



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS E SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Carolina Marian Pedrini

Análise das regiões nucleolares com prata (AgNOR) em lesões cervicais

Florianópolis

2020

Carolina Marian Pedrini

Análise das regiões nucleolares com prata (AgNOR) em lesões cervicais

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.
Orientador: Prof. Dra. Fabiana Botelho de Miranda
Onofre

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pedrini, Carolina

Análise das regiões nucleolares com prata (AgNOR) em
lesões cervicais / Carolina Pedrini ; orientador, Fabiana
Botelho de Miranda Onofre, 2020.

54 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. I. Botelho de Miranda Onofre, Fabiana .
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmácia. III. Título.

Carolina Marian Pedrini

Análise das regiões nucleolares com prata (AgNOR) em lesões cervicais

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Ana Carolina Rabello de Moraes
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Mariana Gouvea Melo Ribeiro
Estácio de Sá

Profa. Dra. Dirleise Colle
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmácia

Profa. Dra. Elenara Marian Teixeira Lemos
Coordenadora do Programa

Profa. Dra. Fabiana Botelho de Miranda Onofre
Orientadora

Florianópolis, 2020

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Mirian e Joel, que não mediram esforços para me dar uma ótima educação e para me guiar no caminho certo. O amor incondicional de vocês é o que me dá forças para continuar sempre. Eu não tenho palavras que possam descrever o quanto eu sou grata e feliz por ter vocês por perto e por sempre me apoiarem, independente das decisões tomadas.

A André Felipe Vilvert, meu amor, que diariamente me apoia e me dá forças para não desistir. Meu parceiro, que alegre e motiva os meus dias com seu sorriso e palavras de apoio. Obrigado por ser quem você é e por me tornar uma pessoa melhor todos os dias. Eu te amo incondicionalmente.

A minha orientadora, que considero minha família e mentora, Profa. Dra. Fabiana Botelho de Miranda Onofre, pelas horas de conversa, paciência e dedicação para que eu pudesse concluir um sonho. Meu eterno agradecimento.

Ao Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, meu mentor acadêmico e conselheiro de vida, que muito acrescentou com seus conhecimentos e reflexões.

A Ane Francyne, colega do Laboratório de Citologia Clínica (LACIT), por ser extremamente amigável e por ter me recebido tão bem. Sentirei falta das nossas conversas e das caronas em dias de chuva.

Meu agradecimento a Dra. Adriane Pogere, por tornar possível a realização do estudo através das suas pacientes.

Ao Departamento de Patologia do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade (HU/UFSC/EBSERH), pelo fornecimento dos resultados histopatológicos.

Ao Prof. Dr. Marcos José Machado, pelo carinho e atenção no auxílio das análises estatísticas realizadas neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de estudar em um programa de qualidade, e à CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

O câncer do colo do útero ou câncer cervical é a quarta causa de morte por câncer em mulheres brasileiras. A condição displásica pré-maligna do colo uterino é denominada neoplasia intraepitelial cervical (NIC), que em uma pequena proporção de casos acabará por evoluir para câncer cervical invasivo se não for tratada. Anormalidades da morfologia nucleolar são características constantes das células cancerígenas e a malignização de células de normais para malignas é caracterizada pelo aumento da síntese de proteínas, responsáveis pela transcrição do RNAr. As regiões organizadoras de nucléolo podem ser coradas com prata (AgNOR) e foi sugerido que o número de AgNORs em um núcleo pode refletir a atividade de proliferação das células e o grau de transformação maligna de certos tecidos. Então, o objetivo desse estudo foi analisar a expressão das regiões nucleolares por prata (AgNOR) como fator preditivo de risco para progressão de lesões escamosas ou glandulares do colo uterino. Foi visto que o número de AgNORs aumenta conforme grau da lesão e diferencia facilmente as lesões de alto grau.

Palavras-chave: Câncer cervical; Lesões intraepiteliais cervicais; AgNOR.

ABSTRACT

Cervical cancer or cervical cancer is the fourth leading cause of cancer death in Brazilian women. The pre-malignant dysplastic condition of the uterine cervix is called cervical intraepithelial neoplasia (CIN), which in a small proportion of cases will eventually develop into invasive cervical cancer if left untreated. Abnormalities of nucleolar morphology are constant characteristics of cancer cells and the transformation of cells from normal to malignant cells is characterized by an increase in protein synthesis, responsible for the transcription of RNAr. The nucleolus-organizing regions can be stained with silver (AgNOR) and it has been suggested that the number of AgNORs in a nucleus may reflect the proliferation activity of cells and the degree of malignant transformation of certain tissues. So, the objective of this study is to analyze the expression of nucleolar regions by silver (AgNOR) as a predictive risk factor for the progression of squamous or glandular lesions of the cervix. It was seen that the number of AgNORs increases according to the degree of the lesion and easily differentiates high-grade lesions.

Keywords: Cervical cancer; Cervical intraepithelial lesions; AgNOR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Lesões precursoras do câncer de colo do útero.....	18
Figura 2 – Estrutura do nucléolo.....	21
Figura 3 – Esquema de coloração ilustrada.....	26
Figura 4 – Regiões organizadoras de nucléolo coradas com prata (AgNOR).....	30
Figura 5 – Média dos valores da contagem total de AgNOR, contagem de satélites e <i>clusters</i> em amostras com resultados citológicos e histológicos.....	31
Figura 6 – Distribuição dos núcleos com mais de quatro pontos NOR em relação à histologia.....	34
Figura 7 – Distribuição dos núcleos com mais de quatro pontos NOR em relação à citologia.....	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sistema de Bethesda para relato de citologia cervical.....	19
Quadro 2 – Diferenças entre grupos da contagem total de AgNOR pelo resultado citológico.....	32
Quadro 3 – Diferenças entre grupos da contagem total de AgNOR pelo resultado histológico.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre citologias de encaminhamento e resultado histológico.....	29
Tabela 2 – Avaliação do ponto de corte nos resultados de AgNOR.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNOR – Regiões Organizadoras de Nucléolo coradas com prata
AC – Adenocarcinoma
AGC – Células Glandulares Atípicas
AGC-SOE – Células Glandulares Atípicas Sem Outras Especificações
AIS – Adenocarcinoma *in situ*
ASC – Células Escamosas Atípicas
ASC-H – Células Escamosas Atípicas não podendo excluir Lesão Intraepitelial de Alto Grau
ASC-US – Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
AUC – Área sobre a curva
BNR – Biópsia Não Realizada
CA - Carcinoma
CBL – Citologia em Base Líquida
CCE – Carcinoma de Células Escamosas
CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CIS - Carcinoma *in situ*
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DP – Desvio Padrão
EA - Eosina
EBSERH - Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
HPV – Papilomavírus humano
HSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
HU– Hospital Universitário
INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
JEC – Junção Escamo-Colunar
LSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
N – Número de casos
NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical
NILM – Negativo para Lesão Intraepitelial ou Malignidade
NOR – Região organizadora de nucléolo
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAP – Papanicolau
RNA – Ácido Ribonucleico
RNAr - Ácido Ribonucleico Ribossômico
pRb - Proteína do Retinoblastoma
ROC – Característica de Operação do Receptor
SR – Sem resultado
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	24
3.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	24
3.3	COLETA DAS AMOSTRAS	24
3.4	CITOLOGIA EM BASE LÍQUIDA	25
3.5	COLORAÇÃO DE PAPANICOLAU	25
3.6	COLORAÇÃO AGNOR.....	26
3.7	PROCEDIMENTO DE CONTAGEM.....	27
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
3.8.1	Cálculo amostral.....	28
4	RESULTADOS.....	30
5	DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÃO	42
7	REFERÊNCIAS	43
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos	50
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	53
	ANEXO C – Instrumento de coleta dos dados	55

1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero ou câncer cervical é caracterizado pela replicação desordenada do epitélio de revestimento do órgão, podendo invadir estruturas e órgãos contíguos ou à distância (WHO, 2014). Dos tipos de câncer, este tipo ocupa o sétimo lugar no ranking mundial e é o quarto tipo de câncer mais comum na população feminina (WHO, 2017), sendo esperados aproximadamente 570.000 novos casos mundiais para o biênio de 2019-2020. No Brasil, espera-se 16.710 novos casos, sendo o câncer cervical, o terceiro mais incidente na população feminina e o quarto mais incidente na região Sul (14,07/100 mil habitantes), que possui uma das menores taxas de mortalidade do país, representando a sexta colocação entre os óbitos por câncer em mulheres (INCA, 2020). A previsão para este mesmo biênio, na região da Grande Florianópolis, é de 70 novos casos a cada 100.000 habitantes (INCA, 2020).

Com aproximadamente 315.000 casos de câncer cervical no ano de 2018, o câncer do colo do útero é responsável por 265 mil óbitos por ano, sendo a quarta causa mais frequente de morte por câncer em mulheres, mesmo possuindo etiologia conhecida e um estágio não invasivo de longa duração que permite o sucesso de programas de rastreamento (WHO, 2016; INCA, 2017; WHO, 2018).

A relação entre o Papilomavírus Humano (HPV) e o câncer de colo uterino já está bem estabelecida. As mulheres tornam-se suscetíveis ao desenvolvimento do câncer do colo do útero após a infecção pelo HPV devido a transformação tecidual, mas outros fatores são necessários para o desenvolvimento da doença (WHO, 2018; BURD, 2003; KUDELA *et al.*, 2016). Portanto, um grande desafio permanece em detectar quais destas lesões vão regredir e quais vão progredir para lesão de alto grau e/ou carcinoma.

As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) são laços de DNA (ácido desoxirribonucleico) que contém todos os elementos necessários e essenciais para sintetizar o RNAr (ácido ribonucleico ribossômico) (DEMAY, 1996; CHERN *et al.* 1997). Como o RNA é o principal local para a síntese de proteínas, o número e o tamanho de NORs em um núcleo celular pode refletir de forma confiável, a cinética celular e a atividade do núcleo. A transformação de células de normais para malignas é caracterizada pelo aumento da síntese de proteínas, portanto, o valor de AgNOR (regiões organizadoras de nucléolo coradas com prata) pode ser considerado como uma medida da taxa de proliferação celular, diferenciação e transformação maligna (RÜSCHOFF *et al.* 1989; HANEMANN *et al.*, 2011; EROZ, 2015; KHANNA, 2014; ELEMAM *et al.*, 2015). O método de AgNOR já foi utilizado em estudos

de adenocarcinoma prostático, efusão pleural, células de mucosa oral, câncer gástrico, evidenciando que frequentemente células malignas apresentam um grande número de NORs em comparação com células benignas (HWANG *et al.*, 2016; FAGERE, 2016; JAFFER, 2017; ULLAH *et al.*, 2018).

A citologia esfoliativa quando acompanhada por métodos adjuvantes como a técnica de AgNOR, poderá oferecer opções diagnósticas seguras nos casos duvidosos ou suspeitos para células malignas. Além disso, seu uso poderá evitar procedimentos diagnósticos invasivos, proporcionando maior conforto e menor sofrimento ao paciente.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

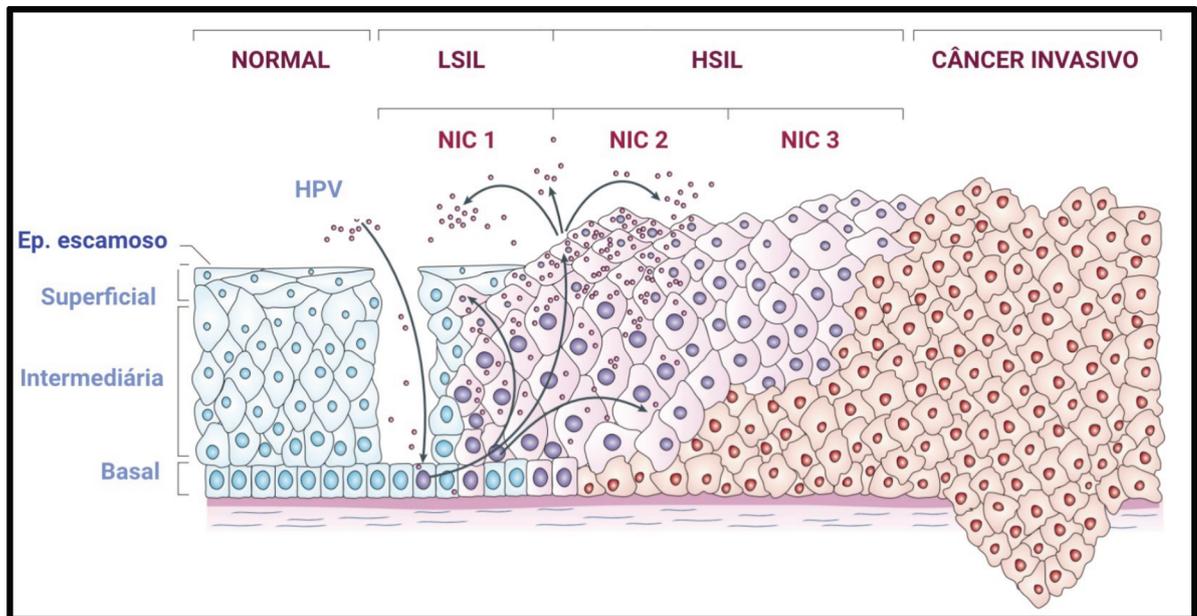
O câncer cervical ocupa o sétimo lugar no ranking mundial, sendo o quarto tipo mais comum na população feminina e o oitavo câncer mais comum (excluindo câncer de pele não melanoma) encontrado mundialmente (INCA, 2017; WHO, 2018). O número de ocorrência da prevalência no ano de 2018 é de 385.540 casos no mundo e a estimativa deste mesmo ano para novos casos é de 569.847. No Brasil, a incidência para o biênio de 2020 é de 16.710 casos e sem considerar o câncer de pele não melanoma, o câncer de colo do útero é o primeiro mais incidente na região Norte (26,52/100 mil habitantes) enquanto a região Sul (14,07/100 mil hab.) ocupa a quarta posição. A nível estadual, em Santa Catarina, estima-se que 970 mulheres receberam o diagnóstico no biênio de 2019-2020 e que surjam 70 novos casos na região de Florianópolis (INCA, 2020; WHO, 2018). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) na estimativa de 2020, o câncer de colo do útero é a quarta causa de morte por câncer no mundo, estimando mais de 310.000 óbitos. No Brasil, o número estimado de mortes por câncer cervical foi de 8.079 mulheres, e a taxa de mortalidade na região Sul é de 4,64/100mil habitantes. No ano de 2016, foram registradas 171 mortes em Santa Catarina e 17 mortes em Florianópolis (INCA, 2017). A magnitude das taxas de mortalidade do câncer cervical é bem menor do que as de incidência, graças ao diagnóstico precoce.

Programas de triagem organizados reduzem a incidência de câncer do colo do útero. É o câncer ginecológico mais fácil de prevenir com testes de rastreamento regulares e acompanhamento das pacientes e é altamente curável quando encontrado e tratado precocemente (MIGNOT *et al.*, 2019; CDC, 2016). O rastreamento do câncer do colo do

útero se baseia na história natural da doença e no reconhecimento de que o câncer invasivo evolui a partir de lesões precursoras, que podem ser detectadas e tratadas adequadamente, impedindo a progressão para o câncer (INCA, 2018). Recomendada pela Organização Mundial da Saúde a técnica convencional de esfregaço cervical tem sido utilizada para o rastreamento do câncer cervical, pois detecta células atípicas em amostras cervicais e tem se mostrado eficaz em reduzir a incidência e a mortalidade deste tipo de câncer. Essa técnica foi descrita na década de 1940, por um médico chamado George Papanicolaou (PAPANICOLAOU, 1942; QURESHI *et al.*, 2018; JIAN, 2019).

Neoplasia intraepitelial cervical (NIC) é a condição displásica pré-maligna do colo uterino, que em uma pequena proporção de casos, cerca de 15%, acabará por evoluir para câncer cervical invasivo se não for tratada (MITRA, 2016; SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2003). Essa condição displásica são as lesões pré-cancerosas que caracterizam a fase de doença pré invasiva e podem durar cerca de 20 anos. As lesões cervicais precursoras apresentam-se em graus evolutivos (Figura 1), a considerar conceitos cito-histopatológico, podendo desta maneira, ser classificadas como NIC 1, classificação que indica lesões de baixo grau, NIC 2 e NIC 3, os quais indicam lesões de alto grau (NAYAR; WILBUR, 2017). Displasia leve com acometimento de 1/3 do tecido cervical é chamado de NIC 1, que é caracterizado por ativação mínima da taxa de proliferação das células basais e ocasionalmente presença de coilócitos nas células da camada mais superficial. Displasia moderada com acometimento de 2/3 do tecido cervical é chamado de NIC 2. Já displasia grave ou carcinoma *in situ* (CIS) é chamado de NIC 3. Nas lesões NIC 3, as células em proliferação ocupam a terceira parte superior do epitélio e no Carcinoma *in situ* (CIS) a espessura total do tecido cervical é acometida (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007; BIBBO; WILBUR, 2015). Estas lesões não são capazes de produzir metástases, sendo assim, não acarretam risco a vida da paciente. Enquanto não houver o rompimento da membrana basal e invasão para o estroma cervical, o tratamento previne o câncer cervical na sua totalidade dos casos (NAYAR; WILBUR, 2017). É consenso, portanto, que as lesões pré-invasivas devem ser tratadas para impedir sua progressão para carcinoma invasor (MCCREDIE *et al.*, 2008; INCA, 2016).

Figura 1 – Lesões precursoras do câncer de colo do útero



Fonte: Adaptado de Woodman; Collins; Young, 2007.

Para padronizar internacionalmente os laudos citopatológicos cérvico-vaginais, estabeleceu-se um sistema de classificação no ano de 1998, em Bethesda, nos Estados Unidos. No Sistema de Bethesda há uma classificação citológica das alterações morfológicas (Quadro 1) no tecido escamoso em uma classificação bimodal que divide as lesões intraepiteliais escamosas em baixo grau – LSIL (NIC 1), baseada na evidência de que a maioria destas lesões oferecem pouco risco de progressão (1%) para câncer invasivo; e alto grau - HSIL (NIC 2 e 3) ao passo que boa parte destas lesões estão associadas a persistência da lesão e maior potencial para progressão (13,5%) (NAYAR; WILBUR, 2015; RYU *et al.*, 2016; KJAER *et al.*, 2010; SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2008).

Há também uma terceira categoria além de LSIL e HSIL, a de células escamosas atípicas (ASC). As alterações observadas em ASC podem conter achados que sugerem a presença de uma lesão intraepitelial cervical oculta ou raramente, câncer cervical, mas também, podem não ter relação com neoplasia ou infecção por HPV. Tal classificação possui duas subcategorias, a de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), que sugere lesão de baixo grau, mas não possuem critérios suficientes para serem classificadas como LSIL; e de células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial escamosa

de alto grau (ASC-H), que possui características morfológicas suspeitas em células pouco diferenciadas, mas não possuem requisitos suficientes para classificação de HSIL (NAYAR; WILBUR, 2015; ROSENDO *et al.*, 2018).

Quadro 1 – Sistema de Bethesda para relato de citologia cervical

LESÕES CERVICAIS ESCAMOSAS		
Atípicas	Células escamosas atípicas de significado indeterminado	ASC-US
	Células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial escamosa de alto grau	ASC-H
Pré câncer	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau	LSIL
	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau	HSIL
Câncer	Carcinoma de Células Escamosas	CCE
LESÕES CERVICAIS GLANDULARES		
Atípicas	Atípicas em células glandulares	AGC
Pré-câncer	Adenocarcinoma endocervical in situ	AIS
Câncer	Adenocarcinoma endocervical	AC

Fonte: Adaptado de NAYAR; WILBUR, 2015.

O rastreamento do câncer do colo do útero é uma intervenção de saúde pública dirigida a uma população-alvo assintomática e não tem a finalidade de diagnosticar uma doença, mas de identificar indivíduos com maior probabilidade de ter a doença propriamente dita ou um precursor da doença (OPAS, 2016). No Brasil, o rastreamento segue o modelo oportunístico e se dá pelo exame citopatológico em mulheres de 25 a 64 anos. Recomenda-se que o exame seja realizado a cada três anos, após dois exames normais consecutivos realizados com um intervalo de um ano. Mulheres com resultado citopatológico de ASC-US devem repetir o exame citopatológico em 12 meses, com exceção das mulheres com mais de 30 anos que devem repetir o exame em seis meses. Mulheres com diagnóstico de LSIL devem repetir o exame citopatológico em seis meses. Recomenda-se que para mulheres com menos de 25 anos com resultados de ASC-US ou LSIL o exame seja repetido a cada três anos, pois a maioria das infecções por HPV nessa faixa etária tem resolução espontânea. Mulheres com resultado de ASC-H, HSIL, AGC, AIS ou suspeita de invasão devem ser encaminhadas para a colposcopia. No caso de achados anormais maiores na colposcopia, deve-se realizar a biópsia

para avaliação histopatológica. Na presença de NIC 1, o seguimento deverá ser feito com exames citopatológicos semestrais por um ano. Nos demais casos a paciente deve seguir conduta de tratamento específica (INCA, 2016). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), há três diferentes tipos de testes de triagem para o câncer do colo do útero: O teste de HPV para tipos de HPV de alto risco; a inspeção visual com ácido acético; exame de citologia convencional (PAP) e citologia de base líquida (CBL)

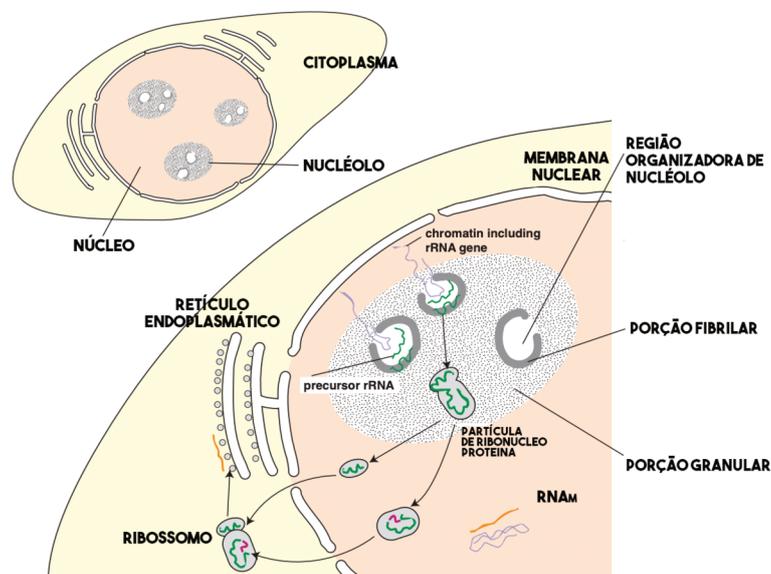
A prevalência geral de HPV no carcinoma cervical humano é de aproximadamente 95%. A infecção pelo HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer de colo do útero devido à transformação tecidual causada pelo vírus. Contudo, é necessária a atuação de cofatores, como imunossupressão, diferenças genéticas, e possivelmente epigenéticas, virais (persistência de HPV de alto risco oncogênico, principalmente os tipos 16 e 18) e fatores comportamentais para que a doença maligna se manifeste. Na maioria dos indivíduos infectados, a infecção pelo HPV é facilmente controlada pelo sistema imunológico e tem remissão espontânea entre um a dois anos; no entanto, a infecção viral pode continuar a persistir, aumentando a chance da mulher adquirir anormalidades nas células epiteliais e subsequentemente desenvolver cânceres no local da infecção. (BARROS, 2012; KUDELA *et al.*, 2016; SCHIFFMAN *et al.*, 2016; SHANMUGASUNDARAM; YOU, 2017).

O câncer de colo de útero seja uma doença que pode ser prevenida e detectada precocemente, entretanto não pode se predizer com segurança com os critérios e exames disponíveis hoje, quais lesões tem a possibilidade de se tornar câncer cervical, que ainda é uma das maiores causas de morbimortalidade entre as mulheres. A identificação de marcadores que nos permitem prever o risco de progressão nessas lesões precoces seria, portanto, uma ferramenta muito útil para o monitoramento e o manejo desses casos (SOARES, 2010; GUERRA, 2014; KUDELA *et al.*, 2016).

A importância do nucléolo para o diagnóstico de malignidade foi reconsiderada após a observação de que a reorganização estrutural e morfológica é consequência da redistribuição dos componentes fibrilares dentro do nucléolo (SHARMA, 2018). As regiões organizadoras de nucléolo ou NOR (*Nucleolar Organizing Region*) são segmentos de DNA que codificam o RNA de proteínas ribossômicas e correspondem a alças do DNA situadas no nucléolo da célula, contendo genes responsáveis pela transcrição e a atividade de síntese do RNA ribossômico (Figura 2) e estão relacionados com a agilidade e rapidez na proliferação celular nos tecidos estudados (GALL, 1969; KHUSHBU *et al.*, 2017).

Anormalidades da morfologia nucleolar são características constantes das células cancerígenas. Os nucléolos são pequenos corpos esféricos basofílicos localizados no núcleo. Geralmente eles podem ser encontrados na região nuclear central, mas também podem estar próximos da membrana nuclear. Eles são construídos por uma região organizadora de nucléolo (NOR) de um cromossomo específico, que é o principal local de formação de nucléolos depois da divisão celular; e têm duas regiões distintas, a parte fibrosa onde o processamento do pré-RNAr é realizado, ou seja, contém as proteínas necessárias para a transcrição; e a parte granulosa, local onde a maturação do RNAr é realizada e transportada para fora do nucléolo, região que contém os precursores ribossômicos (VON KNEBEL; WENTZENSEN, 2008; POLLARD, 2017).

Figura 2 – Estrutura do nucléolo



Fonte: Adaptado de Medical & Biological Laboratory, 2016

As proteínas NOR ou NORs são coradas com métodos de coloração utilizando prata, sendo chamadas de AgNOR ou AgNORs, que identifica estas proteínas ácidas associadas ao local de transcrição do rRNA. Estes são vistos como pontos castanho-escuros a pretos dentro de um núcleo acastanhado dentro de um citoplasma amarelo (CROCKER *et al.*, 1989; SRIVASTAVA *et al.*, 2013). As AgNORs se acumulam em células altamente proliferativas, enquanto sua expressão é muito baixa em células não proliferativas. Algumas dessas proteínas permanecem associadas às regiões organizadoras de nucléolos (NORs) durante a mitose e a

quantidade está relacionada às fases do ciclo celular, sendo baixas contagens para a fase G1 e altas para a fase S – G2. Uma maior contagem de núcleos com altos números de AgNOR caracterizam um ciclo celular rápido (SIRRI *et al.*, 2000). Sendo assim, foi sugerido que o número de AgNORs em um núcleo pode refletir a atividade de proliferação das células e o grau de transformação maligna de certos tecidos (KOTAK *et al.*, 2015; PARDUE, 1969; DERENZINI; PLOTON 1991; SRIVASTAVA *et al.*, 2013).

A análise da expressão das AgNORs pode ser realizada pela contagem de pontos isolados (satélites) e/ou agrupados (*clusters*) pelo padrão de distribuição dos pontos negros dentro do núcleo observado na microscopia óptica e pela medida de sua área por análise de imagem ou pelo cálculo de coeficientes que relacionam esses dois critérios (SRIVASTAVA *et al.*, 2013; KHUSHBU *et al.*, 2017). A transformação de células de normais para malignas é caracterizada pelo aumento da síntese de proteínas e a quantidade de NOR corada com prata tem sido utilizada para o diagnóstico de malignidade de numerosas lesões neoplásicas (JAFFER *et al.*, 2017; KHUSHBU *et al.*, 2017). A estimativa do número de AgNORs foi aplicada na patologia tumoral, tanto para fins diagnósticos quanto prognósticos, assim como em mieloma múltiplo, câncer de mama, carcinoma oral, mesoteliomas e também estudado na área veterinária, como é o caso do estudo que relata a contagem de AgNOR em cães com mastocitoma (BUKHARI *et al.*, 2007; PAPADHIMITRIOU, 2000; DERENZINI, 2004; MONTI, 2020; ONOFRE *et al.*, 2008; SMITH *et al.*, 2017)

As células cancerígenas têm, um maior número de NORs corados pela prata do que as células benignas correspondentes. Portanto, AgNORs pode ser usado como um marcador para proliferação celular, diferenciação e transformação maligna (RÜSCHOFF *et al.*, 1989, DERENZINI *et al.* 2000; SHARMA, 2018).

2 OBJETIVOS

Nas seções abaixo estão descritos o objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho.

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as regiões nucleolares coradas por prata (AgNOR) em lesões cervicais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Classificar morfológicamente as AgNORs das células escamosas do colo do útero
- II. Analisar a expressão das regiões nucleolares por prata (AgNOR) e relacionar com o resultado citológico e/ou histológico;
- III. Verificar a acurácia da técnica AgNOR no diagnóstico diferencial entre lesão intraepitelial de baixo grau e lesão intraepitelial de alto grau.
- IV. Avaliar a atividade proliferativa das células epiteliais de pacientes diagnosticadas com ASC-US, ASC-H, LSIL e HSIL e atipias glandulares usando a coloração de AgNOR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo prospectivo transversal, envolvendo mulheres que foram atendidas no ambulatório de ginecologia e colposcopia do Hospital Universitário da Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC/EBSERH) e que apresentaram alterações citológicas na citologia oncótica de exames prévios. As mesmas foram encaminhadas ao HU/UFSC/EBSERH para exame ginecológico, colposcopia e biópsia. Este trabalho faz parte de um projeto "guarda-chuva" submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UFSC, CAAE: 57423616.3.0000.0121. Toda paciente participante foi previamente abordada e informada acerca dos objetivos do estudo. Aquelas que aceitaram participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam um questionário epidemiológico.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Todas as pacientes que aceitaram participar do estudo e apresentaram algum tipo de alteração citológica no exame citopatológico do colo uterino de acordo com a classificação do Sistema de Bethesda (NAYAR; WILBUR, 2015), maiores de 18 anos e não gestantes foram incluídas no estudo.

3.3 COLETA DAS AMOSTRAS

As mulheres selecionadas foram submetidas a exame ginecológico, colposcopia e biópsia. No momento do exame foram coletadas amostras citológicas com espátula de Ayre e escova endocervical para a execução de citologia em base líquida. As amostras foram armazenadas em solução PreservCyt[®] Thinprep e posteriormente processadas em citocentrífuga para confecção das lâminas para análise de papanicolaou e AgNOR.

Foi realizada biópsia nas lesões evidenciadas na colposcopia e o exame histopatológico foi realizado pelo setor de patologia do HU/UFSC/EBSERH.

3.4 CITOLOGIA EM BASE LÍQUIDA

As amostras coletadas em solução ThinPrep® PreservCyt® foram armazenadas em temperatura ambiente pelo período de até seis semanas antes do processamento. As lâminas citológicas foram preparadas por meio do sistema de citocentrífuga semiautomatizado Cellspin® I (Tharmac GmbH, Waldsolms, Alemanha) que, por meio de um processo de dispersão, separa sangue, muco, detritos não diagnósticos e homogeneiza a amostra de células. O volume de amostra utilizado para a citocentrifugação foi de 2 ml e a velocidade e tempo de rotação foram de 1000 rpm por 5 minutos, respectivamente. Após esse processo, as células foram coletadas em filtro de maneira a criar uma fina camada celular satisfatória e sem sobreposições que foi transferida então para uma lâmina de vidro numa área retangular com 22x15 mm (KOSS; MELAMED, 2005; THARMAC, 2010). As lâminas foram submetidas à coloração pelo método clássico de Papanicolaou e examinadas por meio de microscopia de luz em busca de alterações morfológicas e morfométricas sofridas pela estrutura celular. Essa análise foi realizada pelo Laboratório de Citologia Clínica da UFSC. As alterações celulares foram classificadas utilizando a nomenclatura do Sistema Bethesda de 2015 (NAYAR; WILBUR, 2015). Após análise citológica, as lamínulas das lâminas coradas por Papanicolaou foram removidas para posterior coloração de AgNOR.

3.5 COLORAÇÃO DE PAPANICOLAU

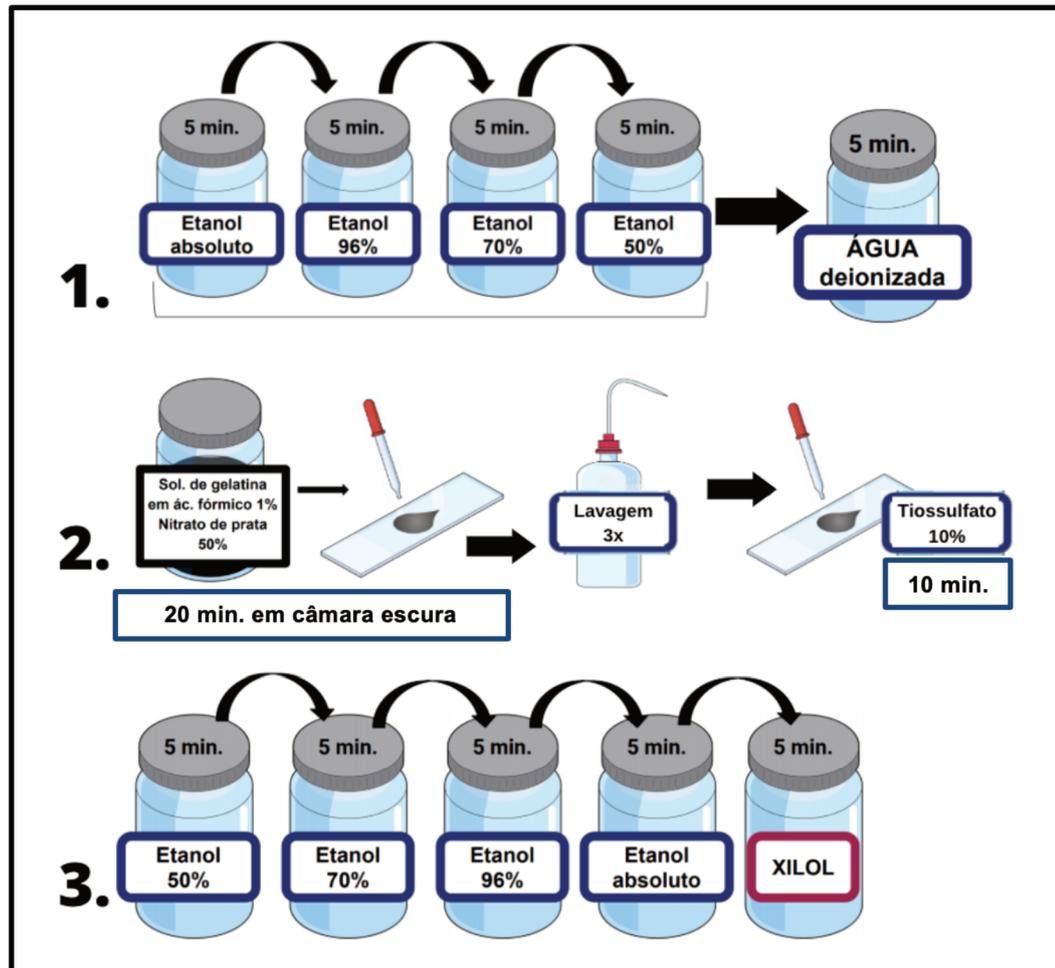
A coloração de Papanicolaou iniciou com a imersão das lâminas em etanol 99,5%. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada por 2 minutos, coradas em solução de hematoxilina de Harris 1a (Merck, Darmstadt, Nr: 1.09253.1022) por 1 minuto e 30 segundos e lavadas em água corrente por 3 minutos. Após duas baterias de etanol 99,5% (2 e 1 minuto, respectivamente), as lâminas foram coradas em solução Orange G 2a (Merck, Darmstadt, Nr: 1.06888.0500) por 10 segundos, imersas duas vezes em etanol 99,5% (2 e 1 minuto, respectivamente), coradas em solução EA 50 (Merck, Darmstadt, Nr: HT40332-1L) por 4 minutos e imersas duas vezes em etanol 99,5% (2 e 1 minuto, respectivamente). Em seguida, as lâminas foram banhadas em etanol/xileno (1:1) por 1 minuto e 30 segundos e imersas em xilol por 2 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas com Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha, Nr:1.07961.0100) e lamínula. As lâminas coradas pelo método de Papanicolaou foram examinadas por meio de microscopia de luz para verificar a celularidade

da amostra e a presença de células atípicas. Após análise citológica, as lâminas foram imersas em xileno até a completa remoção das lamínulas para posterior coloração de AgNOR.

3.6 COLORAÇÃO AGNOR

A coloração pela prata para análise de AgNOR foi realizada de acordo com o método descrito por Ploton et al. (1986), Crocker et al. (1989), e Ruschoff (1992) com algumas modificações. As lâminas foram colocadas com xileno para retirada da lamínula, fixadas em álcool absoluto por 5 minutos, seguido por uma solução de etanol a 96% por mais 5 minutos, em seguida, progressivamente reidratadas. A coloração AgNOR (Figura 2) foi realizada utilizando uma solução consistindo de um volume de gelatina a 2% em solução aquosa de ácido fórmico a 1%, 2 volumes de nitrato de prata a 50%. As lâminas foram incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos no escuro. Após a coloração, as lâminas foram colocadas em um recipiente fechado e protegido da luz, lavadas três vezes em água destilada deionizada e submersos em 10% de tiosulfato por 10 minutos. Os esfregaços em seguida foram lavados por 5 minutos em água corrente, desidratados em xilol, e montados com Entellan (Merck). As lâminas foram armazenadas no escuro e examinadas microscopicamente no aumento de 1000 vezes (objetiva plana, 100/1.25; abertura numérica, 0.17; W-PL, 10/23) em óleo de imersão. Para padronizar a contagem, foi seguido o método descrito por Crocker *et al* (1989).

Figura 2 – Esquema de coloração ilustrado



Fonte: Desenvolvido pela autora

3.7 PROCEDIMENTO DE CONTAGEM

A contagem de AgNOR foi realizada em 100 células escamosas selecionadas aleatoriamente para cada esfregaço citológico. Estes foram examinados sob uma ampliação de 100x em imersão. Para padronizar a contagem, seguimos o método de Crocker. Primeiramente, todas as estruturas coradas em prata foram contadas, tanto em agrupamentos (*clusters*) quanto em pontos individuais fora dos aglomerados (satélites). Cada cluster quando agregados ou parcialmente desagregados foi contado como 1 estrutura. Em segundo lugar, os *clusters* e os satélites foram contados separadamente. O procedimento de contagem levou 30-60 minutos por esfregaço. O número médio de AgNORs por número como *clusters* e satélites separadamente e como *clusters* e satélites juntos, foram calculados em cada caso, como sugerido por Remmerbach *et al.* (2003).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.8.1 Cálculo amostral

Para o cálculo do tamanho da amostra esperada para o estudo foi utilizada a seguinte fórmula (A) para descrição de variáveis qualitativas em uma população (MIOT, 2011):

$$n = \frac{N.p.q.(Z\alpha/2)^2}{(N-1).(E)^2+p.q.(Z\alpha/2)^2} \quad (\text{A})$$

no qual, n = tamanho da amostra;

$Z\alpha/2$ = valor crítico para o grau de confiança desejado, usualmente 1,96 (95%);

E = erro padrão, usualmente $\pm 5\%$ da proporção dos casos (precisão absoluta);

N = tamanho da população (finita);

p = proporção de resultados favoráveis da variável na população;

q = proporção de resultados desfavoráveis na população ($q=1- p$).

Para a determinação do tamanho da população finita e da proporção dos resultados favoráveis (atipias cervicais) a base de dados DATASUS foi consultada quanto a informações sobre os exames citopatológicos cérvico-vaginais realizados no estado de Santa Catarina durante um período total de 8 meses, referentes ao período de coleta das amostras.

Foram selecionados os resultados do número total de exames realizados, resultados de ASC-US, ASC-H, AGC, AIS, LSIL e HSIL. Foi realizada uma média dos valores obtidos e no período de 8 meses foram realizados cerca de 225.668 exames em Santa Catarina. Nesse mesmo período, foram diagnosticados 2.364 ASC-US (1,05%), 625 ASC-H (0,28%), 176 AGC-SOE (0,08%), 51 AGC-possivelmente neoplásico (0,02%), 1.124 LSIL (0,5%) e 439 HSIL (0,19%).

O valor crítico para o grau de confiança desejado foi considerado como sendo 1,96 (95%) e o erro padrão (E) foi considerado como sendo de 5%. Esses e os demais valores populacionais encontrados no DATASUS foram aplicados na fórmula para calcular o tamanho da amostra. Para uma amostra representativa, foram necessárias minimamente 16 amostras de ASC-US, 4 amostras de ASC-H, 8 amostras de LSIL e 4 amostras de HSIL. As

categorias de atipias glandulares foram consideradas em conjunto devido a baixa prevalência, sendo necessária 2 amostras.

Para obtenção de pontos de corte foi realizada a curva ROC e verificada a porcentagem de correspondência de resultados. A distribuição normal ou não dos grupos também foi avaliada e para determinação da diferença entre grupos foi usado o método Kruskal-Wallis, onde foram consideradas medianas diferentes quando $p < 0,05$. Por último, foi verificada a porcentagem de núcleos que possuíam cinco ou mais pontos de AgNOR.

4 RESULTADOS

As 121 pacientes atendidas no HU/UFSC/EBSERH possuíam idade de 18 a 68 anos e a idade mais frequente foi de 34 anos. Estas pacientes possuíam como citologia de encaminhamento ASC-US (30 casos), ASC-H (18 casos), AGC (2 casos), LSIL (30 casos), HSIL (41 casos) sendo uma suspeita de Carcinoma Invasivo, justificando o encaminhamento para o exame ginecológico e colposcópico. Segundo o cálculo amostral, o número mínimo esperado de pacientes com resultados citológicos de ASC-H, AGC, LSIL e HSIL foi obtido.

A análise das amostras histológicas pelo setor de patologia do HU/UFSC/EBSERH, revelou pacientes com resultado negativo (20 casos), NIC 1 (25 casos), NIC 2 (34 casos), NIC 3 (19 casos), CCE (3 casos), AIS (2 casos) e AC (1 caso) (Tabela 1). A biópsia não foi coletada em 17 pacientes devido a achados normais no colo do útero ou julgamento de amostra insatisfatória para biópsia durante o exame colposcópico e esses resultados citológicos sem confirmação histológica não foram incluídos no restante das análises.

Tabela 1 – Relação entre citologias de encaminhamento e resultado histológico

Histologia	Citologia de encaminhamento					Total (%)
	ASC-US	ASC-H	AGC	LSIL	HSIL	
Sem lesão	6	3	-	4	7	20 (16,5)
NIC 1	4	2	-	17	2	25 (20,7)
NIC 2	6	7	-	5	16	34 (28,1)
NIC 3	2	3	1	2	11	19 (15,7)
CCE	-	-	1	-	2	3 (2,5)
AIS	1	-	-	-	1	2 (1,7)
AC	-	1	-	-	-	1 (0,8)
BNR	11	2	-	2	2	17 (14,0)
Total	30	18	2	30	41	121 (100)

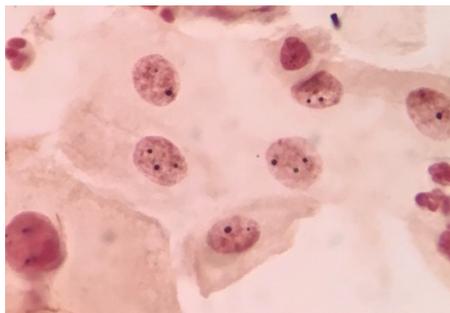
Fonte: Desenvolvido pela autora (2020)

Legenda: (ASC-US) Células escamosas atípicas de significado indeterminado; (ASC-H) Células escamosas atípicas não podendo excluir lesão de alto grau; (AGC) Células glandulares atípicas; (LSIL) Lesão intraepitelial de baixo grau; (HSIL) Lesão intraepitelial de alto grau; (NIC) Neoplasia intraepitelial cervical; (CCE) Carcinoma de células escamosas; (AIS) Adenocarcinoma *in situ*; (AC) Adenocarcinoma; (BNR) Biópsia não realizada.

Entre os 20 resultados histológicos sem lesão, 16 casos eram de cervicite crônica, 2 de HPV juntamente com cervicite crônica, 1 de condiloma acuminado e 1 de metaplasia escamosa. Entre os 25 resultados histológicos de NIC 1, 17 casos (68,0%) tiveram LSIL como citologia de encaminhamento. Dos 53 resultados histológicos de NIC 2 (34 casos) e NIC 3 (19 casos), 27 casos (50,9%) foram encaminhados citologicamente como HSIL. Entre os 59 resultados histológicos de HSIL+ (NIC 2, NIC 3, CCE, AIS e AC), 30 casos (50,8%) foram encaminhados citologicamente como HSIL, 7 casos (11,8%) como LSIL e 22 casos (37,2%) como atipia escamosa (ASC-US e ASC-H) ou atipia glandular (AGC). Entre esses resultados citológicos de atipias, AGC contribuiu com 1,6% dos encaminhamentos, ASC-US com 24,7% e ASC-H com 14,8%.

A técnica de AgNOR foi realizada em 94 pacientes. A redução do número de lâminas analisadas foi devido a não eficiência da coloração e devido ao aparecimento de artefatos impossibilitando leitura. Nas demais amostras, as AgNORs estavam localizadas dentro dos núcleos e eram claramente visíveis como pontos pretos ou marrons escuros distintos (Figura 3)

Figura 3 – Regiões organizadoras de nucléolo coradas com prata (AgNOR). Células escamosas contendo clusters e satélites.

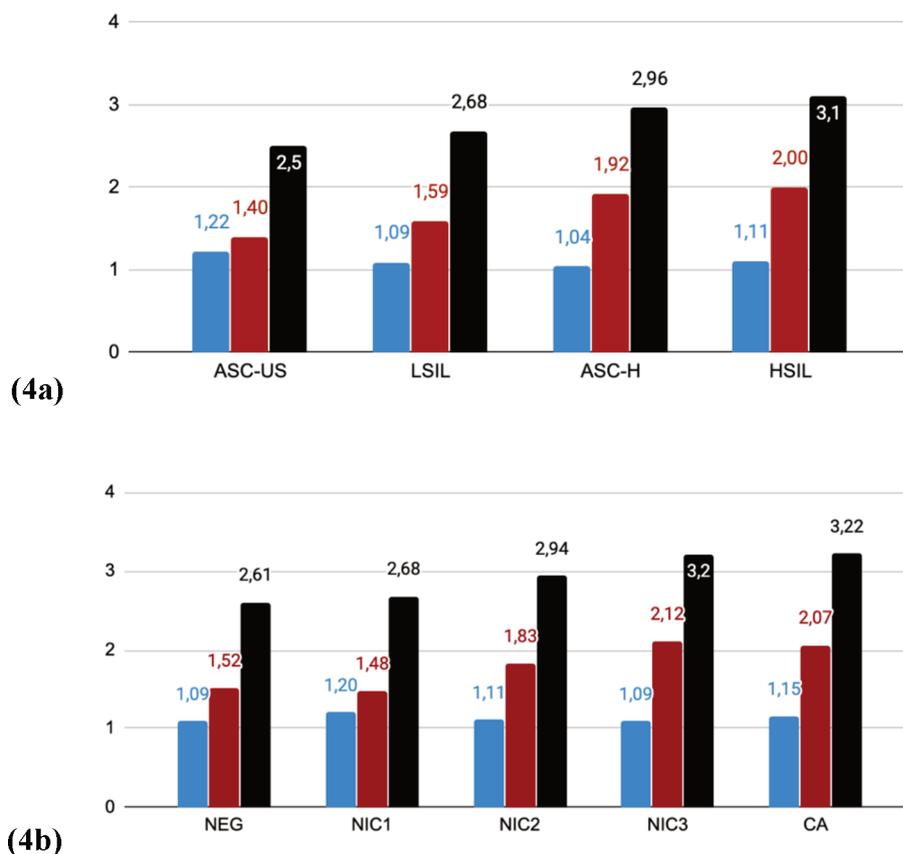


Fonte: Imagem fotografada pela autora (imersão - 100x)

Os resultados obtidos através da contagem média do número de AgNOR em relação à classificação citológica é mostrada na Figura 4. O número médio de *cluster* por núcleo foi de 1,40 (DP 0,58) em amostras de resultado ASC-US, 1,59 (DP 0,69) em LSIL, em amostras ASC-H foi de 1,92 (DP 0,68), em HSIL foi de 2,00 (DP 0,62). O número médio de satélites por núcleo foi de 1,22 (DP 0,67) para amostras ASC-US, 1,09 (DP 0,70) para LSIL, para amostras com resultado ASC-H foi de 1,04 (DP 0,71), HSIL 3 foi de 1,11 (DP 0,50). Já a média do número total de NOR em amostras ASC-US foi de 2,5 (DP 0,30), para resultados LSIL 2,68 (DP 0,52), em amostras ASC-H 2,96 (DP 0,80), em amostras HSIL 3,10 (DP 0,67).

Em relação à classificação histológica, a contagem é mostrada na Figura 4b. O número médio de *cluster* por núcleo foi de 1,52 (DP 0,67) em amostras de resultado negativo, 1,48 (DP 0,53) em NIC 1, em amostras NIC 2 foi de 1,83 (DP 0,62), em NIC 3 foi de 2,12 (DP 0,68) e em CA 2,07 (DP 0,82). O número médio de satélites por núcleo foi de 1,09 (DP 0,66) para amostras negativas, 1,20 (DP 0,72) para NIC 1, para amostras com resultado NIC 2 foi de 1,11 (DP 0,60), NIC 3 foi de 1,09 (DP 0,52) e para resultados CA 1,15 (DP 0,52). Já a média do número total de NORs em amostras negativas foi de 2,61 (DP 0,31), para resultados NIC 1 2,68 (DP 0,52), em amostras NIC 2 2,94 (DP 0,63), em amostras NIC 3 3,21 (DP 0,72) e CA 3,22 (DP 0,80).

Figura 4 – Média dos valores da contagem total de AgNOR, contagem de satélites e *clusters* em amostras com resultados citológicos (4a) e histológicos (4b)



Fonte: Desenvolvido pela autora (2020)

Legenda: Barras azuis: média da contagem do número de satélites; Barras vermelhas: média da contagem do número de *clusters*; Barras pretas: média da contagem do número total de AgNOR (*clusters* e satélites);

A normalidade da distribuição dos pontos nas amostras foi testada e quanto ao valor total das médias de AgNOR verificou-se que possuía uma distribuição normal, no entanto, quando testada entre classes (*clusters* e satélites) não apresentou uma distribuição normal. Sendo assim, foi usado o teste Kruskal-Wallis para verificar a diferença entre os grupos (Quadro 2-3). Verificou-se se há diferença entre as medianas em relação aos resultados classificados pela citologia ($p=0,01$) e encontrou-se diferença entre ASC-US de LSIL e HSIL; LSIL de HSIL; e HSIL de ASC-US e LSIL. Não foi possível diferenciar ASC-H dos demais resultados através da mediana (Quadro 2). Neste teste foram excluídos os resultados de atípias glandulares e cânceres por não ter número de amostras suficientes para testes baseados em medianas.

As medianas tiveram diferença significativa ($p=0,008$) e apresentaram que o número de AgNOR em amostras com resultado negativo foi diferente de resultados NIC 2, NIC 3, adenocarcinoma invasor. O número de AgNOR em resultados de NIC 1 foi diferente de NIC 3 e adenocarcinoma invasor, assim como o número de AgNOR em NIC 2 foi diferente de negativo e o número de AgNOR em NIC 3 foi diferente de negativo, NIC1 e Adenocarcinoma *in situ*. O número de AgNOR em Carcinoma de células escamosas não apresentou diferença, mas o número em Adenocarcinoma *in situ* foi diferente de NIC 3, adenocarcinoma invasor e carcinoma microinvasor. Adenocarcinoma invasor foi diferente de negativo, NIC1 e Adenocarcinoma *in situ* e o número de AgNOR de carcinoma microinvasor foi diferente de adenocarcinoma *in situ* (Quadro 3).

Quadro 2 – Diferenças entre grupos da contagem total de AgNOR pelo resultado citológico

FATOR	Diferenças (P<0,05)
ASC US	LSIL, HSIL
ASC H	-
LSIL	HSIL
HSIL	ASCU-US, LSIL

Quadro 3 – Diferenças entre grupos da contagem total de AgNOR pelo resultado histológico

FATOR	Diferenças (P<0,05)
NEGATIVO	NIC 2, NIC 3, AC
NIC 1	NIC 3, AC
NIC 2	NEGATIVO
NIC 3	NEGATIVO, NIC 1, AIS
CCE	-
AIS	NIC 3, AC, CA
AC	NEGATIVO, NIC 1, AIS
CA	AIS

Buscando o ponto de corte através da curva ROC para diagnóstico de HSIL+ (NIC 2, NIC 3, CCE, AIS, AC, CA) selecionamos dois pontos: um com maior sensibilidade e outro com maior especificidade. A avaliação de desempenho da curva ROC mostra que >3,07 é o ponto mais adequado para diagnóstico de HSIL+, com sensibilidade de 52,7% e especificidade de 87,1%. No entanto, buscando um ponto que tenha maior sensibilidade selecionamos o ponto 2,73, com sensibilidade de 70,9% e especificidade com 66,6% (Tabela 2). Avaliando o ponto de corte com maior especificidade (3,07) foram obtidos 60 casos de Negativo/LSIL, sendo 34 casos de acordo com a histologia, e 34 casos HSIL+ sendo 29 casos de acordo com o resultado histológico. Avaliando os resultados de AgNOR de acordo com o ponto de corte 2,73 foram obtidos 42 casos Negativo/LSIL e destes, 26 casos estiveram de acordo com o resultado da histologia; e 52 casos HSIL+, sendo 39 casos de acordo com a histologia.

Tabela 2 – Avaliação do ponto de corte nos resultados de AgNOR

AgNOR	Histologia		Total (n=94)
	NEG/LSIL (n=39)	HSIL+ (n=55)	
< 2,73	26 (66,6%)	16 (33,4%)	42
> 2,73	13 (29,1%)	39 (70,9%)	52
< 3,07	34 (87,1%)	26 (12,9%)	60
> 3,07	5 (47,3%)	29 (52,7%)	34

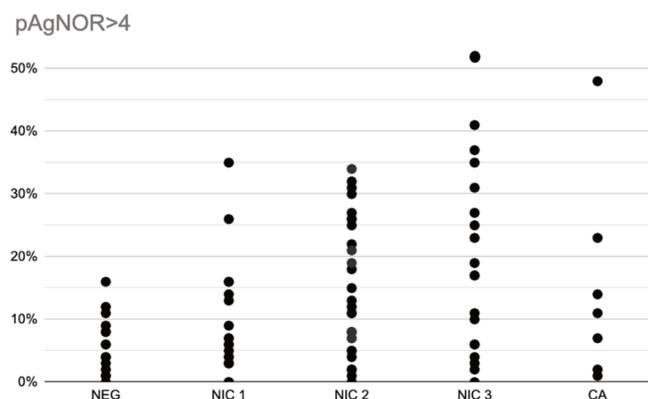
Curva ROC: Área sob a curva (AUC) 0,69; p=0,0004.

A distribuição do número de AgNOR por núcleo é mostrada na Figura 5-6 para avaliar a porcentagem de núcleos que possuem mais de quatro ou cinco pontos de AgNOR. Pode-se observar que há uma concentração alta de células com poucos NORs/núcleo e poucas células com muitos NORs/núcleo. Na Figura 5 ($pAgNOR > 4$) que representa a porcentagem de núcleos que possuem mais de quatro NORs em relação ao resultado histológico, observa-se que todos os casos de negativo e a grande maioria dos casos de NIC I possuíam menos de 20% de núcleos com mais de 4 NORs. No entanto, na Figura 6 ($pAgNOR > 5$), que representa a porcentagem de núcleos que possuem mais de cinco NORs é observa-se que a grande maioria dos casos de NIC II, NIC III e CA, possuem mais que 10 % dos núcleos com mais de 5 NORs.

Usando a configuração de corte em que amostras que possuem 10% de seus núcleos com mais de 4 pontos sejam categorizadas como alto grau e, conseqüentemente menor de 10% baixo grau, temos 68,0% de correspondência. Dos 39 casos de Negativo/LSIL, 30 (76,9%) casos possuem menos de 10% de seus núcleos com mais de quatro pontos e 9 casos possuem mais de 10% de seus núcleos com mais de quatro pontos. Já para os 55 casos de HSIL+ 34 (61,8%) casos possuem mais de 10% dos núcleos com mais de quatro pontos e 18 casos com menos de 10% de núcleos.

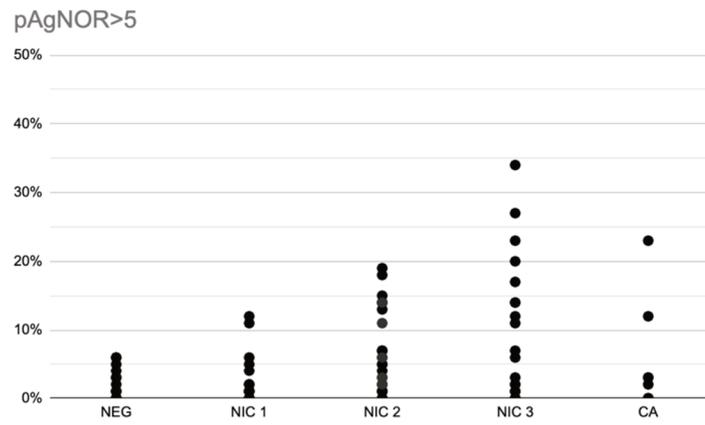
Considerando os núcleos que possuem mais de cinco pontos e categorizando-os como HSIL+ com o corte de 10%, a correspondência de resultados com a histologia foi de 60,6%. Dos 39 casos de Negativo/LSIL, foram 37 (94,8%) casos classificados corretamente e dos 55 casos de HSIL+, 20 (36,3%) foram classificados corretamente.

Figura 5 – Distribuição dos núcleos com mais de quatro NORs em relação a histologia



Fonte: Desenvolvido pela autora (2020)

Figura 6 – Distribuição dos núcleos com mais de cinco NORs em relação a histologia



Fonte: Desenvolvido pela autora (2020)

5 DISCUSSÃO

O câncer do colo do útero tem uma das maiores taxas de mortalidade por câncer entre mulheres em todo o mundo (TORRE *et al.*, 2017). A realização do exame citopatológico tem sido reconhecida mundialmente como uma estratégia segura e eficiente para a detecção precoce da maioria dos casos de câncer do colo do útero e programas de rastreamento organizados foram capazes de reduzir em cerca de 80% a mortalidade nas últimas décadas em alguns países desenvolvidos (LÄÄRÄ; DAY; HAKAMA, 1987; DICKINSON *et al.*, 2012). Atualmente, estima-se que mais da metade de todos os novos casos de câncer cervical se manifestem em mulheres que raramente ou nunca foram investigadas em programas de rastreamento e que mais de 85% das mortes ocorram em países em desenvolvimento (TORRE *et al.*, 2015; BENARD *et al.*, 2017). Por outro lado, mesmo com o sucesso da citologia cervical como método de rastreamento, reconhece-se que a técnica tem suas limitações.

Os principais problemas são relacionados a baixa sensibilidade, problemas de reprodutibilidade, amostras insatisfatórias e má interpretação dos diagnósticos. Alguns casos são de difícil conclusão e necessitam de acompanhamento e realização de novos exames citológicos, em intervalo de tempo que variam conforme a gravidade (INCA, 2002), (BOONE; ERICKSON; HUH, 2012). Estudos relataram que 10-12% dos casos de câncer invasivo não são identificados pela citologia (LEYDEN *et al.*, 2005; SUBRAMANIAM *et al.*, 2011). Sendo assim, a técnica de AgNOR pode ser muito útil no rastreamento de lesão intraepitelial cervical ou câncer, como método auxiliar na distinção entre células benignas e malignas, além disso trata-se de um método de baixo custo e que consome menos tempo. (SRIVASTAVA *et al.*, 2013).

Anormalidades da morfologia nucleolar são características constantes das células cancerígenas. Regiões organizadoras de nucléolo estão relacionadas com a agilidade e rapidez na proliferação celular nos tecidos e o número de NORs em um núcleo pode refletir a atividade de proliferação das células e o grau de transformação maligna de certos tecidos (KOTAK *et al.*, 2015; SRIVASTAVA *et al.*, 2013). Atualmente, vários trabalhos descrevem o emprego da técnica de AgNOR e sua aplicação em morfometria quantitativa, como método auxiliar na distinção entre células benignas e malignas, em diversos tecidos (MAKINEN *et al.*, 1993; KRUGER *et al.*, 2000). Nas células normais, os AgNORs são fortemente compactados nos nucléolos e são indiscerníveis, já nas células de proliferação rápida, como as

células neoplásicas, a desagregação nucleolar pode ocorrer, resultando em uma dispersão de AgNORs (MAHOBIA *et al.*, 2018).

É sugerido por alguns estudos que o aumento significativo nas contagens de AgNOR começa em lesões intraepiteliais escamosas de alto grau, mostrando que é possível detectar lesões pré-cancerosas (SAKAI *et al.*, 2001; SHIVARAJ *et al.*, 2013). Nesta pesquisa, observou-se que o número de AgNOR variou significativamente nos níveis de alteração no epitélio cervical de acordo com a avaliação citológica e histológica das pacientes. Esse aumento pode ser visto tanto na contagem total de AgNOR, quanto na contagem de *clusters*, que varia de forma crescente conforme a gravidade da lesão. Essa variação consolida que o número de AgNOR reflete a atividade proliferativa celular e que a atividade proliferativa e o potencial maligno da lesão neoplásica intraepitelial do colo do útero aumentam progressivamente à medida que o grau da lesão aumenta (MAHOBIA *et al.*, 2018; SRIVASTAVA *et al.*, 2013). Em estudo realizado por Kaushik e colaboradores (2003), avaliaram 100 casos de biópsias cervicais que foram categorizadas histologicamente como Cervicite, NIC 1, NIC 2, NIC 3, CA. Todas as categorias deste estudo apresentaram variações significativas nas contagens de AgNOR de forma crescente de acordo com a gravidade da lesão.

A diferença entre os resultados citológicos e histológicos foram determinadas através da mediana das contagens de cada grupo. Em 2013, foi relatado que a contagem de AgNOR em classificação citológica normal (1,75), cervicite crônica (2,09), LSIL (2,81), HSIL (4,17) e CA (5,48) foram diferentes entre elas de acordo com os pontos de medianas. Os únicos parâmetros que apresentaram uma faixa muito estreita de demarcação na razão AgNOR foram cervicite e LSIL (SHUKLA *et al.*, 2013). Em nosso estudo, fizemos a diferença tanto da classificação histológica, quanto a citológica, agrupando resultados inflamatórios e negativos devido a baixa quantidade de amostras, e foi encontrada diferença entre os grupos. O que melhor se diferenciou foi NIC 3 de Negativo, NIC 1 e AIS; e os resultados negativos que se diferenciaram de NIC 2, NIC 3 e AIS; na classificação HSIL foi diferente tanto de ASC-US quanto de LSIL. A contagem de AgNORs pode ter sido prejudicada na diferenciação de Carcinoma de Células Escamosas devido ao baixo número de amostras. Em estudo realizado em outro tipo de carcinoma, o espinocelular do esôfago, mostrou-se que baixas contagens de AgNOR podem estar associadas a uma melhor sobrevida (HEBER *et al.*, 2002).

Foram encontrados valores de corte através da curva ROC para diferenciação de lesão de alto grau/câncer de negativo/lesão de baixo grau. Em estudo realizado por Vasquez (2013), encontrou-se valores de corte para separação de NIC 1, 2 e 3; sendo que o resultado para NIC 2 não foi significativo em seu estudo. Uma das hipóteses da diferenciação não tão evidente de NIC 2 é por ser um estágio intermediário, sendo assim a coleta pode ter sido realizada em fase de transição, onde mais células NIC 1 estivessem presentes e poucas NIC 2, dificultando a detecção. Isso poderia ter sido visualizado previamente no exame citológico, podendo ser confirmado com a diferença na contagem de AgNOR quando classificado por LSIL e HSIL, que foi a separação escolhida para determinação de ponto de corte no presente estudo. Outra possibilidade é que uma porcentagem dos casos de NIC 2 podem regredir (aproximadamente 40%) e outras progredirem (KYRIGOU, 2018; SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2008) e as com contagens mais altas podem ser as de mau prognóstico e as de contagem mais baixas de bom prognóstico e a proporção de bons e maus podem ter se equiparado quando postas em médias e medianas. Srivastava *et al* (2019) observaram que a maioria dos casos de lesões de baixo grau com altas contagens de AgNOR apresentou persistência ou progressão para grau mais alto.

Em 2018 foi realizado um estudo por Qureshi e colaboradores, que encontraram diferentes contagens em biópsias cervicais que aumentaram significativamente com a progressão das lesões, ou seja, a contagem de NIC 1 foi de 1,64, na contagem de NIC 2 foi de 2,68 e NIC 3 foi de 4,3. Já no estudo realizado por Shukla e colaboradores (2013) a contagem de AgNOR pela classificação citológica, encontrou que em resultados normais e inflamatórios a contagem foi de 2,09, para LSIL foi de 2,81, HSIL foi de 4,17 e Carcinoma 5,4 pontos totais. As contagens de AgNOR, independente da classificação, têm um baixo índice discriminatório em comparação com a citologia normal do colo do útero com resultados inflamatórios, por isso, em nosso estudo agrupamos os resultados negativos e inflamatórios. No entanto, verifica-se que a contagem de AgNOR serve para diferenciar significativamente os resultados citológicos de HSIL daqueles de LSIL, o que foi encontrado em relação aos resultados do presente estudo.

O critério de escolha do ponto de corte, independente se através da Curva ROC ou da porcentagem de núcleos acima de quatro ou cinco pontos AgNOR, pode ser dependente do objetivo da análise. Uma vez determinado o ponto de corte baseado numa alta sensibilidade, este poderá ser usado para rastreamento de lesões pré-cancerosas. No entanto, quando a escolha é um ponto com alta especificidade, este pode ter o objetivo de auxiliar em casos que possuem

resultados duvidosos na citologia. Isso pode ser visto em relação às correspondências de resultados AgNOR e histologia, onde o ponto com maior sensibilidade mostrou maior correspondência em resultados Negativos/LSIL e com maior especificidade, a maior correspondência foram nos resultados iguais ou maiores que HSIL.

A determinação do ponto de corte através da porcentagem de núcleos que possuem certo número de NORs foi realizada por Remmerbach *et al* (2003) em lesões suspeitas da cavidade oral. Neste estudo, verificou-se o valor diagnóstico de AgNOR em biópsias de lesões suspeitas da cavidade oral e mostrou que 70% de núcleos com contagem acima de 3 pontos de AgNOR é um método sensível e significativo de diagnóstico de carcinoma oral. Em nosso estudo, foi possível identificar valores que diferencie lesão de alto e baixo grau dependendo do critério de escolha, se rastreamento ou confirmação de resultados duvidosos da citologia.

Aplicação da contagem de AgNOR como um teste mais barato para discriminar casos de lesão de alto grau verificará a progressão da lesão para carcinoma. Isso evitará o ônus do acompanhamento de todos os casos de LSIL, o que é um problema de fidelidade ao acompanhamento pela paciente e a seleção de casos de alto risco reduzirá definitivamente a incidência de carcinoma do colo do útero e a mortalidade associada na população com baixo acesso ao sistema de saúde (SRIVASTAVA *et al.*, 2013). Vários estudos citados anteriormente e o presente estudo, estabelecem que existe uma relação entre a quantificação de AgNOR e o desenvolvimento neoplásico no colo uterino. Devido a isso, há especulações de que uma correlação entre a quantificação AgNOR e a infecção pelo HPV exista. Sugere-se portanto que a contagem de AgNOR possa ser associada com o exame de Papanicolau e em alguns países, seja uma alternativa ao teste de DNA do HPV para descobrir casos de lesão de alto grau para acompanhamento e para determinar a progressão da doença, uma vez que é um exame mais prático, rápido e mais barato (SRIVASTAVA *et al.*, 2013).

Os resultados deste estudo indicam que a contagem de AgNOR pode ser demonstrada por meio da argirofilia de suas proteínas associadas, usando um método simples de coloração com prata. A técnica pode ser utilizada como um complemento ao exame citológico de rotina das lesões cervicais, especialmente para a classificação de neoplasias intraepiteliais cervicais, buscando o diagnóstico precoce e melhor prognóstico (MAHOBIA *et al.*, 2018; SRIVASTAVA *et al.*, 2019). A análise pode ter sido prejudicada pelo número pequeno de

amostras de carcinoma. No entanto, cumpre-se o objetivo de realizar a diferenciação de lesões de alto e baixo grau através da expressão de AgNOR e sua acurácia diagnóstica.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo encontrou uma relação significativa entre a expressão de NORs e as lesões cervicais. A técnica de AgNOR demonstrou ser um método adequado para investigar as lesões precursoras do câncer cervical, uma vez que o número de regiões organizadoras de nucléolo aumenta conforme gravidade da lesão, tanto em relação a resultados histológicos quanto citológicos. Isso demonstra sua importância diagnóstica, especialmente na discriminação de lesões pré-cancerosas do colo do útero.

Sendo assim, as NORs dentro do núcleo das células escamosas têm uma atividade proliferativa definitiva com a gravidade da patologia cervical. Por fim, o maior número de NORs foi relatado na amostra citológica de pacientes com lesão de alto grau, sendo sugerido para futuros estudos, um número maior de amostras com resultados de carcinomas e adenocarcinomas. Embora os resultados negativos e lesões de baixo grau tenham um índice discriminatório baixo entre si, a técnica de AgNOR serviu para diferenciar bem os resultados HSIL daqueles LSIL.

Pode-se afirmar que técnica de AgNOR é um bom marcador de proliferação e que é possível determinar valores de corte que auxiliam no diagnóstico para diferenciação de lesões de alto grau, auxiliando em casos duvidosos da citopatologia e ajudar na realização de um diagnóstico final, fazendo assim uma imensa diferença no manejo e prognóstico pré-maligno. Pode-se determinar pontos de corte que auxiliam a citopatologia no rastreamento do câncer do colo do útero. Todo este estudo enfatizou fortemente o fato de que as AgNORs podem ser declaradas um índice definitivo para avaliar a proliferação celular.

Para avaliar a reprodutibilidade da técnica é recomendável novos estudos com maior número de amostras, principalmente com resultados de cânceres. Estudos futuros também podem avaliar os parâmetros de ponto de corte e porcentagem de pontos por núcleo, investigando o comportamento de forma separada de satélites e *clusters*, uma vez que o número de *clusters* também aumentou conforme gravidade da lesão. Assim como pode ser visto se a diferença destas morfologias é significativa entre os resultados histológicos.

7 REFERÊNCIAS

BARROS, A. L.; LIMA, D. N. O.; AZEVEDO, M. D.; OLIVEIRA, M. L. Caderno de referência 1: **Citopatologia Ginecológica**. Brasília: Ministério da Saúde; Rio de Janeiro: CEPESC, 2012.

BENARD, V. B. *et al.* Cervical cancer survival in the United States by race and stage (2001-2009): Findings from the CONCORD-2 study. **Cancer**, [s.l.], v. 123, p.5119-5137, 5 dez. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.30906>.

BIBBO, M.; WILBUR, D. C. **Comprehensive Cytopathology.. Philadelphia: Elsevier/Saunders**. 4 ed, 2015.

BOONE, J. D. *et al.* New insights into cervical cancer screening. **Journal Of Gynecologic Oncology**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.282-287, 2012. Asian Society of Gynecologic Oncology; Korean Society of Gynecologic Oncology and Colposcopy (KAMJE).

BRASIL. **Ministério da Saúde. Guia Prático do HPV: perguntas e respostas**. Brasília, DF, 2017.

BUKHARI, Mulazim Hussain *et al.* Modified method of AgNOR staining for tissue and interpretation in histopathology. **International Journal Of Experimental Pathology**, [s.l.], v. 88, n. 1, p.47-53, 22 jan. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2613.2006.00522.x>.

BURD, E. M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-17, 1 jan. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.16.1.1-17.2003>.

CENTER OF CONTROL DISEASE AND PREVENTION (CDC). Global Cancer Statistics. **Centers for Disease Control and Prevention**. 2016. Disponível em: <http://www.cdc.gov/cancer/international/statistics.html>. Acesso em: 23 mar. 2019.

CHERN, Jia-haur *et al.* Usefulness of AgNOR Score in Differentiating Benign from Malignant Pulmonary Aspiration Cytology. **Acta Cytologica**, [s.l.], v. 41, n. 2, p.393-398, 1997. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000332530>.

CROCKER, J. *et al.* How should we count AgNORs? Proposal for standardized approach. **J. Pathol.**, v.158, p.185-188, 1989.

DEMAY, R. M.; The art and science of cytopathology. **Exfoliative Cytology**. ASCP Press. p.269-85, 1996.

DERENZINI, M. The prognostic value of the AgNOR parameter in human breast cancer depends on the pRb and p53 status. **Journal Of Clinical Pathology**, [s.l.], v. 57, n. 7, p.755-761, 1 jul. 2004. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2003.015917>.

DERENZINI, M., PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. **Int. Rev. Exp. Pathol.** 32, 150–192, 1991.

DICKINSON, J. *et al.* Reduced cervical cancer incidence and mortality in Canada: national data from 1932 to 2006. **Bmc Public Health**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.990-992, 16 nov. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-12-992>.

ELEMAM, I. B. Y. *et al.* Assessment of Proliferation Activity by Using Nucleolar Organiser Regions Count among Sudanese Patients with Prostate Cancer and Benign Prostate Hyperplasia. **J Pharm Biomed Sci**, v. 5, n. 11, p.863-866, nov. 2015.

EROZ, Recep. Argyrophilic nucleolar organizing regions associated proteins in oncocytology. **Oncocytology Journal**, v. 5, p.21-24, 2015.

FAGERE, Muaz Osman Mohamed. Diagnostic Utility of AgNORs Staining of Serous Effusion among Sudanese Patients. **International Journal Of Science And Technology**, Albaha, v. 5, n. 1, p.36-42, jan. 2016.

GALL, J.C. Os genes do RNA ribossômico durante a oncogênese. **Genetics**. v. 61, p.121 - 132, 1969.

GUERRA, F *et al.* Argentophilic nucleolus organizer region as a proliferation marker in cervical intraepithelial neoplasia grade 1 of the uterine cervix. **Journal Of Obstetrics And Gynaecology Research**, [s.l.], v. 40, n. 6, p.1717-1724, jun. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jog.12380>.

HANEMANN, João Adolfo Costa; MIYAZAWA, Marta; SOUZA, Mireile São Geraldo dos Santos. Histologic grading and nucleolar organizer regions in oral squamous cell carcinomas. **Journal Of Applied Oral Science**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.280-285, jun. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-77572011000300018>.

HEBER, Elisa *et al.* AgNORs as an Early Marker of Sensitivity to Radiotherapy in Gynecologic Cancer. **Acta Cytologica**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.311-316, 2002. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000326727>.

HUGHES, Andrea Monti; MÉNDEZ, Analía; ITOIZ, María Elina; SCHWINT, Amanda E. Nucleolar organizer regions in human oral verrucous carcinoma and adjacent lining epithelium. **Biotechnic & Histochemistry**, [s.l.], p.1-6, 3 mar. 2020. Informa UK Limited.

HWANG, H. C. *et al.* Utility of BAP1 Immunohistochemistry and p16 (CDKN2A) FISH in the Diagnosis of Malignant Mesothelioma in Effusion Cytology Specimens. **The American Journal Of Surgical Pathology**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.120-126, jan. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/pas.0000000000000529>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Atlas On-line de Mortalidade**. 2016. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>. Acesso em: 23 mar. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Detecção Precoce**. 2018. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/en/node/1194>. Acesso em: 23 fev. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero**. 2. ed. Rio de Janeiro, 2016

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2017.

JAFFER, R *et al.* Proliferation markers: —AgNORs, correlation with grade of invasive ductal carcinoma of breast. **Biomedica**, v. 33, n. 2, p.120-123, jun. 2017.

JIAN, Z. The role of obstetricians and gynecologists in screening for cervical cancer. **Rev. Chinese Preventive Medicine**, v. 3, n. 53, p.241-246, 2019.

KAUSHIK, R. *et al.* AgNOR counts in cervical lesions. **Indian Journal of Pathology & Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 201–203, 2003.

KHANNA, A. Assessment of the Potential of Pathological Stains in Human Prostate Cancer. *Journal Of Clinical And Diagnostic Research*, [s.l.], p.124-128, 2015. **JCDR Research and Publications**. <http://dx.doi.org/10.7860/jcdr/2014/7002.3938>.

KHUSHBU, B. *et al.* Quantitative and qualitative assessment of argyrophilic nucleolar organizer regions in normal, premalignant and malignant oral lesions. **Journal Of Oral And Maxillofacial Pathology**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.360-366, 2017. Medknow. http://dx.doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_52_15.

KJAER, S. K. *et al.* Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 19, p. 1478–1488, 2010.

KOSS, L. G.; MELAMED, M. R. K. **Diagnostic cytology and its histopathologic bases**. Philadelphia: LWW, 5 ed, 2005.

KOTAK, K. *et al.* Pleomorphism of argyrophilic nucleolar organizer regions in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. **Journal Of Natural Science, Biology And Medicine**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.35-39, 2015. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0976-9668.16606>

KRÜGER, S.; STAHLHUT, M.; MÜLLER, H. Cell cycle-dependent AgNOR analysis in invasive breast cancer. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 22, n. 5, p. 358–363, 2000

KUDELA, E. *et al.* Determination of malignant potential of cervical intraepithelial neoplasia. *Tumor Biology*, [s.l.], v. 37, n. 2, p.1521-1525, 22 dez. 2016. **Springer Nature**. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-4677-3>.

LääRä, E. DAY, N; HAKAMA, M. Trends in mortality from cervical cancer in the nordic countries: association with organised screening programmes. **The Lancet**, [s.l.], v. 329, n. 8544, p.1247-1249, maio 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(87\)92695-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(87)92695-x).

LEYDEN, Wendy A. *et al.* Cervical Cancer in Women With Comprehensive Health Care Access: Attributable Factors in the Screening Process. **Jnci: Journal of the National Cancer Institute**, [s.l.], v. 97, n. 9, p.675-683, 4 maio 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/dji115>.

MAHOBIA, Rajesh *et al.* Value of Argyrophilic Nucleolar Organizer regions in Benign, Premalignant, and Malignant Lesions of Cervix Uteri. **International Journal Of Scientific Study**. India, p. 121-125. mar. 2018.

MAKINEN, K. *et al.* Ag-NORs related to flow cytometry, morphometry and prognosis in patients with pancreatic cancer. **Anticancer Res.**, v.1, n.13, p.157-160, 1993.

MCCREDIE, M. R. *et al.* Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. **The Lancet Oncology**, v. 9, n. 5, p. 425– 434, 2008.

MIGNOT, S. *et al.* Pap tests for cervical cancer screening test and contraception: analysis of data from the CONSTANCES cohort study. **Bmc Cancer**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.2-13, 5 abr. 2019. **Springer Nature**. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-019-5477-8>.

MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.275-278, dez. 2011.

MITRA, A. *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia: screening and management. **British Journal of Hospital Medicine**. v.8, n.77, p. 118-123, 2016. doi:10.12968/hmed.2016.77.8.c118

NAYAR, R; WILBUR, D. C; The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: A Historical Perspective. **Acta Cytologica**, [s.l.], v. 61, n. 4-5, p.359-372, 2017. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000477556>.

ONOFRE, F. B. de M. *et al.* 9p21 Deletion in the diagnosis of malignant mesothelioma in serous effusions additional to immunocytochemistry, DNA-ICM, and AgNOR analysis. **Cancer**, [s.l.], v. 114, n. 3, p.204-215, 27 fev. 2008.

OPAS. **Controle integral do câncer do colo do útero. Guia de práticas essenciais**. Washington, DC. 2016

PAPADHIMITRIOU, S I. Evaluation of argyrophilic nucleolar organiser regions (AgNORs) in multiple myeloma. **Journal Of Clinical Pathology**, [s.l.], v. 53, n. 6, p.462-465, 1 jun. 2000. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.53.6.462>.

PAPANICOLAOU, G. N. A New Procedure For Staining Vaginal Smears. **Science**, v. 95, n. 2469, p. 438–439, 1942.

PARDUE, M. L.; GALL, J. G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 64, p. 600-4, 1969.

POLLARD, Thomas D.; EARNSHAW, William C.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, Jennifer; *et al.* **Cell biology**. Third edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2017.

QURESHI, Sabuhi *et al.* Comparative study between liquid-based cytology & conventional Pap smear for cytological follow up of treated patients of cancer cervix. **Indian Journal Of Medical Research**, [s.l.], v. 147, n. 3, p.263-267, 2018. Medknow. http://dx.doi.org/10.4103/ijmr.ijmr_854_16.

REMMERBACH, T. W. *et al.* Earliest Detection of Oral Cancer Using Non-Invasive Brush Biopsy Including DNA-Image-Cytometry: Report on Four Cases. **Analytical Cellular Pathology**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.159-166, 2003. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2003/305151>.

ROSENDO, Denise Andrade *et al.* Atypical squamous cells of indeterminate significance (ASC-US): follow-up of assay in Instituto Adolfo Lutz. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, [s.l.], v. 50, n. 3, 2018. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. <http://dx.doi.org/10.21877/2448-3877.201800680>.

RÜSCHOFF, J. *et al.* Prognostic significance of nucleolar organizing regions (NORs) in carcinomas of the sigmoid colon and rectum. **Path Res Pract**, v. 186, p. 85-91, 1989.

RÜSCHOFF, J.; BARTH, P. Theory and application of silver staining of nucleolus organizer regions (AgNOR). **Der Pathologe**, v. 13, n. 1, p. 13–19, 1992.

RYU, K.J *et al.* Management of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix with human papilloma virus infection among young women aged less than 25 years. **Diagn Cytopathol**. v.12, n. 44, p. 959-963, 2016.

SAKAI, Yuriko Ito *et al.* Morphometric Evaluation of Nucleolar Organizer Regions in Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Pathology - Research And Practice**, [s.l.], v. 197, n. 3, p.189-192, jan. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1078/0344-0338-00032>.

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

SELLORS, John W; SANKARANARAYANAN, R; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: manual para principiante**. Lyon: Centro Internacional de Pesquisas sobre o Câncer, 2004

SHANMUGASUNDARAM, S; YOU, J. Targeting Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses*, [s.l.], v. 9, n. 8, p.229-231, 18 ago. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v9080229>.

SHARMA, R; KUMAR, G, Significance of Silver Binding Nucleolar Organizer Regions in Oral Squamous Cell Carcinomas. **International Journal Of Scientific Study**. v.3, n.12, p. 189-193, 2018.

SHUKLA, Samarth *et al.* A Study on the Nucleolar Organizer Regions-As a Tumour Proliferative Marker in Cervical Smears. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, [s.l.], p.278-283, 2013. <http://dx.doi.org/10.7860/jcdr/2013/4808.2746>.

SIRRI, V; ROUSSEL, P; HERNANDEZ-VERDUN, D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. **Micron**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.121-126, abr. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0968-4328\(99\)00068-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0968-4328(99)00068-2).

SMITH, J. *et al.* Recurrence rates and clinical outcome for dogs with grade II mast cell tumours with a low AgNOR count and Ki67 index treated with surgery alone. **Veterinary And Comparative Oncology**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.36-45, 3 fev. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/vco.12140>.

SOARES, M. B. O.; SILVA, S. R.; Análise de um Programa Municipal de Prevenção do Câncer Cérvico Cérvico-Uterino. **Rev. Brasil. Enfer.** – REBEn. Brasil, 2010.

SRIVASTAVA, A. *et al.* “Diagnostic importance of AgNOR pleomorphism in cervical carcinogenesis.” **Ecancermedicalscience**. v. 7, n. 287, 2013.

SUBRAMANIAM, Akila *et al.* Invasive Cervical Cancer and Screening. **Journal Of Lower Genital Tract Disease**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.110-113, abr. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/lgt.0b013e3181f515a2>.

TORRE, Lindsey A. *et al.* Global Cancer in Women: Burden and Trends. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.444-457, 21 fev. 2017. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.epi-16-0858>.

ULLAH, Humaira Atta *et al.* Significance of Agnor Staining In Determining Malignant or Benign Pleural Effusions. **Indo Am. J. P**, v. 5, n. 5, p.3864-3868, 2018.

VÁSQUEZ, S.Y; BARRIOS, J.B; FERNANDO, G.T; Analysis nucleolar organizer regions (NORs) and intraepithelial neoplasia in cervical cancer. **Acta Microscopica**. v. 22. p. 49-56. 2013

VON KNEBEL DOEBERITZ, M.; WENTZENSEN, N. The Cell: Basic Structure and Function. *In: Comprehensive Cytopathology*. [s.l.]: Elsevier, 2008, p. 3–22. Disponível em: http://www.crossref.org/deleted_DOI.html. Acesso em: 8 mar. 2020

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Comprehensive cervical cancer control: A guide to essential practice**. 2. ed. [s.l.], 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Screening as well as vaccination is essential in the fight against cervical cancer**. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/cancers/fight-cervical-cancer/en/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Cancer Observatory**, 2018. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 29 mar. 2019.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise Multimodal das Atípias do Colo Uterino

Pesquisador: Alexandre Sherley Casimiro Onofre

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57423616.3.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.326.458

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda de um estudo Programa de pós-graduação em Ciências Médicas e Programa de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina orientado pelo professor dr. Alexandre Sherley Casimiro Onofre. Estudo prospectivo transversal, envolvendo mulheres que serão atendidas no ambulatório de ginecologia e colposcopia do Hospital Universitário da UFSC, que apresentarem alterações citológicas na colpocitologia oncótica. Os pesquisadores apresentaram como justificativa para a realização da emenda os seguintes aspectos: "Registrar que o teste de HPV previsto na metodologia o projetos será

realizado pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF). A declaração do diretor do referido Laboratório autorizando sua execução foi anexadas; Incluir a aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmácia Carolina Marian Pedrini (CPF: 060.245.859-50); Como algumas das metodologias do projeto não foram possíveis de serem executadas em tempo hábil por dificuldades relacionadas ao atraso de quase

um ano para a coleta das amostras das pacientes e obtenção dos reagentes para as metodologias previstas, alteração de cronograma ampliando o prazo de coleta de demais etapas." Os pesquisadores esclarecem que não houve alteração do projeto original em nenhuma das etapas, permanecendo, os mesmos objetivos e metodologias anteriormente propostas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.326.458

Realizar uma análise multimodal das atipias do colo uterino utilizando métodos tais como a citometria do DNA (DNA-ICM), imunocitoquímica, teste de HPV, AgNOR e hibridização in situ por fluorescência (FISH).

Objetivo Secundário:

. Avaliar a ploidia do DNA nas células atípicas; . Analisar a positividade dos anticorpos anti-Ki67, anti-p53 e anti p16ink4a; . Analisar a associação entre os graus de atipias identificados nas células cervicais e a presença do HPV detectada por PCR e captura híbrida e sua genotipagem; . Identificar os subtipos de HPV de alto risco mais prevalentes no nosso meio; . Analisar a hiperexpressão das regiões nucleolares por prata (AgNOR) nas células atípicas; . Identificar alterações cromossômicas em células atípicas por hibridização in situ por fluorescência. Fazer uma análise comparativa multimodal em prever o risco de gravidade das lesões; . Identificar os sinais/achados colposcópicos mais importantes numa análise conjunta com a ploidia do DNA em prever o risco de gravidade das lesões

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos são mínimos decorrentes da coleta cérvico-vaginal, já realizada e indicada rotineiramente.

Benefícios:

As pacientes que apresentarem resultados positivos nos métodos adjuvantes serão convidadas a visita médica para acompanhamento adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores realizaram a justificativa da emenda e anexaram a documentação informada relativo a inclusão do novo laboratório e de novo pesquisador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE sem alteração relacionada a primeira versão.

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conclusão: aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC**



Continuação do Parecer: 3.326.458

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_133902_4_E1.pdf	22/04/2019 11:00:35		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao.pdf	22/04/2019 10:59:01	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Outros	Emenda.pdf	22/04/2019 10:58:09	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoGuardaChuva2016.pdf	28/06/2016 15:00:45	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoDiretor.pdf	28/06/2016 15:00:27	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/06/2016 14:58:51	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	28/06/2016 14:54:13	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 15 de Maio de 2019

Assinado por:
Nelson Canzian da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências da Saúde
Hospital Universitário
Curso de Pós-Graduação em Farmácia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Sra. está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa “Análise Multimodal das Atípias do Colo Uterino” a ser desenvolvida na Universidade Federal de Santa Catarina sob a responsabilidade do Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre. Nesse estudo pretende-se avaliar o grau de severidade da lesão evidenciada no seu último exame preventivo utilizando algumas metodologias tais como a citometria do DNA (DNA-ICM), imunocitoquímica, teste de Papiloma vírus humano (HPV), coloração pela prata das regiões organizadoras de nucléolos (AgNOR) e hibridização in situ por fluorescência (FISH).

O motivo que nos levou a este estudo é poder proporcionar um diagnóstico precoce das lesões que poderão progredir ao câncer do colo do útero, tendo como benefício um tratamento e/ou controle mais adequado para seu caso, visando sempre a cura completa da lesão. Devido a lesão diagnosticada no seu último exame, você será submetida ao exame colposcópico (exame necessário para identificar o local da lesão) e biópsia caso haja necessidade. É importante ressaltar que todos esses procedimentos realizados durante a consulta, são rotineiramente realizados em todas as pacientes com preventivo alterado, mesmo naquelas que não façam parte da pesquisa.

Assinando este termo, a Sra concorda em participar deste estudo permitindo uma nova coleta de preventivo para confirmar o resultado anterior, o acesso ao material pertencente a senhora (preventivo e biópsia) e também as informações que estão nas fichas dos exames de preventivo, colposcopia e biópsia e responderá a um questionário epidemiológico. Essa nova coleta de preventivo além de confirmar o resultado anterior, poderá ser utilizada para a realização dos outros testes tais como DNAICM, imunocitoquímica, HPV, AgNOR e FISH. Como desconfortos e riscos, você poderá sentir um pequeno desconforto durante a coleta do preventivo, durante a introdução do espéculo ou coleta de células do colo do útero. Como haverá acesso aos seus dados, há um risco de perda de sigilo dessas informações, mas os pesquisadores garantem que tomarão todos os cuidados para evitar que isso ocorra.

A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que será atendida pela médica pesquisadora responsável pela conduta deste estudo, Dra Adriane Pogere.

A Sra tem a garantia que receberá respostas ou esclarecimentos a todas as suas perguntas sobre os assuntos relacionados à pesquisa, por meio do contato com os pesquisadores. A Sra não terá nenhuma despesa decorrente desta pesquisa, nem receberá qualquer vantagem financeira e tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, sem qualquer represália/prejuízo a seu atendimento. Os pesquisadores declaram que cumprirão as exigências contidas na Resolução CNS 466/2012 (especialmente nos itens IV.3 e IV.4), que o sigilo/privacidade dos participantes será garantido durante todas as etapas

da pesquisa, inclusive na divulgação dos resultados, que os participantes terão direito ao ressarcimento de eventuais despesas e indenização diante de eventuais danos produzidos pela pesquisa. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada.

A Sra. terá assegurado o seu tratamento e acompanhamento clínico da mesma forma como é feito com as mulheres que fazem controle por neoplasia intraepitelial cervical, ou seja, será submetida a exame ginecológico e colposcópico semestral durante o período mínimo de 2 anos. Após este período de tempo e com os resultados desses exames negativos, a Sra. será encaminhada à sua unidade básica de saúde para controle anual de rotina. Este termo de consentimento encontra-se impresso em 2 (duas) vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você.

Dúvidas sobre a pesquisa envolvendo princípios éticos poderão ser questionadas diretamente a Dra Adriane Pogere ou ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC localizado no prédio Reitoria II, 4º andar, sala 401, localizado na Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, Trindade, Florianópolis. Telefone para contato: 3721-6094.

Eu, _____, portadora do RG/CPF _____, concordo em participar desta pesquisa, bem como com a utilização dos dados coletados, desde que seja mantido o sigilo de minha identificação, 129 conforme normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. A minha participação é voluntária podendo ser suspensa a qualquer momento. Pelo presente consentimento, declaro que fui esclarecida sobre a pesquisa a ser realizada, de forma detalhada, livre de qualquer constrangimento e obrigação, e que recebi uma cópia deste termo, assinada pelos pesquisadores.

Florianópolis, _____ de _____ de _____.

Nome e assinatura da paciente

**Dr. Alexandre Sherley
Casimiro Onofre**
Responsável pela Pesquisa
(48) 37213474
e-mail: asonofre@hotmail.com

Dra. Adriane Pogere
Pesquisadora Participante
(48) 30394417
e-mail:
adripogere@hotmail.com

ANEXO C – Instrumento de coleta dos dados

PROTOCOLO DE PESQUISA**DADOS PESSOAIS:**

Nome: _____
 Prontuário: _____ Idade _____ anos
 Estado civil: () casada () união estável () solteira () outros
 Escolaridade (anos completos): _____ anos.
 Procedência (bairro): _____
 Naturalidade: _____
 Fumante: () sim () não no cigarros/dia: _____
 Doenças crônicas: () sim () não
 Qual(is): _____
 Medicações utilizadas: _____

ANTECEDENTES GINECOLÓGICOS:

Idade da primeira relação sexual: _____ anos
 Último preventivo realizado (em meses ou anos): _____
 IST prévias: () sim () não
 () sífilis () gonorréia () clamídia () trichomonas () condilomas ()
 HIV () herpes genital Outros: _____
 Método anticoncepcional : () ACO () DIU () injetável mensal
 Outros: _____
 Condon: () sim () não () às vezes

ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS:

G:____ P:____ C:____ A:____ () espontâneo () provocado () ectópica
 Idade no primeiro parto: _____ anos.

CITOLOGIA DO ENCAMINHAMENTO:

()ASCUS ()ASC-H ()LSIL ()HSIL ()atipias glandulares SOE
 ()atipias glandulares, possivelmente neoplásicas.

IMPRESSÃO COLPOSCÓPICA:

() achados normais. ZTT tipo _____.

- alteração regenerativa.
- alteração de grau menor.
- alteração de grau maior.
- sugestivo de câncer invasor.

CITOLOGIA (BASE LÍQUIDA):

- Negativo ASCUS ASC-H LSIL HSIL Ca invasor
- atipias glandulares SOE atipias glandulares, possivelmente neoplásicas
- adenocarcinoma “in situ” adenocarcinoma invasor

ANATOMO – PATOLÓGICO:

- Negativo NIC 1 NIC 2 NIC 3 Ca micro invasor Ca
- invasor escamoso adenocarcinoma “in situ” adenocarcinoma
- invasor

CITOMETRIA:

- Diploide Poliploide Aneuploide

TESTE HPV:

- negativo
- positivo: 16 18 31 33 35 39 45 51 52 56 58 59 66 68

IMUNOHISTOQUÍMICA:

anti-Ki67: _____

anti-p53: _____

anti p16ink4a: _____