do equipamento de ampliação de imagem, a Linha Pectínea, epitélio colunar e escamoso do canal anal, na tentativa de localizar displasias. Pode ser realizado também o teste de Schiller da mesma forma que realizado na colposcopia, na tentativa de encontrar áreas sugestivas de neoplasia intraepitelial. Ao localizar a área, elas serão biopsiadas após infiltração de anestesia local e então submetidas ao diagnóstico histopatológico para confirmação de lesão.

1.10.2. Exame Histopatológico

O exame histopatológico é considerado padrão ouro para diagnóstico de neoplasia intraepitelial, por representar a margem de comprometimento e o grau de displasia presente no tecido. Ele sempre deve ser realizado em casos de citologias ou colposcopias anormais. A partir do momento em que as alterações celulares e o grau de desarranjo se tornam mais intensos, ocorre o comprometimento progressivo de mais camadas do epitélio e as células malignas tendem a invadir o tecido conjuntivo, podendo então ser assim diagnosticado o carcinoma invasor.

1.10.3. Técnicas de Biologia Molecular

Outra forma muito efetiva de diagnóstico para verificar a presença do vírus HPV se faz através de técnicas de biologia molecular. Existem alguns métodos de aplicação, como a Captura Híbrida, Hibridização *in Situ* e através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Entre eles, a Captura Híbrida é o método molecular mais utilizado para a detecção de HPV (NADAL E MANZIONE, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Esta metodologia baseia-se na hibridização de DNA, fazendo uso de sondas específicas contra os tipos de HPV no qual deseja-se pesquisar. Utiliza-se uma microplaca e solução hibridizadora que contém anticorpos monoclonais para captura com amplificação de sinal, sendo que a presença do vírus é detectada pela quimioluminescência. O material contendo DNA hibridiza-se com o coquetel de sonda específico de RNAHPV, assim ocorre a formação de híbridos RNA/DNA, que são capturados sobre a superfície da microplaca sensibilizada com anticorpos específicos para os híbridos RNA/DNA. Os híbridos imobilizados reagem com a fosfatase alcalina conjugada com anticorpos específicos para híbridos RNA/DNA e são detectados por quimioluminescência ultra-sensível. Os valores lidos por um quimioluminômetro são transmitidos a um computador, dotado de software específico, que analisa os números recebidos e faz os cálculos de validação do ensaio e a quantificação dos controles positivos, negativos e amostras. Os testes de captura híbrida são ao mesmo tempo qualitativos e quantitativos. (RODRIGUES **et al.**, 2009; CARMO, 2007).

A Hibridização *in Situ* é uma técnica baseada na detecção de pequenos segmentos de DNA ou RNA através de preparados citológicos ou em cortes de tecido, utilizando-se uma sequência complementar de ácidos nucleicos marcados com sondas. Sob condições apropriadas, ocorre a hibridização (através do estabelecimento de pontes de hidrogênio) da sonda com a sequência-alvo do DNA viral, que pode ser visualizada através de marcadores fluorescentes ou radioativos, que são ligados às sondas permitindo a detecção e localização de sequências de ácidos nucleicos do HPV proveniente no material analisado. NA técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FSIH) são empregadas sondas marcadas com fluorescentes para cromossomos específicos, que permite a análise de anomalias numéricas dos cromossomos durante a interfase do ciclo celular, sendo o mais utilizado nos dias de hoje por não utilizar marcação radioativa (KOSS, 2006; CARMO, 2007).

A PCR é um teste de alta sensibilidade e de grande utilidade em pesquisas para comprovar a existência ou ausência do DNA do HPV. Pode ser considerada a metodologia mais específica e sensível na detecção dos

genomas virais (quando comparados com outras metodologias) para identificação do DNA do HPV nos diversos tipos de materiais clínicos, porém, devido à alta sensibilidade do método, podem ocorrer resultados falso-positivos, ocasionados por contaminação do ambiente de trabalho por DNA amplificado. A PCR consiste na amplificação específica de segmentos do DNA alvo e tem potencial para a detecção de níveis muito baixos de carga viral em células e tecidos (NADAL E MANZIONE, 2006; CASTRO *et al.*, 2009; CARMO, 2007).

A detecção por PCR pode ser considerada qualitativa e quantitativa. Qualitativa, pois indica a presença do microorganismo em questão e quantitativa, pois pode avaliar a quantidade de material genético em uma amostra biológica. Através dessa técnica, é possível detectar e identificar o material genômico dos HPVs, o que permite saber se o vírus é de alto ou baixo risco oncogênico. Assim, o diagnóstico por PCR representa um complemento importante aos diagnósticos cito-histopatológicos e colposcópicos (CARMO, 2007).

Esta técnica é executada por inteira *in vitro*, sem o uso de células, possibilitando a síntese de fragmentos de DNA, usando a enzima Taq DNA polimerase. Quando um par de oligonucleotídeos (iniciadores) se liga ao DNA alvo, a enzima Taq DNA polimerase sintetiza uma sequência complementar de DNA, a partir da extremidade 3' OH livre do primer. Os iniciadores definem a sequência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência de DNA com bilhões de cópias. São necessários os sistemas iniciadores (primers), de sequências conservadas da região L do HPV, sendo os mais utilizados os iniciadores consensus MY09-MY11 e GP5-GP6. As sondas mais utilizadas para a pesquisa de HPV são: TaqMan® e Molecular Beacons e o corante intercalante SYBR® Green. Os produtos amplificados por PCR podem ser clivados através das enzimas de restrição e os fragmentos obtidos são comparados para identificação do subtipo viral, o que permite classificar o grau do vírus presente. (CARMO, 2007; BRINGHENTI, 2010; CASTRO *et al.*, 2009).

Existem algumas modificações da técnica de PCRc (PCR Convencional) que podem ser aplicadas para a identificação do vírus em mucosa anal, sendo as principais: a PCR-TR (PCR em Tempo Real) , Q-PCR (PCR quantitativa), RT-PCR (PCR por Transcrição Reversa), e a PCR Multiplex (CARMO, 2007).

A PCR em tempo real (PCR-TR) é uma variação da PCRc que permite distinguir as sequências de bases amplificadas de DNA por análise da temperatura de separação das duplas fitas, e, como as reações ocorrem em ambiente fechado, diminui a ocorrência de contaminações. Além disso, o uso de *primers* universais permite, teoricamente, a detecção de todos os tipos de HPV's existentes (RODRIGUES **et al.**, 2009).

Pensando-se em detecção de HPV, a Q-PCR promove uma análise qualitativa e quantitativa, o que permite a estimativa da carga viral de uma amostra biológica. Esta técnica difere da PCR convencional por utilizar sondas marcadas com fluoróforos que emitem uma fluorescência durante as amplificações, e o sinal é detectado por um laser do termociclador. O resultado pode ser visualizado em monitor. Essa variação realiza a quantificação dos ácidos nucleicos de modo precisa e com grande reprodutibilidade. Possibilita maior facilidade na quantificação, maior sensibilidade, precisão, reprodutibilidade, e maior velocidade na análise.

O PCR apresenta vantagens em relação aos demais testes moleculares disponíveis, pois enquanto nos outros métodos o poder de detecção é de no máximo uma partícula viral em cada 10 células normais, a PCR é capaz de detectar 1 partícula viral em cada 1000 células, além de permitir verificar infecções por múltiplos tipos e avaliar o risco oncogênico da população viral infectante.

Mesmo com todas as vantagens que o diagnóstico molecular oferece, todos eles apresentam características intrínsecas particulares que podem conduzir a resultados falsos (CARMO, 2007).

2. OBJETIVOS

- Comparar as diferenças diagnósticas obtidas através dos métodos manual e automatizado em amostras de citologia anal em meio líquido na caracterização de lesões intraepiteliais escamosas;
- Comparar a adequabilidade da amostra nos dois métodos abordados;
- Associar a prevalência das lesões nos diferentes métodos em relação à presença do HPV através da biologia molecular;
- Procurar evidenciar alguma importância na ordem de coleta aplicada aos diferentes métodos.

3. METODOLOGIA

Após a avaliação e autorização da Comissão Científica e do Comitê de Ética e Pesquisa, o presente estudo foi realizado. Este desempenhou-se na coleta de citologia anal de 80 pacientes usuárias do Hospital do Servidor Público do Estado de São Paulo Francisco Morato de Oliveira com histórico prévio de lesão cervical induzida por HPV em trato genital feminino inferior no período de outubro de 2010 a novembro de 2012, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) referente à pesquisa (VIDE ANEXO A).

A técnica de coleta de citologia anal foi realizada através de meio citológico líquido utilizando a escova Cytobrush da Kolplast® que foi introduzida, aproximadamente cinco centímetros, no orifício anal e retirada com movimentos de rotação e após isso, o material colhido juntamente com a escova é então depositado dentro do frasco contendo álcool 95% da marca Liqui-Prep®, homogeneizado e conservado em temperatura ambiente para posterior processamento técnico. Em relação ao processamento do material, este foi realizado por técnica manual. Primeiramente, por meio de um vortex, o frasco contendo o material em meio líquido coletado foi agitado. Após isso, 5 mL do líquido foi transferido para um tubo cônico fornecido pelo kit e centrifugado por 5 minutos a duas mil rotações por minuto em centrífuga Baby 1 modelo 2006-BL marca FANEM®. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso. Adicionou-se duzentos microlitros de solução fisiológica estéril, agitando-se novamente em vortex. Dessa solução, foi transferido duas gotas por meio de uma pipeta Pasteur para um tubo de ensaio de 5 mL. Foi acrescentando ao tubo de ensaio duzentos microlitros de aderente celular líquido, agitando-se novamente com o vortex. Foram confeccionadas três lâminas de microscopia previamente silanizadas por meio de duas gotas, utilizando-se a mesma pipeta Pasteur sobre a superfície central das lâminas previamente identificadas com as iniciais da paciente e número de registro das pacientes de acordo com a ordem de serviço das citologias anais.

As lâminas foram submetidas ao processo de secagem em temperatura ambiente por vinte e quatro horas, e depois transferidas para uma cubeta contendo álcool etílico 95% durante quarenta e oito horas e, após esse processo, coradas pelo método de Papanicolaou.

Após o processo de coleta e técnica de processamento das amostras, as lâminas contendo os esfregaços foram encaminhadas para a análise microscópica para o citologista, o qual identificou a quantidade, qualidade e origem celular, classificando-as de acordo com o Sistema de Bethesda adotado em 2001.

Após o resultado da avaliação citológica, as pacientes com casos suspeitos e positivos para malignidade foram convocadas para a “Anuscopia Magnificada”. A “Anuscopia Magnificada” consiste em examinar o canal anal e a região perianal por meio de um anuscópio, com a finalidade de aumentar o campo visual e identificar lesões displásicas, sendo estas biopsiadas.

A técnica foi realizada introduzindo-se o anuscópio no canal anal juntamente a uma gaze umedecida com solução de ácido acético 4%. O anuscópio foi retirado por três minutos e após este período reintroduzido. A gaze foi retirada e com um aumento de seis a quarenta vezes observou-se a Linha Pectínea do epitélio colunar do reto inferior para o epitélio escamoso do canal anal, procurando-se lesões que se comportavam da mesma forma que as localizadas na cérvix uterina. Este procedimento foi mais enriquecido através do teste de Schiller, por meio de aplicação de solução iodo-iodetada. As lesões suspeitas foram biopsiadas após aplicação anestésica local e encaminhadas ao diagnóstico histopatológico.

As citologias processadas de forma manual foram fixadas em álcool etílico a 95% e, posteriormente, coradas pelo método de Papanicolaou (GOMPEL & KOSS,1997).

Já as citologias processadas de forma automatizada utilizaram o sistema ThinPrep®. Esta técnica tem como princípio transferir o meio líquido com o material celular coletado para uma lâmina, com propriedade de preservar as

estruturas morfológicas e as moleculares, como as proteínas e os ácidos nucléicos.

Para a preparação da lâmina citológica, o material é submetido a três processos dispersão, coleta das células e transferência das células. Para fazer a dispersão das células o filtro do ThinPrep gira dentro do frasco de amostra criando uma corrente em que o fluido é suficientemente forte para separar detritos e dispersar muco, mas suave o suficiente para não ter nenhum efeito adverso na aparência das células, já para fazer a coleta da células utiliza-se um vácuo suave que é criada dentro do ThinPrep, esse vácuo recolhe células na superfície exterior da membrana. Esse processo é controlado pelo Software do ThinPrep para controlar a taxa de fluido que atravessa o filtro ThinPrep. Após as células serem recolhidas pela membrana começa o último processo, a transferência das células para a lâmina, começa invertendo o filtro Thinprep suavemente e pressionado contra a lâmina de vidro. As células ficam fixadas, pois existe uma atração natural e um leve ar com pressão positiva resultando em uma distribuição de células numa área circular definida. Esta lâmina foi corada pelo próprio método automatizado para finalizar todo o processo. (ThinPrep,2000)

Após a realização de todos esses procedimentos, as amostras citológicas foram encaminhadas para o exame de biologia molecular pela técnica de PCR HPV- Nested, desenvolvida pela empresa Exactgene Análise em DNA®. Os 18 tipos de HPV detectados e genotipados foram: de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66,e 68) e de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44).

4. RESULTADOS

4.1 MANUAL

Dos oitenta casos avaliados no diagnóstico citológico, 63 deles (78,75%) foram diagnosticados como negativo para lesão intra-epitelial (NIL); 6 foram insatisfatórios para avaliação, representando 7,5% das amostras; Atipia Escamosa Intraepitelial de Significado Indeterminado (ASC-US) em 9 casos, sendo representando por (11,25%), Lesão Intra-Epitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL) apresentou 1 caso (1,25%) e Lesão Intra-Epitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) em 1 caso, sendo ele 1,25%, conforme representado na tabela 01 e ilustrado no gráfico 01.

Dessas pacientes, 11 (13,75%) apresentaram atipias celulares no diagnóstico citológico, sendo ASC-US (conforme visualização na Figura 03), 04 e 05) em 9 casos, representando 81,9%; LSIL em 1 caso (Figuras 04 e 05), representando 9,1%; HSIL em 1 caso (Figuras 06 e 07), representando 9,1% das amostras. Dessas 11 pacientes, 8 (72,73%) apresentaram lesões induzidas pelo vírus HPV na anosscopia e posteriormente confirmadas no diagnóstico histopatológico das biópsias coletadas. 3 pacientes (27,27%) não apresentaram lesões no diagnóstico histopatológico. Entre os casos positivos, houveram 5 casos de Papiloma Escamoso com Coilocitose (62,5%), 1 caso de LSIL (12,5%), 1 caso de LSIL com Coilocitose (12,5%) e 1 caso de Condiloma Acuminado (12,5%).

Das lesões presentes no diagnóstico citológico comparadas às lesões encontradas no diagnóstico histopatológico, houve 3 casos de ASC-US em diagnóstico citológico e ausência de lesão em diagnóstico histopatológico, representando 33,33%. Casos de ASC-US no diagnóstico citológico com presença de LSIL em diagnóstico histopatológico foi afirmado em 1, representando 11,11%. ASC-US em exame citológico e LSIL com presença de Coilocitose no diagnóstico histopatológico foi de 1 caso (11,11%). Pacientes com diagnóstico de ASC-US em diagnóstico citológico e Papiloma Escamoso com Coilocitose em diagnóstico histopatológico foram de 4 pacientes (44,44%).

Em relação ao diagnóstico de LSIL na citologia, o resultado histopatológico foi de Papiloma Escamoso com Coilocitose, sendo 100% dos casos. Já no caso de HSIL em citologia, o resultado histopatológico foi de Condiloma Acuminado, sendo também de 100%.

O exame de biologia molecular foi aplicado em todas as pacientes estudadas, tendo a presença de HPVs 6/11 em 8 casos, representando 10% do total de amostras; presença de HPV 43 em 4 amostras, sendo estes 5% das amostras e presença de HPVs 35/16 em 1 caso(1,25%). Em relação aos casos que apresentaram resultados negativos na citologia anal, 8 casos foram detectados positivos na biologia molecular pelo método de PCR, sendo que esses foram encaminhados para a o diagnóstico anuscópico (Figura 08), detectadas lesões em 2 casos e realizado o diagnóstico histopatológico nessas pacientes, sendo detectada lesão intraepitelial de baixo grau em 1 caso.

Comparando o diagnóstico citológico com o diagnóstico de biologia molecular, dos 11 casos suspeitos e positivos, 4 casos foram detectados com a presença do vírus HPV (36,36%) e 7 casos não houveram a presença do vírus (63,63%). Em relação aos casos de ASC-US, 7 casos apresentaram ausência do vírus no PCR (77,77%) e 2 casos apresentaram a presença de HPVs de Baixo Risco Oncogênico do tipo 6 e 11 (22,22%). No caso de LSIL diagnosticado na citologia foram encontrados HPVs de Baixo Risco Oncogênico do tipo 6 e 11 no PCR, sendo em 100%; e no caso de HSIL diagnosticado na citologia foram encontrados HPVs de Baixo Risco Oncogênico do tipo 6 e 11 no PCR, sendo também de 100%.

Comparando o diagnóstico histopatológico com o diagnóstico de biologia molecular, sabendo-se da presença de 8 casos com lesão e 3 com ausência de lesão no diagnóstico histopatológico, houveram 5 casos de Papiloma Escamoso com Coilocitose, sendo desses 3 com ausência do vírus no diagnóstico de biologia molecular (60%) e 2 com presença de HPVs de Baixo Risco Oncogênico do tipo 6 e 11 (40%). Em relação ao caso de LSIL confirmado na histopatologia, o diagnóstico do PCR foi negativo para a presença do vírus. O caso de LSIL com Coilocitose obteve diagnóstico positivo para a presença de HPVs de Baixo Risco Oncogênico do tipo 6 e 11 no PCR

(100%). No condiloma Acuminado houve a presença de HPVs de Baixo Risco Oncogênico do tipo 6 e 11 no PCR (100%).

Comparando o diagnóstico citológico, com o diagnóstico histopatológico e o de biologia molecular, houve 3 casos com a presença de ASC-US em diagnóstico citológico, Papiloma Escamoso com Coilocitose no diagnóstico histopatológico e PCR negativo, representando 27, 27%; 3 casos de ASC-US na citologia, ausência de lesão no diagnóstico histopatológico e negativo no PCR, representando também 27, 27%; houve 1 caso com ASC-US na citologia, LSIL na histopatologia e negativo no PCR, representando 9,1%; 1 caso de ASC-US na citologia, Papiloma Escamoso com Coilocitose e PCR positivo para a presença de HPVs 6/11 de Baixo Risco Oncogênico, representando 9,1%; 1 caso com presença de LSIL em exame citológico, Papiloma Escamoso com Coilocitose na histopatologia e presença de HPVs 6/11 de Baixo Risco Oncogênico, representando 9,1%; 1 caso de ASC-US em exame citológico, LSIL com coilocitose em exame histopatológico e presença de HPVs 6/11 de Baixo Risco Oncogênico, representando 9,1%; 1 caso de HSIL na análise citológica, condiloma acuminado em diagnóstico histopatológico e presença de HPVs 6/11 de Baixo Risco Oncogênico, representando também 9,1%.

Tabela 01 – Diagnósticos Citológicos Realizados nos 80 Casos Estudados em método manual.

Citológico	%	Casos
Insatisfatórias	7,50%	6 Casos
Negativo para Lesão Intraepitelial	78,75%	63 Casos
ASC-US	11,25%	9 Casos
LSIL	1,25%	1 Caso
HSIL	1,25%	1 Caso

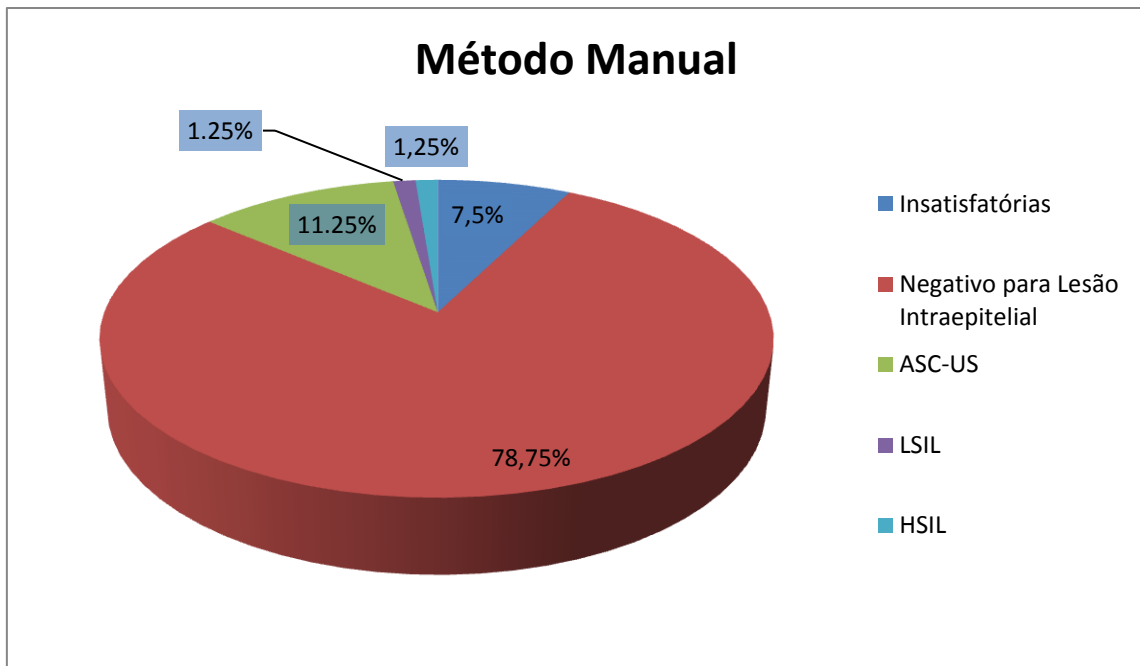


Gráfico 01 – Ilustração do Diagnóstico Citológico Realizado no Método Manual nos 80 Casos Estudados.

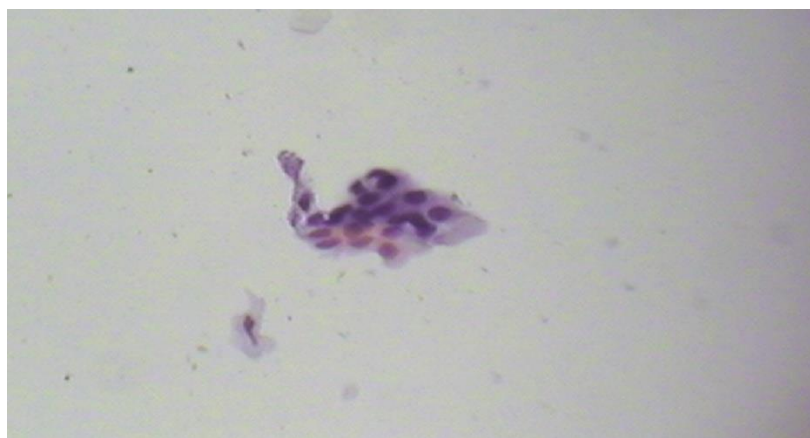


Figura 03 – ASC-US em Diagnóstico Citológico e em Diagnóstico Histopatológico como LSIL com Coilocitose (Acervo Pessoal).

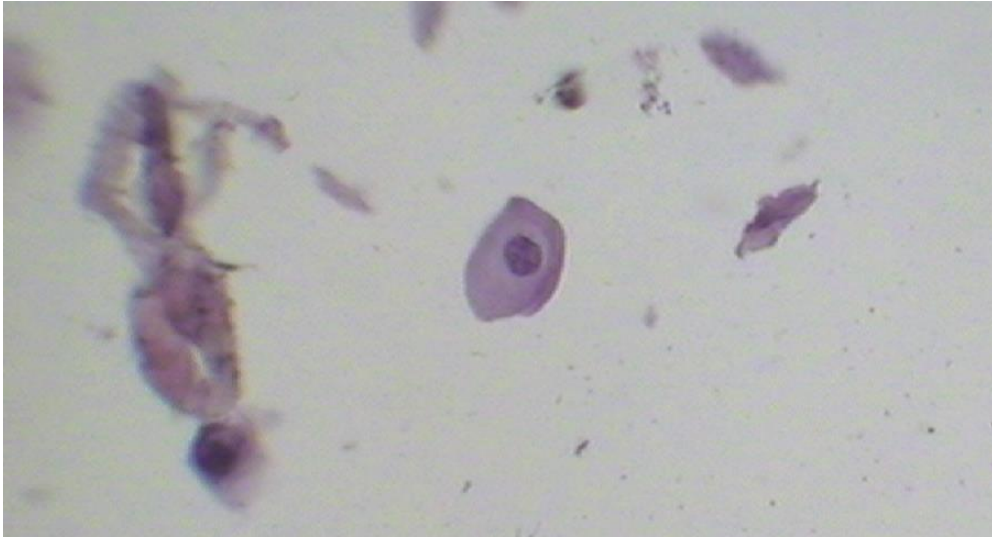


Figura 04 – LSIL em Diagnóstico Citológico e em Diagnóstico Histopatológico como Papiloma Escamoso com Presença de Coilocitose (Acervo Pessoal).

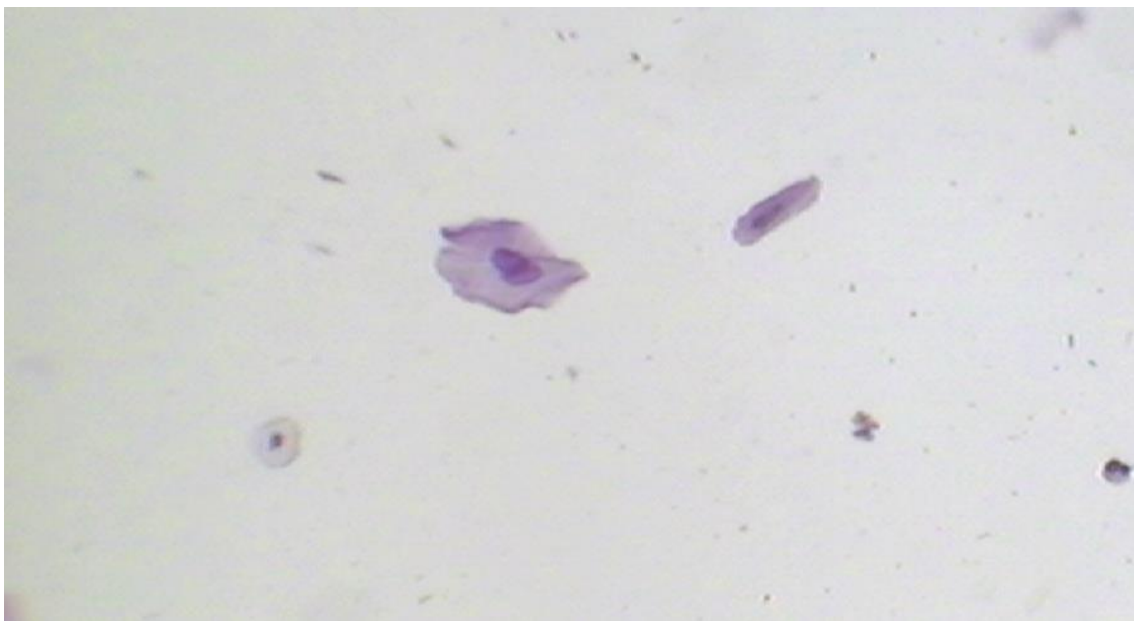


Figura 05 – LSIL em Diagnóstico Citológico e em Diagnóstico Histopatológico como Papiloma Escamoso com Presença de Coilocitose (Acervo Pessoal).

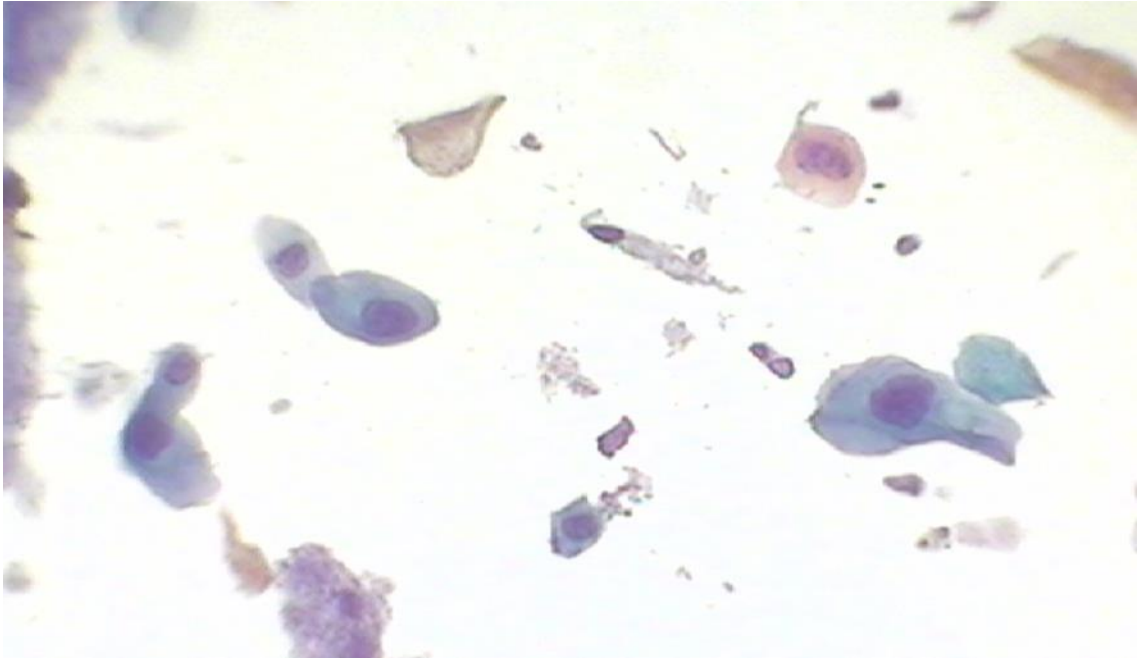


Figura 06 – HSIL em Diagnóstico Citológico e em Diagnóstico Histopatológico como Condiloma Acuminado (Acervo Pessoal).

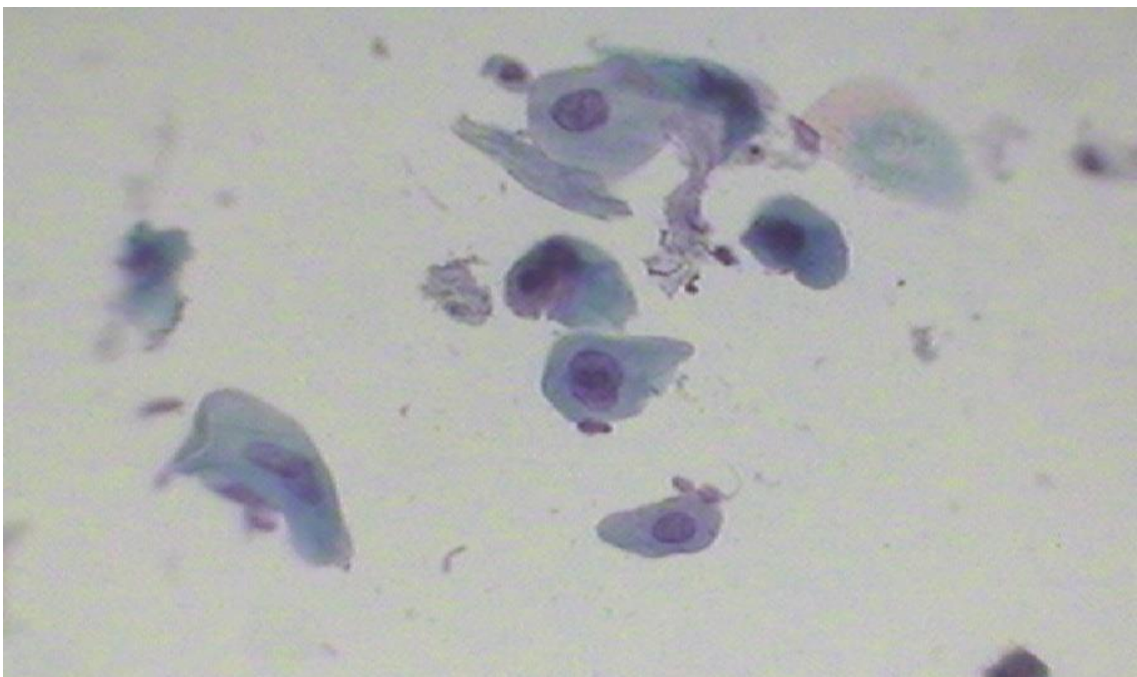


Figura 07 – HSIL em Diagnóstico Citológico e em Diagnóstico Histopatológico como Condiloma Acuminado (Acervo Pessoal).

A tabela 02 e o gráfico 02 expressam a ordem de coleta realizada nos 80 casos estudados através do método manual.

Tabela 02 – Ordem de Coleta Realizada nos 80 Casos Estudados em Método Manual.

Ordem de coleta	1°	2°
Insatisfatórias	2	4
Negativo para Lesão Intraepitelial	29	35
ASC-US	5	3
LSIL	1	0
HSIL	0	1

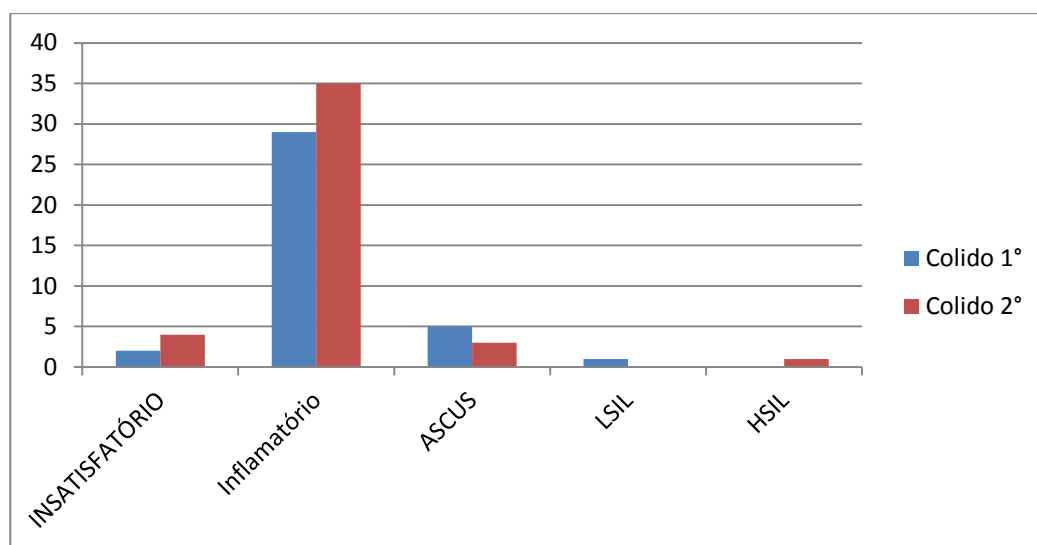


Gráfico 02 – Ordem de Coleta Realizada nos 80 Casos Estudados em Método Manual.



Figura 08 – Exame Anuscópico com Presença de Condiloma Acuminado (Acervo Pessoal).

4.2 AUTOMATIZADO

Dos oitenta casos avaliados no diagnóstico citológico, 52 deles (65%) foram diagnosticados como negativo para lesão intra-epitelial (NIL); 20 foram insatisfatórios para avaliação, representando 25% das amostras; Atipia Escamosa Intraepitelial de Significado Indeterminado (ASC-US) em 6 casos, sendo representando por (7,5%), Lesão Intra-Epitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL) apresentou 2 casos (2,5%) e Lesão Intra-Epitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) em nenhum caso, conforme representado na Tabela 03 e ilustrado no Gráfico 03.

Dessas pacientes, 8 (10%) apresentaram atipias celulares no diagnóstico citológico, sendo ASC-US em 6 casos (Figura 09), representando 75%; LSIL em 2 casos (Figura 10), representando 25%. 5 pacientes (62,5%) não apresentaram lesões no diagnóstico histopatológico. 2 casos de LSIL com Coilocitose (25%) e 1 caso de Condiloma Acuminado (12,5%).

Das lesões presentes no diagnóstico citológico comparadas às lesões encontradas no diagnóstico histopatológico, houve 4 casos de ASC-US em diagnóstico citológico e ausência de lesão em diagnóstico histopatológico, representando 50%. Casos de ASC-US no diagnóstico citológico com presença de LSIL em diagnóstico histopatológico foi afirmado em 2, representando 25%. Pacientes com diagnóstico de LSIL em diagnóstico citológico e condiloma acuminado foram de 4 pacientes (50%).

Comparando o diagnóstico citológico com o diagnóstico de biologia molecular, dos 8 casos suspeitos e positivos, 2 casos foram detectados com a presença do vírus HPV (25%) e em 6 casos não houve a presença do vírus (75%). Em relação aos casos de ASC-US, nenhum caso apresentou o vírus no PCR e 2 casos apresentaram HPVs de Baixo Risco Oncogênico do tipo 6 e 11 (22,22%). Nos 2 casos de LSIL diagnosticado na citologia foram encontrados HPVs de Baixo Risco Oncogênico do tipo 6 e 11 no PCR, sendo em 25%.

Tabela 03 - Diagnósticos Citológicos Realizados nos 80 Casos Estudados em Método Automatizado.

Citológico	%	Casos
Insatisfatórias	25%	20 Casos
Negativo para Lesão Intraepitelial	65%	52 Casos
ASC-US	7,5%	6 Casos
LSIL	2,5%	2 Caso
HSIL	0 %	0 Caso

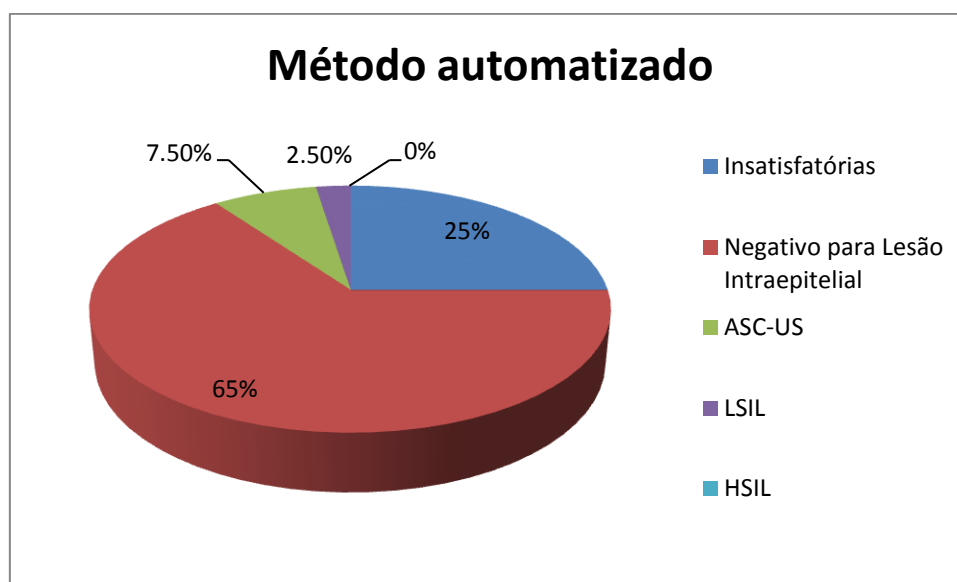


Gráfico 03 – Ilustração do Diagnóstico Citológico Realizado no Método Automatizado nos 80 Casos Estudados.

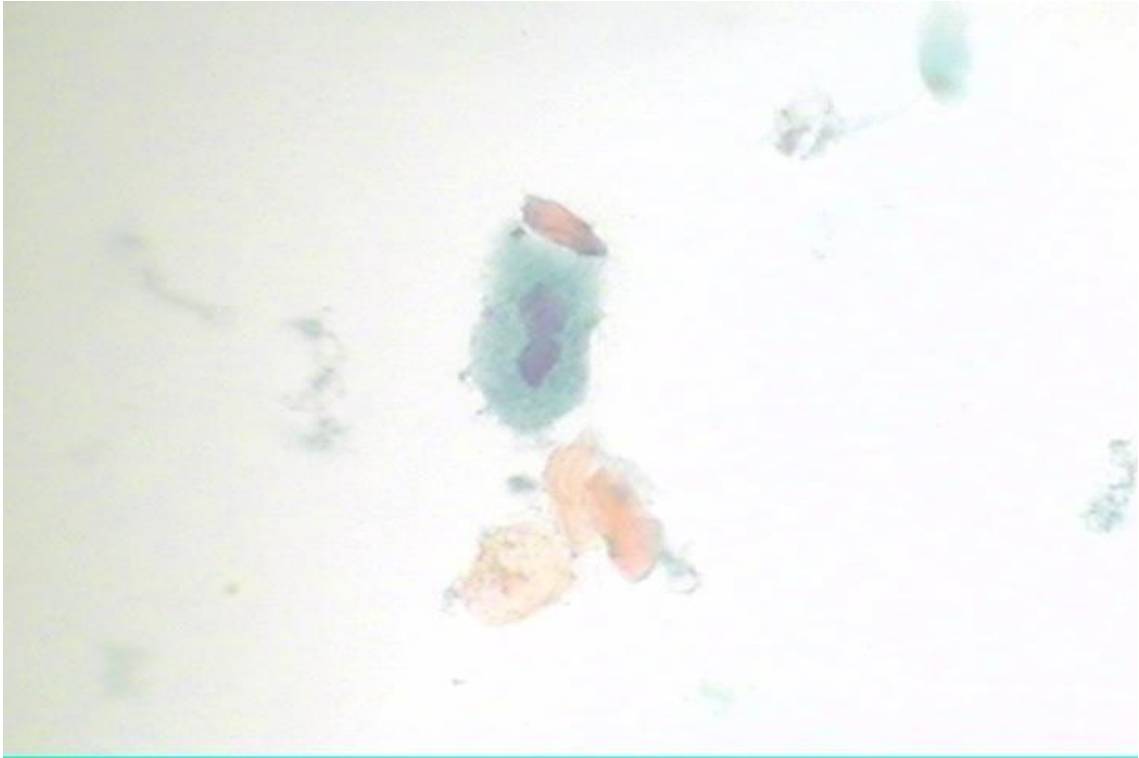


Figura 09 - ASC-US em Diagnóstico Citológico (Acervo Pessoal).

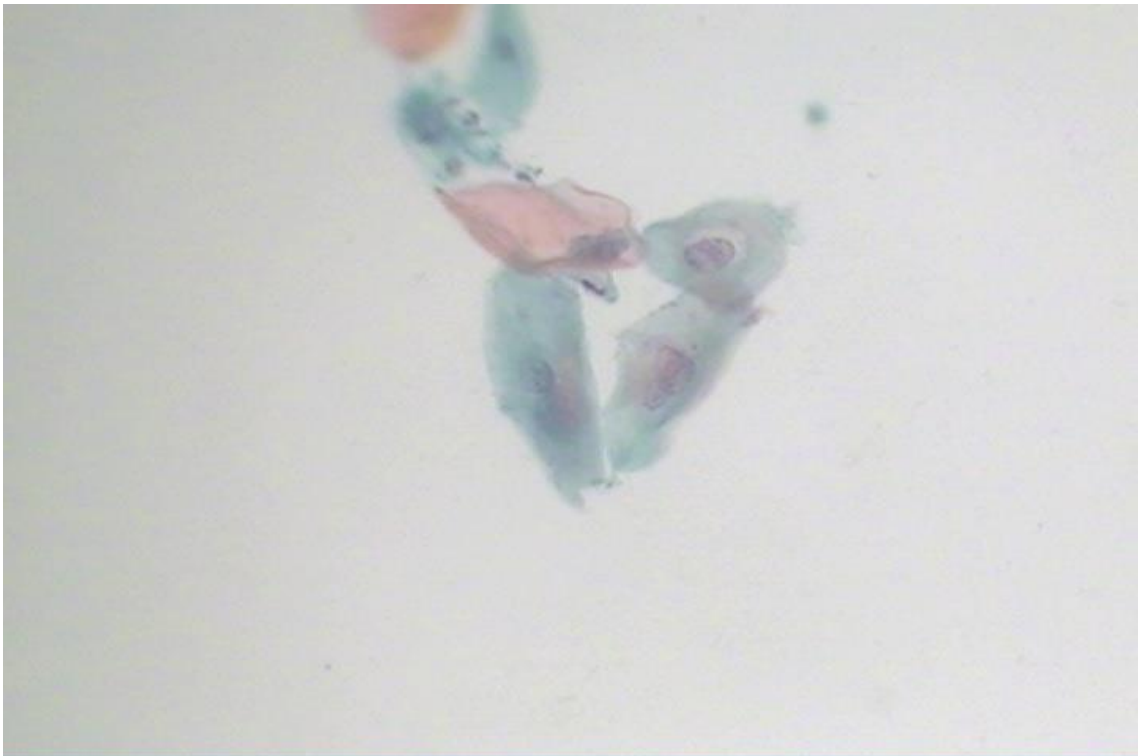


Figura 10 - LSIL em Diagnóstico Citológico (Acervo Pessoal).

A Tabela 04 e o Gráfico 04 expressam a ordem de coleta realizada nos 80 casos estudados através do método automatizado.

Tabela 04 – Ordem de Coleta Realizada nos 80 Casos Estudados em Método Automatizado.

Ordem de coleta	1°	2°
Insatisfatórias	10	10
Negativo para Lesão Intraepitelial	28	24
ASC-US	1	5
LSIL	1	1
HSIL	0	0

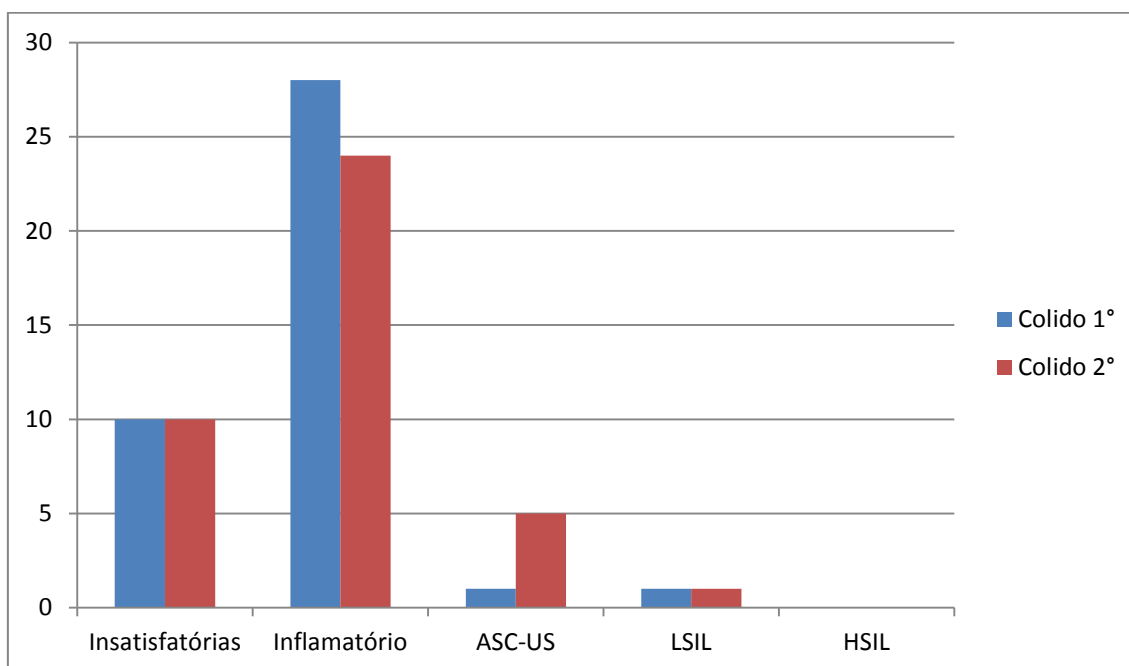


Gráfico 04 – Ordem de Coleta Realizada nos 80 Casos Estudados em Método Automatizado.

A Tabela 05 e o Gráfico 05 expressam a representatividade da Linha Pectínea nos métodos abordados.

Tabela 05 - Presença de Células da Linha Pectínea nas Amostras Processadas em Método Manual e Automatizado.

	Manual	Automatizado
Cel.Metaplásicas	48	55
Cel.Glandulares	54	55

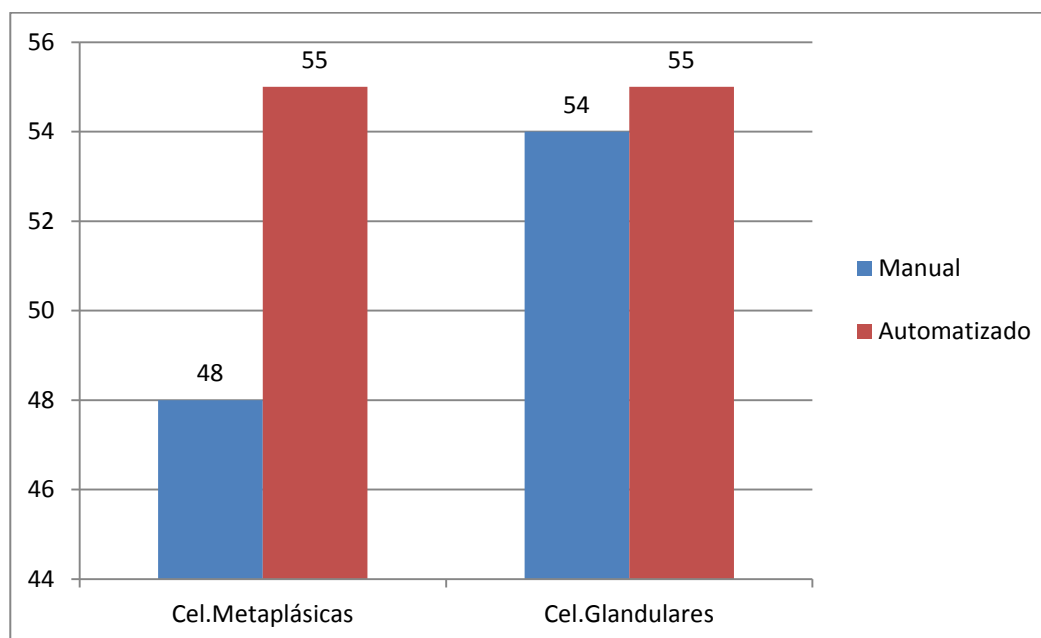
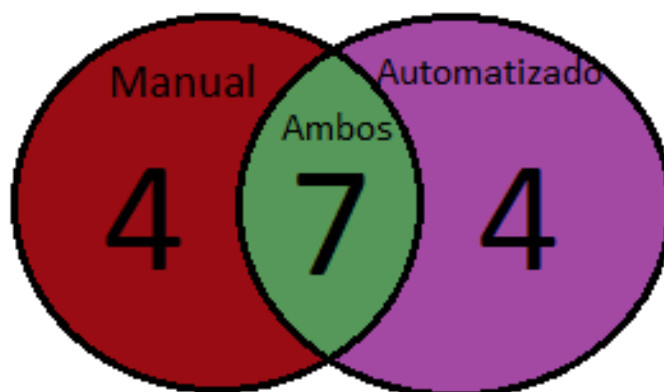


Gráfico 05 - Presença de Células da Linha Pectínea nas Amostras Processadas em Método Manual e Automatizado.

A Tabela 06 e o Gráfico 06 representam a concordância e discordância de atipias em ambos os métodos abordados

Tabela 06 - Presença de Células Atípicas nos 2 Tipos de Métodos.

Método	Casos
Manual	11
Automatizado	11
Ambos	7



Gráficos 06 - de Células Atípicas nos 2 Tipos de Métodos.

5. DISCUSSÃO

Como já descrito anteriormente 80 pacientes foram estudadas nos dois métodos em destaque, porém houve algumas pequenas discordâncias diagnósticas, como nos casos com diagnósticos de insatisfatório que no método manual foram 6 casos e no automatizado 25 casos, pois como LINDER J, 1997, comenta em seu trabalho o método automatizado por apresentar maior sensibilidade em materiais coletados de regiões que apresentem maior dificuldade de coleta, podem sofrer dificuldades ao processamento.

Porém, em casos com citologia suspeita ou positiva as diferenças foram pequenas, 11 casos no manual contra 8 no automatizado. Isso demonstra que ambos os métodos apresentam uma sensibilidade similar (maior que 90% para ambos) (NASCIMENTO M, 2010).

Já em relação à presença das células representativas da linha pectínea, houve uma diferença entre o método manual e automatizado, estando as células metaplásicas mais presentes no automatizado, devido ao método automatizado excluir o erro humano e deixar a padronização mais fidedigna (Manual ThinPrep, 2000).

As discordâncias que ocorreram entre os métodos, manual e automatizado, podem indicar que apesar de apresentar sensibilidade e especificidade altas e próximas uma da outra, esses métodos apresentam características próprias. Estudos mostram que mesmo se a amostra for a mesma, processadas com métodos diferentes, pode haver pequenas divergências sobre o resultado final (BAKER JJ, 2002).

6. CONCLUSÃO

A citologia anal feita anualmente como outros exames para rastreamento do câncer anal pode ser um grande feito na prevenção do câncer. Pois por ser um método simples e de baixa invasão, promove um menor desconforto e uma melhor aceitação. Porém o preconceito por trás desse exame ainda é grande no Brasil, mas sabemos que a aceitação deste exame depende de esclarecimento muito bem descrito pelo profissional de saúde que irá fazer a coleta para que haja um conhecimento e uma aceitação maior perante a população.

O exame citológico anal preventivo para a análise do câncer anal deve ser feito anualmente por pacientes que já tiveram relações sexuais anais, não importando o sexo do paciente.

Após a descoberta de uma possível lesão anal, realizar exames confirmatórios, sendo eles: Anuscopia com posterior coleta de biópsia para realização de exame Histopatológico e realização de exames de Biologia Molecular para conclusão da presença do vírus HPV.

A escolha do método que será utilizado para a realização deste exame também não tem muita importância, pois o trabalho mostrou que não há muitas diferenças entre eles, mas cada tipo de método apresenta suas peculiaridades distintas.

De maneira geral, o trabalho mostrou que a citologia feita de forma preventiva contra o câncer anal pode detectar lesões precursoras malignas na mucosa anal antes mesmo de qualquer sintoma clínico, possibilitando uma intervenção mais rápida e menos invasiva do que quando se detecta uma lesão mais avançada. Sabendo-se que o HPV é o principal agente causador desses carcinomas, mulheres com lesões intraepiteliais cervicais anteriores, recorrentes e constantes que também são causadas pelo mesmo vírus, estão mais suscetíveis a adquirir o câncer anal.

Por isso, a citologia é citada na literatura científica como um método de diagnóstico em termos de prevenção de lesões precursoras e malignas da mucosa anal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABULAFIA. O;PEZZULLO. J.C.;SHERER. D.M.; Performace of Thinprep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey. Gynecol. Oncol., v. 90, p. 137-144, 2003.

AGOSTINHO, Maria Isabel Rodrigues. **Conhecimentos dos jovens universitários sobre HPV e cancro do colo do útero, na era da vacina.** 2012. 116 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade do Porto, Porto, 2012.

ALVES, Alice Manuela Santos. **EGFR, HPV e lesões displásicas do colo do útero.** 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade do Porto, Porto, 2012.

AZEVEDO, Ana Emília Borges. **Papilomavírus humano (HPV) e sua associação com alterações citológicas no seguimento precoce de pacientes com câncer de colo uterino invasivo tratado.** 2012. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

BAKER, J.J. Conventional and liquid-based cervicovaginal cytology: a comparison study with clinical and histologic follow-up. Diagn. Cytopathol., v. 27, p. 185-188, 2002.

BERNSTEIN, S.J.; SANCHEZ-RAMOS, L.; NDUBISI, B. Liquid-based cervical cytologic smear study and conventional Papanicolaou smears: a metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. Am. J. Obstet. Gynecol., v. 185, p. 308-317, 2001.

BOLICK, D. R.; HELLMAN, D.J. Laboratory implementation and efficacy assessment of the ThinPrep® Cervical Cancer Screening System. Acta Cytol., v. 42, p. 209-213, 1998.

BRINGHENTI, Márcia Elena; DOZZA, Ticiana; DOZZA, Tiago; MARTINS, Toni Ricardo; BAZZO, Maria Luiza. Prevenção do Câncer Cervical: Associação da Citologia Oncótica a Novas Técnicas de Biologia Molecular na Detecção do Papilomavírus Humano (HPV). **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. 2010; 22(3): 135-140.

CAMARA, Geni N. N. de Lima; CRUZ, Márcio Roja; VERAS, Verônica Sales e MARTINS, Cláudia Renata. Os papilomasvírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas Ciências da Saúde**, Brasília, v. 1, p. 149-158, 2008.

CARMO, Bianca Bianco. **Estudo comparativo entre a citologia convencional e a citologia em meio líquido na detecção de lesões escamosas intra-epiteliais e invasoras do colo uterino associadas à infecção pelo papiloma vírus humano**. Belo Horizonte Faculdade de Farmácia da UFMG, 2004.

CARMO, Emily Francini Silva; FIORINI, Adriana. Principais Técnicas Moleculares Para Detecção do Papiloma Vírus Humano. **Revista de Saúde e Biologia SaBios**. 2007; 2(1): 29-31.

CARPENTER, A.B.; DAVEY, D.D. ThinPrep® Pap Test. *Cancer Cytopathol.*, v. 87, p. 105-112, 1999.

CARVALHO, Cristina Maria Dias. O Vírus do Papiloma Humano e o Cancro do Colo do Útero: U Estudo Observacional Entre a Citologia em Meio Líquido e o Teste de Detecção de HPV por PCR. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade do Porto, Porto, 2009.

CASTRO, Therezita Maria Peixoto Patury Galvão; FILHO, Ivo Bussoloti; NASCIMENTO, Velber Xavier; XAVIER, Sandra Doria. Detecção de HPV na mucosa oral e genital pela técnica PCR em mulheres com diagnóstico histopatológico positivo para HPV genital. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. 2009; 75(2): 167-71

CHAVES, Eunice Beatriz Martin; CAPP, Edilson; CORLETA, Helena van Eye; FOLGIERINI, Heloísa. A Citologia na Prevenção do Câncer Anal. **Revista Feminina**. 2011(11): 532-537.

CORRÊA, Gilson José. **Prevalência do Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres portadoras de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau e**

carcinoma epidermóide invasor do colo uterino. 2005. 85 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas) – Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2005)

COUTINHO, José Ricardo Hildebrandt. Rastreamento de lesões pré-neoplásicas do ânus. Citologia anal e anoscopia de alta resolução novas armas para a prevenção. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões.** 2006;33(5):311-317.

DAUMAS, Flávio Silveira; CABRAL, Adriana; GUIMARÃES, Celso Rômulo Barbosa; LIBERATO, Erica. Citologia Anal Como Método de Rastreamento Para a Detecção Precoce do Câncer Anal: Esfregaços com Algodão Hidrófilo São Mesmo Insatisfatórios? **Acta Cir Bras. [serial online].** 2005.

FILHO, Paulo Mário Brasil de Góis. Comparação entre Citologia. **Colposcopia e Histopatologia no Diagnóstico do Câncer do Colo do Útero em um Serviço Público de Saúde de Pernambuco.** 2010. 42f. Monografia (Especialização em Citologia Clínica) – Universidade Paulista e Centro de Consultoria Educacional, Recife, 2010

GUIDOS, B.J.; SELVAGGI, S.M. Use of the ThinPrep® Pap Test in clinical practice. *Diag. Cytopathol.* , v. 20, p. 70-73, 1999.

HAVRECHAK, Gisele Cristina. **O Papiloma Vírus Humano (HPV) e sua influência no câncer do colo do útero.** 2002. 46 f. Monografia (Licenciado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2002.

HOLOGIC, INC. ThinPrep® 2000 Processor. MARLBOROUGH, MA, USA: HOLOGIC, INC, 2000. 284p.

HOSSNE, Rogério Saad. Prevalência de Papiloma Vírus perianal assintomático em pacientes portadores de HPV genital tratados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. **Revista Brasileira de Coloproctologia,** Botucatu, v. 28, p.223-226, 2008.

HUTCHINSON, M.L.; ZAHNISER, D.J.; SHERMAN, M.E.; HERRERO, R.; ALFARO, R.; BRATTI, M.C.; HILDESHEIM, A.; LORINCZ, A.T.; GREENBERG, M.D.; MORALES, J.; SCHIFFMAN, M. Utility of liquid-based cytology for cervical screening. *Cancer Cytopathol.*, v. 87, p. 48-55, 1999.

JACYNTHO, Cláudia Márcia de Azevedo. **Prevalência de Lesão Intra-Epitelial Escamosa Anal em Mulheres com Lesão Intra-Epitelial Escamosa Anal**. 2005.129f.Dissertação (Doutorado em Tocoginecologia)-Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005

JUNQUEIRA, Luis Carlos; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOSS, LEOPOLD; GAMPEL, CLAUDE. **Introdução à Citopatologia Ginecológica: Com Correlações Histológicas e Clínicas**. São Paulo: Rocca, 2006.

LINDER, J.; ZAHNISER, D. The ThinPrep® Pap test – a review of clinical studies. *Acta Cytol.*, v. 41, p. 30-38, 1997.

MCGOOGAN, E. Cell preparation methods and criteria for sample adequacy. *Acta Cytol.*, v. 42, p. 25-32, 1998.

NADAL, Sidney Roberto; CALORE, Edenilson Eduardo; HORTA, Sérgio Henrique Couto; MANZIONE, Carmen Ruth. Citologia Anal para Rastreamento de Lesões Pré-Neoplásicas. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 2007; 53(2).

NADAL, Sidney Roberto; CALORE, Edenilson Eduardo; MANZIONE, Carmen Ruth; ARRUDA, Cibelle Nunes; CHA, Jonathan Doyun; FORMIGA, Fernanda Bellotti; MANZIONE, Thiago Silveira. Sensibilidade e Especificidade da Citologia Anal com Escova no Diagnóstico das Lesões Clínicas Provocadas pelo Papilomavírus Humano, Comparando Uma com Duas Coletas. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. 2009; 29(3): 297-302.

NADAL, Sidney Roberto; MANZIONE, Carmen Ruth. A Citologia Como Método Para Detecção de Lesões Precursoras do Carcinoma Anal. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. 2005; 25(1): 72-74.

NADAL, Sidney Roberto; MANZIONE, Carmen Ruth. Manejo dos Portadores das Neoplasias Intraepiteliais Anais. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. 2008; 28(4): 462-464.

NADAL, Sidney Roberto; MANZIONE, Carmen Ruth. Papilomavírus Humano e o Câncer Anal. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. 2006; 26(2): 204-207.

NONNENMACHER, Bernadete; BREITENBACH, Vanessa; VILLA, Luisa Lina; PROLLA, João Carlos; BOZZETTI, Mary Clarisse. Identificação do Papilomavírus Humano Por Biologia Molecular em Mulheres Assintomáticas. **Revista de Saúde Pública**. 2002(1): 95-100.

PEYTON, C.L.; SCHIFFMAN, M.; LORINCZ, A.T.; HUNT, W.C.; MIELZYNSKA, I.; BRATTI, C.; EATON, S.; HILDESHEIM, A.; MORERA, L.A.; RODRIGUEZ, A.C.; HERRERO, R.; SHERMAN, M.E.; WHEELER, C. M. Comparison of PCR- and hybridBAANDRUP, U. Sampling, sampling errors and specimen preparation. *Acta Cytol.*, v. 44, p. 944-948, 2002.

PINTO, Álvaro; TULIO, Siomara; CRUZ, Olívia Russo. Co- fatores dos HPV na oncogênese cervical. **Revista Associação Médica Brasileira**. 2002;48:73-78.

PITOL, Bruna Caroline Vieira. **Análise da expressão das proteínas p16, p53 e L1/HPV nas lesões intraepiteliais cervicais**. 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2012.

RODRIGUES, Adriana Dalpicolli; CANTENERELLI, Vlademir Vicente; FRANTZ, Miriam Alice; PILGER, Diogo André; PEREIRA, Fabiana de Souza. Comparação das Técnicas de Captura de Híbridos e PCR para a Detecção de HPV em Amostras Clínicas. **Revista Brasileira de Patologia e Medicina Laboratorial**. 2009; 45(6): 457-462.

SILVA, Ivan Tramuja da Costa; GIMENEZ, Felicidad Santos; GUIMARÃES, Ricardo Alexandre Golçalves; CAMELO, Romildo Torres; MELO, Manoel Nilzomar Damasceno; BARROS, Flávio Silveira; DAUMAS, Adriana; CABRAL, Celso Rômulo Barbosa e GUIMARÃES, Érica Liberato. Citologia anal como método de rastreamento para a detecção precoce do câncer anal: esfregaços com algodão hidrófilo são mesmo insatisfatórios? **Acta Cirúrgica Brasileira**. 2005; 20(1):109-1014.

SOLOMON, D.; NAYAR, R. **Sistema Bethesda para Citologia Cérvicovaginal**: Definições, critérios e notas explicativas. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. 192p.

TEZUKA, F.; OIKAWA, H.; SHUKI, H.; HIGASHIIWAI, H. Diagnostic efficacy and validity of the ThinPrep method in cervical cytology. *Acta Cytol.*, v. 40, p. 513-518, 1996.

Vassilakos P¹, Schwartz D, de Marval F, Yousfi L, Broquet G, Mathez-Loic F, Campana A, Major A. Biopsy-based comparison of liquid-based, thin-layer preparations to conventional Pap smears. **J Reprod Med.** 2000 Jan;45(1):11-6.

VELA, Rodrigo Alessandro Riemma. **Relação de infectividade entre Papilomavírus humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* em gestantes com lesões genitais sugestivas de doença HPV induzida.** 2006. 53 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

WEINTRAUB, J.; MORABIA, A. Efficacy of a liquid-based thin layer method for cervical cancer screening in a population with a low incidence of cervical cancer. *Diag. Cytopathol.*, v. 22, p. 52-59, 2000.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____Prontuário_____, abaixo-assinada:

Gostaria de convidá-la para participar do projeto de pesquisa, intitulado: "Avaliação da prevalência de citologia anal anormal em pacientes portadoras de infecção pelo HPV no trato genital inferior".

O objetivo deste estudo é avaliar a presença de lesões (verrugas, alterações pré- malignas ou malignas causadas pelo HPV no ânus e reto, através da coleta de citologia, testes de biologia molecular (testes que avaliam a presença do DNA do vírus HPV, que serão colhidos com a introdução de um cotonete e uma escovinha de cerdas macias no ânus, na profundidade de +/- 3 cm) e posteriormente anoscopia(avaliação da mucosa anal através da introdução de aparelho que permite a visualização da parte interna do ânus), no caso da citologia ou algum teste de biologia molecular mostrarem alterações importantes. O exame poderá causar um leve desconforto e caso seja necessário o exame de anoscopia o desconforto poderá ser um pouco maior. No caso de alguma alteração ser detectada você será encaminhada para o setor de proctologia para tratamento.

Entendi as explicações e tive a oportunidade de fazer todas as perguntas que considerei necessárias, relativas a este estudo obtendo respostas totalmente satisfatórias, fui informada que meus dados serão armazenados no mais estrito sigilo e que sou absolutamente livre para retirar-me do estudo a qualquer momento sem que isto afete a condução do meu tratamento.

Em caso de dúvida posso entrar em contato com o Dr. Ilzo Vianna Junior através do telefone 45738085 ou pessoalmente, todas as manhãs, no ambulatório de colposcopia. Referente à ética do trabalho pode tirar as dúvidas através do telefone 45738175.

Li cuidadosamente e entendi todo este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e concordo em participar do estudo clínico acima citado.

Data: ____/____/____

Assinatura do paciente: _____

Eu atesto que expliquei à paciente a natureza e o objetivo do estudo supracitado.


Data: ____/____/____

Assinatura do investigador: _____

ANEXO B

PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Subprojeto do trabalho intitulado como “Avaliar a prevalência de citologia anal anormal em portadores de infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) no trato genital inferior”, nº 0029.0.388.000-11 do comitê de ética


 SECRETARIA DE GESTÃO PÚBLICA
INSTITUTO DE ASSISTÊNCIA MÉDICA AO SERVIDOR PÚBLICO ESTADUAL
Comitê de Ética em Pesquisa - Rua Pedro de Toledo, 1800 - 3º andar - SL 343 - SP
Fones: 5086-8175/5088-8147 - FAX: 5088-8175 - e-mail: cepiamspe@sp.gov.br

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa aprova sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que se encontra registrado e arquivado junto ao CEP/IIAMSPE sob o nº **029/11**.

Ref.: “Avaliar a prevalência de citologia anal anormal em portadores de infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) no trato genital inferior”.

Pesquisador responsável: Ilzo Vianna Junior
Serviço: CEDEP e Ginecologia
Folha de Rosto: 413101 CAAE: 0029.0.388.000-11
São Paulo, 30 de agosto de 2011.


Dr. Roberto Dantas Queiroz
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
IIAMSPE