

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Tainee Bottamedi

**Aplicação da expressão de AgNORs em lesões cervicais**

Florianópolis

2022

Tainee Bottamedi

## **Aplicação da expressão de AgNORs em lesões cervicais**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Farmacêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Botelho de Miranda Onofre.

Florianópolis

2022

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

Bottamedi, Tainee  
Aplicação da expressão de AgNORs em lesões cervicais /  
Tainee Bottamedi ; orientador, Profa. Dra. Fabiana Botelho  
de Miranda Onofre, 2022.  
52 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Câncer cervical. 3. Região Organizadora  
de Nucléolo. 4. Proliferação celular. I. Botelho de Miranda  
Onofre, Profa. Dra. Fabiana. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Tainee Bottamedi

## **Aplicação da expressão de AgNORs em lesões cervicais**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Farmacêutica e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Florianópolis, 15 de março de 2022.

---

Profa. Dra. Liliete Canes Souza Cordeiro

Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Profa. Dra. Fabiana Botelho de Miranda Onofre

Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina

---

Profa. Dra. Beatriz Garcia Mendes Borba

Avaliadora

Universidade Federal de Santa Catarina

---

Ma. Ane Francyne Costa

Avaliadora

Universidade Federal de Santa Catarina

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Venicio e Milene, que não mediram esforços desde o início e tornaram possível que eu realizasse minha formação longe de casa da melhor maneira, sem deixar faltar nada e sempre acreditando no meu potencial.

À Universidade Federal de Santa Catarina, que foi meu lar durante a graduação e todos os professores e funcionários que estiveram presentes na minha trajetória, em especial minha orientadora Profa. Dra. Fabiana Botelho de Miranda Onofre que se fez disponível desde que passei pela disciplina de Citologia e me abriu várias oportunidades, contribuindo para minha formação acadêmica e pessoal. Agradeço toda a atenção e auxílio, bem como ao Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre por todas as palavras de incentivo desde o início do meu contato com as análises clínicas, o que me fez demonstrar interesse pela área.

Às amigas que ganhei da faculdade Fernanda, Gabriela Salim, Heloisa, Iara, Isadora e Luisa, entre tantos outros, que tornaram tudo suportável apesar de todo o desespero durante esses cinco anos. Agradeço todas as risadas, almoços no RU e resumos compartilhados, espero poder continuar crescendo ao lado de vocês.

A todos os meus amigos, de Florianópolis e especialmente de Brusque, tanto os que me acompanham desde o colégio quanto os que surgiram mais tarde, que sempre me deram espaço para desabafar, vibrando e festejando com todas as minhas conquistas. Em especial, agradeço ao Felipe, por ter acompanhado a finalização desse trabalho e tornado tudo mais leve, me apoiando pelo caminho.

A todos que fizeram parte de alguma forma da minha formação acadêmica, meu muito obrigada!

## RESUMO

O câncer de colo do útero é uma das neoplasias do trato genital mais incidentes na população feminina mundial. Trata-se de uma desordem causada pelo Papilomavírus Humano (HPV) no epitélio do colo uterino que pode evoluir para uma transformação maligna e levar à rápida proliferação celular. Em vista disso, novas técnicas de avaliação de marcadores proliferativos mostram-se úteis para o acompanhamento da progressão das lesões. Dentre elas, revela-se promissora a técnica de coloração por prata das regiões organizadoras de nucléolo. O presente estudo consistiu em uma revisão bibliográfica narrativa de modo a verificar a expressão das regiões organizadoras de nucléolo coradas por prata (AgNORs) e caracterizar o desempenho desse marcador quanto à proliferação celular quando utilizado em lesões cervicais. Além disso, expor a importância da prevenção e do diagnóstico precoce de lesões precursoras do câncer de colo do útero e os fatores influentes para seu desenvolvimento. Foram encontradas dezoito publicações entre os anos de 1992 e 2021 que utilizaram amostras de biópsias ou esfregaços cervicais de mulheres apresentando lesões, atípicas e/ou carcinomas. As contagens das regiões coradas por prata foram realizadas de forma manual ou automatizada, sendo que algumas levaram em consideração a área e o formato dos pontos, enquanto outras apenas os quantificaram. A técnica de AgNOR demonstrou ser útil na determinação do prognóstico e acompanhamento das lesões. Elevação no número, tamanho ou pleomorfismos das regiões coradas sugerem aumento do grau da lesão. AgNOR foi considerado um marcador de proliferação simples, barato e confiável em lesões do colo do útero em comparação com outros marcadores.

**Palavras-chave:** Câncer cervical. Região Organizadora de Nucléolo. Proliferação celular.

## ABSTRACT

Cervical cancer is one of the most frequent neoplasms of the genital tract in the female population worldwide. It is a disorder caused by the Human Papillomavirus (HPV) in the uterine cervix epithelium that can progress to a malignant transformation and lead to rapid cell proliferation. In view of this, new techniques for evaluating proliferative markers are useful for monitoring the progression of lesions. Among them, the technique of silver staining of nucleolus organizing regions seems to be promising. The present study consisted of a narrative literature review in order to verify the expression of silver-stained nucleolus organizer regions (AgNORs) and characterize the performance of this marker in terms of cell proliferation when used in cervical lesions. In addition, to expose the importance of prevention and early diagnosis of precursor lesions of cervical cancer and the influential factors for its development. Eighteen publications were found between 1992 and 2021 that used biopsy samples or cervical smears from women with lesions, atypia and/or carcinomas. The counts of the silver-stained regions were performed manually or automatically, with some taking into account the area and shape of the points, while others only quantified them. The AgNOR technique proved to be useful in determining the prognosis and follow-up of lesions. Elevation in the number, size or pleomorphisms of the stained regions suggest an increase in the degree of the lesion. AgNOR was found to be a simple, inexpensive and reliable marker of proliferation in cervical lesions compared to other markers.

**Keywords:** Cervical cancer. Nucleolar Organizer Region. Cell proliferation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade da Federação.....	14
Figura 2 – Taxas brutas de incidência estimadas para 2020, por sexo, para Santa Catarina e Florianópolis.....	14
Figura 3 – Estrutura do Papilomavírus Humano.....	18
Figura 4 – Progressão das lesões cervicais após infecção pelo vírus HPV.....	22
Figura 5 – Fases do ciclo celular.....	23
Figura 6 – Regiões organizadoras de nucléolo coradas por prata (AgNORs).....	27

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Equivalências entre as classificações de Papanicolaou, Reagan, Richart e o Sistema de Bethesda.....	18
Quadro 2 – Classificação do HPV de acordo com seu potencial oncogênico.....	19
Quadro 3 – Caracterização das publicações.....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNOR	Região organizadora de nucléolo corada por prata
ASC-H	Células escamosas atípicas que não permitem excluir uma lesão de alto grau
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
CEC	Carcinoma espinocelular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HPV	Papilomavírus Humano
HSIL	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
JEC	Junção escamocolunar
LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
MEDLINE	Sistema Online de Busca e Análise de Literatura Médica
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NILM	Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade
NOR	Região organizadora de nucléolo
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Fase de leitura aberta
PCR	Reação em cadeia da polimerase

pRB	Proteína Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	Ácido ribonucleico ribossômico
SciELO	Biblioteca Eletrônica Científica Online
SUS	Sistema Único de Saúde
ZT	Zona de transformação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1	COLO DO ÚTERO E CÂNCER CERVICAL	16
1.2	VÍRUS HPV	18
1.3	PROGRESSÃO DO CÂNCER DE COLO DO ÚTERO	21
1.4	PROLIFERAÇÃO CELULAR	22
1.5	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	24
1.6	REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLO	26
1.7	JUSTIFICATIVA	28
1.8	OBJETIVOS	29
1.8.1	Objetivo geral	29
1.8.2	Objetivos específicos	30
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>43</b>
	REFERÊNCIAS	44

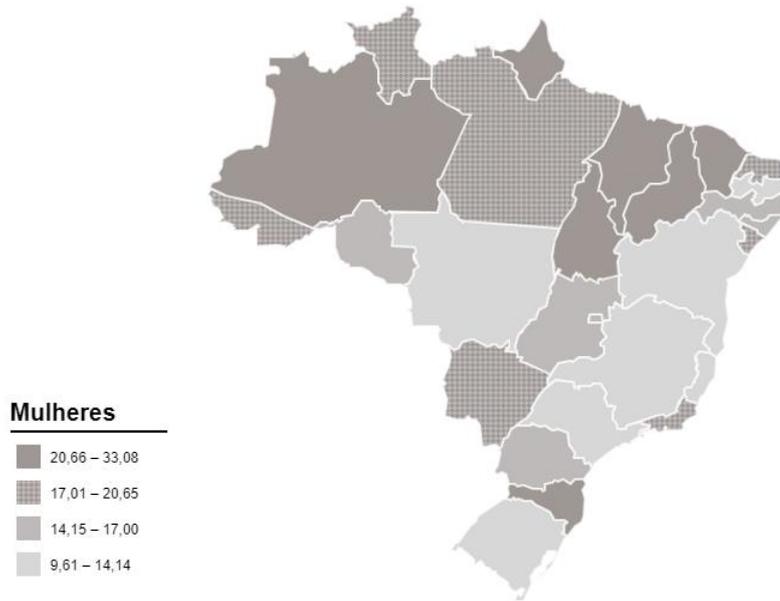
## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as neoplasias do trato genital feminino, destaca-se o câncer de colo do útero, também chamado de câncer cervical. É predominantemente causado pela infecção persistente por alguns tipos do Papilomavírus Humano (HPV) chamados de oncogênicos. Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), “é caracterizado pela replicação desordenada do epitélio de revestimento do órgão, comprometendo o tecido subjacente (estroma) e podendo invadir estruturas e órgãos contíguos ou à distância” (INCA, 2021a). É uma neoplasia com altas chances de prevenção e cura, contudo, ainda assim, apresenta números elevados de novos casos e mortes.

Para 2020, a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), parte da Organização Mundial da Saúde (OMS), estimou a ocorrência de mais de 600 mil novos casos por esse câncer em todo o mundo, que ocupa a sétima posição em incidência no ranking mundial, sendo o quarto tipo mais comum na população feminina e representando 6,5% dos casos novos. As maiores incidências registradas foram de câncer de mama (24,2%), cólon e reto (9,5%) e pulmão (8,4%) (FERLAY *et al.*, 2021).

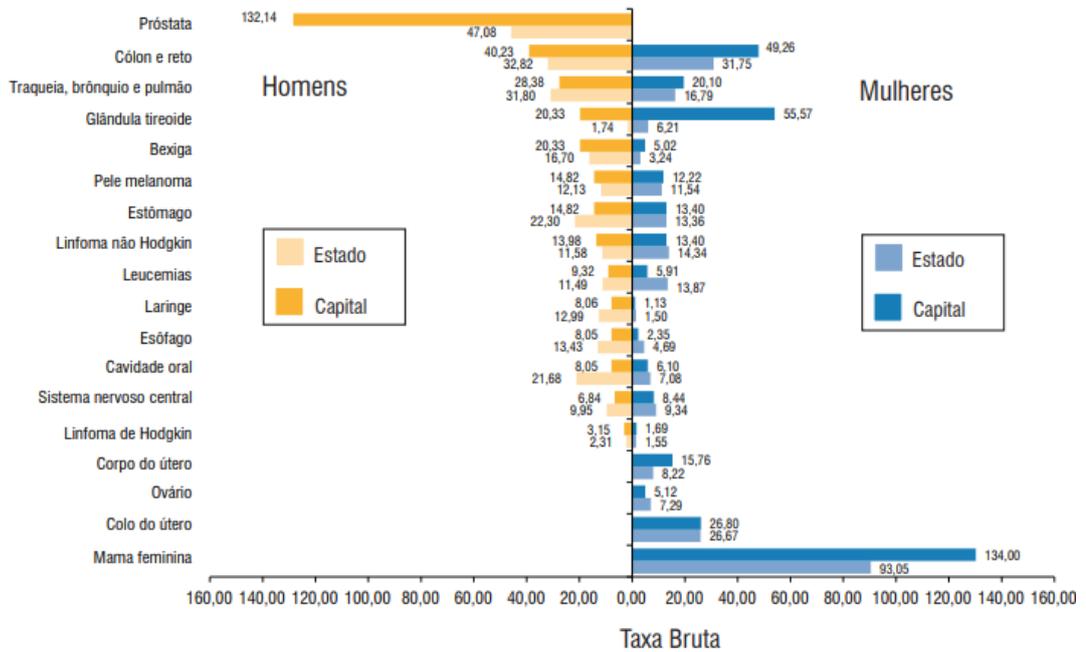
No Brasil, são esperados 16.590 casos novos de câncer do colo do útero para cada ano do triênio 2020-2022, fazendo com que ocupe a terceira posição em incidência com um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2019). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, é o câncer mais incidente na região Norte (22,47/100 mil), estando na segunda posição nas regiões Nordeste (17,62/100 mil) e Centro-Oeste (15,92/100 mil), quarta posição na região Sul (17,48/100 mil), e quinta posição na região Sudeste (12,01/100 mil). As taxas brutas de incidência por estado estão representadas na Figura 1. A previsão para o ano de 2020 no estado de Santa Catarina foi de 970 casos novos, com uma taxa bruta de incidência de 26,67 a cada 100 mil habitantes, enquanto na região da Grande Florianópolis a estimativa foi de 70 novos casos, com taxa bruta de 26,80 por 100 mil habitantes (Figura 2) (INCA, 2020).

**Figura 1** – Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade da Federação.



Fonte: INCA, 2020.

**Figura 2** – Taxas brutas de incidência estimadas para 2020, por sexo, para Santa Catarina e Florianópolis\*



Fonte: INCA, 2020.

\*Valores por 100 mil habitantes.

A infecção por papilomavírus humano (HPV) é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns em todo o mundo (CIAPPONI *et al.*, 2011). Por conseguinte, torna-se imprescindível que os testes de rastreamento sejam expandidos para a população e que sejam utilizadas novas técnicas preditivas como a coloração com prata (método AgNOR) que permite uma avaliação rápida da morfologia e cinética das células tumorais mesmo em pequenas biópsias (BUKHARI *et al.*, 2007).

A partir do reconhecimento do HPV como um fator causal e necessário no desenvolvimento do câncer cervical, tornou-se possível o aprofundamento do estudo do vírus e desenvolvimento de métodos de prevenção, como as vacinas bivalente, quadrivalente (disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde – SUS) e nonavalente (NAKAGAWA; SCHIRMER; BARBIERI, 2010).

Em vista disso, o combate ao câncer de colo do útero deve ser executado através do rastreamento das lesões precursoras, mais comumente realizado por meio do exame citopatológico de Papanicolaou. Contudo, o campo da citopatologia tem visto avanços na pesquisa de técnicas de coloração, marcadores de proliferação celular e análises morfométricas. Dos métodos de análise de proliferação celular, um dos mais simples é a coloração com prata das regiões organizadoras de nucléolo (NORs), que uma vez coradas, auxiliam na detecção do estado da proliferação celular (SHUKLA, 2013). Diversos métodos para a coloração por nitrato de prata já foram estabelecidos, de acordo com o tipo de fixação e o tipo de tecido a ser analisado. Um obstáculo apresentado por essa técnica é a avaliação manual, que acaba tornando o processo muito sujeito a erros humanos, tais como variação nas percepções visuais, variação no nível de especialização dos observadores e uma demanda maior de tempo (AMORIM *et al.*, 2020).

O nucléolo é uma estrutura nuclear com função principal de síntese proteica, entretanto, outras funções foram identificadas para muitas proteínas nucleolares, tais como o controle do ciclo celular, respostas ao estresse celular e síntese de pequenos RNAs e complexos RNA-proteína. Assim como ele influencia na proliferação e crescimento celular, é comum identificar distúrbios e alterações em sua estrutura e função em várias doenças, incluindo câncer (TEITTINEN *et al.*, 2012).

## 1.1 COLO DO ÚTERO E CÂNCER CERVICAL

O colo do útero é formado por duas partes e é revestido por dois tipos diferentes de células: a endocérvice, parte mais interna, é coberta por células colunares glandulares; e a ectocérvice, parte externa, é coberta por células escamosas. O ponto de encontro entre esses dois epitélios é chamado junção escamocolunar (JEC). A localização da JEC pode variar com a idade da mulher, estado menstrual e outros fatores, como gravidez e o uso de contraceptivos orais (SILVA NETO, 2012). Após a puberdade, a anatomia do colo uterino muda e parte do endocérvice se exterioriza, empurrando a JEC para fora do óstio uterino. Com isso, o tecido colunar sofre uma alteração fisiológica chamada metaplasia escamosa, que consiste na transformação do epitélio colunar em epitélio escamoso, como forma de proteção. Por fim, essa região do epitélio que sofreu metaplasia é chamada de zona de transformação (ZT). Ela compreende a zona de metaplasia situada entre a junção escamocolunar original e a junção escamocolunar após a metaplasia. Essa área é bastante vulnerável a diversos agentes agressores e é neste local em que as células normais desenvolvem as primeiras alterações, que podem ou não levar a um câncer (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004).

O conhecimento da história natural do câncer cervical contribuiu para a qualidade do tratamento das lesões que sofreram diversas modificações em suas terminologias ao longo do tempo. George N. Papanicolaou, em 1943, foi o primeiro a estabelecer uma terminologia para classificar células normais e alterações cervicais, que consistia em classes: I, II, III, IV e V, sendo a classe I correspondente à ausência de células atípicas, e a classe V indicativa de câncer (SÁ; SILVA, 2019). Em seguida, em 1953, James W. Reagan introduziu os termos “displasia” (leve, moderada e acentuada) para classificar as lesões antes da invasão, a denominação “carcinoma *in situ*” que refere-se às células cancerosas que ainda encontram-se na camada da qual se desenvolveram, sem ter se espalhado para outras camadas do órgão de origem, e o termo “hiperplasia”, para lesões menos graves que o carcinoma *in situ*, criando uma correlação entre lesões histológicas e citológicas (SILVA NETO, 2012). Essa classificação também caiu em desuso em 1967, quando

Richart estabeleceu o conceito de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) para as lesões precursoras, caracterizado por diversos graus de atipias celulares. Dessa forma, as neoplasias intraepiteliais cervicais foram divididas, histologicamente, em três graus: NIC I correspondia à displasia leve, quando acometia o terço inferior do epitélio escamoso; NIC II, à displasia moderada, quando acometia até dois terços do epitélio; e NIC III, à displasia acentuada, quando já agredia mais de dois terços do epitélio. Nesses casos, dependendo do grau de comprometimento, sucede a perda das funções celulares, havendo impedimento do controle da divisão e amadurecimento celular (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012). Richart também englobou o carcinoma *in situ* no termo NIC III (AIDÉ *et al.*, 2009; CARVALHO; QUEIROZ, 2010).

Atualmente, as lesões cervicais precursoras de neoplasias são mais comumente classificadas de acordo com o Sistema de Classificação de Bethesda de 1988, que foi revisado em 1991, 2001 e 2014 por vários especialistas em citologia, com o intuito de padronizar ao máximo a terminologia e o manejo clínico da citologia cervicovaginal. Esse sistema englobou as alterações celulares associadas ao HPV e à NIC I como “lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau” (LSIL) e as associadas às NIC II e III como “lesões intraepiteliais escamosas de alto grau” (HSIL). Ademais, foi criado o termo “atipia escamosa de significado indeterminado” (ASC-US), para os casos em que há presença de anormalidades mais acentuadas que aquelas atribuídas às alterações reativas, mas que são insuficientes para definir um diagnóstico de lesão intraepitelial ou invasora. Com a revisão de 2001, as atipias classificadas como ASC-US foram divididas em duas subcategorias: células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) e células escamosas atípicas que não permitem excluir uma lesão de alto grau (ASC-H), como uma tentativa de refletir melhor as alterações que, apesar de menos definidas, poderiam representar lesões precursoras de câncer (AGUIAR *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2012). O Quadro 1 expõe as modificações e equivalências das terminologias ao longo do tempo.

**Quadro 1** – Equivalências entre as classificações de Papanicolaou, Reagan, Richart e o Sistema de Bethesda.

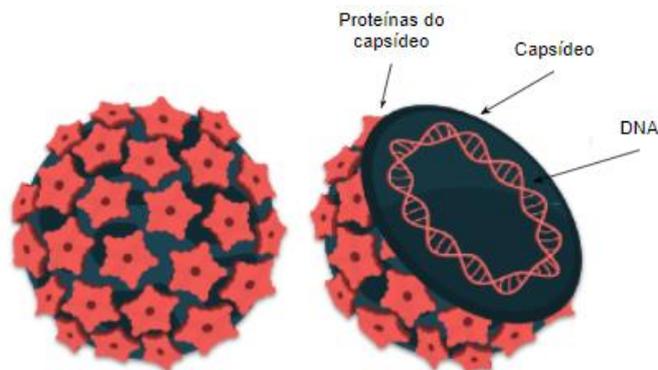
Papanicolaou (1941)	Reagan (1953)	Richart (1967)	Sistema de Bethesda (2014)
Classe I	Normal	Normal	Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade (NILM)
Classe II	Atipias	Atipias	ASC-US ASC-H
Classe III	Displasia leve	NIC I	HSIL
	Displasia moderada	NIC II	
	Displasia acentuada	NIC III	
Classe IV	Carcinoma <i>in situ</i>		
Classe V	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasivo

Fonte: Adaptado de SILVA NETO, 2012.

## 1.2 VÍRUS HPV

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus de ácido desoxirribonucleico (DNA) não-envelopado membro da família Papillomaviridae com comprovado papel etiológico sobre o câncer de colo do útero. Seu genoma é central, único, composto por duas espirais de DNA. Tem 55 nm de diâmetro, com simetria icosaédrica (Figura 3) (SILVA NETO, 2012).

**Figura 3** – Estrutura do Papilomavírus Humano.



Fonte: Adaptado de FOX, 2021.

O HPV penetra no epitélio ou no colo uterino através de microfissuras ou pelas células metaplásicas e atinge as células das camadas profundas. Uma vez que tenha entrado nas células-alvo, seus genes podem manipular o controle do ciclo celular do hospedeiro para promover a sua persistência e replicação (BRENNAN; SYRJÄNEN, 2003; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). Mais de 200 tipos distintos de Papilomavírus têm sido relatados, sendo cerca de 100 deles capazes de acometer o ser humano e, destes, cerca de 50 tipos foram caracterizados por acometer a mucosa do aparelho genital (NAKAGAWA; SCHIRMER; BARBIERI, 2010). Os tipos de HPV genitais são subdivididos em tipos de baixo risco, que causam normalmente verrugas genitais, e tipos de alto risco, que são mais frequentemente associados ao câncer cervical invasivo. Cerca de 10 a 15 tipos são considerados de alto risco, dentre eles, 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58, sendo que cada um implica um risco diferente para a paciente, com a maior carga de risco de carcinoma de células escamosas atribuída aos tipos 16 e 18. Alguns tipos virais de baixa prevalência ainda não apresentam consenso quanto à categorização de risco (Quadro 2) (MUÑOZ *et al.*, 2003; SCHIFFMAN *et al.*, 2000).

**Quadro 2** – Classificação do HPV de acordo com seu potencial oncogênico.

<b>Grau de risco</b>	<b>Sorotipos de HPV</b>
Baixo risco	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81
Alto risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, e 58

Fonte: Adaptado de MUÑOZ *et al.*, 2003

Esse vírus tende a escapar da resposta imune do hospedeiro e pode permanecer latente por tempo indeterminado. Nas células basais, ele pode existir na forma episomal (circular), na qual se mantém em pequeno número, replicando apenas quando a célula também se replica e podendo permanecer no tecido por dias, ou até por anos, sem causar nenhuma alteração tecidual; ou na forma integrada ao DNA do hospedeiro (fase produtiva) e, neste caso, na presença de outros cofatores, pode ser iniciado o processo de oncogênese (CARDIAL *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2015).

Um estudo desenvolvido por Sancer *et al.* (2021) com pacientes positivas para HPV 16 e 18 evidenciou a relação causal entre o HPV e o câncer de colo do útero. O objetivo foi avaliar o papel do HPV na proliferação e integridade do DNA de células epiteliais, sendo possível concluir que os HPV tipo 16 e 18 aumentaram a proliferação celular significativamente. Em geral, os artigos encontrados evidenciaram a prevalência dos tipos 16 e 18 nas lesões mais graves e propensas a progredir.

Além disso, foi observado também que a idade média das pacientes no grupo HPV negativo foi significativamente maior do que para os grupos HPV positivos, o que concorda com relatos anteriores de que a prevalência do HPV é maior em mulheres mais jovens do que em mulheres mais velhas e que ela tende a diminuir com a idade. Concordando com isto, em Alarcón-Romero *et al.* (2009) os casos de infecção pelo HPV foram encontrados em mulheres de em média 19 anos para LSIL e 63 anos para HSIL, enquanto a faixa etária para carcinoma de células escamosas foi de 35 a 89 anos.

Apesar de ser um fator necessário para o desenvolvimento da neoplasia, como a ocorrência de lesões em mulheres jovens infectadas pelo HPV era relativamente baixa, concluiu-se que o vírus por si só não é suficiente para desencadear o câncer (BOSCH *et al.*, 2002).

Além da infecção persistente pelo vírus, o comportamento sexual tem sido constantemente identificado como um importante fator de risco para o câncer cervical, devido à idade precoce na primeira relação sexual, o aumento do número de parceiros, o uso irregular de preservativos e coinfeções (HERRERO *et al.*, 1990; JÆR *et al.*, 1996). Para além das condições sexuais, outros cofatores também foram relacionados à gênese da neoplasia: aspectos comportamentais, como tabagismo e uso de hormônios exógenos; aspectos individuais, como idade, resposta imune e predisposição genética; e fatores relacionados ao vírus (tipo, variante e carga viral), bem como o baixo nível socioeconômico e a não participação em programas de rastreamento (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012). Maciag e Villa (1999) apontaram a possibilidade de polimorfismos em genes MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe I serem responsáveis por uma maior ou menor

susceptibilidade às infecções por HPVs de alto risco, bem como polimorfismos no códon 72 da proteína p53, importante controladora do ciclo celular.

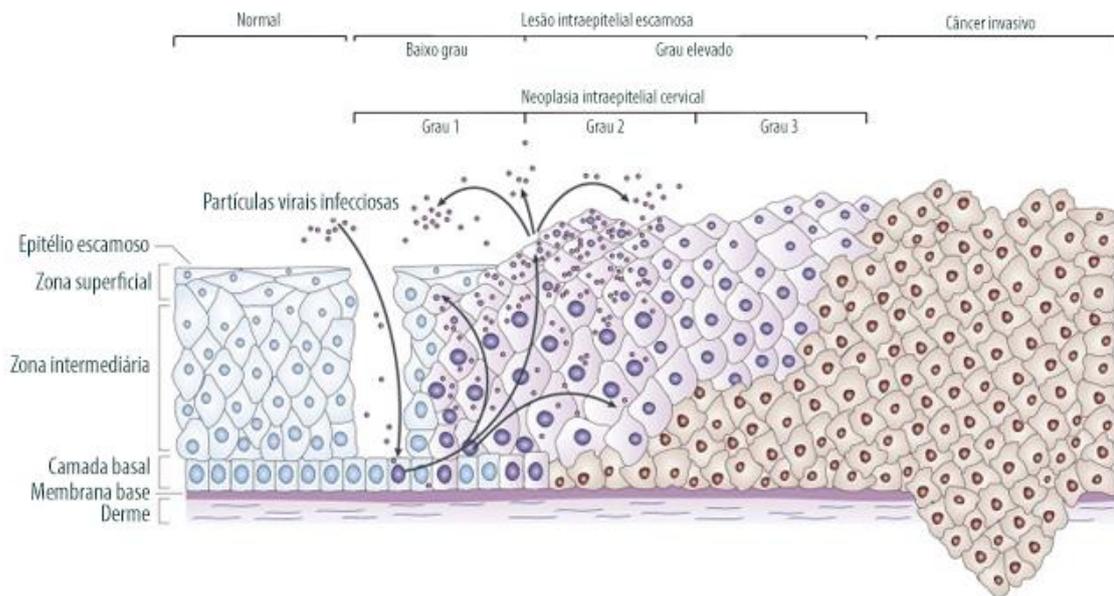
### 1.3 PROGRESSÃO DO CÂNCER DE COLO DO ÚTERO

Em geral, o desenvolvimento do câncer cervical decorre de forma lenta, seguindo alguns estágios de evolução, por isso, as chances de ser diagnosticado precocemente são maiores. Se detectado no início, é um dos tipos de câncer tratáveis com maior sucesso. Para a maioria das mulheres, as células pré-cancerosas desaparecem sem qualquer tratamento. Para algumas, contudo, quando há demora na detecção e tratamento, o câncer pode invadir o útero e gânglios linfáticos, fazendo com que as células cancerosas atinjam a circulação e migrem para outras partes mais distantes do corpo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021). O diagnóstico realizado em fase avançada é um dos maiores responsáveis pela manutenção das taxas de mortalidade elevadas (THULER; MENDONÇA, 2005).

A Organização Mundial da Saúde determinou o aumento da atividade proliferativa e da relação núcleo/citoplasma como alguns dos critérios para a determinação de atipias celulares compatíveis com a ocorrência de alterações malignas (SOARES PINTO *et al.*, 2003). As alterações celulares do epitélio escamoso podem ser observadas em esfregaços cervicais. Os critérios morfológicos clássicos na identificação da infecção por HPV incluem a coilocitose, na qual surge uma área clara circundando o núcleo discariótico com bordas bem definidas; e a disceratose, processo de queratinização intracelular (JORDÃO *et al.*, 2003). As células com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) aparecem com um núcleo aumentado e com a cromatina irregular, característica da discariose. A principal distinção entre lesões de baixo e alto grau é feita a partir da relação núcleo/citoplasma e a maturação celular. Como as células com lesão de alto grau são menos maduras que em baixo grau, há um aumento na relação núcleo/citoplasma, devido a um menor tamanho citoplasmático (NAYAR; WILBUR, 2015).

A Figura 4 evidencia a mudança de morfologia das células com a progressão das lesões cervicais.

**Figura 4** – Progressão das lesões cervicais após infecção pelo vírus HPV.



Fonte: Adaptado de WOODMAN *et al.*, 2007.

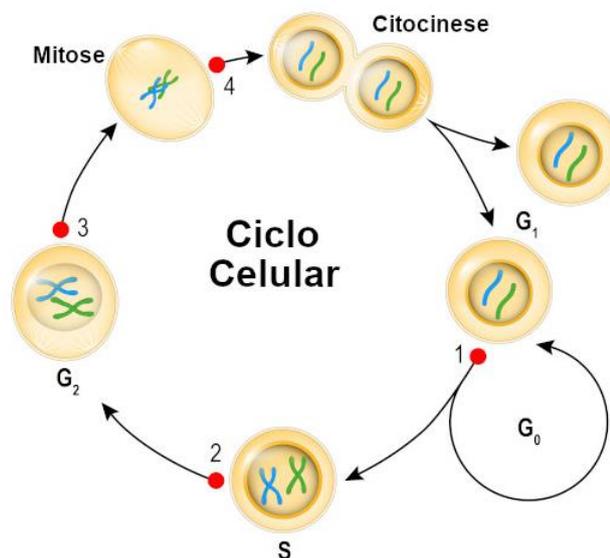
#### 1.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Quando uma célula nasce, até ela se dividir em uma nova, passa por um período de intervalo de intensa atividade metabólica com maior síntese de proteínas e crescimento. Esse período é denominado ciclo celular (Figura 5), que engloba a intérfase e a mitose. A mitose é a fase de divisão celular e é separada da divisão seguinte pela intérfase (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A intérfase é dividida em três etapas: G1, S e G2. A célula que não está replicando apresenta-se na fase G0, em que o DNA apresenta-se mais envelhado, com baixa atividade nuclear. A fase G1 é responsável pela preparação da célula para a multiplicação. Para isso, ocorre a formação de complexos de proteínas e constituintes celulares essenciais para a fase seguinte. Na fase S, ocorre a síntese e replicação do DNA. Na fase G2 há duplicação de centríolos e outras organelas

citoplasmáticas e síntese de componentes para a mitose, como a produção do fuso mitótico. Além disso, é retomada a intensa transcrição e síntese de moléculas necessárias para a segregação dos cromossomos e a própria divisão celular. O ciclo celular é controlado por genes supressores e estimuladores da proliferação celular, que podem sofrer mutações e tornarem-se carcinogênicos, causando multiplicação celular excessiva. Outra forma de alterar esse processo é pela ação de vírus, como o HPV (RIVOIRE *et al.*, 2001; TAVARES; PERDIGÃO, 2001).

**Figura 5 – Fases do ciclo celular**



Fonte: SANTOS, 2022

O genoma do HPV é constituído por aproximadamente oito *open reading frames* (ORF), ou fases de leitura aberta, possuindo pelo menos seis genes que se expressam precocemente e dois genes que se expressam tardiamente, sendo denominados respectivamente de E (*Early*) e L (*Late*). A região L é formada pelos genes L1 e L2, que codificam as proteínas do capsídeo. A região E é formada pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, dentre estes, E1 tem relação com a replicação viral, E2 com a transcrição e replicação, E4 é expressa nos estágios tardios da infecção e tem relação com a maturação viral, alteração da matriz intracelular e liberação das novas partículas virais, enquanto E5, E6 e E7 estão envolvidos na transformação

celular. Como o gene E5 apresenta altos níveis de expressão em neoplasias intraepiteliais cervicais e baixos níveis de expressão em carcinomas cervicais invasivos, é possível que sua função seja mais voltada aos estágios iniciais da carcinogênese (CAMARA *et al.*, 2003, SOUTO; FALHARI; DA CRUZ, 2005).

O potencial carcinogênico dos HPVs de alto risco decorre das proteínas E6 e E7, chamadas de oncoproteínas, responsáveis por interferir no controle do ciclo celular, resultando em proliferação celular exacerbada, e indiretamente também da proteína E2. A oncoproteína E6 acelera os mecanismos de degradação da p53, proteína supressora do crescimento tumoral que atua em resposta a sinais de dano celular, interferindo nos mecanismos de apoptose e reparo do DNA, além de degradar outras proteínas envolvidas no controle do crescimento tumoral, induzir a atividade da telomerase e imortalização celular. Já a oncoproteína E7 age na proteína supressora tumoral pRb (proteína retinoblastoma), também afetando o controle do ciclo celular (FETT-CONTE; SALLES, 2002, YIM; PARK, 2005).

A proteína E2 atua diminuindo a expressão das proteínas E6 e E7. Após a integração do genoma viral ao DNA do indivíduo, ocorre ruptura do gene E2 e, conseqüentemente, diminuição da função inibitória desse gene sobre E6 e E7, que passam a ser expressos em maior quantidade (CAMARA *et al.*, 2003).

## 1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

No Brasil, desde 1988, o exame colpocitológico de Papanicolaou é a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde para mulheres entre 25 e 64 anos de idade. É considerado um método de baixo custo, simples e de fácil execução. O exame é repetido a cada três anos após dois exames normais consecutivos realizados com um intervalo de um ano (SANTANA *et al.*, 2018). É realizado com a paciente em posição ginecológica e primeiramente é analisada a região externa da vagina para observar a presença de corrimento, verrugas ou alguma outra anormalidade. Em seguida, é introduzido um espécúlo para que seja possível a visualização do colo do útero. A coleta então é feita por raspagem com uma espátula de madeira ou escova endocervical, de modo a colher amostras da

parte interna (células glandulares) e da zona de transformação. Por fim, o material coletado é colocado em uma lâmina e levado para análise em laboratório (SILVA NETO, 2012).

A coleta pode ser feita de maneira convencional ou em meio líquido, no qual as células são colocadas em líquido fixador e processadas no laboratório (BRAGAGNOLO; ELI; HAAS, 2010). Em seguida, é realizada uma avaliação de modo a identificar amostras que devem ser rejeitadas, por estarem inadequadamente identificadas ou danificadas, impedindo a leitura. Nesse caso, é necessária uma nova coleta. Caso estejam adequadas, as amostras podem ser classificadas como satisfatórias ou insatisfatórias. Amostras satisfatórias apresentam elementos da JEC, ou seja, células do epitélio escamoso, glandular e eventualmente metaplásico, sem presença de sangue ou outros contaminantes externos, contendo uma quantidade suficiente de células sem intensa sobreposição. Da mesma forma, as amostras insatisfatórias implicam nova coleta (DERCHAIN; LONGATTO FILHO; SYRJANEN, 2005; SILVA NETO, 2012).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o diagnóstico de câncer cervical ocorre mais frequentemente em pacientes entre 30 e 39 anos de idade. É mais raro o desenvolvimento em mulheres com menos de 20 anos ou que fizeram exames regulares para rastreamento antes dos 65 anos (INCA, 2021b). Existe um amplo consenso com base nos resultados de estudos de caso-controle de que o rastreamento diminui significativamente a incidência e mortalidade (MYERS *et al.*, 2000).

Outros testes de triagem também são utilizados, como a inspeção visual com ácido acético. Essa técnica permite a visualização da alteração do epitélio com diminuição da transparência, devido ao acetobranqueamento promovido pelo ácido acético como resultado da coagulação reversível das proteínas nucleares. Esse branqueamento é diretamente proporcional à gravidade da lesão devido à ação mucolítica e desidratante do ácido acético. Também pode ser aplicado posteriormente o iodo de lugol, que é absorvido pelo epitélio escamoso maduro rico em glicogênio, que se torna marrom escuro, enquanto o tecido displásico, que contém pouco ou nenhum glicogênio, adquire uma coloração amarelo-mostarda (CORDEIRO *et al.*, 2005; MITRA *et al.*, 2016).

Métodos moleculares também são empregados para identificação de tipos de HPV de alto risco, realizados a partir da amplificação do DNA do vírus, mediada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ou por captura híbrida, que detecta os ácidos nucleicos por quimiluminescência. São os métodos mais específicos e mais sensíveis para revelar a presença de quantidades indetectáveis do material genético do HPV. Na prática clínica, esses testes podem ser utilizados como adjuntos à colpocitologia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021; GAŠPEROV *et al.*, 2008). Dependendo do resultado do esfregaço, a paciente é encaminhada para colposcopia e pode ser necessária uma biópsia em casos mais extremos para avaliação precisa da lesão.

## 1.6 REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLO

Além da citologia, uma técnica bastante útil na investigação de amostras cervicais é a detecção das regiões organizadoras de nucléolo (NORs). O nucléolo compreende uma estrutura esférica no núcleo das células eucarióticas. Essa estrutura está associada a um cromossomo que é chamado cromossomo organizador do nucléolo. Nele, destaca-se uma constrição secundária que está associada à região organizadora do nucléolo, responsável por produzir e processar os RNAs ribossômicos necessários para sintetizar todas as proteínas da célula (MESQUITA, 1981).

As regiões organizadoras de nucléolo nada mais são, portanto, que alças de DNA contendo genes responsáveis pela transcrição do RNA ribossômico, de 18S e 28S, situados no nucléolo da célula. Elas contêm um conjunto de proteínas argirofílicas, coradas seletivamente por métodos de prata, podendo então ser identificadas como pontos pretos localizados em toda a área nucleolar e chamadas de AgNORs (regiões organizadoras de nucléolo coradas por prata) (Figura 6) (LIMA *et al.*, 2005).

Foi observado que os números de AgNOR em intérfase estão intimamente relacionados à atividade proliferativa celular, visto que é a região do núcleo onde os RNAs ribossomais são sintetizados, processados e montados com proteínas

ribossomais. A atividade proliferativa é aumentada quando há uma maior gravidade das lesões patológicas, resultando em aumento na replicação de DNA e síntese de RNA (SRIVASTAVA *et al.*, 2019). Por isso, a pesquisa por esses marcadores biológicos expressou importância prognóstica desde que foi demonstrado que as células malignas frequentemente apresentam números de AgNOR mais elevados em comparação com células benignas ou normais correspondentes (PICH; CHIUSA; MARGARIA, 2000; TRERÈ, 1993). O método tem sido amplamente utilizado tanto no estudo citológico quanto histopatológico de vários órgãos.

**Figura 6** – Regiões organizadoras de nucléolo coradas por prata (AgNORs)\*.



Fonte: Imagem fotografada pela autora.

\*Aumento de 1000x em objetiva de imersão. Pontos corados por AgNOR são facilmente identificáveis no núcleo das células (pontos marrons).

As vantagens da técnica de AgNOR em relação a outros métodos de avaliação de proliferação celular são a simplicidade e economia, já que pode ser aplicada a um material rotineiramente processado, os reagentes são facilmente encontrados e com custo reduzido (DERENZINI, 2000). A citologia esfoliativa convencional, se complementada com essa técnica, poderia prever com antecedência e sensibilidade uma futura neoplasia, evitando procedimentos diagnósticos invasivos à paciente. A maior desvantagem, entretanto, embora apresente resultados com baixa probabilidade de erro, é a avaliação manual com risco de variações causadas pelas condições de observação e a grande propensão a erros humanos (FONTES, 2005).

Além da aplicação em atipias cervicais, a técnica vem sendo amplamente utilizada na pesquisa de outros tipos de tumores. Oshima e Forones (2001) compararam a proliferação celular através das contagens das AgNORs nos tecidos de câncer gástrico e da mucosa normal adjacente e observaram uma média de contagens significativamente maior nos núcleos das células neoplásicas do que nos núcleos das células da mucosa gástrica normal.

## 1.7 JUSTIFICATIVA

Mesmo sendo uma neoplasia capaz de ser rastreada de forma precoce através da detecção de alterações pré-cancerosas e apresentar um prognóstico favorável, com grandes chances de cura, o câncer de colo do útero ainda é um grande problema de saúde pública em todo o mundo. Tipicamente, a infecção por HPV é um fenômeno transitório e assintomático, não sendo mais detectada após 36 meses. No entanto, uma fração de mulheres, provavelmente por falha de mecanismos imunológicos, apresenta persistência da infecção, que pode provocar alterações atípicas no epitélio cervical e evoluir para transformação maligna, gerando os valores elevados de incidência exibidos anteriormente (HO *et al.*, 1998; ROTELI-MARTINS *et al.*, 2007).

Devido à importante função de produção dos RNAs ribossômicos, foi observado que o número de AgNORs em intérfase está estritamente relacionado à atividade transcricional do RNAr e, em células em proliferação contínua, à rapidez da proliferação celular. Esse tem se mostrado um parâmetro confiável para definir o desfecho clínico da doença oncológica, sendo um fator prognóstico independente em muitos tipos de tumores. AgNORs são marcadores proliferativos, ou seja, quando há maior atividade proliferativa, há maior número de pontos AgNOR, e maior é seu tamanho. Sendo assim, os dados sobre o número e distribuição de AgNORs no núcleo mostram-se úteis para a detecção de tumores e avaliação de sua progressão (MESQUITA, 1981; SRIVASTAVA *et al.*, 2019). O método tem sido amplamente utilizado tanto no estudo citológico quanto histopatológico de vários órgãos.

Considerando a lenta progressão do câncer de colo do útero, que pode levar um período de em média 12 a 15 anos desde a infecção pelo HPV até o desenvolvimento da neoplasia em si, a identificação de potenciais marcadores de proliferação celular e de progressão das lesões pode ser de grande auxílio no acompanhamento das pacientes infectadas por HPV, facilitando o diagnóstico da doença e a escolha de tratamento imediato ou aguardo da resolução espontânea (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012).

Nesse contexto, os artigos selecionados buscam abordar as regiões organizadoras de nucléolo coradas por prata (AgNOR) e verificar a aplicação da expressão das mesmas em amostras citológicas de lesões cervicais para a avaliação do risco de evolução das lesões do colo do útero e verificar as vantagens e desvantagens da técnica com relação aos métodos convencionais. Além disso, expor a importância da prevenção e realização precoce de exames de rastreamento na população feminina.

## 1.8 OBJETIVOS

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

### 1.8.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é apresentar uma revisão de literatura com as principais informações acerca da aplicação da expressão das regiões organizadoras de nucléolo coradas por prata (AgNOR) em amostras citológicas de lesões cervicais.

### 1.8.2 Objetivos específicos

- Descrever, de acordo com a literatura, os conceitos envolvendo o câncer de colo do útero, a técnica de AgNOR e sua aplicação em amostras citológicas de lesões cervicais;
- Verificar a expressão das AgNORs e caracterizar o desempenho desse marcador quando utilizado em amostras de lesões cervicais;
- Investigar a relação das AgNORs com a taxa de proliferação celular e malignidade;
- Expor a importância da prevenção e realização precoce de exames de rastreamento na população feminina.

## 2 METODOLOGIA

O presente trabalho consiste em uma revisão narrativa de literatura. Trata-se de uma análise ampla, na qual a seleção dos artigos é feita de forma arbitrária, sem seguir uma sistemática rigorosa, com o intuito de adquirir e atualizar o conhecimento sobre a temática específica (CORDEIRO *et al.*, 2007).

Foram selecionados artigos publicados em periódicos indexados nas bases de dados SciELO (sigla em inglês para Biblioteca Eletrônica Científica Online), LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde) e MEDLINE (sigla em inglês para Sistema Online de Busca e Análise de Literatura Médica), desde que contivessem informações relevantes acerca de qualquer tópico abordado na revisão. A pesquisa também foi baseada nos dados encontrados nos sites do Ministério da Saúde, INCA e *American Cancer Society*. As referências dos artigos escolhidos também foram verificadas para reunir outros estudos que pudessem ter sido omitidos na busca eletrônica.

Apesar do grande uso da técnica de coloração com prata em diversas regiões do corpo, o foco deste trabalho consistiu na utilização em amostras de lesões cervicais. Portanto, foi realizada uma busca mais específica nas bases de dados citadas anteriormente a partir dos descritores: “*Cervical cancer*”, “*Cervix*”, “*Nucleolar organizer region*”, “*AgNOR staining*” e “*Cell proliferation*”, em inglês e português. Foram feitas combinações para pesquisa em todas elas.

Por fim, de modo a expor os temas retratados, foram incluídos neste trabalho artigos em inglês que reuniram informações acerca de conceitos relacionados ao câncer de colo do útero, HPV, à técnica de AgNOR e/ou que investigaram pacientes com amostras citológicas ou histológicas positivas para atipias, lesões ou neoplasias cervicais. Nesse caso, foi estabelecido um período de três décadas para a publicação dos artigos, devido a um número mais baixo de trabalhos recentes publicados. Para o refinamento adequado da pesquisa, o foco da revisão consistiu na relação da expressão das AgNORs com a evolução das lesões cervicais e a importância da prevenção e do diagnóstico precoce de lesões precursoras do câncer de colo do útero, bem como os fatores influentes para o desenvolvimento dessa neoplasia. Foram excluídos artigos que apresentavam duplicidade, ou seja,

publicações encontradas em mais de uma das bases de dados, além dos que por algum motivo não puderam ser acessados, artigos sem texto completo ou que abordaram relatos de caso.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Após leitura dos títulos e resumos dos artigos, foram selecionadas 18 publicações, datando de 1992 a 2021. Todos eles foram realizados com amostras de biópsias (10) ou esfregaços cervicais (7), sendo que um deles utilizou ambos.

Foi observada uma predominância de estudos indianos (10) e nenhum brasileiro. Três dos artigos são da Argentina, dois do México, um da Turquia, um da China e um do Japão. O número de pacientes variou entre 18 e 135 mulheres.

Dos estudos encontrados, 13 dos 18 utilizaram o método manual de contagem a partir da leitura de 100 células no microscópio, enquanto 5 realizaram a medição da área dos pontos corados por citometria de imagem através de softwares como Image J ou Image Pro-Plus.

Não houve homogeneidade na definição dos graus de lesão analisados, alguns autores fizeram comparações levando em conta todos os estágios de proliferação, e outros compararam apenas entre estágios dos tumores.

Apresenta-se no Quadro 3 a caracterização das publicações selecionadas quanto ao local de estudo, autores, título do artigo, material coletado e método de detecção, quantidade de pacientes e resumo dos resultados.

**Quadro 3 – Caracterização das publicações.**

(Continua)

Local do estudo	Referência	Título	Material coletado/ método de detecção do AgNOR	Número de pacientes	Resultados
Turquia	SANCER <i>et al.</i> , 2021	Comparison of DNA damage and proliferative capacities in smear samples of HPV positive and negative patients by micronucleus counting and AgNOR staining	Esfregaços cervicais/ Manual	135	Os testes AgNOR e micronúcleo foram úteis para avaliar a proliferação celular e danos no DNA. AgNOR para o grupo HPV 16/18 foi significativamente maior do que para o grupo negativo
Índia	SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 2019	AgNOR pleomorphic count as a tumor marker in cervical carcinogenesis and feasibility of its introduction in cervical cancer screening programs to discriminate high-risk cases of squamous intraepithelial lesions of the cervix	Esfregaços cervicais/ Manual	115	Baixas contagens de AgNOR em 92 casos LSIL e altas contagens em 23 casos. O seguimento revelou persistência da lesão em 21 dos casos com contagens altas e em 4 dos casos com contagens baixas
México	GARCÍA-VIELMA <i>et al.</i> , 2016	Digital image analysis of AgNORs in cervical smears of women with premalignant and malignant lesions of the uterine cervix	Esfregaços cervicais/ Automatizado	37	Observou-se aumento da área total/núcleo de AgNORs com aumento do desenvolvimento neoplásico
Argentina	GUERRA <i>et al.</i> , 2014	Argentophilic nucleolus organizer region as a proliferation marker in cervical intraepithelial neoplasia grade 1 of the uterine cervix	Biópsias cervicais/ Automatizado	75	AgNOR pode ser um melhor marcador de proliferação de NIC I, um valor maior que 3,0 $\mu\text{m}^2$ indica a persistência ou progressão da lesão
Índia	SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 2013	Diagnostic importance of AgNOR pleomorphism in cervical carcinogenesis	Esfregaços cervicais/ Manual	50	O pleomorfismo AgNOR aumenta com a gravidade das lesões citopatológicas do colo do útero. A diferença foi mais pronunciada com pontos pleomórficos do que com pontos únicos

**Quadro 3 – Caracterização das publicações.**

(Continuação)

Local do estudo	Referência	Título	Material coletado/ método de detecção do AgNOR	Número de pacientes	Resultados
Índia	SHUKLA <i>et al.</i> , 2013	A study on the nucleolar organizer regions as a tumour proliferative marker in cervical smears	Esfregaços cervicais/ Manual	50	Houve um aumento progressivo nas contagens de AgNOR com a gravidade das lesões. Cada lesão teve um valor AgNOR significativo que ajudou a diferenciá-la de sua lesão precursora
Argentina	HIDALGO <i>et al.</i> , 2012	AgNOR, p16 and human papillomavirus in low-grade squamous intra-epithelial lesions of the uterine cervix. Preliminary report	Biópsias e esfregaços cervicais/ Automatizado	28	Áreas de AgNOR > 3,3 $\mu\text{m}^2$ e expressão de p16INK4a demonstraram persistência ou piora das lesões cervicais
Índia	GOYAL; MOHI; SINGH, 2012	AgNOR count and its correlation with colposcopy in suspicious cervix	Biópsias cervicais/ Manual	100	O escore médio do AgNOR foi de $1,21 \pm 0,51$ na cervicite crônica, $2,44 \pm 0,56$ na displasia leve, $3,48 \pm 0,35$ na displasia moderada e $4,58 \pm 0,43$ e $5,91 \pm 0,51$ no carcinoma espinocelular. O coeficiente de correlação entre a colposcopia e a contagem de AgNOR foi altamente significativo
Argentina	PALAORO; ROCHER, 2009	AgNOR technique could be useful for differential diagnosis of squamous carcinomatous cells and atypical cells related to human papillomavirus in cervical smears	Esfregaços cervicais/ Automatizado	27	23 pacientes com amostras com área média de AgNOR de $1,32 \mu\text{m}^2$ tornaram-se normais após 18 meses. A área não foi estatisticamente diferente das de células metaplásicas normais intermediárias ou LSIL. 4 amostras ASC-US com atipia viral e áreas médias de $7,70 \mu\text{m}^2$ foram diagnosticadas posteriormente como carcinomas
México	ALARCÓN-ROMERO <i>et al.</i> , 2009	AgNOR polymorphism association with squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma with HPV infection	Biópsias cervicais/ Manual	60	As AgNORs apresentaram uma diminuição significativa na forma esférica de acordo com o desenvolvimento neoplásico. As três formas atípicas apresentaram aumento significativo de SIL e SCC

**Quadro 3 – Caracterização das publicações.**

(Continuação)

Local do estudo	Referência	Título	Material coletado/ método de detecção do AgNOR	Número de pacientes	Resultados
Índia	MISRA <i>et al.</i> , 2005	AgNOR counts in cervical smears under normal and other cytopathologic conditions	Esfregaços cervicais/ Manual	50	Nos esfregaços normais e inflamatórios, o número de pontos AgNOR variou de 1-2, na displasia leve de 2-4, na displasia moderada de 4-6, na displasia grave de 6-8 e nos carcinomas cervicais de 8-10 pontos
Índia	PAHUJA; CHOUDHURY; GUPTA, 2003	Proliferative activity in squamous intraepithelial and invasive lesions of cervix: analysis by AgNOR staining	Biópsias cervicais/ Manual	50	As contagens/núcleos de AgNOR na camada parabasal e basal apresentaram aumento progressivo em seu valor médio com o aumento do grau de lesão. Entre as neoplasias invasivas, a maior média de AgNORs/núcleo foi observada no carcinoma espinocelular pouco diferenciado do colo do útero
Índia	PAHUJA; CHOUDHURY; GUPTA, 2003	Proliferation in squamous cell carcinoma of cervix: a comparative assessment by two markers	Biópsias cervicais/ Manual	18	O maior número médio de AgNORs foi encontrado no carcinoma espinocelular pouco diferenciado e foi observada diferença estatisticamente significativa entre CEC bem e mal diferenciado e entre CEC moderadamente e pouco diferenciado
Índia	KASHYAP <i>et al.</i> , 1998	Nucleolar organizer regions and morphologic subtypes of squamous cell carcinoma of cervix	Biópsias cervicais/ Manual	58	A contagem média de AgNOR foi maior (3,66) no carcinoma espinocelular queratinizante (pior prognóstico) em comparação a 3,04 no carcinoma não queratinizante de grandes células e 3,45 nos 2 casos de carcinoma de pequenas células do colo uterino

### Quadro 3 – Caracterização das publicações.

(Conclusão)

Local do estudo	Referência	Título	Material coletado/ método de detecção do AgNOR	Número de pacientes	Resultados
China	CHUNG <i>et al.</i> , 1994	Ki67 and AgNORs staining in squamous cell carcinoma of the cervix: A comparison	Biópsias cervicais/ Manual	29	Não houve correlação entre o estágio clínico do tumor e os métodos de coloração, mas ambos os métodos correlacionaram-se com o grau histológico
Japão	KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1994	The proliferative activity in dysplasia and carcinoma in situ of the uterine cervix analyzed by proliferating cell nuclear antigen immunostaining and silver-binding argyrophilic nucleolar organizer region staining	Biópsias cervicais/ Manual	30	As contagens obtidas nos casos de displasia leve, moderada, severa e carcinoma <i>in situ</i> , respectivamente, foram de 1.7, 1.9, 2.0 e 1.9 por núcleo
Índia	LAHSHMI <i>et al.</i> , 1993	Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in inflammatory pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix	Biópsias cervicais/ Manual	46	Variações significativas nas contagens de AgNOR foram observadas entre os três grupos com carcinoma invasivo mostrando contagens máximas. Uma correlação altamente significativa foi observada entre as contagens de AgNOR e a progressão do tumor
Índia	TOSI <i>et al.</i> , 1992	Prognostic factors in invasive cervical carcinomas associated with human papillomavirus (HPV). Quantitative data and cytokeratin expression	Biópsias cervicais/ Semiautomatizado	85	A proporção de AgNORs grandes/pequenos mostrou-se um preditor prognóstico independente significativo ( $p = 0,0104$ ), assim como o número total de AgNORs, perdendo apenas para a densidade de células linfóides

Fonte: Elaborado pela autora.

A técnica de AgNOR vem sendo investigada por ser fácil, barata e mais rápida para avaliação do desenvolvimento neoplásico. A contagem dos pontos de AgNOR, assim como a estimativa de outros parâmetros (como tamanho e distribuição), tem sido aplicada na patologia tumoral para fins diagnósticos e prognósticos (FILIPPIN *et al.*, 2006). Por meio da microscopia de luz é possível observar os fragmentos de cromossomos corados por prata no nucléolo como pontos pequenos e escuros, distribuídos de diferentes formas nas células, dependendo do estágio em que se encontra o ciclo celular.

Um obstáculo apresentado por essa técnica de coloração é a avaliação manual, que acaba tornando o processo muito sujeito a erros humanos, tais como variação nas percepções visuais, variação no nível de especialização dos observadores e uma demanda maior de tempo (AMORIM *et al.*, 2020). Por isso, além da leitura por microscopia, vem sendo muito utilizada a análise digital de lâminas de biópsia ou esfregaços através de softwares, de modo a estimar a área dos pontos corados.

O primeiro método proposto para análise quantitativa de AgNORs foi a contagem de cada estrutura corada por célula no microscópio. Os AgNORs podem apresentar-se como pontos únicos ou agrupados. De acordo com Crocker *et al.* (1989), pontos agrupados que não podem ser distinguidos devem ser considerados como “clusters” e enumerados como um único. No entanto, quando há muita aglomeração de pontos AgNOR ou sobreposição, o método de contagem torna-se subjetivo e pouco reprodutível. Células de proliferação rápida costumam apresentar-se bastante sobrepostas, tornando-se um desafio para o método. Além disso, a enumeração de AgNOR não leva em consideração a dimensão de cada ponto corado com prata, que, principalmente em células cancerosas, pode ser muito variável (TRERÈ, 2000).

Em contraste, outro método quantitativo é a análise morfométrica, na qual é realizada a medição da área dos pontos corados por prata por meio de análise de imagem assistida por computador. É uma forma mais objetiva e mais precisa de avaliação, contudo, necessita de uma instrumentação adequada e profissionais minimamente adaptados a softwares e estatísticas (ANDREA; BLEGGI-TORRES; ALVES, 2008).

Hidalgo *et al.* (2012) realizaram um estudo preliminar com 28 pacientes diagnosticadas com LSIL, HSIL e epitélio não displásico com o intuito de avaliar a expressão de AgNOR e da proteína p16INK4a e a correlação entre eles. A proteína p16INK4a constitui um dos marcadores mais estudados para a progressão das NIC. Já foi demonstrado que o aumento da expressão dessa proteína em lesões de alto grau, como NIC 2 e NIC 3, enquanto não foi detectada em casos de NIC 1 e alterações benignas. Quanto à expressão de AgNOR, foi realizada a análise das áreas através de citometria de imagem. O grupo de alto risco demonstrou um número de pacientes com áreas AgNOR maiores que  $3,3 \mu\text{m}^2$  e com expressão de p16INK4a estatisticamente maior que o número de pacientes de baixo risco, enquanto nenhuma das biópsias de baixo risco expressaram p16 e áreas de AgNOR maiores que  $3,3 \mu\text{m}^2$  simultaneamente.

Guerra *et al.* (2014) também pesquisaram os mesmos marcadores e puderam acompanhar a evolução de algumas pacientes. Foram selecionadas 75 biópsias de NIC I, que foram refeitas cerca de seis meses depois. Destas, 20 sofreram regressão espontânea, 38 permaneceram com NIC I, 10 evoluíram para NIC II e 7 para NIC III. Com relação à proteína p16INK4a, todas as amostras que evoluíram apresentaram-se positivas, sendo mais expressas nas lesões de alto grau, contudo 12 das 20 que regrediram também positivaram. Em contrapartida, as áreas expressas por AgNOR tiveram valores de  $2,45 \mu\text{m}^2$  nas pacientes que regrediram e  $3,93 \mu\text{m}^2$  nas pacientes que persistiram ou progrediram. Portanto, a técnica de AgNOR demonstrou-se um melhor marcador, indicando valores maiores de  $3 \mu\text{m}^2$  como indicativos de persistência ou progressão da lesão.

A maior parte dos estudos teve como objetivo correlacionar apenas a quantidade de pontos por célula com os estágios de progressão maligna, como demonstrado por Srivastava *et al.* (2013), que acompanharam 115 pacientes positivas para LSIL, sendo que 92 apresentaram contagens baixas de AgNOR e 23 contagens elevadas. Desses 115, 107 casos tiveram seguimento e em 21 dos 23 com contagens altas a lesão persistiu, enquanto apenas 4 de 84 casos com contagens baixas apresentou persistência. Também em um estudo realizado por Misra *et al.* (2005) os autores objetivaram investigar o valor diagnóstico das contagens de AgNOR em esfregaços cervicais e discriminar os graus de lesão intraepitelial escamosa. Os resultados demonstraram aumento progressivo na

contagem de AgNOR com o aumento da gravidade das lesões, principalmente na diferenciação entre lesões de baixo e alto grau.

Outro estudo que evidenciou a contagem dos pontos corados por prata foi realizado por Goyal, Mohi e Singh (2012), em que foi observado um escore médio de AgNOR de  $1,21 \pm 0,51$  na cervicite crônica,  $2,44 \pm 0,56$  na displasia leve,  $3,48 \pm 0,35$  na displasia moderada e  $4,58 \pm 0,43$  e  $5,91 \pm 0,51$  no carcinoma de células escamosas, mostrando diferenças na contagem entre NIC I e NIC II, NIC II e NIC III e entre NIC III e NIC I estatisticamente significativas. Esse tipo de correlação também foi evidenciado por Shukla *et al.* (2013), Pahuja; Choudhury; Gupta (2003), Kashyap *et al.* (1998) e Lahshmi *et al.* (1993).

Contudo, com o tempo foi observada também uma variedade de formatos dos pontos corados. García-Vielma *et al.* (2016) evidenciaram a relação entre os polimorfismos apresentados pelas regiões coradas por prata e a taxa de atividade transcricional. Formas típicas, com depósito mais esférico, estariam relacionadas a uma atividade normal, enquanto formas atípicas, mais longas ou agrupadas, sugerem uma atividade transcricional aumentada. Foi realizada análise de esfregaços de pacientes negativas para lesões cervicais e positivas para LSIL, HSIL e câncer cervical, levando em conta as diferenças de formato dos AgNORs. Foi observado um aumento significativo na área dos AgNORs das pacientes com HSIL e câncer em comparação com as que apresentaram LSIL ou nenhuma lesão. Com relação ao polimorfismo, AgNORs em formato de rim ou *cluster* (agrupamento) apresentaram áreas maiores que os de formato longo ou esférico.

Srivastava *et al.* (2013) também verificaram a relação de pleomorfismos com a gravidade das lesões. Obtiveram como resultados: amostras de epitélio normal variaram de 1 a 2 pontos de AgNOR e em 41,8% dos casos os pontos eram pleomórficos. Nos esfregaços inflamatórios, o número de pontos variou de 2 a 3, e a porcentagem de casos com pontos pleomórficos foi 45,3%. Na LSIL, o total de pontos corados foi de 3 a 4, e a porcentagem de casos com pontos pleomórficos foi de 48,3%. No caso de HSIL, os pontos AgNOR variaram de 5 a 7, e a porcentagem de casos pleomórficos foi de 56,7%. Já nos casos de carcinoma, os pontos AgNOR totais foram de 8 a 10 e em 62,9% dos casos os pontos eram pleomórficos.

Alarcón-Romero *et al.* (2009) também tiveram como objetivo avaliar as relações entre os diferentes formatos de AgNORs e lesões intraepiteliais escamosas (SIL) e carcinoma espinocelular (CEC) com a infecção pelo HPV. Foram estudadas 60 mulheres, 15 das quais apresentavam LSIL, 15 HSIL, 15 CEC e 15 foram utilizados como grupo controle com citologia normal. Foi observado que a infecção pelo HPV estava presente em todos os casos de lesão e carcinoma e nenhum foi encontrado no grupo controle. O polimorfismo das AgNORs foi pontuado e classificado de acordo com sua forma típica ou atípica, sendo a forma típica considerada com estrutura esférica e as formas atípicas podendo ser grandes, em forma de rim ou agrupadas. Como resultado, tiveram a forma esférica como a mais frequente para citologia normal, grupos LSIL e HSIL, e a forma grande como a menos frequente para todos eles. Nas amostras de citologia normal não foi encontrada nenhuma forma atípica, enquanto houve um aumento mediano para as formas grandes de 2 a 11, em formato de rim de 20 a 36 e agrupadas de 3 a 25 estruturas de LSIL a CEC, revelando um aumento progressivo de todas as formas atípicas conforme a lesão progride.

Dos trabalhos selecionados, apenas dois não demonstraram relevância significativa da técnica de coloração de AgNOR. O artigo publicado por Chung *et al.* (1994) utilizou 29 amostras de carcinoma de células escamosas com o objetivo de correlacionar a contagem das regiões organizadoras de nucléolo e o estágio clínico do tumor. Como resultado, foi observada correlação entre o grau histológico e as contagens de AgNORs. No entanto, as maiores contagens foram associadas aos tumores moderadamente diferenciados (grau 2), e não ao grau 3, sendo preferidas outras técnicas de imunocoloração.

Em Kobayashi *et al.* (1994), houve diferença significativa na contagem de AgNORs em toda a camada mucosa contendo células normais e displásicas que estavam entre grau leve e moderado. No entanto, não houve diferenças significativas entre os casos controle e displasias leves, moderadas e graves, e entre displasias graves e carcinoma *in situ*. As contagens obtidas nos casos de displasia leve, moderada, severa e carcinoma *in situ* foram 1,7, 1,9, 2,0 e 1,9 por núcleo, respectivamente. Portanto, concluíram que a coloração AgNOR não parecia fornecer mais informações sobre biópsias cervicais do que as alterações morfológicas.

Dos estudos encontrados, 13 utilizaram o método manual de contagem a partir da leitura de 100 células no microscópio, enquanto 5 realizaram a medição da área dos pontos corados por citometria de imagem através de softwares como Image J ou Image Pro-Plus. Todos os estudos foram realizados em amostras de biópsias (10) ou esfregaços cervicais (7), sendo a maioria dos estudos provenientes da Índia. Com base nos artigos pesquisados, a técnica de AgNOR demonstrou ser um marcador de proliferação simples, barato e confiável em lesões do colo do útero em comparação com outros marcadores.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o avanço da tecnologia, o advento de novas técnicas moleculares e todo o conhecimento acumulado, principalmente nas últimas duas décadas, sobre a biologia, a carcinogênese e a imunogênese do Papilomavírus Humano, tornou-se possível estabelecer a correlação entre este microrganismo e o desenvolvimento do câncer de colo do útero, além do aprimoramento de métodos de diagnóstico e prevenção que se tornam cada vez mais precisos e eficazes, com o objetivo de diminuir os números ainda tão altos de casos.

Destaca-se, contudo, o desafio de se realizar uma cobertura regular dos exames em países sem programas organizados e os custos consideráveis de infraestrutura, força de trabalho e equipamentos necessários para o estabelecimento de um programa de rastreamento de base populacional com o intervalo de rastreamento ideal, o que acaba sendo uma grande barreira para a implementação em países de baixa e média renda. No Brasil, por exemplo, é muito comum que algumas mulheres realizem testes de rastreamento além do necessário, enquanto outras nunca os fizeram.

O exame citopatológico é o método mais difundido para investigação de lesões precursoras, todavia, a possibilidade de erros na coleta, preparação das lâminas e a subjetividade na leitura das mesmas acabam comprometendo sua sensibilidade e especificidade. Assim sendo, torna-se útil a incorporação de exames complementares que realizem uma avaliação rápida da morfologia e cinética das células potencialmente lesadas, evitando procedimentos invasivos e incômodos às pacientes.

Com base nos artigos pesquisados, a técnica de AgNOR demonstrou ser um marcador de proliferação simples, barato e confiável em lesões do colo do útero em comparação com outros marcadores. Elevação no número, tamanho ou pleomorfismos dos pontos de AgNORs sugerem aumento do grau da lesão. Assim, os pontos corados podem desempenhar um papel crucial na discriminação de diferentes graus de lesão intraepitelial escamosa e podem ser muito úteis para estabelecer o prognóstico da doença, definindo a melhor conduta de acordo com a provável regressão, persistência ou progressão das lesões.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, Luciana Silva *et al.* Avaliação crítica das nomenclaturas diagnósticas dos exames citopatológicos cervicais utilizadas no Sistema Único de Saúde (SUS).

**Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 144-149, mar. 2011.

AIDÉ, S. *et al.* Neoplasia intraepitelial cervical: Cervical intraepithelial neoplasia.

**DST-Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis**, v. 21, n. 4, p. 166-170, 2009.

ALARCÓN-ROMERO, Luz del Carmen *et al.* AgNOR polymorphism association with squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma with HPV infection. **Salud pública de méxico**, v. 51, p. 134-140, 2009.

ALMEIDA, Vera Lúcia de *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova** [online]. 2005, v. 28, n. 1, pp. 118-129.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Key Statistics for Cervical Cancer**. Atlanta: American Cancer Society 2021. Disponível em:

<https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/about/key-statistics.html>. Acesso em: 01 set. 2021.

AMORIM, João Gustavo Atkinson *et al.* A Novel Approach on Segmentation of AgNOR-Stained Cytology Images Using Deep Learning. In: 2020 IEEE 33rd International Symposium on Computer-Based Medical Systems (CBMS). IEEE, 2020. p. 552-557.

ANDREA, Carlos Eduardo de; BLEGGI-TORRES, Luiz Fernando; ALVES, Maria Teresa de Seixas. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, p. 51-57, 2008.

BOSCH, F X. *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal Of Clinical Pathology**, [S.L.], v. 55, n. 4, p. 244-265, 1 abr. 2002. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.55.4.244>.

BRAGAGNOLO, A.; ELI, D.; HAAS, P. Papiloma vírus humano (HPV). **Rev. bras. anal. clin.**, p. 91-96, 2010.

BRENNNA, Sylvia Michelina Fernandes; SYRJÄNEN, Kari Juhani. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. **Sao Paulo Medical Journal**, [S.L.], v. 121, n. 3, p. 128-132, 2003.

BUKHARI, Mulazim Hussain *et al.* Modified method of AgNOR staining for tissue and interpretation in histopathology. **International journal of experimental pathology**, v. 88, n. 1, p. 47-53, 2007.

CAMARA, Geni N. N de Lima. *et al.* Os papilomavírus humanos – HPV: carcinogênese e imunogênese. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 1, n. 1, p. 159-168, 2003.

CARDIAL, Márcia Fuzaro Terra *et al.* Papilomavírus humano (HPV). **Femina**, p. 94-100, 2019.

CARVALHO, Maria Cristina de Melo Pessanha; QUEIROZ, Ana Beatriz Azevedo. Lesões precursoras do câncer cervicouterino: evolução histórica e subsídios para consulta de enfermagem ginecológica. **Escola Anna Nery**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 617-624, set. 2010.

CHUNG, Tony KH *et al.* Ki67 and AgNORs staining in squamous cell carcinoma of the cervix: a comparison. **Gynecologic and obstetric investigation**, v. 37, n. 2, p. 127-129, 1994.

CIAPPONI, Agustín *et al.* Type-Specific HPV Prevalence in Cervical Cancer and High-Grade Lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. **Plos One**, [S.L.], v. 6, n. 10, 4 out. 2011. Public Library of Science (PLoS).

CORDEIRO, Alexander Magno *et al.* Revisão sistemática: uma revisão narrativa. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 34, n. 6, p. 428-431, 2007.

CORDEIRO, Maria Rachel Aguiar *et al.* Inspeção visual do colo uterino após aplicação de ácido acético no rastreamento das neoplasias intra-epiteliais e lesões

induzidas por HPV. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 51-57, fev. 2005.

CROCKER, John *et al.* How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. **The Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 158, n. 3, p. 185-188, jul. 1989. Wiley.

DERCHAIN, Sophie Françoise Mauricette; LONGATTO FILHO, Adhemar; SYRJANEN, Kari Juhani. Neoplasia intra-epitelial cervical: diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 7, p. 425-433, 2005.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 117-120, abr. 2000. Elsevier BV.

FERLAY, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2020: GLOBOCAN sources and methods. **International journal of cancer**, New York, 2021.

FERNANDES, Fernando *et al.* Diagnóstico citopatológico de ASC-US e ASC-H no serviço integrado tecnológico em citologia do INCA. **Rev. bras. cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 3, p. 453-459, 2012.

FERRAZ, Laís de Campos; SANTOS, Ana Beatriz Rossetti; DISCACCIATI, Michelle Garcia. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **J. Health Sci. Inst**, 2012.

FETT-CONTE, Agnes C.; SALLES, Andréa BCF. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, p. 85-89, 2002.

FILIPPIN, Carla *et al.* Determinação do número de regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR) em lesões do epitélio cervical uterino. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 133-139, 2006.

FONTES, Patrícia Campos. **Avaliação quantitativa das proteínas AgNORs na citologia esfoliativa da mucosa bucal de pacientes fumantes e não-fumantes.**

2005. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2005.

GARCÍA-VIELMA, C. *et al.* Digital image analysis of AgNORs in cervical smears of women with premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 91, n. 2, p. 102-107, 2016.

GAŠPEROV, Nina Milutin *et al.* Detection and typing of human papillomaviruses combining different methods: polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, line probe assay and sequencing. **Pathology & Oncology Research**, v. 14, n. 4, p. 355-363, 2008.

GOYAL, Ritu; MOHI, Kaur Manjit; BAL SINGH, Manjit. AgNOR count and its correlation with colposcopy in suspicious cervix. **The Journal of Obstetrics and Gynecology of India**, v. 62, n. 4, p. 437-441, 2012.

GUERRA, Fernando *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**, v. 40, n. 6, p. 1717-1724, 2014.

HERRERO, Rolando *et al.* Sexual behavior, venereal diseases, hygiene practices, and invasive cervical cancer in a high-risk population. **Cancer**, [S.L.], v. 65, n. 2, p. 380-386, 15 jan. 1990. Wiley.

HIDALGO, J. V. *et al.* AgNOR, p16 and human papillomavirus in low-grade squamous intra-epithelial lesions of the uterine cervix. Preliminary report. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 87, n. 4, p. 257-264, 2012.

HO, Gloria Y.F. *et al.* Natural History of Cervicovaginal Papillomavirus Infection in Young Women. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 338, n. 7, p. 423-428, 12 fev. 1998. Massachusetts Medical Society.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Conceito e Magnitude**. 2021a. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-do-colo-do-utero/conceito-e-magnitude>. Acesso em: 01 set. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Detecção precoce**. 2021b. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-do-colo-do-utero/acoes-de-controle/deteccao-precoce>. Acesso em: 01 set. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 01 set. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020**. Rio de Janeiro: INCA, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa>. Acesso em: 01 set. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Periodicidade de realização do exame preventivo do câncer do colo do útero. **Revista Brasileira de Cancerologia**, p. 13-15, 2002. Disponível em: [https://rbc.inca.gov.br/site/arquivos/n\\_48/v01/pdf/normas.pdf](https://rbc.inca.gov.br/site/arquivos/n_48/v01/pdf/normas.pdf). Acesso em 01 set. 2021.

JORDÃO, Andréa Valderrama *et al.* Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citológico de papilomavírus humano. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 81-89, 2003.

KASHYAP, Seema *et al.* Nucleolar organiser regions and morphologic subtypes of squamous cell carcinoma of cervix. **Indian journal of pathology & microbiology**, v. 41, n. 3, p. 303-308, 1998.

KJÆR, Susanne K. *et al.* Human papillomavirus—the most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. **International Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 65, n. 5, p. 601-606, 1 mar. 1996. Wiley.

KOBAYASHI, Ieyoshi *et al.* The proliferative activity in dysplasia and carcinoma *in situ* of the uterine cervix analyzed by proliferating cell nuclear antigen immunostaining and silver-binding argyrophilic nucleolar organizer region staining. **Human pathology**, v. 25, n. 2, p. 198-202, 1994.

LAHSHMI, S. et al. Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in inflammatory pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. **Cancer letters**, v. 71, n. 1-3, p. 197-201, 1993.

LIMA, Flávio de Oliveira *et al.* Regiões organizadoras nucleolares argirofílicas no sarcoma sinovial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.L.], v. 41, n. 5, p. 347-352, out. 2005.

MESQUITA, E. C. **Citologia, histologia e embriologia**. São Paulo: Ed. E.P.U., 1981, 134p. (Coleção: Série Currículo de Estudos de Biologia).

MISRA, Jata S. *et al.* AgNOR counts in cervical smears under normal and other cytopathologic conditions. **Analytical and quantitative cytology and histology**, v. 27, n. 6, p. 337-340, 2005.

MITRA, A. *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia: screening and management. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 77, n. 8, p. C118-C123, 2016.

MUÑOZ, Nubia *et al.* Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 348, n. 6, p. 518-527, 6 fev. 2003. Massachusetts Medical Society.

MYERS, E. R. *et al.* Mathematical Model for the Natural History of Human Papillomavirus Infection and Cervical Carcinogenesis. **American Journal Of Epidemiology**, [S.L.], v. 151, n. 12, p. 1158-1171, 15 jun. 2000. Oxford University Press (OUP).

NAKAGAWA, Janete Tamani Tomiyoshi; SCHIRMER, Janine; BARBIERI, Márcia. Vírus HPV e câncer de colo de útero. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [S.L.], v. 63, n. 2, p. 307-311, abr. 2010.

NAYAR Ritu; WILBUR David C. The Bethesda System for Reporting Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria and Explanatory Notes, 3rd Edition. New York: Springer; 2015.

OSHIMA, Celina Tizuko Fujiyama; FORONES, Nora Manoukian. AgNOR em câncer gástrico. **Arquivos de Gastroenterologia**, [S.L.], v. 38, n. 2, p. 89-93, abr. 2001.

PAHUJA, Sangeeta; CHOUDHURY, Monisha; GUPTA, Usha. Proliferation in squamous cell carcinoma of cervix: a comparative assessment by two markers. **Indian journal of pathology & microbiology**, v. 46, n. 4, p. 585-588, 2003.

PAHUJA, Sangeeta; CHOUDHURY, Monisha; GUPTA, Usha. Proliferative activity in squamous intraepithelial and invasive lesions of cervix: analysis by AgNOR staining. **Indian journal of pathology & microbiology**, v. 46, n. 4, p. 573-575, 2003.

PALAORO, L; ROCHER, A. AgNOR technique could be useful for differential diagnosis of squamous carcinomatous cells and atypical cells related to human papillomavirus in cervical smears. **Biotechnic & Histochemistry**, [S.L.], v. 84, n. 3, p. 73-78, jan. 2009.

PICH, A.; CHIUUSA, L.; MARGARIA, E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. **Micron**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 133-141, abr. 2000. Elsevier BV.

RIVOIRE, W. A. *et al.* Bases Biomoleculares da Oncogênese Cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 179-184, 2001.

ROTELI-MARTINS, Cecília Maria *et al.* Associação entre idade ao início da atividade sexual e subsequente infecção por papilomavírus humano: resultados de um programa de rastreamento brasileiro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, [S.L.], v. 29, n. 11, p. 580-587, nov. 2007.

SÁ, Kássia Camila Camargo de; SILVA, Luciano Ribeiro. Exame Papanicolaou na prevenção do câncer no colo uterino: uma revisão integrativa. **Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres**, Ceres (GO), v. 8, n. 1, 2019.

SANCER, Okan *et al.* Comparison of DNA damage and proliferative capacities in smear samples of HPV positive and negative patients by micronucleus counting and AgNOR staining. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 96, n. 5, p. 354-358, 2021.

SANTANA, Ercília A. *et al.* Câncer cervical: etiologia, diagnóstico e prevenção. **Cienc. saúde**. v. 15, n. 4, 2008.

SANTOS, N. S. D. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia humana**. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2015.

SANTOS, Vanessa Sardinha dos. **Ciclo celular**. Disponível em: <https://escolakids.uol.com.br/ciencias/ciclo-celular.htm>. Acesso em: 30 jan. 2022.

SCHIFFMAN, Mark *et al.* HPV DNA Testing in Cervical Cancer Screening. **Jama**, [S.L.], v. 283, n. 1, p. 87, 5 jan. 2000. American Medical Association (AMA).

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

SHUKLA, Samarth. A Study on the Nucleolar Organizer Regions-As a Tumour Proliferative Marker in Cervical Smears. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 278-283, 2013. JCDR Research and Publications.

SILVA NETO, Jacinto da Costa. Características Básicas Anatômicas e Citológicas do Trato Genital Feminino. In: SILVA NETO, Jacinto da Costa. **Citologia Clínica do Trato Genital Feminino**. Rio de Janeiro: Revinter, 2012. Cap. 3. p. 11-28.

SILVA, C.M. *et al.* Quantificação das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) como parâmetro para avaliar a proliferação das células da granulosa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 113-116, fev. 2003.

SOARES PINTO, Tatiana Andrea *et al.* Avaliação quantitativa de núcleo/citoplasma e AgNORS em células da mucosa bucal de fumantes e não-fumantes. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**. Porto Alegre. Vol. 44, n. 2 (dez. 2003), p. 12-16, 2003.

SOUTO, Rafael; FALHARI, Júlio Pedro Borgo; DA CRUZ, Aparecido Divino. O papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 2, p. 155-160, 2005.

SOUZA, Gláucia da Conceição Silva *et al.* Papilomavírus humano: biologia viral e carcinogênese. **Femina**, p. 189-192, 2015.

SRIVASTAVA, Anand N. *et al.* AgNOR Pleomorphic Count as a Tumor Marker in Cervical Carcinogenesis and Feasibility of Its Introduction in Cervical Cancer

Screening Programs to Discriminate High-Risk Cases of Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix. **Acta Cytologica**, [S.L.], v. 63, n. 5, p. 371-378, 2019. S. Karger AG.

SRIVASTAVA, A. N. *et al.* Diagnostic importance of AgNOR pleomorphism in cervical carcinogenesis. **E-cancer Medical Science**, v. 7, 2013.

TAVARES, Alvaro; PERDIGÃO, J. Ciclo Celular e novas terapias contra o cancro (o ano do Nobel). **Boletim de Biotecnologia**, n. 70, p. 7-14, 2001.

TEITTINEN, Kaisa J. *et al.* Nucleolar proteins with altered expression in leukemic cell lines. **Leukemia research**, v. 36, n. 2, p. 232-236, 2012.

THULER, Luiz Claudio Santos; MENDONÇA, Gulnar Azevedo. Estadiamento inicial dos casos de câncer de mama e colo do útero em mulheres brasileiras. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, [S.L.], v. 27, n. 11, p. 656-660, nov. 2005.

TOSI, P. *et al.* Prognostic factors in invasive cervical carcinomas associated with human papillomavirus (HPV): quantitative data and cytokeratin expression. **Pathology-Research and Practice**, v. 188, n. 7, p. 866-873, 1992.

TRERÈ, D. AgNOR quantification in tumour pathology: what is actually evaluated?. **Journal Of Clinical Pathology**, [S.L.], v. 46, n. 2, p. 189-189, fev. 1993. BMJ.

TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron**, v. 31, n. 2, p. 127-131, 2000.

WOODMAN, Ciaran B. J.; COLLINS, Stuart I.; YOUNG, Lawrence S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nat Rev Cancer**, [s. l.], v. 7, p. 11-22, jan. 2007.

YIM, Eun-Kyoung; PARK, Jong-Sup. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. **Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association**, v. 37, n. 6, p. 319, 2005.