



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Maria Elizabeth Andrade Galeno Carvalho

**Avaliação do diagnóstico de lesões precursoras do câncer de colo do útero e da  
oncogenicidade do HPV através da determinação do número de regiões organizadoras  
de nucléolo (AgNOR)**

Florianópolis  
2023

Maria Elizabeth Andrade Galeno Carvalho

**Avaliação do diagnóstico de lesões precursoras do câncer de colo do útero e da oncogenicidade do HPV através da determinação do número de regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, Dr.

Florianópolis

2023

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

Andrade Galeno Carvalho, Maria Elizabeth

Avaliação do diagnóstico de lesões precursoras do Câncer de colo do útero e da oncogenicidade do HPV através da determinação do número de regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR) / Maria Elizabeth Andrade Galeno Carvalho ; orientador, Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, 2023.  
66 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas-Novo, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Médicas-Novo. 2. Câncer de colo uterino. 3. AgNOR. 4. Rastreamento do câncer cervical. 5. Papilomavírus humano. I. Casimiro Onofre, Alexandre Sherlley . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas-Novo. III. Título.

Maria Elizabeth Andrade Galeno Carvalho

**Avaliação do diagnóstico de lesões precursoras do câncer de colo do útero e da oncogenicidade do HPV através da determinação do número de regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR)**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 12 de julho de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Fabrício de Souza Neves, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Karoline Bunn Borba, Dra.  
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 Mestra em Ciências Médicas.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

---

Prof. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2023



## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar primeiramente minha profunda gratidão à Deus pelas bênçãos e orientação ao longo de minha jornada.

Agradeço também imensamente ao meu marido e meus filhos pelo apoio incondicional e compreensão durante este período desafiador. Digo, você é meu porto seguro, meu parceiro de estudos e de vida, meu amigo e companheiro. E Antonio e João, meus filhos, obrigada por me fazerem a mãe mais feliz do mundo, me ensinando a ver a vida pelo modo tão especial de vocês. Mamãe ama vocês.

Aos meus pais, Melka e Miguel, sou extremamente grata por seu constante incentivo e confiança em mim, pelo amor incondicional, pelos conselhos e carinho. Obrigada por nos apoiarem sempre, mesmo nos nossos sonhos mais improváveis.

Também gostaria de agradecer à minha irmã Nayane e meu cunhado Eudes por seus conselhos inestimáveis, apoio, assistência, carinho e amizade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, que com seus conselhos e experiência me guiou pela jornada do mestrado e principalmente da vida. Serei eternamente grata.

Agradeço também à Prof. Dra Fabiana Botelho de Miranda Onofre pelo apoio nas pesquisas do AgNOR.

À Dra. Flavia Del Castanhel, pelo apoio, incentivo e atenção no auxílio das análises estatísticas realizadas neste trabalho.

Meu agradecimento à Dra. Adriane Pogere pelos ensinamentos e por permitir, através de suas pacientes, a realização desse estudo.

Aos demais professores do departamento de ginecologia do HU UFSC por todo o conhecimento que compartilharam comigo e que foram tão importantes para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço também ao chefe da Residência Médica em Ginecologia e Obstetrícia, Dr. Alberto Trapani Júnior, e aos meus amigos de residência Margot, Guilherme e Luciana pelo apoio e incentivo.

Gostaria de agradecer antecipadamente à minha Banca examinadora pelas orientações, atenção, respeito e disponibilidade.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências médicas da UFSC pela oportunidade de realizar meu mestrado em um programa de qualidade.

*“O mundo é grande demais para nascer e morrer no mesmo lugar.  
E o tempo muito curto para esperar o amanhã”. (Alice M. Mercês).*

## RESUMO

**Introdução:** O câncer de colo uterino é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres no Brasil. A infecção pelo HPV é conhecida por desempenhar um papel importante no desenvolvimento do câncer cervical. Embora o rastreamento primário com exame citopatológico de rotina e colposcopia seja a estratégia recomendada, a predição do comportamento biológico da neoplasia intraepitelial cervical de alto grau em pacientes individuais é desafiadora, sendo fundamental o desenvolvimento de novas técnicas que auxiliem no diagnóstico e planejamento terapêutico. A técnica de AgNOR é um método cito-histoquímico que evidencia as regiões organizadoras de nucléolo, sendo considerado um bom marcador de proliferação celular e conseqüentemente pode ser usado para avaliar malignidade.

**Objetivo:** Avaliar a capacidade da técnica de AgNOR em identificar lesões precursoras do carcinoma de colo uterino e a oncogenicidade do HPV. Além de fazer uma análise comparativa entre os valores da contagem de AgNOR (*clusters*, satélites e AgNOR total) para avaliar qual deles seria mais útil na prática clínica.

**Método:** Foi realizado um estudo transversal, no qual 87 mulheres atendidas no ambulatório de patologia cervical do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina e que tiveram alteração citológica no citopatológico do colo uterino foram submetidas à exame ginecológico e coleta de material para realização de teste de HPV e coloração AgNOR, além de biópsia para confirmação histopatológica.

**Resultados:** Nesse estudo encontramos que os valores de AgNOR total e *clusters* são diretamente proporcionais ao grau da lesão, sendo em geral encontrados valores maiores de AgNOR nas neoplasias intraepiteliais cervicais III do que nas NIC I. Além disso, as amostras com maior número de *clusters* e AgNOR total eram das pacientes com HPV de alto risco oncogênico quando comparadas com as amostras das pacientes com HPV de baixo risco. Em relação ao tipo de contagem de AgNOR que deveria ser utilizada para o rastreio do HPV de alto risco oncogênico, encontramos que, assim como para a determinação do grau histológico da lesão, a contagem de *clusters* e de AgNOR total, seriam mais adequadas do que a contagem de satélites.

**Conclusões:** A contagem de AgNOR demonstrou ser útil como adjuvante tanto no diagnóstico de lesões precursoras de colo uterino quanto na identificação do HPV de alto risco oncogênico. Vimos também ser possível a determinação de valores de corte para o rastreio das lesões de alto grau, auxiliando em casos duvidosos da citopatologia. Ademais, a contagem de *clusters* e AgNOR total foram mais adequadas do que a de satélites.

**Palavras Chaves:** Câncer de colo uterino; AgNOR; Rastreamento do câncer cervical; Papilomavírus humano.



## ABSTRACT

**Introduction:** Cervical cancer is the third most common type of cancer among women in Brazil. HPV infection is known to perform an important role in the development of cervical cancer. Although primary screening with routine cytopathological examination and colposcopy is the recommended strategy, predicting the biological behavior of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in individual patients is challenging, being essential the development of new techniques to assist in diagnosis and therapeutic planning. The AgNOR technique is a cytohistochemical method that highlights the nucleolar organizer regions and is considered a good marker of cell proliferation, therefore can be used to assess malignancy. **Objective:** Evaluate the ability of the AgNOR technique to identify precursor lesions of cervical carcinoma and the oncogenicity of HPV. In addition, to perform a comparative analysis of the AgNOR count values (clusters, satellites, and total AgNOR) to assess which of them would be more useful in clinical practice. **Method:** A cross-sectional study was conducted, in which 87 women who attended the cervical pathology outpatient clinic at the University Hospital of the Federal University of Santa Catarina and had cytological abnormalities in the cervical cytology test, went through gynecological examination and material collection for HPV testing and AgNOR staining, in addition to biopsy for histopathological confirmation. **Results:** In this study, we found that the values of total AgNOR and clusters are directly proportional to the degree of the lesion, with generally higher values of AgNOR found in cervical intraepithelial neoplasia III compared to CIN I. Furthermore, samples with a higher number of clusters and total AgNOR belonged to patients with high-risk oncogenic HPV compared to samples from patients with low-risk HPV. Regarding the type of AgNOR count that should be used for screening high-risk oncogenic HPV, we found that, similar to determining the histological grade of the lesion, the count of clusters and total AgNOR would be more appropriate than the count of satellites. **Conclusions:** AgNOR counting proved to be useful as an adjunct in both the diagnosis of precursor lesions of cervical cancer and the identification of high-risk oncogenic HPV. We also found it possible to establish cutoff values for screening high-grade lesions, aiding in cases of cytological uncertainty. Furthermore, the count of clusters and total AgNOR were more appropriate than satellites.

**Keywords:** Cervical câncer; AgNOR; Cervical cancer screening; Human papillomavirus.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mortalidade por câncer de colo uterino nas regiões brasileiras, 1980-2020.....	17
Figura 2. Progressão da lesão cervical benigna até o câncer invasivo .....	20
Figura 3. <i>Clusters</i> e satélites em coloração AgNOR.....	24
Figura 4. Coloração de AgNOR .....	28
Figura 5. Distribuição quanto ao estado civil das pacientes incluídas no estudo .....	30
Figura 6. Infecções sexualmente transmissíveis relatadas pelas pacientes .....	32
Figura 7. Distribuição entre pacientes com e sem HPV de alto risco para câncer .....	34
Figura 8. Gráfico representativo da comparação entre a técnica AgNOR e classificação histológica.....	40
Figura 9. Curva ROC para classe histológica NIC I.....	40
Figura 10. Curva ROC para classe histológica NIC II .....	41
Figura 11. Curva ROC para classe histológica NIC III.....	42

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Nomenclaturas das lesões precursoras de câncer de colo uterino .....	22
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil das participantes estratificado por faixa de idade .....	31
Tabela 2. Frequência quanto ao diagnóstico da citologia de encaminhamento .....	33
Tabela 3. Resultados e classificação do teste histológico .....	35
Tabela 4. Tipos de HPV presentes nas amostras das 87 pacientes envolvidas no estudo .....	36
Tabela 5. Resultados da comparação da técnica AgNOR entre grupo de mulheres com e sem HPV de alto risco oncogênico .....	37
Tabela 6. Resultados da comparação entre a técnica AgNOR e classificação histológica .....	39
Tabela 7. Coordenadas da curva ROC para AgNOR <i>clusters</i> e total .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNOR	<i>argyropholic nucleolar organizer region</i>
ALTS	<i>ASCUS-LSIL Triage Study</i>
ASCUS	<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CCU	Câncer de Colo Uterino
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EBSERH	Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
HPV	Papilomavírus humano
HSIL	<i>High-grade intraepithelial lesion</i>
HU	Hospital Universitário
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
LAST	<i>Lower Anogenital Squamous Terminology</i>
LSIL	<i>Low-grade intraepithelial lesion</i>
LIEAG	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
LIEBG	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NOR	<i>nucleolar organizer region</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
RNA	Ácido Ribonucleico
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SIL	<i>Squamous Intraepithelial Lesion</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1	CÂNCER DE COLO UTERINO .....	16
1.2	PAPILOMAVÍRUS HUMANO E CÂNCER DE COLO UTERINO .....	17
1.3	PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	18
1.4	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL.....	19
1.5	RASTREAMENTO DO CÂNCER DE COLO UTERINO E NOMENCLATURA	
	20	
1.5.1	Teste de HPV.....	22
1.5.2	AgNOR .....	22
1.6	OBJETIVOS.....	24
1.6.1	Objetivo Geral.....	24
1.6.2	Objetivos Específicos.....	24
<b>2</b>	<b>MÉTODO .....</b>	<b>26</b>
2.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	26
2.2	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	26
2.3	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	26
2.3.1	Coloração de AgNOR.....	27
2.3.2	Teste de HPV.....	28
2.4	ANÁLISE DOS DADOS .....	29
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
	<b>APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	
	<b>.....</b>	<b>62</b>
	<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM</b>	
	<b>SERES HUMANOS.....</b>	<b>64</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER DE COLO UTERINO

O câncer desponta como grave problema de saúde pública em todas as sociedades globais. No Brasil, o câncer de colo uterino ou câncer de colo do útero (CCU) é a terceira localização primária de incidência e de mortalidade por câncer em mulheres, sem considerar tumores de pele não melanoma.<sup>1</sup>

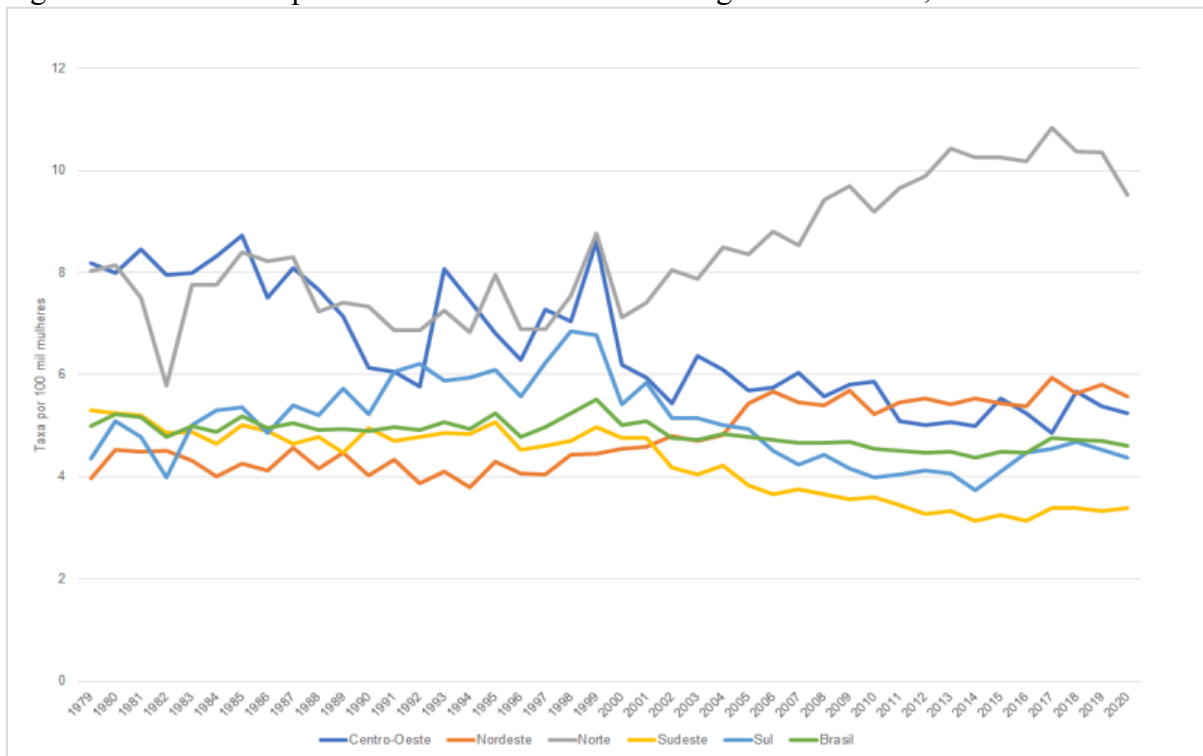
O controle do CCU no Brasil tem seu ponto de partida em iniciativas pioneiras de profissionais que trouxeram para o país a citologia e a colposcopia, a partir dos anos 1940.<sup>2</sup>

Ao longo desses anos, várias iniciativas públicas têm sido feitas visando à redução desse câncer, entre elas, várias estratégias de diagnóstico e prevenção. Apesar disso, para o ano de 2023 foram estimados 17.010 casos novos de CCU, o que representa um risco considerado de 13,25 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2022).<sup>1</sup>

Na análise regional, o câncer do colo do útero é o segundo tipo mais incidente nas regiões Norte (20,48/100 mil) e Nordeste (17,59/100 mil) e o terceiro na Centro-Oeste (16,66/100 mil). Já na região Sul (14,55/100 mil) ocupa a quarta posição e, na região Sudeste (12,93/100 mil), a quinta posição (INCA, 2022).<sup>1</sup>

Com relação às taxas de mortalidade, em 2019, no Brasil, ocorreram 6.596 óbitos por esta neoplasia. Na análise regional, as regiões Norte e Nordeste apresentaram as maiores taxas de mortalidade por CCU do país, sendo a Região Norte, a única com tendência de crescimento entre 2000-2017, representando a primeira causa de óbito por câncer feminino nesta região (Figura 1).<sup>3</sup>

Figura 1. Mortalidade por Câncer de colo uterino nas regiões brasileiras, 1980-2020



Fonte: INCA. Atlas de Mortalidade. Acesso em 22 de Fevereiro de 2023.

Em 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>4</sup> reuniu 194 países, incluindo o Brasil, para adotarem as medidas necessárias para eliminar o câncer de colo do útero globalmente até 2030. Essa estratégia está baseada em três pilares: prevenção, rastreamento e gerenciamento do câncer e das lesões precursoras.

Baseado nessa ação da OMS, de acordo com o Ministério da Saúde do Brasil,<sup>5</sup> é esperado que até 2030, 90% das meninas estejam vacinadas aos 15 anos de idade; 70% das mulheres sejam rastreadas com um teste de alta qualidade aos 35 anos e, novamente, aos 45 e 90% das mulheres diagnosticadas com câncer de colo do útero estejam em tratamento.

## 1.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO E CÂNCER DE COLO UTERINO

A relação entre papilomavírus humano (HPV) e o câncer cervical está bem estabelecida. Na década de 1990, com o advento da clonagem molecular, estudos multicêntricos confirmaram a presença do DNA do HPV em quase 100% dos epitélios dos carcinomas invasivos. A infecção persistente por um ou mais dos tipos oncogênicos de HPV é uma causa necessária para a neoplasia cervical e seus precursores.<sup>6-9</sup>



O processo natural do câncer de colo do útero ocorre ao longo de vários anos, variando de 5 a 20 anos. Esse processo tem início com a infecção pelo HPV, que leva ao desenvolvimento de uma lesão pré-cancerosa e, eventualmente, avança para o estágio de câncer invasivo.<sup>10</sup>

Na maioria das pessoas, o sistema imunológico é capaz de eliminar a infecção pelo HPV. No entanto, em uma pequena parcela dos infectados, o corpo não consegue eliminar completamente a infecção, resultando em uma infecção persistente. A infecção persistente pelo HPV está associada ao risco aumentado de desenvolvimento de câncer cervical, bem como outros tipos de câncer, como câncer vulvar e vaginal em mulheres, câncer peniano em homens, e câncer anal e orofaríngeo em ambos os sexos.<sup>10</sup>

### 1.3 PAPILOMAVÍRUS HUMANO

O HPV é um vírus pertencente à família *Papillomaviridae* composto por um genoma de DNA circular de fita dupla.<sup>11</sup> Ele infecta células epiteliais em várias partes do corpo, principalmente na área genital.<sup>12</sup>

Ele é dividido em três regiões: precoce (*early* = genes E que codificam as proteínas reguladoras da atividade celular), tardia (*late*= genes L que codificam o capsídeo viral) e região regulatória contracorrente (URR).<sup>13</sup>

Existem mais de 200 tipos diferentes de HPV, dos quais cerca de 40 podem infectar a área genital. Esses tipos de HPV são classificados em categorias de alto risco e baixo risco, dependendo de sua associação com o desenvolvimento de câncer.<sup>14</sup>

Os HPVs de baixo risco oncogênico são os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72, 81, CP6 108 e os de alto risco são os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82. Os HPVs de baixo risco desenvolvem os condilomas e lesões de baixo grau, já os de alto risco estão relacionados com o câncer, estando os tipos 16 e 18, presentes em cerca de 70% dos carcinomas escamosos, seguidos pelos 31, 33, 45, 52 e 58, totalizando 89% dos cânceres epiteliais.<sup>15</sup>

A infecção pelo HPV se dá por acesso do vírus à membrana basal do epitélio, por meio de microtraumas que ocorrem na relação sexual. Nos HPV de baixo risco, seu DNA se mantém na forma circular sem ocorrer integração ao DNA celular. Já na infecção provocada por HPV de alto risco, o genoma perde sua forma circular e se integra ao DNA da célula hospedeira. Nos seres humanos, os HPVs infectam conjuntivas, cavidade oral, laringe, árvore traqueobrônquica, esôfago, bexiga, ânus, canal anal e trato genital inferior e localizam-se no núcleo das células do hospedeiro.<sup>15</sup>

A infecção pelo vírus HPV é bastante frequente e pode afetar qualquer indivíduo sexualmente ativo. A grande maioria das infecções se resolve naturalmente sem causar complicações à saúde. Entretanto, quando ocorre a persistência da infecção por determinadas cepas de HPV consideradas de alto risco, existe a possibilidade de desenvolver câncer ao longo do tempo.<sup>4</sup>

Além dos aspectos relacionados à própria infecção pelo HPV, como o tipo específico do vírus e a quantidade de vírus presente no organismo, bem como se a infecção é única ou múltipla, existem outros elementos ligados à imunidade, genética e comportamento sexual que parecem influenciar os mecanismos ainda desconhecidos que determinam se a infecção regredirá ou persistirá, e se haverá progressão para lesões precursoras ou câncer. Dessa maneira, o tabagismo, o início precoce da atividade sexual, o envolvimento com múltiplos parceiros sexuais, a multiparidade, a idade e o uso de contraceptivos orais são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de colo do útero.<sup>16</sup>

Em relação à idade, estudos mostram que apesar da prevalência da infecção ser maior em mulheres jovens e com vida sexual ativa,<sup>17</sup> a persistência do vírus é mais comum nas mulheres acima de 30 anos.<sup>18</sup>

#### 1.4 NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

As neoplasias invasivas do colo uterino são em geral precedidas por uma longa fase de doença pré-invasiva, denominada de neoplasia intraepitelial cervical (NIC).<sup>19</sup>

Pode-se suspeitar de NIC no exame citológico ou por meio do exame colposcópico, mas o diagnóstico final da NIC é estabelecido mediante o exame anatomopatológico de uma biopsia cervical.<sup>19</sup>

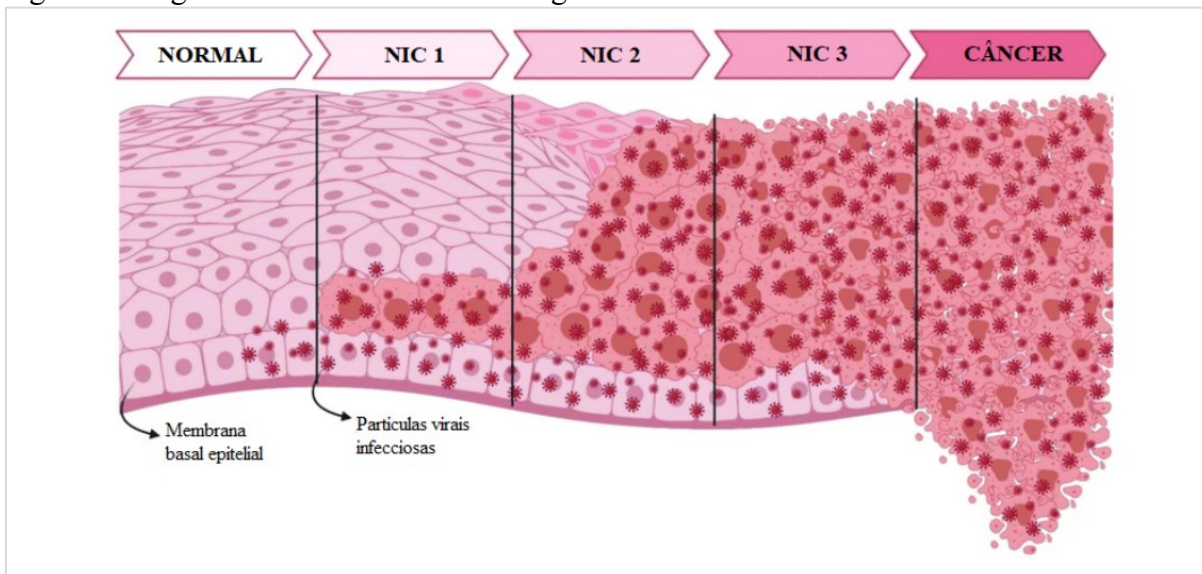
Portanto, NIC é uma classificação histológica categorizada em graus I, II e III dependendo da proporção da espessura do epitélio atípico que apresenta células maduras e diferenciadas. Os graus mais graves de NIC (II e III) apresentam uma maior proporção da espessura do epitélio atípico composto de células indiferenciadas e, devido à sua maior probabilidade de progressão para o câncer, se deixadas sem tratamento, são consideradas seus reais precursores.<sup>19</sup>

As NIC I são consideradas lesões de baixo grau, dificilmente progredem para II ou III em um período de 2 anos, segundo dados do ASCUS-LSIL *Triage Study* (ALTS),<sup>20</sup> sendo as NIC II e III consideradas as verdadeiras precursoras do câncer.<sup>21</sup>

A maioria das lesões de baixo grau costuma regredir ao estado normal em um curto período. Por outro lado, a NIC de alto grau apresenta uma maior probabilidade de progredir para uma neoplasia invasiva, embora uma porcentagem dessas lesões também possa regredir ou persistir.<sup>22-26</sup>

No entanto, desde que a membrana basal não seja rompida e não haja invasão no estroma cervical, o tratamento tem uma taxa de prevenção de 100% contra o câncer cervical.<sup>27</sup> Portanto, considera-se consenso que o tratamento das lesões pré-invasivas de alto grau é necessário para impedir a progressão para o câncer (Figura 2).<sup>28</sup>

Figura 2. Progressão da lesão cervical benigna até o câncer invasivo



Fonte: adaptado de Causin *et al.*<sup>29</sup>

### 1.5 Rastreamento do câncer de colo uterino e Nomenclatura

O esfregaço cérvico-vaginal para o diagnóstico do câncer no trato genital feminino foi introduzido por George N. Papanicolaou em 1941 e foi aceito mundialmente como um método não invasivo para detecção e prevenção do câncer cervical. Desde então, várias nomenclaturas já foram utilizadas para descrever os achados citopatológicos, porém, em virtude de muitos conflitos, devidos à falta de padronização dos resultados, desencadeou-se, em 1988, a primeira de uma série de conferências de consenso em Bethesda, Maryland (EUA), para desenvolver uma nova nomenclatura descritiva dos achados da citologia ginecológica, surgindo então a Nomenclatura de Bethesda.<sup>30</sup>

A característica principal do sistema de Bethesda foi a criação do termo lesão intraepitelial escamosa (SIL) e um esquema de dois graus que compreendia lesões de baixo

grau (LSIL) e alto grau (HSIL). A classificação do sistema de Bethesda combina alterações condilomatosas (HPV) planas e NIC de baixo grau (NIC I) em LSIL, enquanto a HSIL compreende NIC mais avançada, como NIC II e III. Esta divisão binária tem importante significado na clínica, já que os casos de HSILs devem ser confirmados histologicamente e normalmente tratados, enquanto os casos de LSIL podem ser seguramente seguidos através da citologia e colposcopia.<sup>31</sup>

Uma terceira categoria, atipias das células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) e células escamosas atípicas não podendo excluir lesão de alto grau (ASC-H) é utilizado para classificar alterações celulares que não satisfazem os critérios para as categorias LSIL ou HSIL.<sup>31,32</sup>

Já as alterações das células glandulares são divididas em: atípicas sem outras especificações (AGC-SOE), quando a atipia nuclear excede alterações reativas ou reparadoras, sem características de adenocarcinoma in situ (AIS) ou invasivo; atípicas favorecendo neoplasia (AGC-NEO), quando as alterações parecem com AIS, mas não tem todos os critérios para ser classificadas como tal; AIS e adenocarcinoma invasivo, que pode ser endocervical, endometrial, extra-uterino ou sem especificação.<sup>31,32</sup>

O sistema de Bethesda passou por revisões em 1991,<sup>31</sup> 2001<sup>33</sup> e em 2014.<sup>34</sup> A nomenclatura brasileira utilizada para laudos citopatológicos também passa por constantes alterações. A adoção do Sistema de Bethesda, ainda que adaptado ao Brasil, facilitou a comparação de resultados nacionais com os encontrados em publicações estrangeiras.<sup>35</sup>

Em 2012, o Colégio Americano de Patologia e a Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical publicaram o LAST (*Lower Anogenital Squamous Terminology*),<sup>36</sup> uma recomendação histopatológica para o trato genital inferior. Com base na baixa reprodutibilidade e falta de evidências que a NIC II seja uma entidade biológica distinta, recomendam mudanças para um sistema de nomenclatura com 2 categorias, as lesões intraepiteliais de baixo grau – LIEBG (infecções transitórias) e as lesões de alto grau – LIEAG (lesões pré-câncer) (Quadro 1).

Para determinar o comportamento das lesões intermediárias (NIC II) foi utilizado o p16 em que uma coloração forte e difusa indica ser uma lesão de alto grau e do contrário indica lesão de baixo grau ou lesão não associada ao HPV, evitando assim o supertratamento dessa paciente. No entanto, apesar de promissor, persistem casos de p16-negativos associados à progressão para lesão de alto grau e os estudos ainda têm demonstrado resultados variados.<sup>37</sup>

Sendo assim, o uso de outros parâmetros, tais como o conteúdo de DNA nuclear, hibridização *in situ* por fluorescência, imunohistoquímica, AgNOR e teste de HPV merecem maior atenção.<sup>32,38,39</sup>

Quadro 1. Nomenclaturas das lesões precursoras de câncer de colo uterino

<b>Nomenclatura original da NIC</b>	<b>Classificação Bethesda 1991</b>	<b>LAST</b>
NIC I	LSIL	LIEBG
NIC II	HSIL	LIEAG
NIC III	HSIL	LIEAG

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Legenda: NIC = neoplasia intraepitelial cervical; LAST = *Lower Anogenital Squamous Terminology*; LSIL = Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (do inglês *low-grade squamous intraepithelial lesion*); HSIL = Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau; LIEBG = Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau; LIEAG = Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau

### 1.5.1 Teste de HPV

O Teste de HPV é um exame de biologia molecular capaz de identificar o DNA do vírus no material analisado, permitindo não só a identificação do vírus na amostra, mas também a diferenciação entre HPV de alto ou baixo risco oncogênico de colo uterino.<sup>40</sup>

Atualmente existem diversos tipos de testes de HPV com diferentes tecnologias disponíveis. Esses testes podem ser geralmente classificados em dois grupos: os que detectam a presença do DNA de alto risco do HPV (testes de DNA de HPV), e os que detectam a presença do RNA mensageiro (testes de RNA do HPV). A detecção molecular do HPV de alto risco é realizada por meio de testes de amplificação de ácido nucleico (NAATs), que podem ser categorizados como testes de amplificação de sinal ou ensaios de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).<sup>10</sup>

O teste de HPV por amplificação de DNA é uma técnica molecular amplamente utilizada para a detecção e genotipagem dos diferentes tipos de vírus do papiloma humano (HPV) presentes em amostras clínicas, permitindo a identificação do vírus e, em alguns casos, a genotipagem para determinar os tipos específicos de HPV presentes.<sup>41</sup>

A amplificação de DNA é realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite a amplificação específica de regiões genômicas do HPV.<sup>42</sup>

### 1.5.2 AgNOR

A Técnica de AgNOR é um método cito-histoquímico que evidencia as regiões organizadoras de nucléolo (NORs), sendo considerado um bom marcador de proliferação celular.<sup>46</sup>

A descoberta e caracterização inicial das regiões organizadoras nucleolares (NORs) foi feita em 1928 por Heitz, que identificou a presença das NORs no núcleo das células<sup>44</sup> e as descreveu como sendo as regiões marcadas de cromatina em torno da qual, no fim da telófase, o nucléolo é reformado após seu desaparecimento durante a fase mitótica da célula. Estas regiões correspondem aos constituintes secundários de cromossomas da metáfase.<sup>45</sup>

As NORs são, portanto, segmentos de DNA que codificam o RNA de proteínas ribossômicas. Elas contêm um conjunto de proteínas argirofílicas, que são coradas seletivamente por métodos de prata. Após a coloração com prata, as NORs podem ser facilmente identificadas como pontos pretos localizados exclusivamente em toda a área nucleolar e são chamadas de “AgNORs”. Portanto, a argirofilia das NORs se deve a um grupo de proteínas nucleolares, que possuem alta afinidade pela prata (proteínas AgNOR).<sup>46</sup>

A aplicação do método de coloração com prata para visualizar as NORs e identificar as AgNORs (pontos pretos distintos) foi introduzida por Howell e Black em 1980, permitindo a visualização e contagem das NORs em células e tecidos.<sup>47</sup>

A fim de controlar melhor a reação de coloração e evitar antecedentes não específicos, Ploton *et al.*,<sup>48</sup> propuseram uma temperatura mais baixa e um tempo de coloração mais longo. Devido à sua confiabilidade e especificidade, este método de coloração com prata tornou-se o mais frequentemente empregado para a visualização da proteína AgNOR na cito-histopatologia de rotina.<sup>49</sup>

No final da década de 1980, o interesse dos patologistas pelas proteínas AgNOR aumentou muito após a observação de que as células malignas frequentemente exibem uma quantidade maior de proteína AgNOR em comparação com as células benignas ou normais correspondentes. Investigações subsequentes também demonstraram que a quantidade da proteína AgNOR representa um parâmetro valioso da cinética celular, estando significativamente associada à rapidez da duplicação celular.<sup>43</sup>

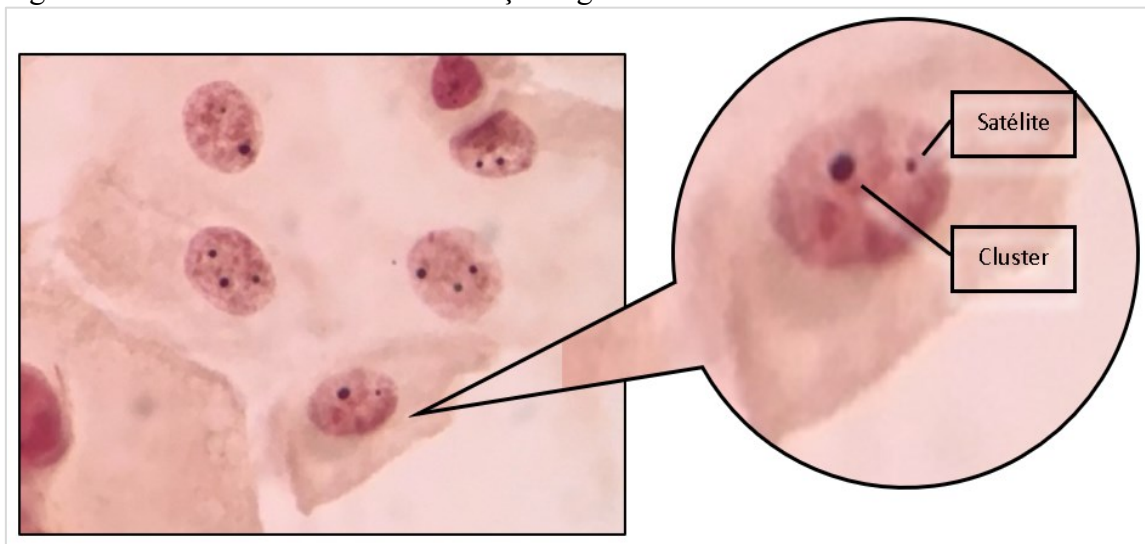
Um maior número de AgNOR nos núcleos caracteriza um ciclo celular rápido.<sup>50</sup> Sendo assim, foi sugerido que o número de AgNORs em um núcleo pode refletir a atividade de proliferação das células e o grau de transformação maligna de certos tecidos.<sup>51-54</sup>

A análise das AgNORs pode ser realizada pela contagem de pequenos pontos de nucléolos dispersos (satélites) e/ou grandes pontos aglomerados (*clusters*) pelo padrão de distribuição dos pontos negros dentro do núcleo observado na microscopia óptica.<sup>54,55</sup>

Os *clusters* representam concentrações de sítios de transcrição ativa do DNA ribossômico em determinadas regiões nucleolares das células. Por outro lado, os satélites do AgNOR referem-se a estruturas menores e mais dispersas dentro do núcleo das células coradas com AgNOR.<sup>48,56,57</sup>

A quantificação e análise das AgNORs tem sido utilizada para investigar a taxa de proliferação celular, avaliar a malignidade de células e tecidos, prognosticar o curso da doença e determinar a resposta ao tratamento em uma variedade de cânceres e outras condições médicas (Figura 3).<sup>58</sup>

Figura 3. *Clusters* e satélites em coloração AgNOR



Fonte: Adaptado de Pedrini<sup>59</sup>.

## 1.6 OBJETIVOS

### 1.6.1 Objetivo Geral

Determinar do número de regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR) em lesões do colo do útero para avaliar a capacidade do AgNOR em diagnosticar lesões precursoras do CCU e prever a oncogenicidade do HPV.

### 1.6.2 Objetivos Específicos

-Avaliar o perfil socioeconômico das pacientes atendidas no ambulatório de Patologia Cervical do HU – UFSC no período da realização da pesquisa;

-Analisar a hiperexpressão das regiões nucleolares por prata (AgNOR) nas células atípicas;

-Fazer uma análise comparativa entre os números de *clusters*, de satélites e do valor de AgNOR total para avaliar qual desses valores seria mais útil para o diagnóstico das lesões de CCU;

-Sugerir um possível valor de contagem de AgNOR que possa ser utilizado para o rastreio do CCU;

-Avaliar a acurácia da técnica de AgNOR em prever a oncogenicidade do HPV;

-Analisar a possibilidade de utilização do AgNOR como adjuvante na decisão terapêutica das pacientes baseando-se na sua capacidade de diagnosticar as lesões.



## 2 MÉTODO

Foi realizado um estudo transversal no qual avaliamos a capacidade do AgNOR em detectar as lesões precursoras de colo uterino. Para isso foram utilizados dados de um estudo de doutorado que já estava em andamento na UFSC, envolvendo mulheres que foram atendidas no ambulatório de ginecologia e colposcopia do Hospital Universitário da UFSC.

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HU-UFSC, CAAE: 57423616.3.0000.0121 e teve parecer favorável para execução (Anexo A). Toda paciente que se enquadrava nos critérios de inclusão foi previamente convidada a participar do estudo e informada acerca da pesquisa. Aquelas que aceitaram participar assinaram um Termo de Consentimento Livre Esclarecido – TCLE (Apêndice A) e responderam a um questionário com dados relativos ao perfil socioeconômico, hábitos e doenças pré-existentes, que foi aplicado como uma entrevista por um membro da equipe médica do ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior, do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina (PTGI do HU-UFSC).

### 2.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Todas as pacientes que apresentavam algum tipo de alteração citológica no citopatológico do colo uterino e aceitaram participar do estudo.

### 2.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Aquelas mulheres que estavam grávidas no momento do exame ou menores de 18 anos e as pacientes em que não foi realizado o teste de HPV.

### 2.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As mulheres selecionadas foram submetidas a exame ginecológico e colposcopia. 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

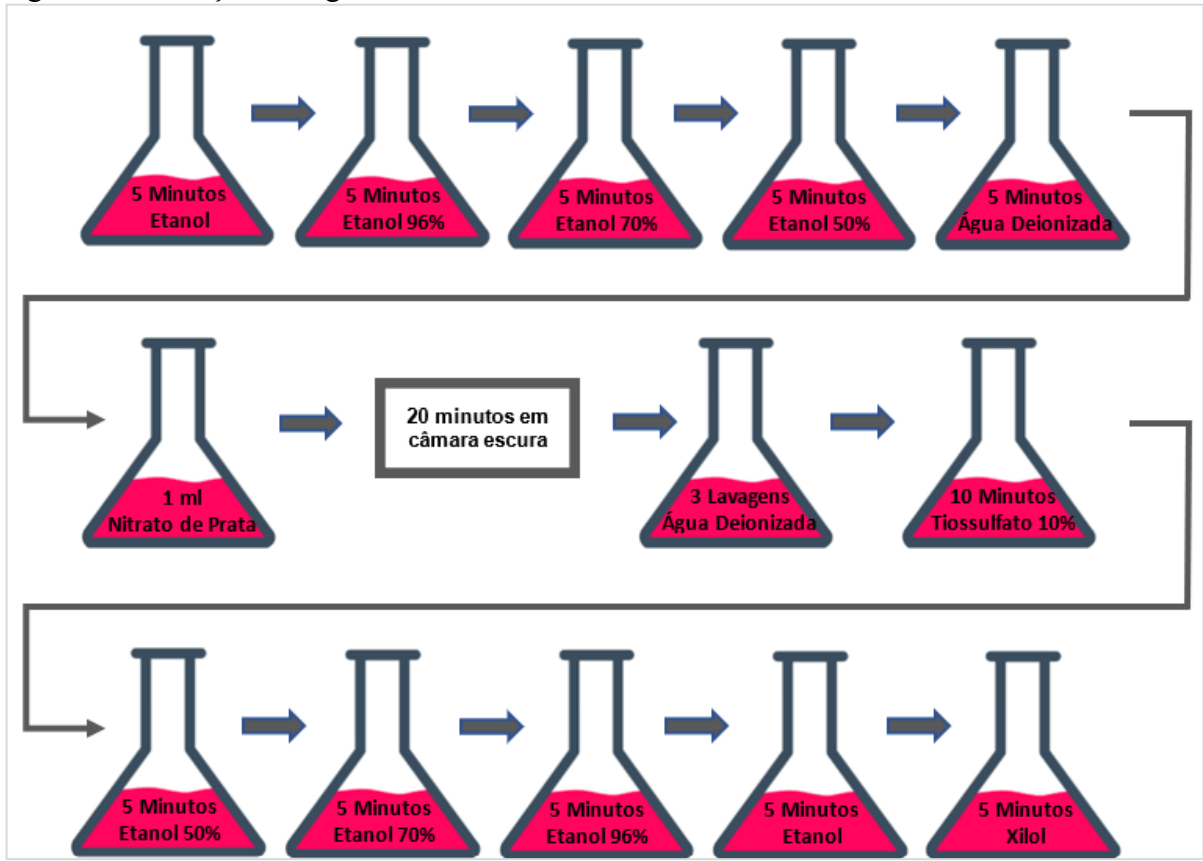
das lâminas e posterior coloração AgNOR. O material armazenado em solução PreservCyt® Thinprep foi utilizado também para o teste de HPV por PCR.

Foi realizada biópsia nas lesões evidenciadas na colposcopia como é feito na rotina de acordo com o estabelecido pelo Ministério da Saúde. O material obtido pelas biópsias foi fixado em formol tamponado a 10% e enviado ao Serviço de Anatomia Patológica do HU-UFSC e o laudo histopatológico foi dado por dois médicos patologistas experientes.

### **2.3.1 Coloração de AgNOR**

A coloração de AgNOR foi realizada de acordo com o método descrito por Ploton *et al.*,<sup>48</sup> (1986), Crocker *et al.*,<sup>60</sup> (1989), e Ruschoff *et al.*;<sup>61</sup> com algumas adaptações, sendo realizada uma etapa de fixação em etanol absoluto, 96%, 70% e 50% respectivamente com tempo de 5 minutos em cada frasco e posteriormente, realizada hidratação em água deionizada por 5 minutos. Logo após, as lâminas foram colocadas em câmara úmida e escura para adição de 1 mL de nitrato de prata (Solução de gelatina em ácido fórmico 1% e Nitrato de Prata 50%) e incubadas por 20 minutos. Após esse processo, foram realizadas 3 lavagens com água destilada deionizada e submersas em tiosulfato de sódio 10% por 10 minutos. Por último foi realizada desidratação com uma sequência de 5 minutos em cada frasco com etanol a 50%, 70%, 96%, etanol absoluto e xilol, respectivamente (Figura 4).

Figura 4. Coloração de AgNOR



Fonte: elaborado pela autora, 2023.

A contagem das NORs foi realizada observando os pontos de coloração negra no interior dos nucléolos em cada célula, por meio de microscopia óptica na magnitude de (1000x) em óleo de imersão.

O padrão de contagem das NORs foi realizado considerando-se 10 células/campo, repetindo-se em 10 campos microscópicos aleatórios, totalizando a contagem em 100 células por lâmina de acordo com o método de Crocker *et al.*<sup>60</sup> Em cada célula, contou-se o número de satélites, o número de *clusters* e o número total de AgNORs, como sugerido por Remmerbach *et al.*<sup>62</sup>

### 2.3.2 Teste de HPV

Os testes de HPV da pesquisa foram realizados pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF).

As amostras foram coletadas e armazenadas em solução PreservCyt® Thinprep e enviadas para o LACEN-DF para realização das análises.

As amostras de células coletadas foram analisadas através do teste CLART® HPV2 (Genomica, Madri, Espanha)

Nesse teste foi feita uma amplificação por PCR de fragmentos do genoma do vírus, gerando ampliações que foram comparadas à sondas específicas, permitindo a detecção do tipo do HPV. A interpretação do resultado foi feita através de um software de processamento de imagens.

Com isso, o teste de HPV permite não só a identificação do vírus na amostra, mas também a diferenciação entre HPV de alto ou baixo risco para câncer de colo uterino.

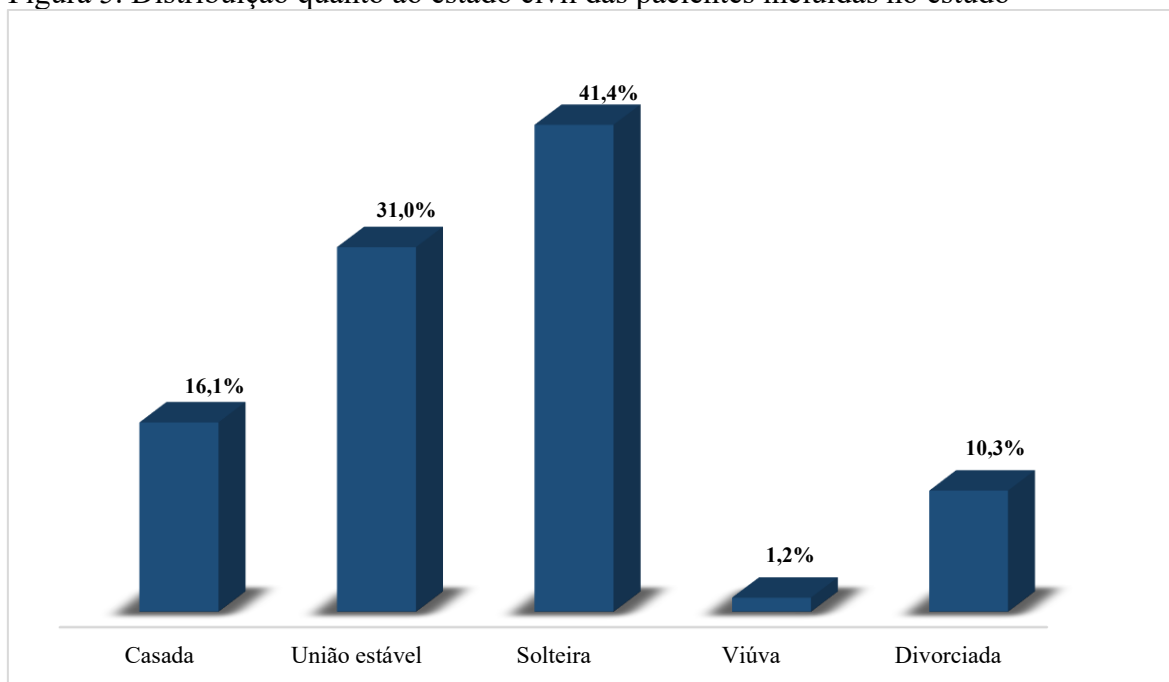
## 2.4 ANÁLISE DOS DADOS

O conjunto de dados foi armazenado em planilhas Microsoft Excel, importado e analisado com o uso do programa IBM *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 23. A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro Wilk. As variáveis numéricas estão expressas em tendência central e variabilidade e as categóricas em frequência absoluta e relativa. Para analisar a diferença entre grupos foram empregados os seguintes testes: Qui-quadrado, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis este último com auxílio do Post-Hoc de Dunn. Foi utilizada a curva ROC para avaliar o poder de discriminação da coloração AgNOR e identificar a sensibilidade e especificidade. Para significância estatística foi adotado p-valor  $\leq 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

Participaram deste estudo 87 pacientes cuja média de idade foi 35,6 (DP = 9,4) anos variando de 18 a 68 anos. O tempo de escolaridade foi computado em anos e variou de 0 a 19 com média de 12,1 (DP = 4,6) anos. Sessenta e nove (79,3%) pacientes não eram tabagistas, 11 (12,6%) declararam ser tabagistas e sete (8,0%), ex-tabagistas. Quanto ao estado civil das participantes, 14 eram casadas, 27 viviam em união estável, 36 eram solteiras, uma era viúva e nove, divorciadas. A Figura 5 ilustra a distribuição em frequência relativa.

Figura 5. Distribuição quanto ao estado civil das pacientes incluídas no estudo



Fonte: elaborado pela autora, 2023.

O início da atividade sexual teve a idade mínima registrada de 12 a e a máxima de 42 anos, sendo a mediana de 17 (15 – 18) anos. Quanto ao uso de preservativos, a maioria (85,1%) das pacientes relatou não fazer uso ou usavam esporadicamente. Oitenta pacientes (92,0%) negaram ter sido vacinadas contra o HPV. A maioria das pacientes (66,7%) relatou não sofrer de algum tipo de Infecção sexualmente transmissível (IST). O método contraceptivo mais utilizado foi o hormonal, citado por 45 (51,7%) pacientes. A mediana da idade que a paciente tinha no momento do primeiro parto foi 20 (17 – 24) anos, variando de 14 a 36 anos. Já em relação às gestações incluindo abortos, a mediana foi 1 (0 – 2) variando de 0 a 11 gestações. A idade das pacientes foi dicotomizada com base na média, assim, foi possível detalhar as variáveis acima citadas (Ver Tabela 1).

Tabela 1. Perfil das participantes estratificado por faixa de idade

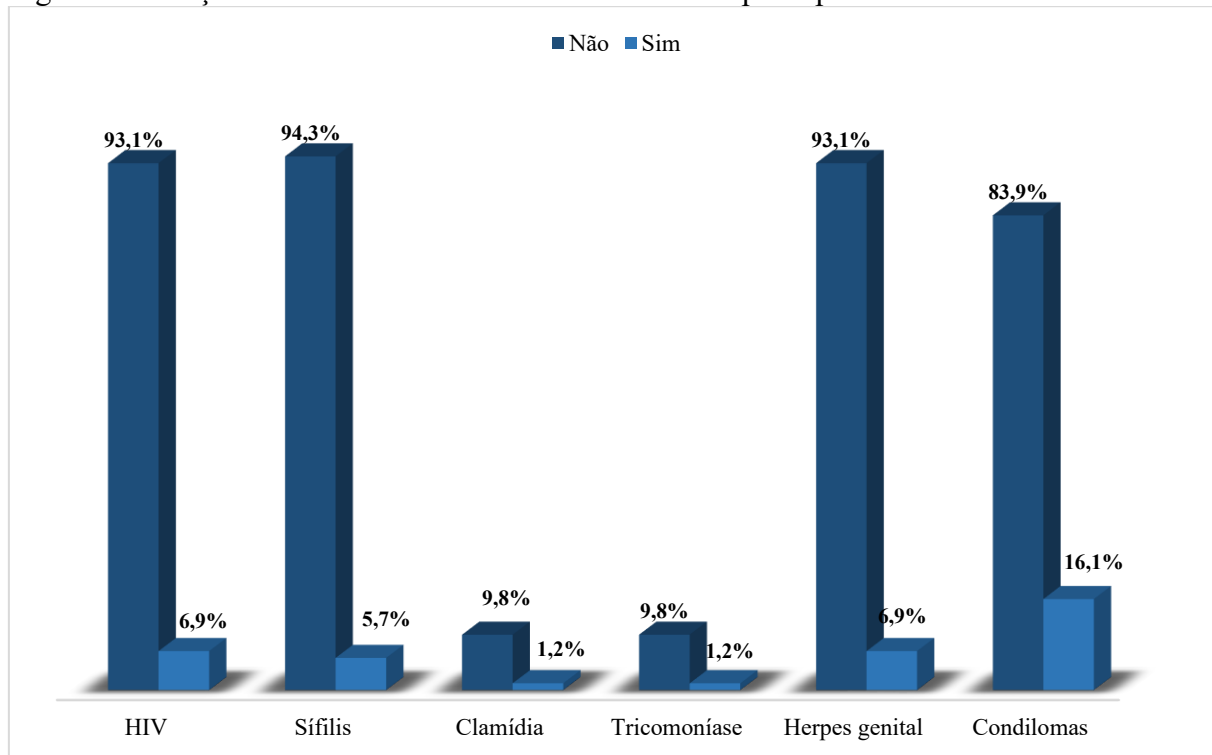
Variáveis <sup>a</sup>	Idade	
	< 35 anos	≥ 35 anos
<b>Uso de preservativos</b>		
Não	38 (51,4%)	36 (48,6%)
Sim/as vezes	6 (46,2%)	7 (53,8%)
<b>Vacina contra o HPV</b>		
Não	38 (47,5%)	42 (52,5%)
Sim	6 (85,7%)	1 (14,3%)
<b>Método contraceptivo</b>		
Não hormonal	23 (54,8%)	19 (45,2%)
Hormonal	21 (46,7%)	24 (53,3%)
<b>Histórico de IST</b>		
Não	27 (46,6%)	31 (53,4%)
Sim	17 (58,6%)	12 (41,4%)
<b>HIV</b>		
Não	41 (50,6%)	40 (49,4%)
Sim	3 (50,0%)	3 (50,0%)
<b>Sífilis</b>		
Não	42 (51,2%)	40 (48,8%)
Sim	2 (40,0%)	3 (60,0%)
<b>Clamídia</b>		
Não	43 (50,0%)	43 (50,0%)
Sim	1 (100,0%)	0 (0,0%)
<b>Tricomoníase</b>		
Não	44 (51,2%)	42 (48,8%)
Sim	0 (0,0%)	1 (100,0%)
<b>Herpes genital</b>		
Não	41 (50,6%)	40 (49,4%)
Sim	3 (50,0%)	3 (50,0%)
<b>Condilomas</b>		
Não	34 (46,6%)	39 (53,4%)
Sim	10 (71,4%)	4 (28,6%)

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Legenda: HPV = Papilomavírus humano (do inglês *human papillomavirus*); IST = Infecções Sexualmente Transmissíveis; HIV = vírus da imunodeficiência humana (do inglês *Human immunodeficiency virus*).  
 Nota: <sup>a</sup> valores expressos em número absoluto e relativo.

Entre os tipos de IST identificados, 14 eram condilomas, 5 sífilis, 6 HIV e herpes genital e 1 tricomoníase e clamídia. Frequência relatada na Figura 6.

Figura 6. Infecções sexualmente transmissíveis relatadas pelas pacientes



Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Legenda: HIV = vírus da imunodeficiência humana (do inglês *Human immunodeficiency virus*).

No que se refere ao diagnóstico do exame de colpocitologias do encaminhamento, 29 (33,7%) foram classificadas com lesões de baixo grau, 27 (31,4%) com lesões de alto grau, 16 (18,6%) foram classificadas com células escamosas atípicas de significado indeterminado, 13 (15,1%) células pouco diferenciadas em que não se pode excluir uma lesão de alto grau e 1 (1,2%) células glandulares atípicas sem outras especificações. Não foi encontrada diferença com significância estatística quando foi comparada por faixa de idade [ $\chi^2_{(4)} 7,120$ ;  $p = 0,13$ ]. A Tabela 2 descreve esses achados com maiores detalhes estratificados por idade.

Tabela 2. Frequência quanto ao diagnóstico da citologia de encaminhamento

Classificação	Idade	
	< 35 anos	≥ 35 anos
LSIL	19 (65,5%)	10 (34,5%)
HSIL	9 (33,3%)	18 (66,7%)
ASC – US	9 (56,3%)	7 (43,7%)
ASC-H	6 (46,2%)	7 (53,2%)
AGC-SOE	0 (0,0%)	1 (100,0%)

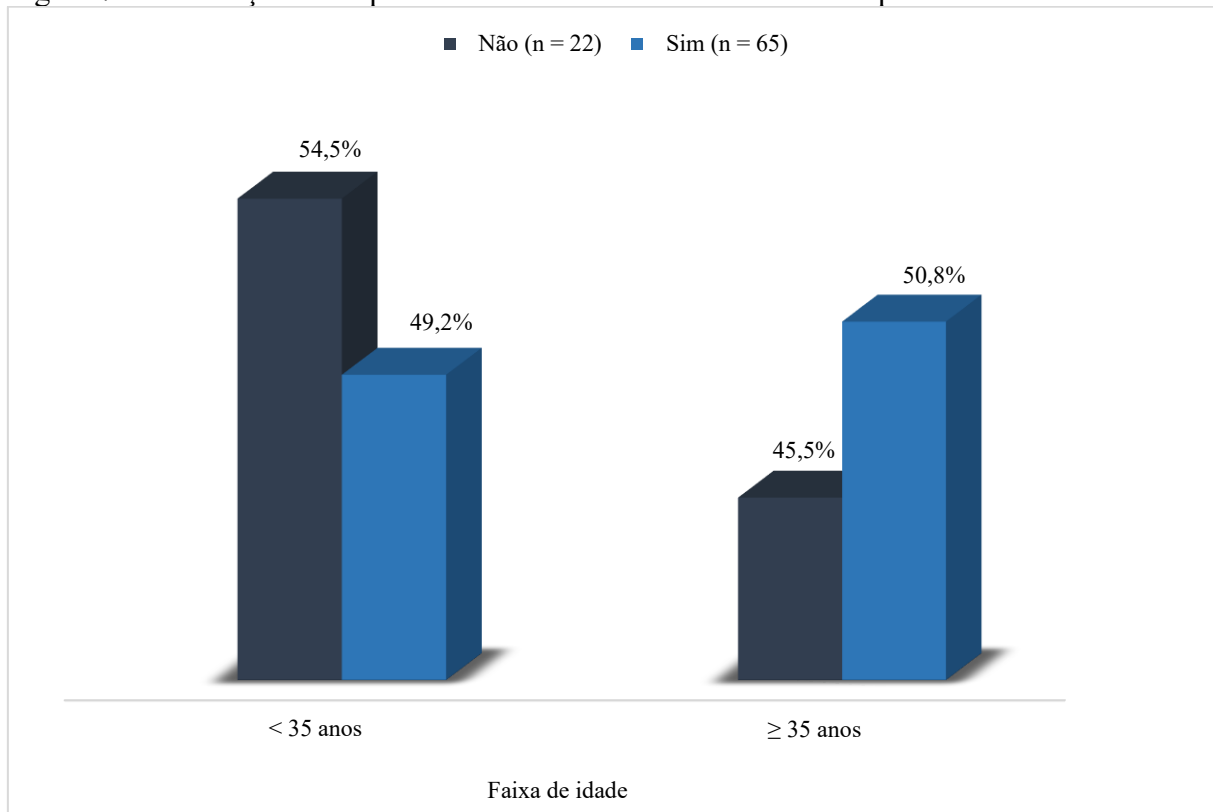
Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Legenda: LSIL = Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (do inglês *low-grade squamous intraepithelial lesion*); HSIL = Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (do inglês *high-grade intraepithelial lesion*); ASC – US = – Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (do inglês *atypical squamous cells of undetermined significance*); ASC-H = Células Escamosas Atípicas não podendo excluir Lesão Intraepitelial de Alto Grau (do inglês *atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion*); AGC-SOE = Células Glandulares Atípicas Sem Outras Especificações (do inglês *Atypical glandular cells*).

Sessenta e cinco (74,7%) pacientes apresentaram HPV de alto risco para câncer (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82), contudo, não foi detectada diferença entre faixa de idade e HPV de risco para câncer ou não [ $\chi^2_{(1)} 0,186$ ;  $p = 0,67$ ] (Ver Figura 7).



Figura 7. Distribuição entre pacientes com e sem HPV de alto risco para câncer



Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Legenda: HPV = Papilomavírus humano (do inglês *human papillomavirus*).

Os resultados dos exames histopatológicos revelaram que 23 (26,4%) das amostras estavam classificadas como NIC I, 28(32,2%) eram NIC II, 20 (23,0%) NIC III e 16 (18,4%) classificadas como cervicite crônica. Foi observada diferença significativa entre as classes histológicas e faixa de idade [ $\chi^2_{(3)} 9,654; p = 0,02$ ], sugerindo que as pacientes com idade abaixo de 35 anos tinham suas amostras classificadas em NIC I e cervicite crônica quando comparadas àquelas com idade superior a 35 anos. Por outro lado, as pacientes com idade acima de 35 anos tinham amostras classificadas em NIC II e NIC III comparadas com as pacientes com idade inferior a 35 anos (Ver Tabela 3).

Tabela 3. Resultados e classificação do teste histológico

Variáveis	Idade	
	< 35 anos	≥ 35 anos
NIC I	16 (69,6%)	7 (30,4%)
NIC II	13 (46,4%)	15 (53,6%)
NIC III	5 (25,0%)	15 (75,0%)
Cervicite crônica	10 (62,5%)	6 (37,5%)

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Legenda: NIC = neoplasia intraepitelial cervical.

Em relação aos tipos de HPV mais relacionados ao câncer de colo do útero, 32 (36,8%) tinham os tipos 16 e 18 presentes em suas amostras, 23 (26,4%) tinham a presença dos tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 em seus materiais biológicos e 32 (36,8%) apresentaram outros tipos. A Tabela 4 mostra esses resultados divididos por faixa de idade. Destaca-se nesta mesma tabela que os tipos mais agressivos estavam presentes nas amostras das pacientes com idade abaixo dos 35 anos refletindo em 62,5% dos casos comparados com as pacientes com idade igual ou superior a 35 anos.

Tabela 4. Tipos de HPV presentes nas amostras das 87 pacientes envolvidas no estudo

Tipos de HPV	Idade	
	< 35 anos	≥ 35 anos
16 e 18	20 (62,5%)	12 (37,5%)
31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82	7 (30,4%)	16 (69,6%)
Outros	17 (53,1%)	15 (46,9%)

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Legenda: HPV = Papilomavírus humano (do inglês *human papillomavirus*).

No que se refere à técnica AgNOR, a mediana de satélites por núcleo foi 105,0 (74,5 – 151,0); a mediana de *clusters* foi 177,5 (136,5 – 220,5), o AgNOR total apresentou mediana de 280,0 (248,5 – 327,5) por núcleo e a mediana da média de AgNOR 2,7 (2,4 – 3,2).

Os resultados revelaram que não houve diferença com significância estatística entre a coloração por AgNOR satélite e HPV de alto risco para câncer [ $U = 516,500$ ;  $p = 0,77$ ]. Já entre *clusters* foi observada diferença estatisticamente significativa [ $U = 322,500$ ;  $p = 0,01$ ], demonstrando que as amostras com maior número de *clusters* eram das pacientes com HPV de alto risco quando comparadas com as amostras das pacientes com HPV de baixo risco. Também, foi verificado que houve diferença significativa entre AgNOR total [ $U = 380,000$ ;  $p = 0,02$ ], mostrando que as amostras das pacientes com HPV de alto risco oncogênico tinham maiores números de AgNOR total por núcleo em comparação com aquelas pacientes com HPV de baixo risco oncogênico. Além disso, os resultados revelaram diferença na média dos AgNORs por núcleo das pacientes com HPV de alto risco oncogênico, as quais apresentavam um valor mais alto comparadas com àquelas de baixo risco [ $U = 505,000$ ;  $p = 0,04$ ] (Ver Tabela 5).

Tabela 5. Resultados da comparação da técnica AgNOR entre grupo de mulheres com e sem HPV de alto risco oncogênico

HPV de alto risco para câncer <sup>a</sup>	AgNOR <sup>b</sup>							
	Satélite	p valor	Cluster	p valor	Total	p valor	Média	p valor
Não	120,0 (67,5 – 165,5)	0,77	156,0 (109,0 – 179,0)	0,01	262,5 (245,5 – 287,3)	0,02	2,6 (2,4 – 2,8)	0,04
Sim	99,0 (76,0 – 138,0)		181,0 (153,0 – 234,0)		290,0 (252,0 – 349,5)		2,8 (2,4 – 3,4)	

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Legenda: HPV = Papilomavírus humano (do inglês *human papillomavirus*); AgNOR = regiões organizadoras de nucléolo coradas com prata.

Nota: <sup>a</sup> valores expressos em mediana e intervalo interquartil; <sup>b</sup> Teste de Mann-Whitney.

Quando comparados os resultados dos exames de biópsia com os resultados da coloração AgNOR, a contagem de satélites por núcleo não mostrou diferença estatisticamente significativa [ $\chi^2_{(3)}0,598$ ;  $p = 0,90$ ]. No entanto, pode-se verificar que houve diferença estatisticamente significativa para os AgNOR *clusters* [ $\chi^2_{(3)}13,718$ ;  $p < 0,01$ ]. Com teste de Post-Hoc de Dunn foi possível identificar que essa diferença estava presente em amostras com resultados NIC I e NIC III demonstrando que havia *clusters* em maior número entre as amostras de NIC III em comparação com NIC I. Também foi identificado que houve diferença significativa entre a contagem de AgNOR total por núcleo [ $\chi^2_{(3)} 8,565$ ;  $p = 0,04$ ] entre as categorias de NIC I e NIC III. Igualmente, verificou-se diferença com significância estatística para a média dos AgNORs por núcleo [ $\chi^2_{(3)} 8,581$ ;  $p = 0,04$ ], cuja diferença também estava nas amostras com resultados NIC I e NIC III (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados da comparação entre a técnica AgNOR e classificação histológica

Classificação histológica <sup>a</sup>	AgNOR <sup>b</sup>			
	Satélite	Cluster	Total	Média
NIC I	110,0 (91,0 – 174,0)	162,0 (90,0 – 178,0)	261,0 (251,0 – 277,0)	2,6 (2,4 – 2,7)
NIC II	105,5 (74,0 – 105,5)	180,5 (153,0 – 220,5)	287,5 (242,5 – 337,8)	2,8 (2,4 – 3,3)
NIC III	101,5 (80,5 – 131,0)	227,0 (169,5 – 278,8)	312,0 (268,5 – 376,5)	3,1 (2,6 – 3,7)
Cervicite crônica	104,0 (64,0 – 163,0)	160,0 (140,0 – 203,0)	276,0 (250,0 – 307,0)	2,7 (2,1 – 2,9)

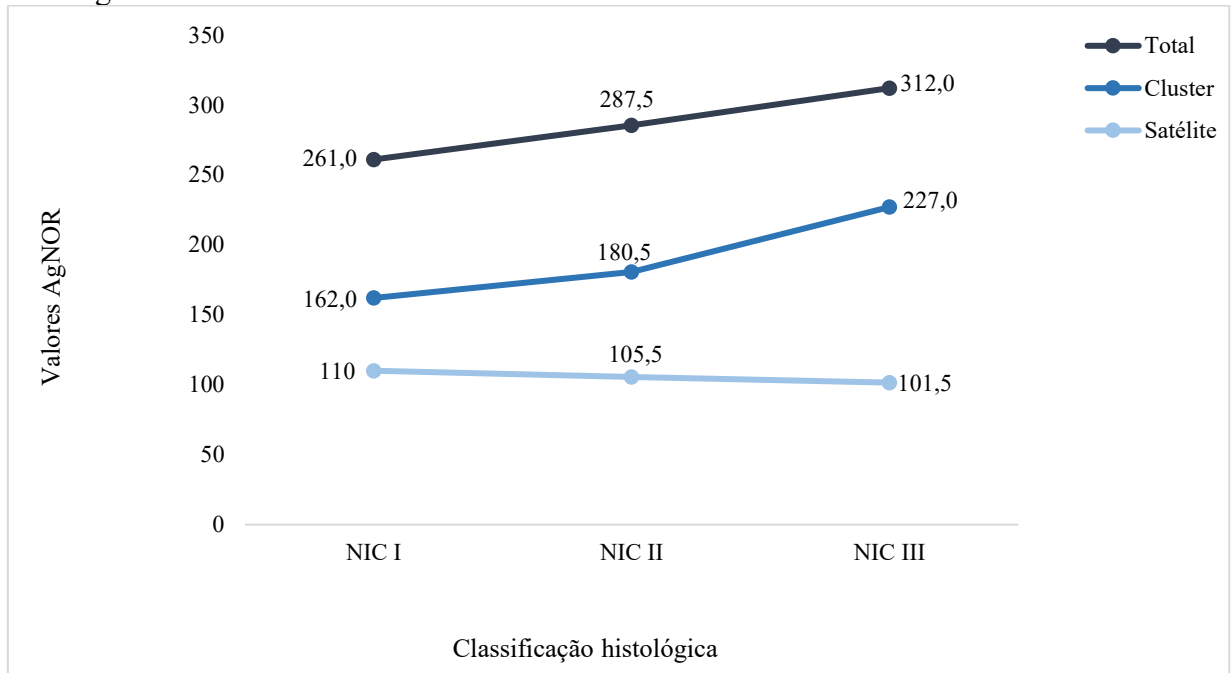
Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Legenda: AgNOR = regiões organizadoras de nucléolo coradas com prata; NIC = neoplasia intraepitelial cervical.

Nota: <sup>a</sup> valores expressos em mediana e intervalo interquartil; <sup>b</sup> Teste Kruskal-Wallis.

No gráfico abaixo visualizamos como os marcadores AgNOR se comportaram em relação às classificações NIC I, II e III (Figura 8).

Figura 8. Gráfico representativo da comparação entre a técnica AgNOR e classificação histológica



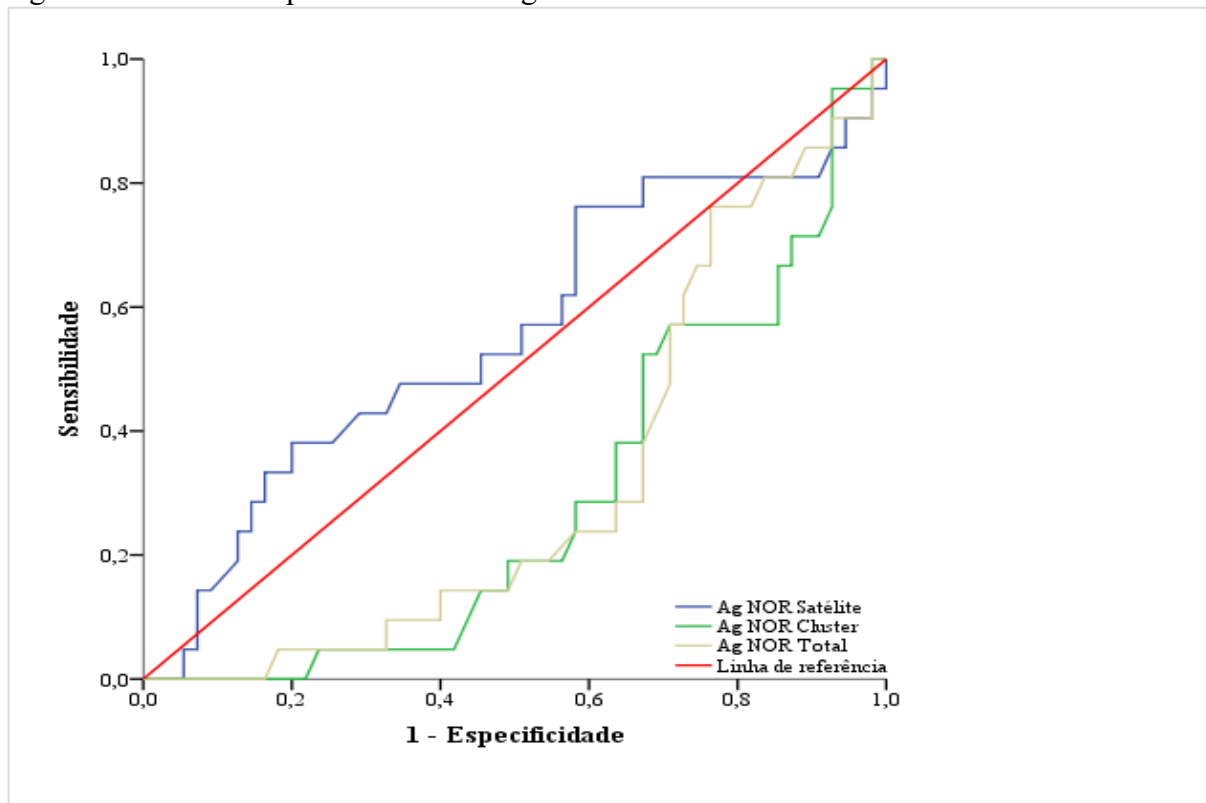
Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Legenda: AgNOR = regiões organizadoras de nucléolo coradas com prata; NIC = neoplasia intraepitelial cervical.

A análise da curva ROC permitiu avaliar o poder de discriminação da coloração AgNOR sendo a biópsia o padrão ouro para comparação. Foram analisadas as três classes histológicas NIC I, NIC II e NIC III.

Na Figura 9, pode-se visualizar as curvas ROC elaboradas com as três contagens: satélite, *cluster* e total. Em relação à classe NIC I, nenhuma das contagens manifestou poder de sensibilidade ao NIC I: AgNOR satélite [AUC = 0,55; (IC95%:0,40-0,71);  $p = 0,46$ ]; AgNOR *cluster* [AUC = 0,29; (IC95%:0,17-0,41)  $p = 0,01$ ] e AgNOR total [AUC = 0,32;(IC95%:0,19-0,44);  $p = 0,01$ ].

Figura 9. Curva ROC para classe histológica NIC I



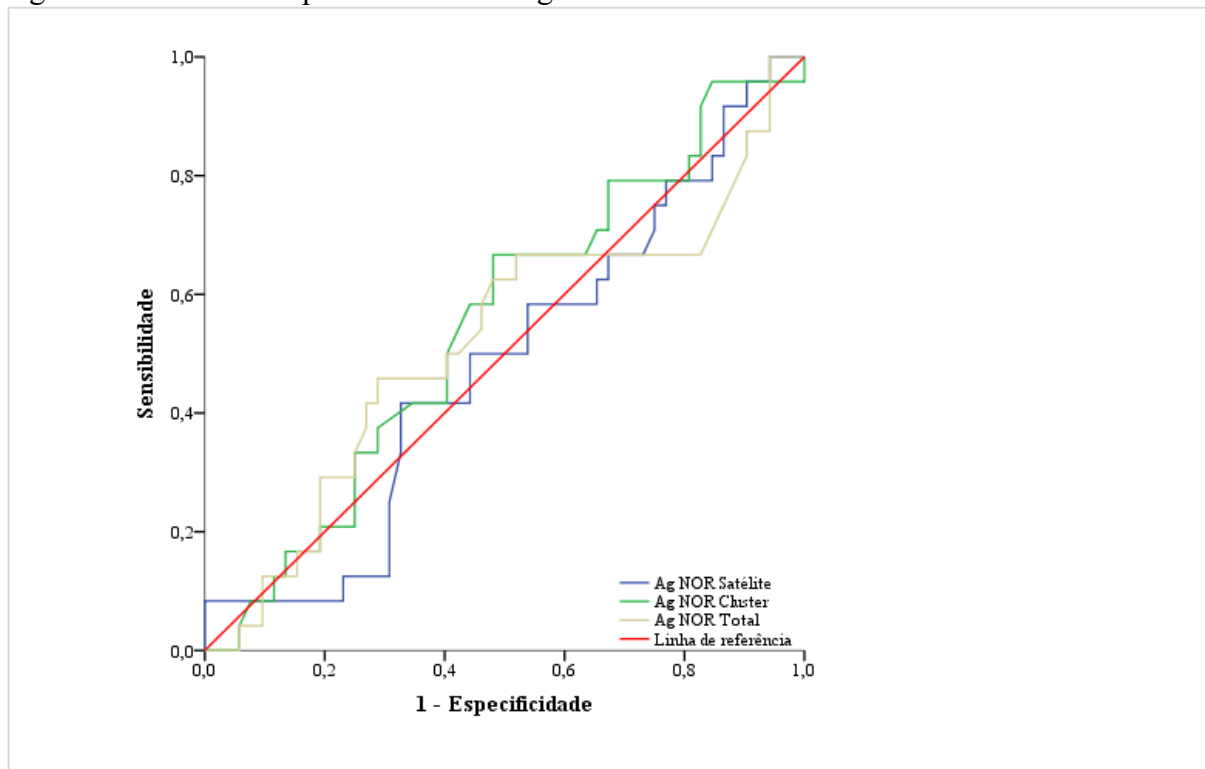
Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Legenda: ROC = *Receiver Operator Characteristics*; AgNOR = regiões organizadoras de nucléolo coradas com prata.

Da análise envolvendo AgNOR e NIC II, pode-se observar na Figura 10 que as três curvas ilustradas não demonstraram poder discriminatório para sensibilidade. Nota-se nesta mesma figura que as três curvas se aproximaram muito da bissetriz, indicando que a coloração AgNOR não teve capacidade discriminativa para NIC II. AgNOR satélite [AUC = 0,48; (IC95%:0,34-0,62);  $p = 0,81$  AgNOR *cluster* [AUC = 0,55; (IC95%:0,41-0,69);  $p = 0,49$ ]; e AgNOR total [AUC = 0,52; (IC95%:0,37-0,67);  $p = 0,79$ ].



Figura 10. Curva ROC para classe histológica NIC II

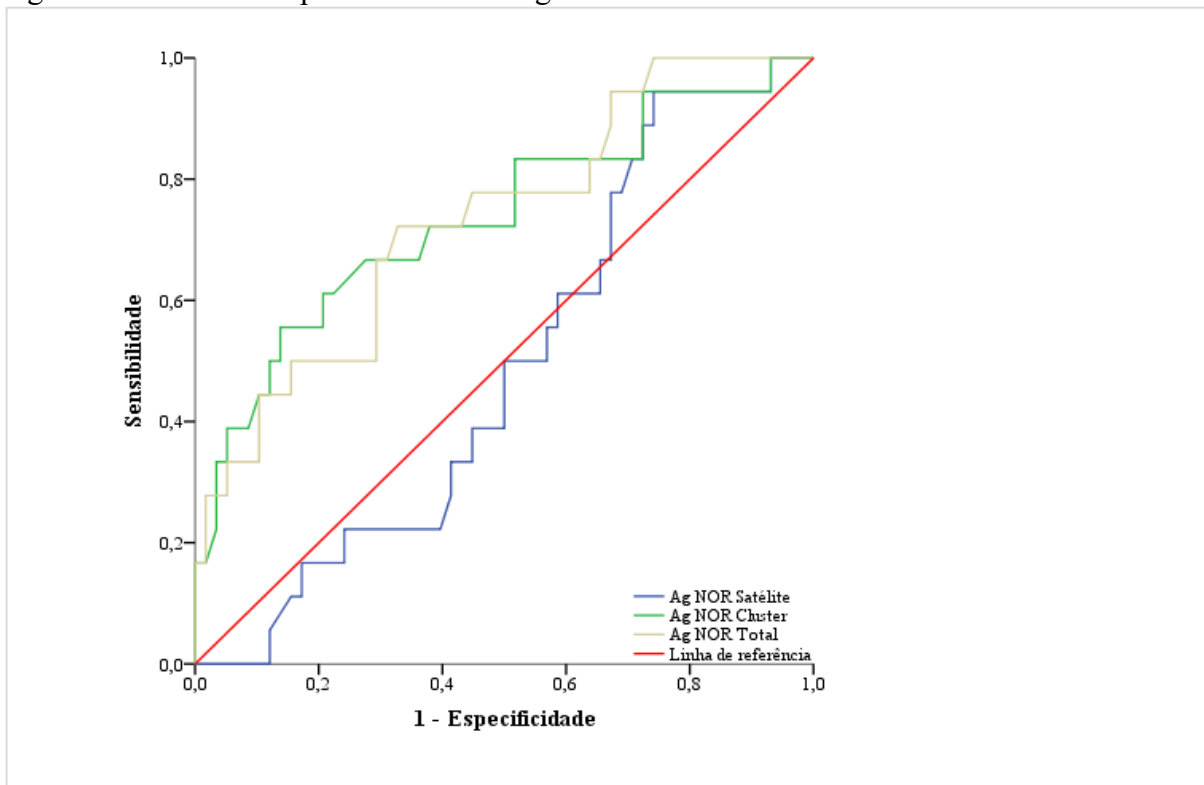


Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Legenda: ROC = *Receiver Operator Characteristics*; AgNOR = regiões organizadoras de nucléolo coradas com prata.

Quanto à comparação envolvendo a classificação NIC III, a coloração AgNOR satélite não mostrou boa performance no rastreamento [AUC = 0,49; (IC95%:0,35-0,63);  $p = 0,89$ ], contudo, notou-se desempenho aceitável para rastreamento com: AgNOR *cluster* [AUC = 0,74; (IC95%:0,59-0,88);  $p < 0,01$ ] e AgNOR total [AUC = 0,73;(IC95%:0,60-0,87);  $p < 0,01$ ]. As curvas ROC estão representadas na Figura 11.

Figura 11. Curva ROC para classe histológica NIC II



Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Legenda: ROC = *Receiver Operator Characteristics*; AgNOR = regiões organizadoras de nucléolo coradas com prata.

As coordenadas da curva ROC foram avaliadas com intuito de propor um ponto de corte para rastreio de NIC III. Com base nos resultados, foi possível sugerir apenas valores para AgNOR *cluster* e AgNOR total. A Tabela 7 mostra as coordenadas da curva ROC até o valor estabelecido como ponto de corte.

Tabela 7. Coordenadas da curva ROC para AgNOR *clusters* e total

AgNOR <i>cluster</i> <sup>a</sup>			AgNOR total <sup>a</sup>		
		1 -			1 -
Contagem	Sensibilidade	Especificidade	Contagem	Sensibilidade	Especificidade
18,0	1,00	1,00	-1,0	1,00	1,00
25,5	1,00	0,98	71,5	0,95	0,97
38,0	1,00	0,97	160,5	0,95	0,95
47,0	1,00	0,95	187,5	0,95	0,93
53,5	1,00	0,93	199,0	0,95	0,92
57,5	0,94	0,93	206,0	0,95	0,90
72,5	0,94	0,91	219,5	0,95	0,88
87,5	0,94	0,90	229,5	0,95	0,87
88,5	0,94	0,88	234,0	0,95	0,85
89,5	0,94	0,86	238,0	0,95	0,83
91,0	0,94	0,83	240,5	0,95	0,82
99,0	0,94	0,81	243,0	0,95	0,78
112,0	0,94	0,79	245,0	0,95	0,75
122,0	0,94	0,78	246,5	0,95	0,72
127,0	0,94	0,76	248,5	0,90	0,70
130,0	0,94	0,72	250,5	0,90	0,68
133,5	0,89	0,72	252,0	0,90	0,65
136,0	0,83	0,72	253,5	0,84	0,65
138,5	0,83	0,71	255,0	0,79	0,63
142,0	0,83	0,69	256,5	0,79	0,62
148,5	0,83	0,67	258,5	0,74	0,62
154,5	0,83	0,64	260,5	0,74	0,60
157,5	0,83	0,62	263,0	0,74	0,58
159,5	0,83	0,59	266,5	0,74	0,55
161,0	0,83	0,57	270,0	0,74	0,52
163,0	0,83	0,53	272,5	0,74	0,50
164,5	0,83	0,52	273,5	0,74	0,48
165,5	0,78	0,52	275,0	0,74	0,47
166,5	0,72	0,52	276,5	0,74	0,45
167,5	0,72	0,50	278,5	0,74	0,43
169,5	0,72	0,48	283,5	0,68	0,42
173,0	0,72	0,47	287,5	0,68	0,40
176,0	0,72	0,45	289,0	0,68	0,35
177,5	0,72	0,43	292,5	0,68	0,33
178,5	0,72	0,41	296,0	0,68	0,32
179,5	0,72	0,38	302,0	0,63	0,30
180,5	0,67	0,36	308,0	0,63	0,28

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Legenda: ROC = *Receiver Operator Characteristics*; AgNOR = regiões organizadoras de nucléolo coradas com prata.

Estes pontos de corte propõem uma contagem de 179,5 AgNOR *cluster* para rastrear NIC III com 72% de sensibilidade com 38% de especificidade. Isto indica que, a probabilidade é de que 72% das amostras positivas sejam corretamente classificadas (verdadeiro positivo), com margem de erro de 38% indicando que este percentual se refere à probabilidade de classificar erroneamente amostras negativas como sendo positivas (falso negativo).

Para a contagem de AgNOR total foi identificado ponto de corte de 278,5 para rastreamento do NIC III com 74% de sensibilidade e 43% de especificidade. De posse destes achados, a probabilidade das amostras classificadas corretamente positiva é de 74% (verdadeiro positivo), contudo, com erro estimado em 43% para classificar incorretamente amostras negativas como sendo positivas (falso negativo).

## 4 DISCUSSÃO

O câncer de colo uterino é uma doença evitável e tratável, desde que diagnosticada precocemente e manejada de maneira eficiente. Porém ainda é uma grave questão de saúde pública mundial tanto pela sua frequência elevada, quanto pela gravidade e importante impacto psicossocial.

Nesse contexto, nesse trabalho avaliamos a utilização da técnica de AgNOR para o diagnóstico das lesões precursoras do câncer cervical e para a identificação do HPV de alto ou baixo risco oncogênico.

Participaram do estudo 87 pacientes que haviam sido encaminhadas ao ambulatório de patologia cervical do HU-UFSC por apresentarem alguma alteração citológica no citopatológico de colo uterino.

Avaliamos as características demográficas das participantes, no que diz respeito aos principais fatores de risco para o CCU, uma vez que compreender esses fatores é de extrema importância para a identificação precoce da doença, implementação de medidas preventivas e promoção da saúde da mulher.

Primeiramente é importante ressaltar que, todas as pacientes estavam infectadas por algum subtipo de HPV, uma vez que foram excluídas as pacientes em que não foi realizado o teste de HPV. Observou-se que a faixa etária média foi de 35,6 anos, com uma variação entre 18 e 68 anos, sendo a maior parte representada por pacientes jovens e sexualmente ativas. Esse dado é consoante com a literatura que mostra uma maior prevalência de infecção por HPV nesse grupo de pacientes.<sup>17</sup>

Além disso, o tempo de escolaridade das participantes variou de 0 a 19 anos, com uma média de 12,1 anos. Esse dado é relevante, uma vez que a educação formal pode influenciar o nível de conscientização e conhecimento sobre a importância do rastreamento do câncer de colo uterino. Portanto, é fundamental levar em consideração os diferentes níveis de escolaridade ao analisar os resultados e interpretar as implicações para a saúde pública.

A maioria das participantes (79,3%) não era tabagista, enquanto 12,6% declararam ser tabagistas e 8,0% eram ex-tabagistas. Esse dado difere de algumas publicações<sup>63-65</sup> que correlacionam o tabagismo à presença de lesões precursoras e neoplasia cervical, sendo inclusive o tabagismo um fator de risco estabelecido para CCU.<sup>16</sup> Essa divergência pode ser um reflexo da efetividade de programas antitabagismo na região onde foi desenvolvida a pesquisa, reduzindo a prevalência de pacientes tabagistas na amostra.

Em relação ao estado civil das participantes, 14 eram casadas, 27 viviam em união estável, 36 eram solteiras, uma viúva e nove divorciadas, ou seja, a maior parte delas não tinha parceiro fixo. Embora o estado civil em si não seja um fator de risco para o câncer de colo uterino, ele pode estar associado a outros fatores que influenciam a saúde reprodutiva e o comportamento sexual, visto que a multiplicidade de parceiros é considerada um fator de risco para CCU.<sup>16</sup>

No que se refere ao uso de preservativos, a maioria das pacientes relatou não fazer uso ou usá-los esporadicamente (85,1%). Esses dados indicam uma baixa adesão ao uso de preservativos, o que pode aumentar o risco de infecções sexualmente transmissíveis, incluindo o HPV e são consistentes com o estudo epidemiológico sobre a prevalência nacional de infecção pelo HPV no Brasil que demonstrou que a maioria dos 8.562 jovens avaliados não utilizava preservativos regularmente.<sup>66</sup>

Outro resultado relevante é o fato de que a maioria das pacientes (92,0%) negou ter sido vacinada contra o HPV. Porém, essa vacina está disponível gratuitamente no Brasil desde 2014 e o público-alvo são as meninas de 9 a 14 anos, então para que a maioria das pacientes desse estudo recebessem a vacina, elas teriam que ter feito de forma privada.

Essa baixa taxa de vacinação encontrada no estudo está em linha com a baixa cobertura vacinal no Brasil relatada no estudo realizado pela Fundação do Câncer em 2023 que revela que todas as capitais e regiões brasileiras estão com a vacinação contra o HPV abaixo da meta estabelecida pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS).<sup>67</sup>

Laz e Rahman em 2018<sup>68</sup> corroboraram com a informação, ao citarem que o Brasil apresentou uma cobertura vacinal contra o HPV relativamente baixa em comparação com outros países.<sup>68</sup> Esses achados são preocupantes, uma vez que a vacinação é uma medida importante para a prevenção do câncer cervical e das lesões precursoras. Assim, ressalta-se a necessidade de ações para aumentar a conscientização sobre a importância da vacinação contra o HPV e melhorar a cobertura vacinal entre as populações de mulheres em idade apropriada.

Outro fator extremamente relevante de ser avaliado no contexto do CCU é a infecção por HPV e o tipo de HPV que causou a infecção para a determinação de sua oncogenicidade, uma vez que o CCU é HPV induzido.<sup>6-9</sup>

Em relação aos tipos de HPV mais relacionados ao câncer de colo, tivemos como resultado que 32 pacientes (36,8%) tinham os tipos 16 e 18 presentes em suas amostras, resultado consistente com o da literatura, que relata que aproximadamente 291 milhões de mulheres no mundo são portadoras do HPV, sendo que 32% estão infectadas pelos subtipos 16,

18 ou ambos.<sup>69</sup> Ademais, vimos que 23 pacientes (26,4%) tinham a presença dos tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 em seus materiais biológicos e 32 (36,8%) apresentaram outros tipos.

Nesse trabalho foi realizada a avaliação da capacidade do AgNOR em identificar o HPV com potencial oncogênico. Com base nos resultados obtidos, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre a presença de *clusters* e AgNOR total em relação aos subtipos de HPV de alto risco oncogênico. Especificamente, as amostras das pacientes com HPV de risco apresentaram um maior número de *clusters* e total em comparação com as amostras das pacientes com HPV de baixo risco.

No entanto, pode-se observar que o resultado de AgNOR satélite não apresentou diferença estatisticamente significativa na detecção dos subtipos oncogênicos de HPV.

Esses dados são semelhantes aos encontrados por Srivastava *et al.*,<sup>70</sup> que realizaram a avaliação e seguimento de 115 pacientes por 1 ano e demonstraram que contagens de *clusters* mais elevadas foram encontradas em amostras com HPV de alto risco em comparação com HPV de baixo risco. Além disso, seus resultados também mostraram que contagens mais elevadas de AgNOR estavam associadas com a positividade do HPV e com a persistência de LSIL. Esses resultados sugerem que a contagem de *clusters* e AgNOR total pode ser uma abordagem útil como um método adjuvante para identificar subtipos de HPV de alto risco oncogênico, complementando as informações citológicas e histológicas, fornecendo *insights* adicionais sobre a presença de alterações nucleares associadas aos subtipos de HPV de risco.

O exame histopatológico é amplamente reconhecido como o padrão-ouro para a detecção e classificação das lesões precursoras de câncer cervical, como as lesões intraepiteliais cervicais.<sup>71,72</sup> Na avaliação dos resultados dos exames histológicos, foi observado que uma proporção significativa das amostras apresentava lesões precursoras do câncer de colo uterino, sendo 26,4% classificadas como NIC I, 32,2% como NIC II, 23,0% como NIC III, o que era esperado, uma vez que as pacientes foram encaminhadas para o ambulatório por apresentarem alguma alteração no citopatológico de colo uterino.

A análise da relação entre as classes histológicas e a faixa etária revelou uma diferença significativa. Pacientes com idade abaixo de 35 anos tendiam a ter suas amostras classificadas como NIC I e cervicite crônica, enquanto aquelas com idade superior a 35 anos tinham amostras classificadas como NIC II e NIC III em maior proporção. Esses resultados sugerem uma maior prevalência de lesões precursoras de alto grau entre as mulheres mais velhas, corroborando as descobertas de Landy *et al.* em 2016.<sup>73</sup>

Com o objetivo de avaliar a capacidade do AgNOR em diagnosticar as lesões precursoras de CCU, fizemos a comparação do valor da contagem de AgNOR satélites, *clusters* e AgNOR total e correlacionamos esses resultados com o resultado histológico. Com isso, encontramos que a contagem de satélites por núcleo não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as três categorias de NIC.

No entanto, em relação à contagem de *clusters* e AgNOR total encontramos que os valores foram diretamente proporcionais ao grau da lesão, tendo sido encontrados valores maiores de AgNOR nas lesões de NIC III, o que está em conformidade com o resultado encontrado por Mohanty *et al.*,<sup>74</sup> que demonstraram um aumento da quantidade de AgNOR em lesões precursoras de alto grau e em células de CCU invasivo em relação às lesões de baixo grau e às células de epitélio sem alterações.

Porém, diferença estatisticamente significativa que nos permitisse fazer uma diferenciação entre as categorias foi encontrada apenas entre as NIC I e III, não sendo possível estabelecer uma relação significativa entre número de AgNOR e NIC II. Dados que corroboram o estudo de Filippin *et al.*,<sup>43</sup> que encontraram valores extremamente mais altos de AgNOR nas lesões de alto grau, mas sem significância estatística que permitisse a diferenciação entre NIC II e III.

Isso se deve, provavelmente, ao fato da NIC II ser uma lesão de difícil identificação, e seu diagnóstico não ser consenso entre os patologistas, visto que há controvérsias se realmente é uma categoria isolada ou se seria NIC I ou III não diagnosticadas.<sup>75</sup>

Com o objetivo de avaliar o poder de discriminação do AgNOR, utilizando a biópsia como padrão ouro para a comparação, fizemos a análise da curva ROC que nos permitiu concluir que apenas o AgNOR *clusters* apresentou valores aceitáveis de sensibilidade e especificidade para o NIC III e vimos que os pontos de corte propõem uma contagem de 179,5 AgNOR *cluster* (em 100 células) para rastrear NIC III com 72% de sensibilidade e 38% de especificidade. Sugerem também que, uma contagem de 278,5 AgNOR total (em 100 células) para rastreio do NIC III com 74% de sensibilidade e 43% de especificidade. Porém, para o estabelecimento de um ponto de corte aplicável na prática clínica, mais estudos são necessários.

Diante desses resultados, sugerimos que o AgNOR não seria indicado como um teste único de rastreio, mas sim como adjuvante aos testes citológicos e histológicos nas decisões terapêuticas, como um método objetivo e acessível que por ser um marcador de proliferação celular e de oncogenicidade do HPV, auxiliaria na predição do comportamento biológico das lesões precursoras, principalmente as NIC II, uma vez que esse resultado representa um desafio clínico devido à variabilidade de comportamento dessas lesões, especialmente em mulheres



jovens, podendo tanto progredir para estágios mais avançados quanto regredir espontaneamente.

Tanto na avaliação da capacidade do AgNOR em detectar as lesões precursoras do CCU, quanto na avaliação de sua capacidade de determinar a oncogenicidade do HPV, realizamos as análises para as categorias de AgNOR *clusters*, satélites e total para avaliarmos qual desses parâmetros da contagem de AgNOR apresentariam um resultado mais satisfatório. Portanto, nesse trabalho, encontramos que as contagens de *clusters* e conseqüentemente AgNOR total, apresentam melhor correlação com a gravidade das lesões do que a contagem de satélites. Dados semelhantes aos encontrados por Lorand-Metze *et al.*,<sup>76</sup> que avaliaram o AgNOR como parâmetro da cinética celular na leucemia linfocítica crônica e perceberam que a porcentagem de células com aglomerados (*clusters*) foi o parâmetro AgNOR que melhor se correlacionou com o tempo de duplicação de linfócitos e com os valores da massa tumoral total.

Além disso, o bom desempenho da contagem de *clusters* na determinação do grau de lesão também foi evidenciado por Mohanty *et al.*,<sup>74</sup> que mostraram um aumento do número de *clusters* com o aumento do estágio das lesões precursoras de câncer cervical e foram comparados com dados citológicos e histológicos dos doentes. Assim, os *clusters* podem ser muito úteis para estabelecer o prognóstico da doença e podem desempenhar um papel crucial na discriminação de diferentes graus de LSIL e na determinação do diagnóstico de casos limítrofes.

O desempenho satisfatório do AgNOR no rastreamento do câncer de colo uterino como marcador de proliferação celular e gravidade de lesões precursoras, malignidade e de HPV de alto risco oncogênico encontrado nesse trabalho, tem sido também demonstrado em outros tipos de câncer.

Em um estudo realizado por Muenzner *et al.*,<sup>77</sup> os autores investigaram o valor prognóstico das AgNORs em pacientes com câncer colorretal. Eles observaram que uma contagem aumentada de AgNORs estava associada a um pior prognóstico e maior recorrência do câncer.

No estudo realizado por Onofre *et al.*,<sup>78</sup> propuseram a aplicação sequencial de imunocitoquímica, análise de DNA-ICM e AgNOR para estabelecer um diagnóstico citológico de mesotelioma maligno em derrames serosos, uma vez que foram encontrados valores elevados de AgNOR total em 89,3% dos mesoteliomas malignos e 96,7% dos carcinomas metastáticos.

Outra pesquisa foi conduzida por Iezzoni *et al.*,<sup>79</sup> em pacientes com câncer de mama. Nesse estudo, os pesquisadores analisaram a relação entre as AgNORs e outros parâmetros

histopatológicos do tumor. Eles descobriram que uma maior quantidade de AgNORs estava correlacionada com características agressivas do câncer de mama, como maior tamanho do tumor e presença de metástases linfonodais.

Outro estudo foi realizado por Savera *et al.*,<sup>80</sup> em que os autores investigaram a expressão de AgNORs em células de câncer de pulmão de pequenas células. Eles observaram que uma alta contagem de AgNORs estava associada a uma menor taxa de sobrevivência dos pacientes.

Portanto, a transição de células normais para malignas é marcada pelo aumento na síntese de proteínas e a quantidade de regiões organizadoras nucleolares (NORs) coradas com prata tem sido amplamente utilizada como um indicador para o diagnóstico de malignidade em várias lesões neoplásicas<sup>55,81</sup> e de acordo com os resultados desse trabalho, aventamos a hipótese que o AgNOR também poderia ser bastante útil no rastreamento do câncer de colo uterino.

## 5 CONCLUSÃO

A contagem de AgNOR demonstrou ser útil como adjuvante tanto no diagnóstico de lesões precursoras de colo uterino quanto na identificação do HPV de alto risco oncogênico, sendo um bom marcador de diferenciação celular, proliferação e de transformação maligna.

Vimos ser possível a determinação de valores de corte para o rastreio das lesões de alto grau, auxiliando em casos duvidosos da citopatologia e como adjuvante na decisão terapêutica.

Ademais, a contagem de *clusters* e AgNOR total foram mais adequadas do que a de satélites tanto para o rastreio do grau histológico da lesão precursora de CCU, quanto para a determinação do HPV de alto risco oncogênico.

## REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. [Internet]. Rio de Janeiro; 2022 [cited 2022 Mar 06]. Available from: [https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/dados\\_e\\_numeros\\_colo\\_22setembro2022.pdf](https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/dados_e_numeros_colo_22setembro2022.pdf)
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. [Internet]. Rio de Janeiro; 2022 [cited 2021 Apr 24]. Available from: [https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/diretrizesparaorastreamentodocancerdocolodoutero\\_2016\\_corrigeo.pdf](https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/diretrizesparaorastreamentodocancerdocolodoutero_2016_corrigeo.pdf)
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. [Internet]. Rio de Janeiro; 2021 [cited 2021 Apr 24]. Available from: [https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/rastreamento\\_cancer\\_colo\\_uterio.pdf](https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/rastreamento_cancer_colo_uterio.pdf)
4. World Health Organization. Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. [Internet]. Geneva; 2021 [cited 2021 May 01]. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336583/9789240014107-eng.pdf>
5. Brasil. Ministério da Saúde. Estratégia Nacional para a Prevenção e Controle do Câncer do Colo do Útero [Internet]. Brasília; 2020 [cited 2021 May 01]. Available from: [https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/estrategia\\_nacional\\_prevencao\\_controle\\_cancer\\_colo\\_uterio.pdf](https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/estrategia_nacional_prevencao_controle_cancer_colo_uterio.pdf)
6. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(1):1-17. doi: 10.1128/CMR.16.1.1-17.2003.
7. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;110(3 Suppl 2): S4-7. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.07.045.
8. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(8):550-60. doi: 10.1038/nrc2886.
9. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(5):342-50. doi: 10.1038/nrc798.

10. Launch of new IARC atlas: Using HPV tests for cervical cancer screening and managing HPV-positive women -a practical online guide [Internet]. 2021[cited 2021 May 01]. Available from: <https://screening.iarc.fr/atlasHPVdetail.php?Index=017&e=#0>
11. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110(5):525-41. doi: 10.1042/CS20050369.
12. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005;32 Suppl 1:S7-15. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.006.
13. Doenças do Trato Genital Inferior. [Internet]. Rio de Janeiro; 2016 [cited 2022 Oct 06]. Available from: <https://www.febrasgo.org.br/pt/certificacao-de-atuacao/category/2016>
14. Centers for Disease Control and Prevention: HPV Infection. [Internet]. Rio de Janeiro; 2016 [cited 2022 Oct 06]. Available from: <https://www.cdc.gov/hpv/parents/about-hpv.html>
15. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. [Internet]. Rio de Janeiro; 2016 [cited 2022 Oct 06]. Available from: <https://www.febrasgo.org.br/pt/noticias/item/120-hpv>
16. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2006;119(5):1108-24. doi: 10.1002/ijc.21953.
17. Skinner SR, Wheeler CM, Romanowski B, Castellsagué X, Lazcano-Ponce E, Del Rosario-Raymundo MR, et al. Progression of HPV infection to detectable cervical lesions or clearance in adult women: Analysis of the control arm of the VIVIANE study. *Int J Cancer*. 2016;138(10):2428-38. doi: 10.1002/ijc.29971.
18. Rositch AF, Koshiol J, Hudgens MG, Razzaghi H, Backes DM, Pimenta JM, et al. Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2013;133(6):1271-85. doi: 10.1002/ijc.27828.

19. Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginner's manual. [Internet]. France; 2003 [cited 2022 Apr 01]. Available from: <https://screening.iarc.fr/doc/Colposcopymanual.pdf>
20. Walker JL, Wang SS, Schiffman M, Solomon D; ASCUS LSIL Triage Study Group. Predicting absolute risk of CIN3 during post-colposcopic follow-up: results from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(2):341-8. doi: 10.1016/j.ajog.2006.02.047.
21. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(7):384. doi: 10.3390/medicina55070384.
22. McIndoe WA, McLean MR, Jones RW, Mullins PR. The invasive potential of carcinoma in situ of the cervix. *Obstet Gynecol*. 1984;64(4):451-8.
23. Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*. 1993;12(2):186-92.
24. Mitchell MF, Hittelman WN, Hong WK, Lotan R, Schottenfeld D. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia: an argument for intermediate endpoint biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3(7):619-26.
25. Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BK, Howell LP. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 1998;92(4 Pt 2):727-35. doi: 10.1016/s0029-7844(98)00245-2.
26. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(3):252-8. doi: 10.1093/jnci/91.3.252.
27. Koss LG. *Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. 1824 p.
28. McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Medley G, Jones RW, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2008;9(5):425-34. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70103-7.

29. Causin RL, Freitas AJA, Trovo Hidalgo Filho CM, Reis RD, Reis RM, Marques MMC. A Systematic Review of MicroRNAs Involved in Cervical Cancer Progression. *Cells*. 2021;10(3):668. doi: 10.3390/cells10030668.
30. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Report of the 1991 Bethesda Workshop. *Am J Surg Pathol*. 1992;16(9):914-6. doi: 10.1097/00000478-199209000-00011.
31. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002;287(16):2114-9. doi: 10.1001/jama.287.16.2114.
32. Bollmann R, Bollmann M, Henson DE, Bodo M. DNA cytometry confirms the utility of the Bethesda system for the classification of Papanicolaou smears. *Cancer*. 2001;93(3):222-8.
33. Luff RD. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Report of the 1991 Bethesda workshop. *Am J Clin Pathol*. 1992;98(2):152-4. doi: 10.1093/ajcp/98.2.152. PMID: 1354939.
34. Nayar R, Wilbur DC. The Pap Test and Bethesda 2014: "The reports of my demise have been greatly exaggerated. (after a quotation from Mark Twain)". *J Low Genit Tract Dis*. 2015;19(3):175-84. doi: 10.1097/LGT.0000000000000115.
35. Instituto nacional de câncer José Alencar Gomes da Silva. [Internet]. Rio de Janeiro; 2012 [cited 2022 May 01]. Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//nomenclatura-brasileira-para-laudos-citopatologicos-cervicais-2012.pdf>
36. Waxman AG, Chelmow D, Darragh TM, Lawson H, Moscicki AB. Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol*. 2012;120(6):1465-71. doi: 10.1097/aog.0b013e31827001d5.
37. Maniar KP, Sanchez B, Paintal A, Gursel DB, Nayar R. Role of the Biomarker p16 in Downgrading -IN 2 Diagnoses and Predicting Higher-grade Lesions. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(12):1708-18. doi: 10.1097/PAS.0000000000000494.

38. Bibbo M, Wilbur D. *Comprehensive Cytopathology: Expert Consult: Online and Print* 4th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2014. 976 p.
39. Nasiell K, Näslund I, Auer G. Cytomorphologic and cytochemical analysis in the differential diagnosis of cervical epithelial lesions. *Anal Quant Cytol.* 1984;6(3):196-200.
40. World Health Organization. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. [Internet]. Geneva; 2014 [cited 2021 May 02]. Available from: [https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases/human-papillomavirus-vaccines-\(HPV\)](https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases/human-papillomavirus-vaccines-(HPV))
41. Zhang J, Zhao Y, Dai Y, Dang L, Ma L, Yang C, et al. Effectiveness of High-risk Human Papillomavirus Testing for Cervical Cancer Screening in China: A Multicenter, Open-label, Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2021;7(2):263-270. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.6575.
42. de Lima SF Jr, Fernandes MC, Heráclio Sde A, de Souza PR, Maia Mde M. Prevalência dos genótipos do papilomavírus humano: comparação entre três métodos de detecção em pacientes de Pernambuco, Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2011;33(10):315-20. doi: 10.1590/s0100-72032011001000008.
43. Filippin C, Christofolletti LD, Ribeiro, MCM, Vituri CL. Determinação do número de regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR) em lesões do epitélio cervical uterino. *Rev Bras Anal Clin.* 2006;38(3):133-139.
44. Heitz E. Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb. Wiss. Bot.* 1928; 69:762-818.
45. Howell WM. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma.* 1977;62(4):361-7. doi: 10.1007/BF00327034.
46. Trerè D. AgNOR staining and quantification. *Micron.* 2000;31(2):127-31. doi: 10.1016/s0968-4328(99)00069-4.
47. Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia.* 1980;36(8):1014-5. doi: 10.1007/BF01953855.



48. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J.* 1986;18(1):5-14. doi: 10.1007/BF01676192.
49. Rüschoff J, Fauser G, Knüchel R, Hofstädter F. AgNOR quantification with special reference to staining patterns. *Zentralbl Pathol.* 1994;140(1):23-30.
50. Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron.* 2000;31(2):121-6. doi: 10.1016/s0968-4328(99)00068-2.
51. Khot KP, Kotak KJ, Bagri-Manjrekar K, Alex S, Choudhari SS. Pleomorphism of argyrophilic nucleolar organizer regions in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. *J Nat Sci Biol Med.* 2015;6(Suppl 1):S35-9. doi: 10.4103/0976-9668.166064.
52. Pardue ML, Gall JG. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science.* 1970;168(3937):1356-8. doi: 10.1126/science.168.3937.1356.
53. Derenzini M. The AgNORs. *Micron.* 2000;31(2):117-20. doi: 10.1016/s0968-4328(99)00067-0.
54. Srivastava A, Yadav V, Sharma PK, Misra S, Srivastava PK. AgNOR staining as an adjunct to histopathological examination in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(5): 905-908.
55. Khushbu BP, Chalishazar M, Kale H, Baranwal M, Modi T. Quantitative and qualitative assessment of argyrophilic nucleolar organizer regions in normal, premalignant and malignant oral lesions. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2017;21(3):360-366. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_52\_15.
56. Derenzini M, Trerè D, Pession A, Montanaro L, Sirri V, Ochs RL. Nucleolar function and size in cancer cells. *Am J Pathol.* 1998;152(5):1291-7.
57. Cejas H, Casanova M, Barbeito CG, Oliva M, Chasseing NA, Cabrini RL. Nuclear argyrophilic proteins (AgNOR) in cancer: pathological interpretation and diagnostic applications. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1999;31(2):199-208.

58. Lim SM, Duggan MA, Ruff M, Rahim S, McGregor SE, Green FH. Morphometric analysis of nucleolar organizer regions in benign and malignant peritoneal effusions using backscattered electron microscopy. *J Pathol.* 1992 Jan;166(1):53-60. doi: 10.1002/path.1711660109.
59. Pedrini CM. Análise das regiões nucleolares com prata (AgNOR) em lesões cervicais [dissertation on the Internet]. Florianópolis: Programa de Pós-Graduação em Farmácia; 2020 [cited 2021 Jun 20]. 56 p. Available from: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/216317>
60. Crocker J, Boldy DA, Egan MJ. How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. *J Pathol.* 198;158(3):185-8. doi: 10.1002/path.1711580303.
61. Rüschoff J, Barth P. Theorie und Praxis der Silberfärbung Nukleolus organisierender Regionen (AgNOR). *Pathologe.* 1992;13(1):13-9.
62. Remmerbach TW, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A. Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: report on four cases. *Anal Cell Pathol.* 2003;25(4):159-66. doi: 10.1155/2003/305151.
63. Trimble CL, Genkinger JM, Burke AE, Hoffman SC, Helzlsouer KJ, Diener-West M, et al. Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. *Obstet Gynecol.* 2005;105(1):174-81. doi: 10.1097/01.AOG.0000148268.43584.03.
64. Pedrosa ML. Perfil epidemiológico de mulheres portadoras de atipias escamosas de significado indeterminado atendidas pelo Programa de controle do câncer do colo uterino no município do Rio de Janeiro [dissertation on the Internet]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca; 2003 [cited 2022 Mar 22]. 109 p. Available from: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/4761>
65. Giuliano AR, Sedjo RL, Roe DJ, Harri R, Baldwi S, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Inserra P. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). *Cancer Causes Control.* 2002;13(9):839-46. doi: 10.1023/a:1020668232219.
66. Estudo epidemiológico sobre prevalência nacional de infecção pelo HPV [Internet]. Porto Alegre; 2020 [cited 2022 Jul 13]. Available from: <https://www.gov.br/aids/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/2020/estudo-epidemiologico-sobre-a-prevalencia-nacional-de-infeccao-pelo-papilomavirus-humano-pop-brasil-2015-2017>

67. Agência Brasil [Internet]; 2023 [cited 2023 Mar 06]. Available from: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2023-03/estudo-mostra-que-brasil-esta-abaixo-da-meta-de-vacinacao-contra-hpv>
68. Laz TH, Rahman M. Wide disparities in HPV vaccination rates across the United States: a systematic review and meta-analysis. *J Infect.* 2018; 76(3): 241-246.
69. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(7):453-9. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70158-5. PMID: 17597569.
70. Srivastava AN, Misra JS, Singh U, Khan M, Raza S. 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 Cytol.* 2019;63(5):371-378. doi: 10.1159/000498978.
71. Smith W, Jones A. Histopathological assessment of cervical intraepithelial neoplasia: interobserver variation and quality assurance. *Histopathology.* 2000;36(1):55-64.
72. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. WHO classification of tumours of female reproductive organs. 4th ed. France: World Health Organization; 2014. 316 p.
73. Landy R, Pesola F, Castañón A, Sasieni P. Impact of cervical screening on cervical cancer mortality: estimation using stage-specific results from a nested case-control study. *Br J Cancer.* 2016;115(9):1140-1146. doi: 10.1038/bjc.2016.290.
74. Mohanty G, Nayak B, Padhy AK. Diagnostic and Prognostic Significance of AgNOR Counts in Before and After Radiotherapy-Treated Cervical Carcinogenesis is Compared with Cervical Cytology and Histology. *Indian J Gynecol Oncol.* 2020; 18:47. doi: 10.1007/s40944-020-00393-9.
75. Castle PE, Stoler MH, Solomon D, Schiffman M. The relationship of community biopsy-diagnosed cervical intraepithelial neoplasia grade 2 to the quality control pathology-reviewed diagnoses: an ALTS report. *Am J Clin Pathol.* 2007;127(5):805-15. doi: 10.1309/PT3PNC1QL2F4D2VL.

76. Lorand-Metze I, Metze K. AgNOR clusters as a parameter of cell kinetics in chronic lymphocytic leukaemia. *Clin Mol Pathol*. 1996;49(6):M357-60. doi: 10.1136/mp.49.6.m357.
77. Muenzner JK, Anlauf M, Schäfer AK, Primavesi F, Perren A, Klöppel G, et al. The prognostic significance of AgNOR in colorectal cancer. *Pathol Resand Pract*. 2012;208(5):287-292.
78. Onofre FB, Onofre AS, Pomjanski N, Buckstegge B, Grote HJ, Böcking A. 9p21 Deletion in the diagnosis of malignant mesothelioma in serous effusions additional to immunocytochemistry, DNA-ICM, and AgNOR analysis. *Cancer*. 2008;114(3):204-15. doi: 10.1002/cncr.23413.
79. Iezzoni DG, Romond EH, Bryant AG, Vohra NA, McCaskill-Stevens W, Warren-Mears V, et al. AgNORs as Prognostic Indicators in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2016;16(6):485-491.
80. Savera AT, Sloman A, Huvos AG, Klimstra DS. AgNOR count in small cell lung carcinoma. *American J Clin Pathol*. 2000;113(6):844-849.
81. Ahtesham K, Jaffer R, Imran AA, Salaria SMR, Haseeb MT. Proliferation markers, - AgNORs, correlation with grade of invasive ductal carcinoma of breast. *Biomedica*, 2017;33,(2):120-123.

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Hospital Universitário**  
**Departamento de Análises Clínicas**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

A Sra. está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa “Análise Multimodal das Atipias do Colo Uterino” a ser desenvolvida na Universidade Federal de Santa Catarina sob a responsabilidade do Prof. Dr. Alexandre Sherley 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 DNA-ICM, 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, 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 Sherlley 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 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:** 4

**CAAE:** 57423616.3.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.762.408

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda com o seguinte teor: "Esta emenda tem por justificativa: Incluir a participação do professor Dr. Aldo von Wangenheim no projeto. Informar que as lâminas, coradas em Feulgen para análise da ploidia e coradas em nitrato de prata para análise do AgNOR, ambas analisadas manualmente, serão fotografadas via microscópio/câmera. As imagens das células fotografadas serão enviadas ao LAPIX/UFSC localizado no Departamento de Ciências da Computação e Estatística – INE – do Centro Tecnologia – CTC – da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, sob a responsabilidade do professor Dr. Aldo von Wangenheim. As imagens das células serão analisadas a cega e posteriormente o resultado encontrado comparado com a análise manual que foi realizada no Laboratório de Citologia Clínica da UFSC. Esclareço que não haverá alteração do projeto original em nenhuma das etapas. Os resultados que poderão ser fornecidos via automatizada, não acarretarão qualquer mudança na conduta das pacientes. Servirá unicamente para validar o método de forma automatizada na tentativa de obter resultados mais rápidos e preferencialmente reprodutíveis."

Portanto nesta emenda está em análise a inclusão de um pesquisador e a análise da lâminas por mais uma metodologia (digital) para verificar se é possível emitir laudos a partir dessa análise automatizada.

**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)3721-8094

**E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.762.408

**Objetivo da Pesquisa:**

Já avaliados.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Já avaliados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Não se aplica.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foi incluída nova autorização institucional do HU/UFSC/EBSERH.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O CEP/SH tomou conhecimento da emenda e recomenda sua aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1472243_É2.pdf	02/12/2019 07:41:56		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoGerenteHU.pdf	02/12/2019 07:41:21	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoAldo.pdf	14/11/2019 11:06:15	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	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	TCLE.pdf	28/06/2016 14:58:51	Alexandre Sherley Casimiro Onofre	Aceito

**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: 3.762.408

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, 11 de Dezembro de 2019

---

**Assinado por:**  
**Maria Luiza Bazzo**  
**(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