

# O IMPACTO DO DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DE ATIPIAS INDETERMINADAS NO SISTEMA PÚBLICO DE SAÚDE

*THE IMPACT OF CYTOLOGICAL DIAGNOSIS OF UNDETERMINED ATYPIAS IN PUBLIC HEALTH SYSTEM*

Sônia MM Pereira<sup>1</sup>, Luzia SU Yamamoto<sup>1</sup>, Celso di Loreto<sup>1</sup>, Luciana A Silva<sup>1</sup>,  
Sérgio Makabe<sup>3</sup>, José A Marques<sup>3</sup>, Marina YS Maeda<sup>1</sup>, Carmen L Santoro<sup>3</sup>,  
Maria Lúcia Utagawa<sup>1</sup>, Adhemar Longatto Filho<sup>1,2</sup>

## RESUMO

**Introdução:** as alterações citológicas de significado indeterminado representam uma importante limitação diagnóstica nos programas de rastreio de lesões cervico-vaginais. A introdução de métodos biomoleculares, como o sistema de captura híbrida para detecção de HPV de alto risco contribui para a otimização da conduta clínica dessas pacientes, indicando colposcopia com precisão. **Objetivo:** avaliar o significado de lesões de significado indeterminado com relação à infecção pelo HPV, com o uso do teste de DNA para HPV com o método da captura de híbridos II. **Métodos:** foram estudadas amostras de 236 casos consecutivos examinados no laboratório da DIGENE-BRASIL, de pacientes com diagnóstico citológico prévio de ASCUS. As amostras foram submetidas ao teste de captura híbrida para identificação de DNA-HPV de alto e baixo riscos. **Resultados:** dos 236 casos analisados, 183 (77,5%) foram negativos para o teste de captura híbrida, seis (2,6%) foram positivos para HPV de baixo risco e 47 (19,9%) foram positivos para HPV de alto risco. **Conclusão:** as amostras positivas para HPV de baixo risco representam uma pequena e não-considerável minoria de casos, provavelmente, transientes. Cerca de 20% dos casos foram positivos para HPV de alto risco e deverão ser encaminhados à colposcopia e biopsia, se necessário. Esses casos representam um grande potencial de progressão para lesões cervicais.

**Palavras-chaves:** ASCUS, reflex test, captura híbrida, DNA-citoliq

## ABSTRACT

**Introduction:** in order to optimize the morphological analysis of the cases with uncertain diagnosis, we critically analyzed the cases with Atypia of Squamous Cells of Undetermined Significance (ASCUS) in cytological samples of uterine cervix collected in conventional smears (CS) and liquid-based preparations (LBC) in order to correlate the findings with Hybrid Capture II (HC2) assay and biopsy. **Objective:** to evaluate the meaning of undetermined cytological atypia in relation to HPV infection detected by hybrid capture II test. **Methods:** 97 cases taken from women examined at Perola Byington Hospital, São Paulo, Brazil, during the year of 2002. The conventional smears were taken previously than LBC. The residual sample was placed in liquid-medium and LBC preparation with DNA-Citoliq system was performed. If at least one of the paired samples were classified as ASCUS, the pair was submitted to a guided revision in order to evaluate the type of alteration taken in account to categorized ASCUS. **Results:** from 97 cases studied, 14 were categorized as ASCUS by the two methods simultaneously. The others had different classification under or hyper estimated. Six cases diagnosed as squamous intraepithelial lesion (SIL) by CS were ASCUS by LBC; in contrary, 19 ASCUS by CS were SIL by LBC. Eleven ASCUS by CS were diagnosed as negative by LBC, but CS categorized 47 LBC ASCUS as negative. From the morphological parameters nuclear enlargement and coarse chromatin were regarded as ASCUS. From 68 ASCUS by LBC, 36 were HC2 positive for high risk HPV (hr-HPV); ten of them with biopsy proven lesion. From 42 CS ASCUS, 23 were hr-HPV positive, but only 7 with histological lesion. **Conclusion:** our results reinforced the hypothesis that ASCUS is poorly reproducible by morphological examination by CS or LBC preparations. To add HC2 as adjunct method to ASCUS cytology can improve the routine diagnosed of the uncertain atypias.

**Keywords:** ASCUS, reflex test, hybrid capture II, DNA-citoliq

ISSN: 0103-0465

*DST – J bras Doenças Sex Transm 17(4): 251-254, 2005*

## INTRODUÇÃO

O câncer cervical continua sendo um problema de Saúde Pública de graves conseqüências à população feminina. Cerca de 500.000 novos casos são registrados anualmente em todo o mundo, com quase 200 mil mortes<sup>1</sup>. A infecção persistente por HPV de alto risco (hr-HPV) é o principal fator de risco para câncer cervical<sup>2</sup>.

O final do século XX trouxe inovações importantes para o rastreamento de lesões precursoras do colo de útero como a introdução da citologia de base-líquida (LBC), cujo meio coletor preserva tanto as células para avaliação morfológica quanto os ácidos nucléicos para testes biomoleculares, trazendo também uma enorme expectativa de recursos laboratoriais impensáveis até recentemente<sup>3,4</sup>. Rapidamente, vários estudos foram elaborados para tentar demonstrar a utilidade desses recursos em condições rotineiras, o desempenho da citologia para reconhecimento de lesões de alto grau com a realização do teste de HPV<sup>5</sup>.

O teste de captura híbrida II (HC2) para a detecção de HPV de alto risco (hr-HPV) foi aprovado como teste adjunto para os casos em que a citologia categoriza seus achados como atipias de signifi-

<sup>1</sup> Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup> Life and Health Sciences Research Institute, School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal

<sup>3</sup> Hospital Pérola Byington, São Paulo, SP, Brasil

do indeterminado (ASCUS). Em metanálise recente, Arbyn *et al.*<sup>6</sup> demonstraram a superior *performance* da LBC associada a HC2 para hr-HPV nos casos de ASCUS, em comparação, por exemplo, com a repetição de nova amostra citológica depois de seis meses a um ano, como era preconizado anteriormente. O FDA norte-americano (*Food and Drugs Administration*)<sup>7</sup> abalçou o uso do chamado *DNA-PAP test*, no qual a premissa de rastreio é realizar concomitantemente a LBC e a HC2 para hr-HPV em mulheres de 30 anos ou mais, idade de maior eficácia do teste, pois infecções em faixas etárias mais baixas são de caráter mais transiente, o que compromete a especificidade dos achados. A utilização do teste de HC2 para hr-HPV em casos em que o resultado do exame citológico for indeterminado, também tem sido sugerida por algumas sociedades de ginecologia, como a norte-americana<sup>8</sup>. Como atrativo complementar, a combinação da LBC e da HC2 em rastreios populacionais é mais custo-efetiva, pois, embora hajam gastos adicionais de implementação, ambos os testes reduzem os casos de incerteza por citologia, diminuem os casos limitados ou inadequados por problemas técnicos de preparo das amostras e possibilitam maiores intervalos entre as coletas, graças ao altíssimo valor preditivo negativo, o que assegura que testes negativos sejam de fato negativos<sup>9</sup>.

## OBJETIVO

Estudar os casos diagnosticados como ASCUS em amostras preparadas de forma convencional e LBC, a fim de avaliarmos que parâmetros morfológicos estão presentes nesses casos e que conduzem a um diagnóstico de incerteza, analisar se há diferenças entre os dois tipos de preparado e correlacionar esses achados aos resultados de HC2 para hr-HPV e biopsias.

## MÉTODOS

Amostras de colo uterino foram coletadas no período de janeiro a dezembro de 2002 de mulheres encaminhadas ao Hospital Pérola Byington, em São Paulo, Brasil, por alguma suspeita detectada junto a ambulatórios da rede pública. Todas as mulheres foram submetidas à coleta citológica, colposcopia, teste de HC2 e biopsia quando clinicamente indicada. Os exames foram realizados na Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, em estudo cego.

A coleta foi realizada com escova do sistema DNA-Citoliq® – DCS (Digene Brasil, São Paulo). Após preparo de esfregaço convencional, o material residual foi colocado no meio conservativo do sistema de LBC. No laboratório, essas amostras foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante, que prevê preparo simultâneo de 12 casos por vez em cerca de 10 a 15 minutos. As amostras foram dispensadas em membrana circular de 25 milímetros por *imprint* pelo sistema de pressão. Os resultados da avaliação citológica por ambos os métodos de preparo seguiram as determinações do sistema de Bethesda<sup>10</sup>, exceto com relação aos casos com diagnóstico indeterminado. As atípicas indeterminadas de células escamosas e glandulares foram classificadas como uma única categoria citológica.

## Teste da captura híbrida II (HC2)

A realização do teste seguiu o protocolo preconizado pelo fabricante (Digene Co. Gaithersburg, MD, USA). O material para análise

passou por cinco procedimentos: desnaturação, hibridização, captura dos híbridos, reação dos híbridos com o conjugado, detecção dos híbridos por quimioluminescência seguindo o protocolo preconizado pelo fabricante (Digene Brasil). A estimativa de carga viral foi emitida em unidades relativas de luz (*relative light units* – RLU): > 20 alta carga viral, 5-19.9 intermediária, e 1-4.99 baixa. Apenas os tipos oncogênicos hr-HPV foram testados (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68)<sup>11</sup>.

## Avaliações citológicas e histopatológicas

As amostras citológicas foram analisadas de acordo com o sistema de Bethesda. Os casos com alterações morfológicas foram originalmente checados por mais de um observador. Avaliação de adequabilidade da amostra também foi realizada e os casos foram classificados em satisfatórios, limitados (má fixação, purulento ou hemorrágico) e insatisfatórios para análise.

Para o objetivo deste estudo, foram selecionados 97 pares de casos para revisão por apresentarem, em pelo menos um deles, o diagnóstico de ASCUS. Consideraram-se os seguintes parâmetros morfológicos, subjetivamente classificados em (+) a (+++):

- Aumento do volume nuclear.
- Condensação da cromatina (cromatina grosseira).
- Halo perinuclear.
- Presença de agente etiológico infeccioso (definido como presente ou ausente)

As amostras histológicas foram classificadas de acordo com os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde<sup>12</sup>.

## RESULTADOS

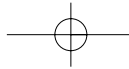
Nos 97 pares de casos preparados por LBC, os resultados foram: 68, 15 e 14 e em CS foram 42, 8 e 47 para ASCUS, lesão intraepitelial e negativo, respectivamente. Seis casos diagnosticados como lesão intraepitelial escamosa (SIL) na CS foram ASCUS na LBC; e 19 ASCUS por CS foram SIL na LBC. Onze ASCUS por CS foram diagnosticados como negativos por LBC; entretanto, CS diagnosticou 47 ASCUS em LBC como negativos.

A adequabilidade da amostra está relatada na Tabela 1. Os parâmetros foram relacionados com o resultado do teste de HC2 para se analisar os diagnósticos de HC2 nas amostras citologicamente inadequadas. Apenas os casos com limitações ou insatisfatórios foram relacionados. De 97 casos, 73 (75,2%) dos CS apresentaram algum grau de limitação de adequabilidade, enquanto em LBC apenas quatro (4,1%) foram limitados.

A Tabela 2 apresenta a relação de diagnósticos citológicos por CS e LBC, correlacionados. Apenas 13 casos foram classificados como ASCUS pelos dois métodos concomitantemente.

A Tabela 3 apresenta os diagnósticos citológicos relacionados com os resultados do teste de captura híbrida. Mais de 50% dos ASCUS diagnosticados por LBC foram HC2 positivas. Dezesesseis casos foram positivos com carga viral abaixo de 20 picogramas/mL (carga viral baixa ou intermediária) e 36 acima de 20 picogramas/mL (carga viral alta).

A Tabela 4 apresenta os achados morfológicos observados em preparados convencionais e de LBC, correlacionados com os diag-

**Tabela 1.** Relação dos casos classificados quanto à adequabilidade da amostra em comparação com os resultados do teste de HC2

Adequabilidade	CS		LBC	
	HC2 hr-HPV +	HC2 hr-HPV -	HC2 hr-HPV +	HC2 hr-HPV -
Limitada	7	64	3	1
Insatisfatória	2	-	-	-
<b>Total</b>	73	4		

Nota: a diferença refere-se a casos sem problemas de limitações técnicas.

**Tabela 2.** Classificação citológica dos preparados convencionais e de LBC

Diagnóstico	CS	LBC
ASCUS	42	68
Lesão Intra-epitelial	8	15
Negativo	47	14
<b>TOTAL</b>	97	97

**Tabela 3.** Diagnósticos citológicos relacionados com os resultados do teste de CH2

Diagnóstico citológico	CS		LBS	
	HC2 hr-HPV +	HC2 hr-HPV -	HC2 hr-HPV +	HC2 hr-HPV -
Negativo	22	25	5	9
ASCUS	23	19	36	32
Lesão Intra-epitelial	7	1	11	4
<b>Total</b>	52	45	52	45

**Tabela 4.** Achados morfológicos em preparados convencionais e de LBC, correlacionados com os diagnósticos emitidos

Critérios Morfológicos						Halo
	C+/V+	C++/V++	C++/V+	C+/V++		
<b>LBC</b>						
Negativo	12	1	-	1	-	
ASCUS	46	15	2	5	14	
SIL	2	12	1	-	13	
<b>Convencional</b>						
	Negativo	28	1	5	11	-
ASCUS	25	14	1	2	10	
SIL	2	4	2	-	8	

C = Cromatina grosseira

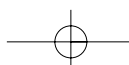
V = Aumento do volume nuclear

Halo = halo perinuclear

nósticos emitidos. Discreto aumento do volume celular e cromatina grosseira foram achados sobreponíveis em diagnósticos negativos e ASCUS em numerosos casos analisados em preparados convencionais. Essa sobreposição é menor quando o preparado é de LBC. Mais consistentes são esses parâmetros de moderado a intenso, pois estão mais freqüentemente associados às lesões intra-epiteliais. Por outro lado, os halos perinucleares são parâmetros mais relacionados

com atípicas e SIL. Em nenhum caso diagnosticado como negativo se observou halo.

Dos 97 casos selecionados com ASCUS, 17 (17,5%) tiveram biopsias com lesão. Os diagnósticos histopatológicos foram: oito NIC 1, três NIC 2 e seis NIC 3. Desses, somente três casos (dois NIC 1 e um NIC 3) não foram positivos para hr-HPV por HC2.



## DISCUSSÃO

Os diagnósticos de incertezas, que na citologia são conhecidos como atípias de células escamosas (ou glandulares) de significado indeterminado, são de difícil reprodutibilidade em razão da grande gama de variáveis possíveis de serem encontradas e muitas vezes sobreponíveis a alguns critérios usados para definir-se lesão intra-epitelial<sup>6</sup>. Obviamente, esse grau de incerteza está relacionado com alterações pouco convincentes, que em nosso estudo chamamos de + ou discreta. De qualquer forma, esse viés é um problema encontrado com frequência na rotina citológica. Justamente por esse motivo, consideramos oportuno esse estudo, que tentou objetivamente caracterizar quais eram os parâmetros mais frequentemente associados ao diagnóstico de ASCUS e, a partir dessa avaliação, analisar objetivamente eventuais estratégias de correção.

Para cumprir essa meta, selecionamos alguns critérios morfológicos mais rotineiramente usados na prática citológica. Imaginamos que um rol bem definido desses parâmetros morfológicos pudesse aumentar a consistência da reprodutibilidade diagnóstica, justamente o ponto mais vulnerável dos diagnósticos citológicos de incertezas. Abrirmos o leque de opções agregaria mais vieses, por isso optamos por parâmetros mais frequentemente utilizados. Como opção à morfologia, introduzimos o teste de HC2 para hr-HPV por sua notória contribuição à prática citológica, implementando melhor desempenho nos programas de rastreamento de lesões de colo uterino<sup>5</sup>.

Nossos resultados mostram claramente que alterações nucleares discretas que tanto comprometem a resolução diagnóstica são sobreponíveis àquelas encontradas em preparados negativos e em alguns casos com lesão. Menos comprometedora, são as alterações mais proeminentes. Essas alterações, exceto em alguns casos, são preferencialmente encontradas em casos com lesão. Não por acaso, a citologia apresenta alta especificidade<sup>6</sup>. Entretanto, de 97 casos diagnosticados como ASCUS, apenas 13 foram classificados como atípias indeterminadas por CS e LBC, concomitantemente. Esse dado reflete de forma muito expressiva a variabilidade diagnóstica dessa categoria.

Por outro lado, encontramos expressiva associação do teste de HC2 positivo aos ASCUS diagnosticados, tanto por LBC quanto por CS, mostrando que a HC2 pode ser de fato muito útil em condições de rotina, conduzindo para colposcopia casos que tenham uma real chance de apresentar lesão ao exame histológico. Um dos graves problemas dos ASCUS relaciona-se exatamente com a conduta das pacientes. A conduta clínica pode ser expectante ou não. Alguns indicam colposcopia imediata, outros sugerem repetição da citologia após seis meses. Na prática, um número elevado de ASCUS significaria uma grande quantidade de procedimentos colposcópicos desnecessários, sobrecarregando e onerando os sistemas de Saúde, e criando ansiedade às mulheres. Com a associação da HC2 para hr-HPV, apenas as mulheres com o teste positivo seriam encaminhadas à colposcopia<sup>9</sup>.

Trinta e seis casos foram positivos para hr-HPV com carga viral alta (acima de 20 picogramas/mL) o que recomendaria um seguimento mais cauteloso a essas pacientes.

Observamos ainda que as limitações técnicas encontradas em CS não são usualmente encontradas em LBC. Nenhum dos preparados em LBC foram insatisfatórios para a análise, e apenas quatro casos foram limitados por serem purulentos. Em contrapartida, 75,2% dos casos convencionais tinham adequabilidade comprometida por algum grau de limitação técnica.

## CONCLUSÃO

Concluimos que a reprodutibilidade do diagnóstico de ASCUS é um problema de difícil solução com recursos morfológicos, mas que a utilização de testes biomoleculares pode otimizar o desempenho da citologia para essa categoria diagnóstica, uma vez que mais de 50% (59) dos ASCUS em LBC de nossa casuística foram positivos para HC2 hr-HPV. É importante salientar que 17 casos, comprovados por biopsias, apresentaram lesão intra-epitelial, sendo que nove deles eram lesões de alto grau.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Waggoner SE. Cervical cancer. *Lancet* 2003; 361: 2217-25.
2. Monsonego J, Bosch FX, Coursaget P, Cox JT, Franco E, Frazer I, et al. Cervical cancer control, priorities and new directions. *Int J Cancer* 2004; 108: 329-33.
3. Lörincz A & Anthony, J. Advances in HPV detection by Hybrid Capture<sup>®</sup>. *Papillomavirus Report* 2001; 12: 145-153.
4. Nonogaki S, Alda Wakamatsu A, Longatto Filho A et al. Hybrid Capture II and Polymerase Chain Reaction for Identifying HPV Infections in Samples Collected in a New Collection Medium: A Comparison. *Acta Cytol* 2004; 48: 514-520.
5. Witt A, Hudelist G, Gregor H, Kucera E, Walchetseder C, Czerwenka K. The detection of HPV DNA improves the recognition of cervical intraepithelial lesions. *Arch Gynecol Obstet* 2003; 268: 29-34.
6. Arbyn M, Buntinx F, van Ranst M, Paraskeva E, Martin-Hirsch P, Dillner J. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 280-93.
7. FDA news. FDA approves expanded use of HPV Test. March 31, 2003. [www.fda.gov/bbs/topics/news/2003/new00890.html](http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2003/new00890.html)
8. Cox JT; American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. The clinician's view: role of human papillomavirus testing in the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology Guidelines for the management of abnormal cervical cytology and cervical cancer precursors. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:950-958.
9. Sherlaw-Johnson C, Philips Z. An evaluation of liquid-based cytology and human papillomavirus testing within the UK cervical cancer-screening programme. *Br J Cancer* 2004; 5;91:84-91.
10. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287: 2114-9.
11. Howard M, Sellors J, Kaczorowski J, Lorincz A. Optimal cutoff of the hybrid capture II human papillomavirus test for self-collected vaginal, vulvar, and urine specimens in a colposcopy referral population. *J Lower Genit Tract Dis* 2004; 8: 33-7.
12. Tavassoli FA, Deville P. Tumours of the breast and female genital organs. World Health Organization Classification of Tumours 2003; IARC Press, WHO, Lyon.

### Endereço para correspondência:

**SÔNIA MARIA MIRANDA PEREIRA**

Instituto Adolfo Lutz

Divisão de Patologia

Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César

01246-902, São Paulo, SP, Brasil.

Tel: 55 11 3068-2875 - Fax: 55 11 3068-2871.

E-mail: [spereira@ial.sp.gov.br](mailto:spereira@ial.sp.gov.br)

Recebido em: 17/08/05

Aprovado em: 12/10/05