

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

ADEMIR BARIANNI RODERO

O USO DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA, EM  $\lambda$  488 nm,  
PARA DIFERENCIAÇÃO DIAGNÓSTICA EM BIÓPSIAS DE COLO DE  
ÚTERO DE PACIENTES COM COLPOCITOLOGIA ATÍPICA

São José dos Campos  
2006

Ademir Barianni Rodero

O USO DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA, EM  $\lambda$  488 nm,  
PARA DIFERENCIAÇÃO DIAGNÓSTICA EM BIÓPSIAS DE COLO DE  
ÚTERO DE PACIENTES COM COLPOCITOLOGIA ATÍPICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Junior.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

São José dos Campos  
2006

R594u

Rodero, Ademir Barianni

O uso da espectroscopia de fluorescência, em  $\lambda$  488nm, para diferenciação diagnóstica em biópsias de colo de útero de pacientes com colpocitologia atípica / Ademir Barianni Rodero, São José dos Campos, 2006.

1 disco laser, color.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Espectroscopia de Fluorescência 2. Colposcopia 3. Colo do Útero 4. Neoplasias. I. Silveira Junior, Landulfo Orient. II Pacheco, Marcos Tadeu Tavares, Orient. III. Título.

CDU: 616.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

  
Aluno: Ademir Barianni Rodero

Data: \_\_\_\_\_

08/12/2006.

**“O USO DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA, EM  $\lambda$  488nm, PARA  
DIFERENCIAÇÃO DIAGNÓSTICA EM BIÓPSIAS DE COLO DE ÚTERO DE PACIENTES  
COM COLPOCITOLOGIA ATÍPICA”**


Ademir Barianni Rodero

Banca Examinadora:

Prof. Dr. **MARCOS TADEU TAVARES PACHECO** (UNIVAP) 

Prof. Dr. **LANDULFO SILVEIRA JUNIOR** (UNIVAP)

Prof. Dr. **CÍCERO MENEGUETTE** (UNICASTELO) 

  
Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco  
Diretor do IP&D – UniVap

## Dedicatória

*Dedico este trabalho a Deus, força superior, grande arquiteto do Universo, sempre presente nos momentos de necessárias reflexões para compreensão dessa nova etapa que a vida me ofereceu, frente a novos caminhos, novos conhecimentos. Agradecendo pela oportunidade de traçar novas tarefas para um melhor aperfeiçoamento no meu desempenho profissional.*

*A minha esposa Maria Aparecida Roder, companheira, amiga e conselheira, que com sua força espiritual me fez acreditar que tudo seria possível nos momentos de desânimo, desenvolvendo a paciência necessária para as ausências que ocorreram em momentos tão importantes de nossas vidas.*

*A meus filhos David Augusto e Lucas, a minha contribuição para a formação de suas carreiras e o agradecimento das horas que tive que ocupar para algumas dúvidas da pesquisa. Com certeza vocês serão a continuidade da minha luz e dedicação profissional.*

*A meus pais, que com toda dedicação e trabalho me deram a oportunidade de uma formação profissional e que hoje tem continuidade com esse novo trabalho. Mesmo que em alguns momentos ficaram em segundo plano, e souberam entender esse momento impar da minha vida*

*Ao Professor Doutor Landulfo Silveira Júnior,  
que com paciência, orientação me fez  
acreditar que tudo seria possível, através de  
sua determinação, tornando-se um grande  
amigo e parceiro para a concretização desse  
trabalho.*

*Às pacientes, que com sua concordância em  
participar dessa pesquisa, abriram  
perspectivas para que novas tecnologias,  
sejam desenvolvidas e estejam disponíveis  
para benefício da ciência.*

## **Agradecimentos**

*A Universidade Camilo Castelo Branco que viabilizou condições, para que esse mestrado fosse possível.*

*A Profa. Dra. Ilda Estefani R. Marta, que se tornou uma incansável revisora, parceira e amiga.*

*A Diretoria Municipal de Saúde, na sua compreensão pelos momentos de ausência.*

*A Bibliotecária Rúbia de Carvalho Gravito Gomes, que com sua sensibilidade e amizade foi pessoa fundamental nesses meses de pesquisa e aperfeiçoamento.*

*Ao professor e amigo Roberto Racanicchi, que soube me ajudar a decifrar o enigma do complexo campo da Informática e Estatística.*

# O USO DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA, EM 488 nm, PARA DIFERENCIAÇÃO DIAGNÓSTICA EM BIÓPSIAS DE COLO DE ÚTERO DE PACIENTES COM COLPOCITOLOGIA ATÍPICA

## RESUMO

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica que vem se mostrando promissora na diferenciação de tecido epitelial normal de pré-neoplásico/neoplásico em colo de útero. Esta pesquisa teve como objetivo estabelecer critérios de diferenciação diagnóstica por espectroscopia de fluorescência em Cervicite Crônica (CC), Lesão Intra-Epitelial Escamosa de Alto Grau (HGSIL) e Lesão Intra-Epitelial Escamosa de Baixo Grau (LGSIL), em material de biópsia de colo de útero, de pacientes com atipias (ASC-US e ASC-H) e lesões (LGSIL e HGSIL), rastreadas na colpocitologia oncótica, em comprimento de onda de excitação de 488nm. Foram realizadas 97 biópsias de 32 pacientes com colpocitologia oncóticas atípicas. As biópsias foram orientadas por colposcopia sem a realização do teste de Schiller e impregnação com ácido acético; e realizadas na Junção Escamo-Colunar (JEC). No fragmento de cada biópsia foi realizada a coleta dos espectros em dois pontos aleatórios. Através de um cabo de fibras ópticas acoplado ao laser de argônio, foram coletados os espectros de emissão fluorescente das peças de biópsias e direcionados, via cabo de fibras, para um espectrógrafo e uma câmera CCD, onde foram convertidos em sinal elétrico, lidos por um programa, calibrados e armazenados. Os espectros foram então separados em três grupos (CC, LGSIL HGSIL), baseados no diagnóstico histopatológico. Na análise dos espectros médios de CC, LGSIL HGSIL detectou-se perfis semelhantes para os CC e LGSIL, e diferenças significativas para o HGSIL. Como forma de separação dos espectros, utilizou-se o valor da razão entre as intensidades em 500 e 600nm, onde foi possível detectar a diferenciação do HGSIL, com relação ao grupo CC e LGSIL, separadas por uma linha de diagnóstico empírica. Foi possível, a partir dos valores de razão das intensidades, determinar a diferenciação dos espectros de HGSIL em relação a CC e de HGSIL em relação a LGSIL, com sensibilidade de 82%. A espectroscopia de fluorescência induzida por laser, em comprimento de onda 488nm, pode ser utilizada na diferenciação de lesão intra-epitelial de alto grau de lesão intra-epitelial de baixo grau e cervicite crônica, podendo auxiliar em um diagnóstico precoce e menos invasivo.

**Palavras-chave:** Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser; Colposcopia; Colo do Útero; Cervicite; Lesão Intra-Epitelial



USE OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY AT 488NM FOR DIAGNOSTIC  
DIFFERENTIATION IN  
UTERI'S CERVIX BIOPSIES OF PATIENTS WITH CERVICAL/VAGINAL  
ATYPICAL CYTOLOGY

**ABSTRACT**

Fluorescence spectroscopy is a technique that could become promising in the differentiation of normal epithelial of preneoplastic/neoplastic tissues in cervix uteri. This work goals to establish approaches of differentiation diagnosis for fluorescence spectroscopy in crhonic inflammation (CC), high-grade intraepithelial squamous lesions (HGSIL) and low-grade Intraepithelial squamous lesions (LGSIL), in biopsy tissues of cervix of uterus, of patients with atipias (ASC-US and ASC-H) and lesions (LGSIL and HGSIL), traced in the cervical/vaginal cytologic in excitation wavelength of 488nm. Ninety seven biopsies from 32 patients were accomplished with cervical/vaginal cytologic atypical. The biopsies were guided by colposcopy without the accomplishment of the Schiller test and impregnation with acetic acid; and accomplished in the squamous-columnar junction (SCJ). In the fragment of each biopsy the collection of the spectra was accomplished in two aleatory spots. By means of na optical fiber cable coupled to the argon laser, the fluorescence emission spectra of biopsies were collected and addressed, through the optical cable, to a spectrofluorimeter and a CCD camera. Spectra were converted to electric signal, read by a program, gauged and stored. All spectra were then separated in three groups, based on the diagnosis cytopathologic. In the analysis of the medium spectra of CC, LGSIL and HGSIL it was detected similar profiles for CC and LGSIL, and significant differences for HGSIL. As a method to separate the spectra, the ratio among the intensities in 500 and 600nm were calculated for three groups in which it was possible to detect differences of HGSIL tissue in comparison to the CC and LGSIL tissues, separated by an empiric diagnosis line. It was possible, starting from the values of intensity ratio of the spectra, to determine the differentiation of HGSIL from CC and LGSIL, with sensitivity of about 82%. Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy (LIFS), in wavelength of 488nm can be used to differentiate high-grade intraepithelial squamous lesions from the low-grade intraepithelial squamous lesions and of chronic inflammation, and could become a precocious and less invasive diagnosis of cervix lesions.

**Keywords:** Laser Induced Fluorescence Spectroscopy, Colposcopy; Cervix Uteri; Cervicitis; Intraepithelial Lesions

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Células basais do epitélio pavimentoso ancoradas por hemidesmossomos e desmossomos às membranas basais e células adjacentes respectivamente. ....	23
Figura 2 - Células parabasais de esfregaço cérvico-vaginal. ....	24
Figura 3 - Células intermediárias de esfregaço cérvico-vaginal. ....	25
Figura 4 - Células superficiais em esfregaço cérvico-vaginal. ....	26
Figura 5 - Desenho esquemático do desenvolvimento da zona de transformação do colo do útero. ....	27
Figura 6 - Desenho esquemático: células de reserva da zona de transformação são contínuas com as células basais da ectocévice (a direita) e podem sofrer diferenciação colunar e escamosa(metaplasia). ....	28
Figura 7 - Células escamosas reativas associadas a inflamação. ....	35
Figura 8 - Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US). ....	35
Figura 9 - Células escamosas atípicas, não sendo possível excluir HGSIL (ASC-H). ....	36
Figura 10 - Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LGSIL). ....	37
Figura 11 - Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HGSIL). ....	38
Figura 12 - Material e instrumental utilizados para coleta das biópsias. ....	51
Figura 13 - A. Sala de realização dos exames e coleta das biópsias, B.colposcópico, C. tambor de nitrogênio líquido para armazenamento e transporte. ....	52
Figura 14 - Diagrama esquemático do espectrofluorímetro com utilização de laser de Argônio (488 nm) para coleta de espectros de fluorescência de biópsias de colo de útero. ....	54
Figura 15- Fotomicrografia de biópsia de colo de útero, em corte transversal. C - epitélio cervical; M - membrana basal; E- matriz extra celular (estroma). Diagnóstico Histopatológico de Cervicite Crônica Inespecífica (100x). ....	58
Figura 16 - Fotomicrografia de biópsia de colo de útero, em corte transversal. C - epitélio cervical; M - membrana basal; E- matriz extra celular (estroma), Diagnóstico Histopatológico de Cervicite Crônica Inespecífica (400x). ....	59
Figura 17 - Fotomicrografia de biópsia de colo de útero, em corte transversal. C- epitélio cervical; M - membrana basal; E - matriz extracelular (estroma). Diagnóstico Histopatológico de Lesão Intra-epitelial de Baixo Grau (NIC I) - (100x). ....	60
Figura 18 - Fotomicrografia de biópsia de colo de útero, em corte transversal. Diagnóstico Histopatológico: Lesão Intra epitelial de Baixo Grau (NIC I) - (400x). ....	61
Figura 19 - Fotomicrografia de biópsia de colo de útero, em corte transversal. C- epitélio cervical; M - membrana basal; E - matriz extracelular (estroma). Diagnóstico Histopatológico: Lesão Intra-epitelial de Alto Grau (NIC III) - (200x). ....	61
Figura 20 - Fotomicrografia de biópsia de colo de útero corte transversal. C- epitélio cervical; M - membrana basal; E - matriz extracelular (estroma). Diagnóstico Histopatológico: Lesão Intra-epitelila de Alto Grau (NIC III) - (400x). ....	62

Figura 21 - Espectro médio da autofluorescência de biópsia de colo de útero com excitação de 488nm obtidos de CC, LGSIL e HGSIL. ....	64
Figura 22 - Razões entre as intensidades dos espectros médios entre comprimento de onda de 500 e 600nm. ....	65
Figura 23 - Média das razões entre as intensidades dos espectros médios entre comprimento de onda de 500 e 600nm. A linha de diagnóstico (tracejada) foi empiricamente determinada em 4,5, separando os espectros médios de CC e LGSIL do espectro médio de HGSIL .....	66
Figura 24 - Médias das razões de CC, LGSIL e HGSIL com seus respectivos desvios padrões. ....	67
Figura 25 - Gráfico da média das razões das intensidades dos espectros de CC e LGSIL e razão dos espectros HGSIL nos comprimentos de onda 500 e 600nm. A linha de diagnóstico (vide Figura 23) separa os espectros médios de CC e LGSIL das razões dos espectros de HGSIL .....	68
Figura 26 - Razões entre as intensidades dos espectros nos comprimentos de onda de 500 e 600nm. A linha de diagnóstico separa as razões dos espectros médios de CC e LGSIL em falso positivo e verdadeiro negativo, e de HGSIL em verdadeiro positivo e falso negativo .....	69.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Alterações obtidas na colpocitologia oncótica e resultados histopatológicos. ....	57
Tabela 2 - Diagnóstico histopatológico das biópsias.....	58

## LISTA DE SIGLAS

HPV - Papilomavirus humano

ASC-US - Células escamosas atípicas de significado indeterminado

ASC-H - Células escamosas atípicas, não é possível excluir uma HGSIL

LGSIL - Lesão Intra-epitelial Escamosa de Baixo Grau

HGSIL - Lesão Intra-epitelial Escamosa de Alto Grau

NILM - Negativo para Lesão Intra-epitelial e Malignidade

CIS - Carcinoma *In situ*

CA - Carcinoma Invasivo

TBS - Sistema Bethesda

ASC - Células Escamosas Atípicas

SIL - Lesão Intra-epitelial Escamosa

EFIL - Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser

JEC - Junção Escamo-colunar

NIC - Neoplasia Intra-epitelial Cervical

ALTS - Estudo de Triagem - ASCUS/LSIL

CC - Cervicite Crônica

NAD(P)H - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (Fosfato) - Forma reduzida

NAD - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - oxidado

FADH<sub>2</sub> - Flavina Adenina Dinucleotídeo - Forma Reduzida

FAD - Flavina Adenina Dinucleotídeo - oxidada

EEM - Matrix de Multi-Excitação

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>21</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>22</b>
<b>2.1 ANATOMIA E HISTOLOGIA DO COLO DO ÚTERO (CÉRVICE)</b>	<b>22</b>
<b>2.2 COLPOCITOLOGIA ONCÓTICA</b>	<b>29</b>
2.2.1 Sistema papanicolaou	30
2.2.2 Sistema Bethesda	31
<b>2.3 COLPOSCOPIA</b>	<b>39</b>
<b>2.4 BIÓPSIA</b>	<b>40</b>
<b>2.5 CORRELAÇÃO COLPOCITOLOGIA E HISTOPATOLÓGICO</b>	<b>40</b>
<b>2.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORÊSCENCIA</b>	<b>43</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>47</b>
<b>3 OBJETIVO</b>	<b>48</b>
<b>MATÉRIAL E MÉTODOS</b>	<b>49</b>
<b>4.1 AMOSTRAS</b>	<b>50</b>
<b>4.2 PROCEDIMENTOS PARA COLETA DOS DADOS</b>	<b>50</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>56</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>57</b>
<b>5.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA</b>	<b>58</b>
<b>5.2 ANÁLISE ESPECTRAL DOS FRAGMENTOS DE BIÓPSIA</b>	<b>62</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>70</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>71</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>76</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>78</b>

<b>APÊNDICES</b>	<b>85</b>
<b>APENDICE A - COMPARAÇÃO ENTRE SISTEMA BETHESDA, PAPANICOLAOU, SISTEMA NIC E DISPLASIA</b>	<b>85</b>
<b>APENDICE B - CONDUTAS CLÍNICAS APÓS O EXAME</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO B - TERMO DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO C – CADIP</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>90</b>

## **INTRODUÇÃO**



## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundial. É a segunda causa principal de mortes em países desenvolvidos e está entre as três causas principais de mortes para adultos em países em desenvolvimento. A mortalidade por câncer é maior que a da Aids, tuberculose e malária reunidas (UNION INTERNACIONALE LE CANCER, 2006).

A incidência mundial de câncer vem aumentando significativamente nos últimos anos. A Organização Mundial de Saúde estima que, se não houver uma nova estratégia de ação, 7.6 milhões de pessoas morrerão de câncer em 2005 e 84 milhões de pessoas morrerão nos próximos 10 anos. Sabe-se ainda que 70% de todas as mortes por câncer acontecem em países de baixa e média renda, onde os recursos não existem ou estão limitados para prevenção, diagnose e tratamento de câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

As estatísticas nos EUA demonstram que o câncer é a segunda maior causa de mortes, sendo precedido apenas pelas doenças circulatórias (NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS, 2006).

Estimativas predizem que, em 2006, nos EUA, serão diagnosticados aproximadamente 9700 casos de câncer de colo de útero e ocorrerão aproximadamente 3700 óbitos por este tipo de câncer (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2006).

No Brasil, em 2006, são esperados mais de 472 mil novos casos de câncer, sendo aproximadamente 234 mil para o sexo masculino e 237 mil para o sexo feminino. Estima-se que o câncer de colo do útero seja a terceira neoplasia maligna mais comum no sexo feminino, com 19 mil novos casos, sendo superado apenas pelo câncer de pele (não-melanoma) e pelo câncer de mama. Estima-se ainda que o câncer de colo de útero seja a quarta causa de morte por câncer em mulheres (BRASIL, 2006).

Não obstante as estimativas assustadoras, dentre todas as neoplasias, o câncer de colo de útero é o que apresenta um dos mais altos potenciais de prevenção e cura, chegando próximo de 100% quando diagnosticado precocemente (BRASIL, 2006).

O pico de incidência do câncer de colo de útero situa-se entre 40 a 60 anos de idade, no entanto, a idade de incidência vem diminuindo em razão do aumento do Papiloma Vírus Humano (HPV), particularmente em jovens abaixo de 20 anos (DERCHAIN et al.,1991).

Dentre os fatores de risco para o aumento da incidência de câncer de colo de útero em mulheres jovens encontram-se a multiplicidade de parceiros, doenças sexualmente transmissíveis em geral, tabagismo (diretamente relacionados à quantidade de cigarros fumados), má higiene íntima, uso prolongado de contraceptivos orais, precocidade na atividade sexual, primiparidade na adolescência e a infecção pelo Papilomavírus Humano. Este último fator é considerado o mais importante (TRINDADE, 2000).

O câncer de colo de útero tem sua etiologia comprovadamente ligada ao Papiloma Vírus Humano em aproximadamente 90% dos casos. Atualmente já são conhecidos aproximadamente 100 tipos de HPV, destes, em torno de 20 agem no trato genital (LORINEZ et al., 1992).

De acordo com estes autores os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 e 58 determinam 90% dos casos de Lesão Intra-Epitelial Escamosa de Alto Grau (HGSIL) e câncer. O HPV tipo 18 é mais específico para tumores invasivos (LORINEZ et al., 1992).

A principal estratégia utilizada para detecção precoce do câncer de colo de útero no Brasil é o rastreamento, que significa realizar o exame de colpocitologia oncótica (Papanicolaou) em mulheres sem sintomas da doença. O objetivo é identificar aquelas que possam apresentar a doença em fase muito inicial, quando o tratamento pode ser bastante eficaz (BRASIL,2006).

Faz-se necessária, no entanto, infra-estrutura complexa e muito bem organizada para se obter resultados satisfatórios, dentre elas, unidades de saúde, profissionais bem treinados para coletar e preparar o material de forma adequada, laboratórios para corar as lâminas e profissionais especializados para lê-las e emitir laudos e, finalmente, médicos treinados para lidar com as anormalidades detectadas (MILLER et al., 2000).

O exame de colpocitologia oncótica é dirigido a mulheres de 25 a 59 anos, que devem submeter-se ao exame periodicamente, recomendando-se inicialmente um exame por ano. No caso de dois exames normais seguidos, com intervalo de 1 ano entre eles, o exame poderá ser realizado a cada 3 anos (BRASIL, 2005).

O protocolo atual do Ministério da Saúde preconiza que, em resultados de colpocitologia oncótica que evidenciem alterações escamosas de significado indeterminado (ASC-US), seja repetido o exame após seis meses (BRASIL, 2006).

No âmbito da saúde coletiva não é realizada a diferenciação diagnóstica das Atipias de Células Escamosas (ASC). Esta diferenciação pode ser realizada a partir de colposcopia e/ou biópsia do colo do útero (PEREYRA et al., 1995).

A colposcopia é uma técnica pouco invasiva que, a partir da aplicação de soluções químicas no colo do útero e vagina, permite uma melhor visualização das alterações de células escamosas e a diferenciação entre lesões pré-neoplásicas/neoplásicas. Esta técnica permite ainda a escolha do local mais adequado para realização de biópsia do colo uterino.

Observou-se que, entre pacientes jovens, abaixo de 20 anos encaminhados para colposcopia em decorrências de alterações citológicas, de 6 a 22% apresentaram lesões até carcinoma *in situ* (ZANINETTI et al., 1986). Diante desta realidade, faz-se necessário que a colposcopia seja realizada mais precocemente, ou seja, a partir da primeira relação sexual até cerca de 65 anos.

Não existe consenso da idade limite para a colpocitologia, no entanto, é aceito que, mesmo em idade avançada, o rastreamento reduz a mortalidade. Esta afirmação pode ser fundamentada no fato de que 40% dos óbitos por câncer de colo de útero ocorrem em mulheres com idade acima de 65 anos e 55% nas com idade acima de 55 anos (FAHS et al., 1992).

A biópsia, embora seja técnica pouca invasiva, requer a retirada de um fragmento do colo do útero, que, posteriormente deverá ser enviado a um serviço de patologia para análise; demanda, portanto, um certo tempo e um custo financeiro, com materiais e profissionais envolvidos (PEREYRA et al., 1995).

Uma outra técnica com potencial para, futuramente, ser incluída nos métodos diagnósticos em saúde coletiva é a Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (EFIL). Pesquisas têm demonstrado que a EFIL é eficaz na diferenciação das alterações intra-epiteliais escamosas do colo do útero (AGRAWAL et al., 1999, NORDSTRON et al., 2001; WEINGANDT et al., 2002; RIVOIRE et al., 2004).

O principal interesse em realizar essa pesquisa deve-se ao fato de que as alterações ASC (ASC-US e ASC-H) e SIL (LGSIL, HGSIL), constituem um problema na prática ginecológica, pela inexistência de consenso sobre a conduta mais adequada diante das mulheres com esse diagnóstico citológico, pois nessas alterações citológicas já podem estar presentes alterações mais graves, sendo tratadas como lesões de menor gravidade ou como alterações inflamatórias (reativas). Com diagnóstico adequado, a partir da EFIL, pode-se contribuir com práticas mais conservadoras e menos invasivas, realizando apenas seguimento citológico.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

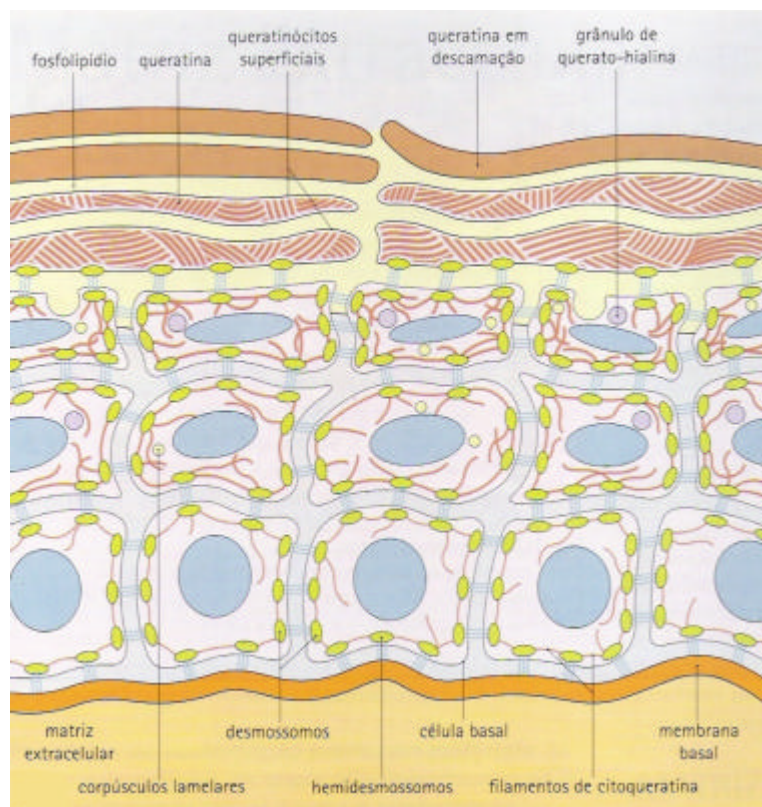
### **2.1 ANATOMIA E HISTOLOGIA DO COLO DO ÚTERO (CÉRVICE)**

A Colpocitologia, Colposcopia e Biópsia são realizadas no colo do útero, que juntamente com vagina e vulva, são parte integrante do órgão genital externo.

Do ponto de vista histológico, o canal endocervical é revestido de epitélio colunar, sendo que ao nível da junção escamo-colunar (JEC); penetrando no canal cervical encontra-se o epitélio cilíndrico, ciliado e mucíparo, que recobre a superfície externa e interna das estruturas glandulares encontradas na mucosa cervical. As células que descamam deste epitélio são chamadas de células glandulares cervicais; sua presença no esfregaço citológico, juntamente com as células escamosas superficiais, intermediárias e parabasais, constituem achado fundamental para definir que a colheita foi adequada para colpocitologia oncótica (HORTA, 2001).

A ectocérvice e canal vaginal é revestido por epitélio escamoso, as células que descamam deste epitélio são classificadas em basais, parabasais, intermediárias e superficiais, sendo essa a seqüência da maturação fisiológica da mucosa vaginal e ectocervical (GOMPEL; KOSS, 1997).

O epitélio mantém a sua integridade através da adesão das células entre si e à matriz extracelular, graças às proteínas da membrana celular, que atuam como moléculas de adesão em áreas especializadas da membrana que fazem parte das junções celulares. As junções são estruturas especializadas que unem as células, formando uma unidade funcional. Existem três tipos de junções: 1 - junções de oclusão, cuja função é unir as células e mantendo sua integridade para que a célula atue como barreira, 2 - junção de ancoragem que ligam o citoesqueleto das células entre si e 3 - junções de comunicação, que permitem uma comunicação direto célula a célula (STEVENS; LOWE, 2001).



**Figura 1 - Células basais do epitélio pavimentoso ancoradas por hemidesmossomos e desmossomos às membranas basais e células adjacentes respectivamente.**  
 Fonte: Stevens e Lowe (2001).

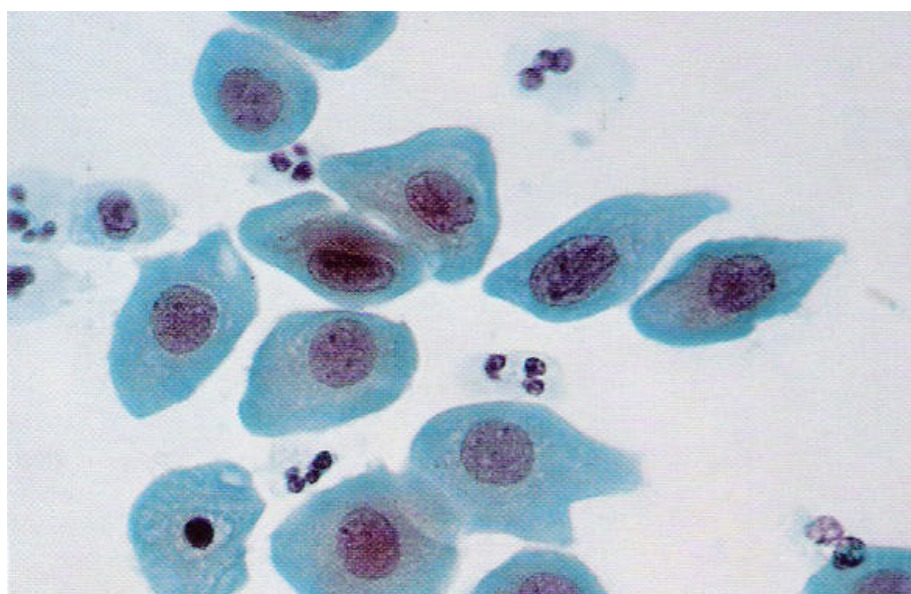
A membrana basal é composta por lâminas especializadas da matriz extracelular, localizadas entre as células parenquimais e os tecidos de sustentação (matriz extracelular). A matriz extracelular é composta principalmente de proteína fibrosa e glicosaminoglicanas, sendo que estas determinam a difusão de substâncias através da matriz extracelular. As proteínas fibrosas determinam as propriedades tensivas dos tecidos de sustentação, e são compostas de fibrilina, elastina e fibronectina e colágeno. Os colágenos são uma grande família de proteínas e é o componente mais importante da matriz extracelular (STEVENS; LOWE, 2001).

O epitélio escamoso do colo do útero é constituído de várias células, basal, parabasal, intermediária e superficial.

A célula basal é a célula germinativa, responsável pelo processo de divisão celular e substituição das células superficiais mortas que descamam. Esta célula basal é pequena, seu citoplasma é compacto, basófilo, de forma oval ou redonda, núcleo volumoso, com cromatina regular (HORTA, 2001).

As células basais, compostas de uma fileira única, localizadas na camada mais profunda do epitélio escamoso, raramente são encontradas na colpocitologia oncótica. Para sua presença neste exame, é necessária uma raspagem total da mucosa do colo uterino (GOMPEL; KOSS, 1997).

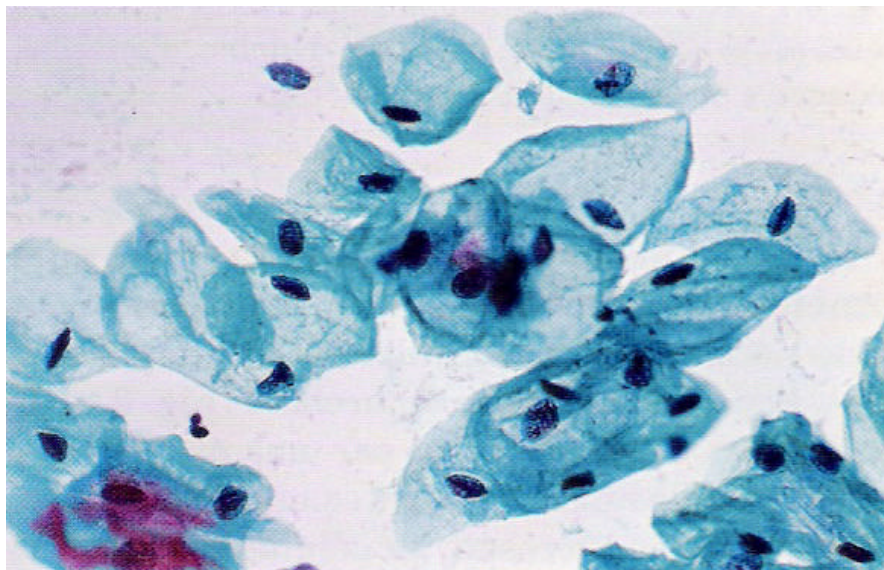
As células parabasais são semelhantes às célula basais, formando duas ou quatro fileiras de células imaturas, que possuem figuras de mitose normais, no entanto, apresentam núcleo menor e citoplasma maior (HORTA, 2001).



**Figura 2 - Células parabasais de esfregaço cérvico-vaginal.**  
Fonte: Gompel e Koss (1997).

As células intermediárias incluem quatro a seis fileiras, são poligonais com núcleo redondo ou oval, cromatina regular, vesiculosa. O citoplasma é denso, volumoso, podendo se corar de forma basófila ou eosinófila. A variante da célula intermediária é a chamada de célula navicular, com a periferia do citoplasma cianófilo e intensamente corado, núcleos tomam a forma semelhante ao contorno citoplasmático (HORTA, 2001).





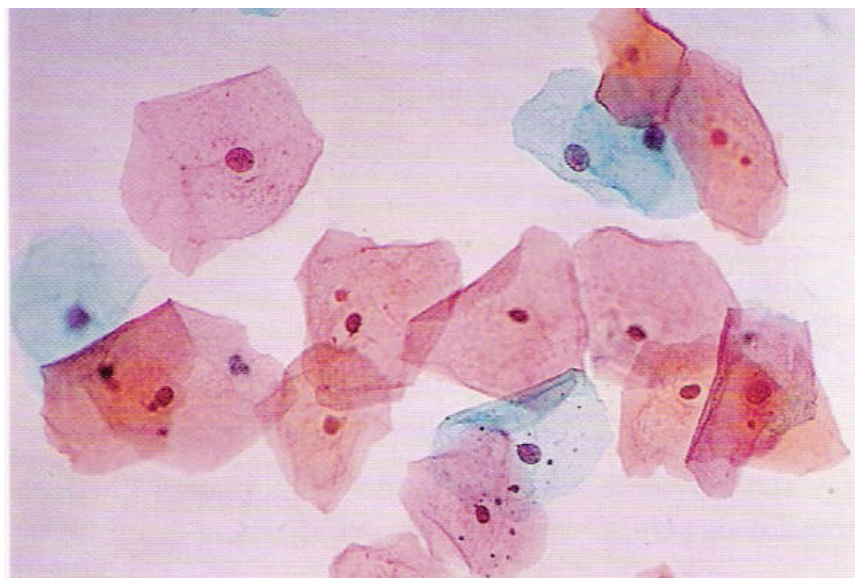
**Figura 3 - Células intermediárias de esfregaço cérvico-vaginal.**  
Fonte: Gompel e Koss (1997).

As células superficiais possuem cinco a oito fileiras, têm núcleo picnótico, ou seja pequeno, hipercromácrito, regular em seu contorno, textura homogênea definindo padrão “tinta nanquim”. O citoplasma é amplo, cheio de glicogênio, aplainado, eosinofílico, podendo ser cianofílico em célula superficiais das camadas mais inferiores (HORTA, 2001).

As células superficiais formam a base para o exame de colpocitologia, pois são estas, as células, que se destacam da superfície (esfoliação) (HORTA, 2001).

Como dito anteriormente, o esfregaço citológico contendo apenas células epiteliais escamosas é indicativo de material pouco adequado para diagnóstico de neoplasias cervicais, conforme o Sistema Bethesda (HORTA, 2001).

O ponto em que o epitélio colunar e o escamoso se encontram, no colo uterino, é denominado de junção escamo colunar (JEC).

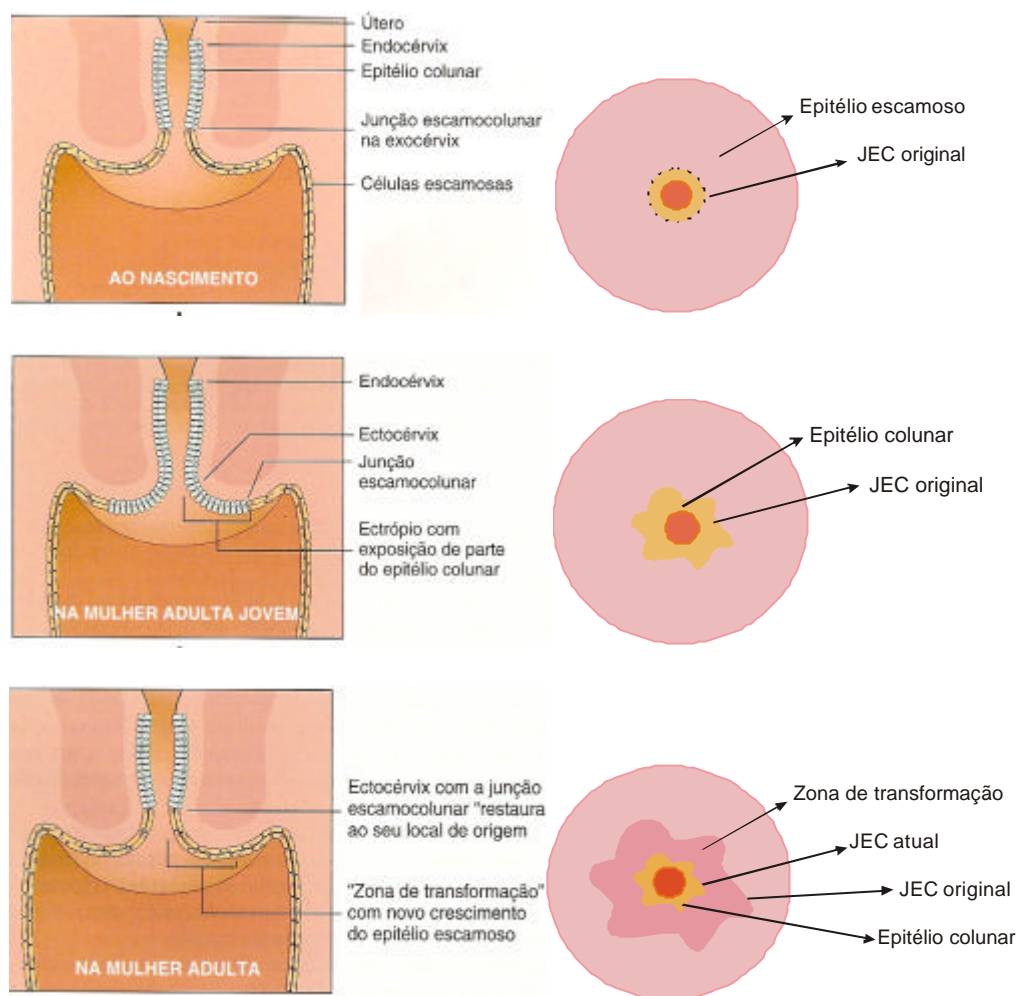


**Figura 4 - Células superficiais em esfregaço cérvico-vaginal.**

Fonte: Gompel e Koss (1997).

A JEC é um ponto dinâmico que se altera em resposta à puberdade, à gravidez, à menopausa e à estimulação hormonal. Em recém-nascidas, a JEC está localizada na exocérvice; no período da menarca esta localizada na ectocérvice, mas com a produção de estrogênio faz com que o epitélio vaginal se encha de glicogênio. Os lactobacilos acidófilos atuam sobre o glicogênio com reflexos para pH ideal, estimulando as células de reserva sub-colunares a sofrerem metaplasia. Esta avança internamente da JEC original, em direção ao óstio externo e sobre as vilosidades colunares. Este processo estabelece uma área denominada de zona de transformação, que se estende da JEC original até a JEC fisiologicamente ativa; à medida que o epitélio metaplásico na zona de transformação amadurece, começa a produzir glicogênio e finalmente se assemelha ao epitélio escamoso original, na colposcopia e na histologia, conforme representado na Figura 4 (HATCH; HACKEL, 1998; ROBINS, COTRAN, 2005).

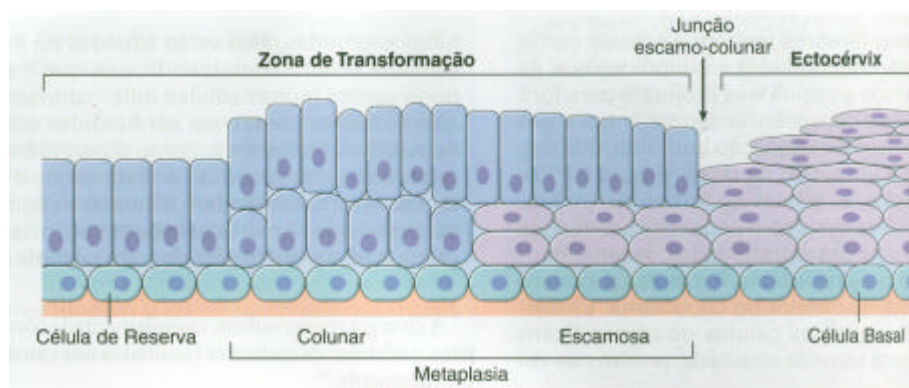
Uma pesquisa realizada por Weingandt et al. (2002), mostra que a zona de transformação é onde se localizam 94% das lesões displásicas, confirmadas através da biópsia.



**Figura 5 - Desenho esquemático do desenvolvimento da zona de transformação do colo do útero.**

Fonte: Kumar, Abbas e Fausto (2005)

A Figura 6 a seguir, extraída de Crum (p.1120, 2005), ilustra as células de reserva da zona de transformação sofrendo diferenciação colunar e escamosa.



**Figura 6 - Desenho esquemático: células de reserva da zona de transformação são contínuas com as células basais da ectocérvix (a direita) e podem sofrer diferenciação colunar e escamosa (metaplasia).**

Fonte: Kumar, Abbas e Fausto (2005)

Acredita-se que a Lesão Intra-Epitelial Escamosa (SIL) origina-se, na maioria dos casos, como um único foco na zona de transformação na JEC e avança sobre o epitélio. O lábio anterior do colo do útero é duas vezes mais propenso a desenvolver SIL que o lábio posterior, estas lesões raramente originam-se nos ângulos laterais. Em nível proximal, a SIL envolve as criptas cervicais, esta área tende a possuir lesões mais graves (HATCH; HACKEL, 1998).

Após o epitélio metaplásico amadurecer e formar glicogênio passa a ser denominado de “zona de transformação cicatrizada”, esta área é geralmente resistente a fatores oncogênicos. Antes do amadurecimento toda célula metaplásica é mais susceptível a fatores oncogênicos que podem transformar essas células em lesão intra-epitelial do colo. Os principais fatores oncogênicos são introduzidos através do ato sexual, dentre eles, espermatozoides, histomas do líquido seminal, trichomonas, clamídyas, vírus herpes simples e HPV. Sabe-se hoje que este último agente desempenha papel fundamental no desenvolvimento de SIL (HATCH; HACKER, 1998).

## 2.2 COLPOCITOLOGIA ONCÓTICA

A Colpocitologia oncótica, é o exame realizado para rastreamento do câncer de colo do útero, podendo ser utilizado o sistema Papanicolaou ou Bethesda. Na saúde coletiva brasileira utiliza-se, atualmente, classificações pertinentes aos dois sistemas. Sendo o câncer de colo de útero relativamente freqüente, a realização deste exame, efetivo e de baixo custo, é recomendada, em especial para mulheres sexualmente ativas (HORTA, 2001).

O exame consiste basicamente na coleta de material do óstio do colo uterino com uma espátula especial tipo “Ayre” e do canal endocervical com uma escova; esse material é fixado em lâmina e analisado posteriormente por patologista ao microscópio (HORTA, 2001).

A American Cancer Society recomenda que a realização da colpocitologia oncótica deverá iniciar-se, no máximo após 3 anos do início da atividade sexual, mas não após a idade de 21 anos. Recomenda ainda, seguimento anual com a citologia convencional, ou a cada 2 anos com citologia em meio líquido, antes dos 30 anos, podendo o intervalo do seguimento ser aumentado para 2-3 anos, baseado nos exames anteriores e a fatores de risco (SMITH et al. 2002).

A partir da realização de colpocitologia oncótica, em 1950, observou-se redução de 79% na incidência de câncer cervical e de 70% na mortalidade por essa doença (RIES et al., 1999).

Segundo o National Institute of Health (1996), acreditava-se que a sensibilidade da Colpocitologia fosse de 80%, deste modo com a realização de 3 colpocitologias anuais, chegar-se-ia a uma sensibilidade de rastreio de 99%.

Em um estudo realizado por McCrory et. al., (1999) foi demonstrado que a sensibilidade da colpocitologia convencional na detecção de lesões precursoras de câncer de colo era de 51%, enquanto que a especificidade era de 98%; portanto a taxa de falso negativo era de 49%.

Sabe-se que a colpocitologia apresenta taxa de falso negativo de 75% nas lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (NIC I), de 50% nas lesões intra-epiteliais de alto grau (NIC II), de 25% nas lesões intra-epiteliais de alto grau (NIC

III), de 10% no câncer *in situ* e de 5% em carcinoma invasor. A ocorrência de falso negativos deve-se ao fato de que nas lesões atípicas, as células não descamam facilmente, são mais agregadas. Outra razão para a ocorrência de falso negativos é que as lesões NIC I e II situam-se nas camadas mais profundas, tendo maior dificuldade para, para se superficializarem e conseqüentemente para serem colhidas na colpocitologia (MARCOS, 1997).

A avaliação colpocitológica em meio líquido (“ThinPrep”) apresenta maior sensibilidade, próxima a 80%. Essa técnica, transfere de 80 a 90% das células para o meio líquido em comparação com 10 a 20% transferidas quando em lâmina de vidro (“AutoPap”), portanto, reduz a taxa de esfregaço insatisfatório em 79 a 90%, possibilitando uma maior detecção das células alteradas (BOLICK; HELLMAN, 1998).

No entanto, as recomendações da U.S. Preventive Service Task Force, consideram que as novas tecnologias são mais caras que a citologia convencional, e que a acurácia das avaliações até a presente data, são insuficientes para determinar se são mais efetivas do que a citologia cervical convencional para prevenção de câncer cervical invasivo (BERG; ARKINS, 2003).

O resultado citológico não define diagnóstico, apenas levanta suspeitas, sendo necessária a confirmação por colposcopia e/ou biópsia.

Atualmente dispõe-se de dois sistemas para avaliação das alterações ASC, o sistema classificatório Papanicolaou e o Bethesda.

### **2.2.1 Sistema papanicolaou**

Esse sistema é o método de excelência na avaliação do grau de alteração celular do epitélio escamoso cervical e tem ajudado a diminuir drasticamente a incidência de câncer de colo uterino (MANOS et al., 1999).

Não obstante, a classificação dos resultados desse sistema é numérico, confuso, idiossincrático. Estas particularidades, juntamente com a terminologia “displasia”, são de pouca reprodutibilidade entre observadores na prática (KURMAN, 2005).

O sistema Papanicolaou classifica os esfregaços em I, II, III, IV e V, não diferenciando as atipias colicitóticas das alterações celulares benignas (infecciosas, reativas ou realmente regenerativas), classificando ambas como classe II (NETO, 2000).

Na classificação de Papanicolaou, as atipias e lesões identificadas no sistema Bethesda como ASC-US, ASC-H, LGSIL e HGSIL, estão dentro da Classe III. Esse sistema não as diferencia entre si, enquanto no sistema Bethesda essas ASC e SIL são classificadas de acordo com a história natural das neoplasias do colo (KURMAN, 2005).

### **2.2.2 Sistema Bethesda**

Esse sistema de classificação de colpocitologia oncótica, proposto em 1988, possui terminologia que refletia três princípios fundamentais: comunicar informações clinicamente relevantes a partir do laboratório para o médico responsável pelo atendimento do paciente; utilizar terminologia uniforme e razoavelmente reprodutível entre diferentes patologistas e laboratórios, e ser flexível para se adaptar a uma grande variedade de situações laboratoriais e situações geográficas; a terminologia deve ainda refletir a compreensão mais atual da neoplasia cervical. Pautado nesses objetivos, padronizou-se a descrição das citologias cervicais, visando reduzir confusões diagnósticas e intervenções desnecessárias (SOLOMON; NAYAR, 2005).

Em particular, esse sistema reclassificou as lesões de colo uterino de acordo com novos critérios estabelecidos, baseados nos dados epidemiológicos e nos entendimentos mais atuais sobre a história natural das neoplasias do colo uterino (comportamento biológico), os achados denominados de atipias pela classificação de Papanicolaou (classe II e III), distinguindo neste sistema, as alterações celulares benignas (infecciosas, reativas ou regenerativas), recebendo o nome de NILM (negativo para lesão intra-epitelial e malignidade), das alterações realmente atípicas ASC-US (atipias escamosas de significado indeterminado), LGSIL (Lesão Intra-Epitelial Escamosa de Baixo Grau) e HGSIL (Lesão Intra-Epitelial Escamosas de Alto Grau) (KURMAN, 2005).

Desde 1991, após revisão da classificação Bethesda, todas as anormalidades de células epiteliais escamosas são classificadas como ASC (células escamosas atípicas) ou como SIL (lesão intra-epitelial escamosa) (SOLOMON et al., 2002).

As ASCs devem ser interpretadas e qualificadas como “de significado indeterminado” (ASC-US) ou “não é possível excluir uma HGSIL” (ASC-H), já as SIL deve ser interpretadas como LGSIL ou HGSIL. Apesar da maioria das interpretações ASC-US serem sugestiva de LGSIL, a classificação “de significado indeterminado” é possível, pois aproximadamente 10 a 20% das mulheres portadoras de ASC-US, apresentam HGSIL (NIC II ou NIC III) (SOLOMON et al., 2002).

Espera-se que ASC-US ocorra em mais de 90% das interpretações ASC na maioria dos laboratórios (SHERMAN et al., 2005).

O diagnóstico citológico de ASC-US esta associado a uma incidência de 10 a 20% de LGSIL (NIC I), e a um risco de 3 a 5% de HGSIL (NIC II ou III) (COX et al., 1995; WRIGHT; SUN; KOULOS, 1995).

Para Melnikow et al. (1998), torna-se evidente que na maioria das vezes a LGSIL (NIC I) é uma infecção benigna por HPV, que regredirá espontaneamente em mais de 60% dos caso, portanto, a colpocitologia oncótica serve como triagem.

A identificação de lesões mais avançadas tipo HGSIL (NIC II e NIC III) foi estudada através da ASCUS/LSIL TRIAGE STUDY (ALTS), que promoveu um estudo comparativo utilizando três métodos de rastreamento para alterações ASCUS/LSIL: 1 - colposcopia imediata, 2 - teste para HPV e 3 - repetição do Papanicolaou , onde o ensaio concluiu que a triagem para HPV é altamente sensível na identificação de lesões NIC II e NIC III, e com taxa aceitável de encaminhamento para colposcopia (SOLOMON; SCHIFFMAN; TARONE, 2001; LEE; KIM; PARK; KIM, 2001; SHLAY et al., 2000).

As interpretações ASC devem ter as seguintes características básicas: diferenciação escamosa, aumento da proporção núcleo/citoplasma e hiper Cromasia nuclear mínima, agrupamento de cromatina, desorganização celular e multinucleação, sendo que essas alterações tem significado no aumento do grau da



lesão. Os critérios de evolução são: redução gradativa do citoplasma e aumento da relação núcleo/citoplasma (SHERMAN et al., 2005).

### **2.2.2.1 ASC-US**

A terminologia “Atipias Escamosa de Significado Indeterminado” (ASC-US), juntamente com ASC-H, com Lesão Intra-Epitelial de Baixo Grau (LGSIL), com Lesão Intra-Epitelial de Alto Grau (HGSIL) e Carcinoma de Células Escamosas, contempla todas as alterações oriundas das células escamosas do colo uterino (SOLOMAN et al., 2002).

Um estudo nacional sobre a prática de laudos em 768 laboratórios durante o ano de 1996 descobriu que a classificação ASC-US correspondia a uma média de 5,2% e uma mediana de 4,5% de todos os laudos de citologia cervical ( DAVEY et al., 2000).

Vários autores revisaram colpocitologias oncóticas. Manos et al. (1999) fizeram revisão de 46.000 colpocitologias na Califórnia, encontrando 3,4% de prevalência de diagnóstico de ASC-US. Eltabbakh et al. (2000) revisaram mulheres atendidas entre 1997 e 1999, na Universidade de Vermon, esta alteração correspondia a 10,2%. Esses dados indicam que diversos laboratórios dos Estados Unidos não foram capazes de atingir o alvo de manter uma frequência de registros de ASCUS em patamares abaixo de 5%. O Instituto Nacional do Câncer dos EUA concluiu que espera-se citologias ASC-US em, no máximo, 5% das citologias (KURMAN et al., 1994).

De todas as alterações introduzidas pelo sistema de classificação Bethesda, a mais problemática e controvertida foi a ASC-US, ela ressalta a dificuldade dos patologistas decidirem entre espécimes celulares e histopatológicos, deixando o médico responsável com a decisão de tratar ou não a paciente (KURMAN, 2005).

Em razão destas dificuldades e do fato de que a alteração ASC-US representam, no mundo, 2,5 milhões de citologias de Papanicolaou, resolveu-se em 2001, em um Encontro de Patologistas (ALTS) com mais de 400 participantes de 24 países, revisar a terminologia, diferenciando a alteração ASC em ASC-US (células

escamosas atípicas de significado indeterminado) e ASC-H (células escamosas atípicas, onde não é possível excluir uma HSIL) (SOLOMON; NAYAR, 2005).

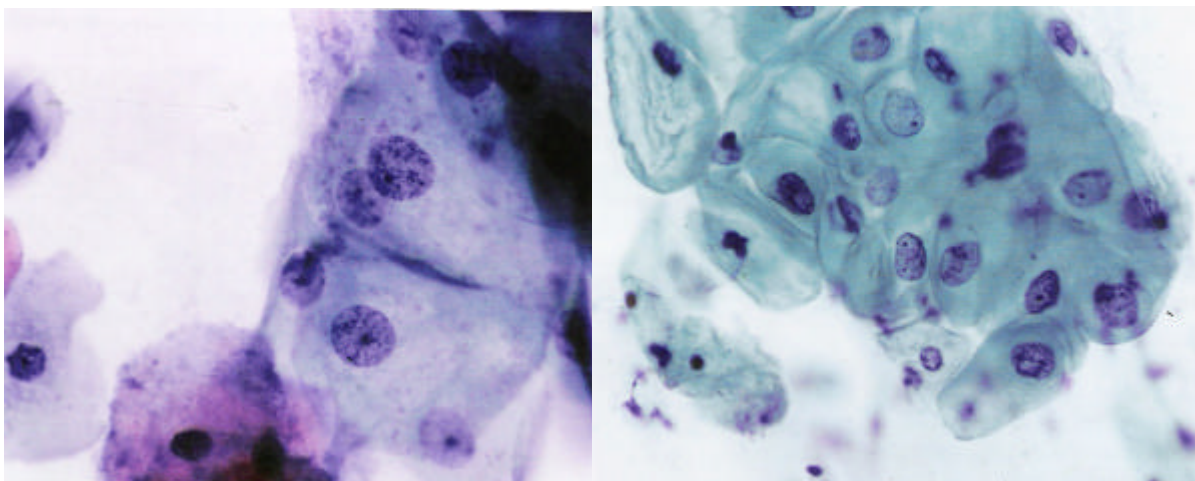
Desse modo, a categoria ASC-US reflete a dificuldade na distinção entre as alterações reativas, e LGSIL engloba agora, alterações decorrentes de HPV (atipia coilocitótica) e LGSIL (NIC I). A alteração ASC-H implica em lesão de maior risco, inclusive sendo precursora do câncer (SOLOMON; NAYAR, 2005).

As atipias celulares associadas ao HPV (coilocitose e NIC I) foram incorporadas à categoria LGSIL, em razão de que a história natural, a distribuição dos vários tipos de HPV e as características dessas duas lesões são iguais (SHIFFMAN, 1992).

São descritas como ASC-US as células escamosas anormais que não preenchem os critérios ASC-H ou para lesão intra-epitelial de alto grau (HGSIL). Deste modo elimina a distinção entre atipia coilocitótica (efeito HPV) e neoplasia intra-epitelial cervical, não se incluindo nesta categoria alterações benignas, reativas ou regenerativas, que devem ser descritas como normais nos laudos colpocitológicos (SOLOMON; NAYAR, 2005).

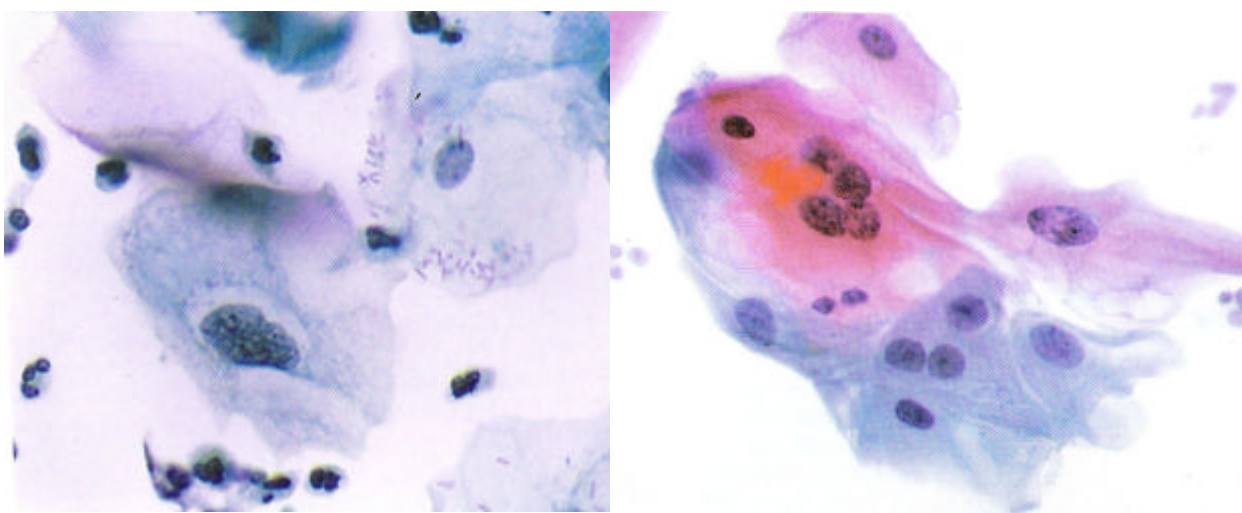
As ASC-US são as alterações observadas com maior frequência nas citologias realizadas para rastreamento do câncer cervical. A conduta diante das mulheres com ASC-US é particularmente problemática, pois, este diagnóstico pode significar alteração reativa ou neoplásica/pré-neoplásica (PEDROSA et al., 2003).

As alterações reativas associadas à inflamação presentes na maioria das citologias, apresentam aumento nuclear (1 a 1 ½ até 2 vezes a área normal de uma célula escamosa normal). As células endocervicais podem mostrar maior aumento nuclear, podendo ocorrer binucleação ou ocasionalmente multinucleação, os contornos nucleares são lisos, redondos e uniformes, os núcleos podem ser vesiculares ou hipocromáticos, é possível encontrar hiper cromasia moderadas, mas a estrutura e distribuição da cromatina é regulada com granulações finas. Pode ocorrer nucléolos únicos ou múltiplos, o citoplasma pode ter policromasia, vacuolização ou halos perinucleares, sem espessamento periférico (YOUNG et al., 2005).



**Figura 7 - Células escamosas reativas associadas a inflamação.**  
Fonte: Solomon e Nayar (2005).

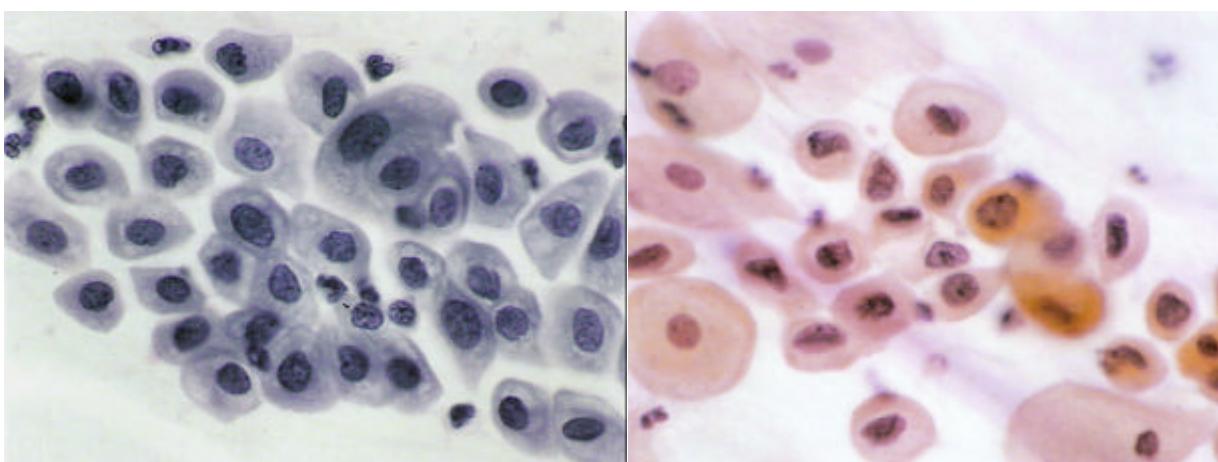
Os critérios propostos para o diagnóstico de ASC-US, são: núcleo celular 2 ½ a 3 vezes o tamanho da área do núcleo de uma célula normal da camada intermediária do epitélio escamoso estratificado; proporção núcleo e citoplasma ligeiramente aumentada; hiper cromasia nuclear mínima e irregularidade na distribuição da cromatina ou da forma nuclear; anormalidades nucleares associadas a citoplasma orangeofílico denso, na presença de citoplasma maduro; aumento discreto da relação núcleo-citoplasma; cromatina com padrão de distribuição regular; alterações na forma e no tamanho do núcleo, além da bi-nucleação (SHERMAN et al., 2005).



**Figura 8 - Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US).**  
Fonte: Solomon e Nayar (2005).

### 2.2.2.2 ASC-H

Os critérios citológicos para citologias ASC-H são: células isoladas ou em pequenos fragmentos com menos de 10 células, núcleo 1 ½ a 2 ½ vezes maior que o normal, proporção da área entre núcleo e o citoplasma aproximadamente igual à do HGSIL, ocorrem anormalidades nucleares como hipercromasia, irregularidade da cromatina e formas nucleares anormais com irregularidades focais (SHERMAN et al., 2005).



**Figura 9 - Células escamosas atípicas, não sendo possível excluir HGSIL (ASC-H).**  
Fonte: Fonte: Solomon e Nayar (2005).

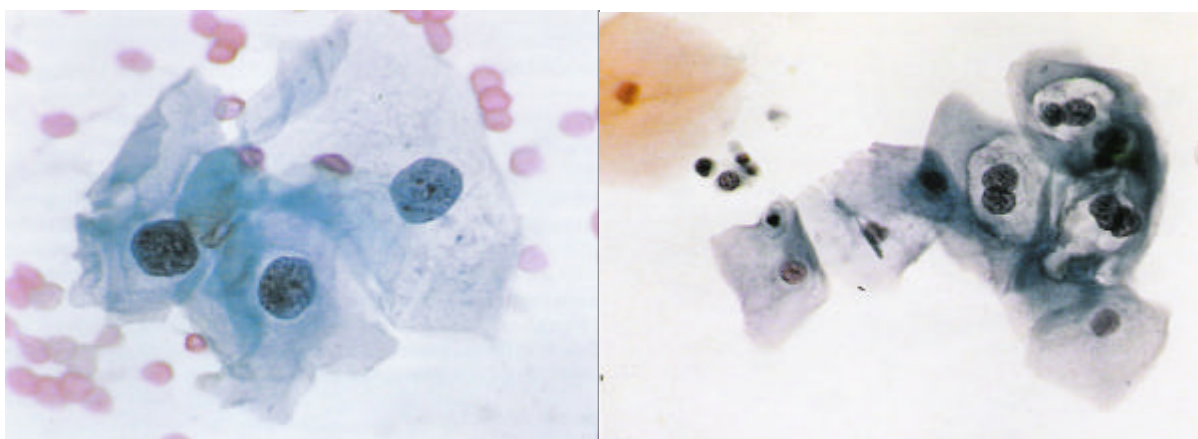
As ASC-H são encontradas na minoria dos casos de ASC (espera-se 5 a 10%) e tem maior valor preditivo positivo para detectar HGSIL (NIC II e III), do que um ASC-US (WRIGHT et al., 2002; SHERMAN et al., 2005).

### 2.2.2.3 LGSIL

Segundo Davey et al. (2000) e Kurman et al. (1994), a taxa de anormalidades do tipo LGSIL em colpocitologias oncóticas é de 1,6% em relação ao total das citologias. Para Syrjanen et al. (2005) esta incidência é de 1,9%.

As alterações de células escamosas LGSIL tem como critérios: geralmente as alterações estão restritas a células com citoplasma maduro ou tipo superficial, o

tamanho célula total é grande, citoplasma abundante e bem definido, aumento nuclear de pelo menos 3 vezes a área do núcleo de uma célula intermediária normal, graus variáveis de hiperchromasia nuclear, com variações do tamanho do núcleo, binucleação e multinucleação quase sempre presentes, cromatina nuclear com distribuição irregular, grosseiramente granular, com cromatina borrada ou degenerada, nucléolos ausentes ou diminutos, contorno da membrana nuclear irregular, porém pode ser liso, presença de células com cavitação citoplasmática nuclear (coilocitose), citoplasma pode ter aspecto denso e orangeofílico (WRIGHT et al., 2005).



**Figura 10 - Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LGSIL).**  
Fonte: Solomon e Nayar (2005).

Para Wright, Sun e Koulos (1995), 75% das pacientes são portadoras de LGSIL. Para Kinney et al. (1998), 20% dos casos são de HGSIL (NIC II ou III).

Segundo Lorinez et al. (1992), a LGSIL está claramente ligada ao HPV em aproximadamente 90% dos casos. As alterações em células escamosas associadas a HPV são conhecidas como coilocitos e, de acordo com Solomon et al. (2002), evoluem para HGSIL em 14%. Para Nasiel, Roger e Nasiel (1986), as mesmas evoluem para HGSIL em 16%.

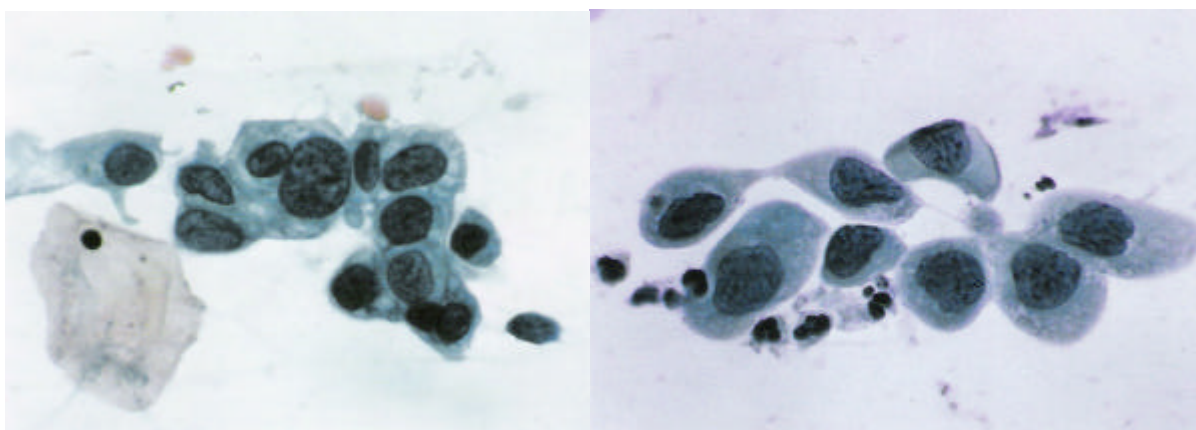
Lesão Intra-epitelial de Baixo Grau (NIC I) é considerada lesão precursora do câncer cervical, porém muitas dessas lesões regridem espontaneamente (NASIEL et al., 1986).

Em uma revisão de 30 anos, as taxas de progressão de LGSIL e HGSIL foram respectivamente 0,15% e 1,44% para carcinoma invasivo, após 24 meses. Nesta mesma análise, 47% de LGSIL e 35% do HGSIL regrediram para normal, em dois anos (MELNIKOV et al., 1998).

#### 2.2.2.4 HGSIL

HGSIL são lesões mais raras e consensuais. Para Davey et al. (2000), totalizam 0,5% das colpocitologias oncóticas e para Syrjanen et al. (2005), esta porcentagem é de 0,6%.

Os critérios para HGSIL são: afetam células menores e menos maduras, ocorrem isoladas, em grupos ou agregadas, os agrupamentos hiper Cromáticos devem ser avaliados criteriosamente, o tamanho da célula é variável, hiper Cromasia nuclear acompanhada de variações no tamanho e forma nuclear, grau de aumento nuclear variável, citoplasma diminuído, levando a acentuada proporção núcleo/citoplasma, cromatina fina ou grosseiramente granular, com distribuição irregular, contorno da membrana nuclear irregular, com entalhes freqüentes, nucléolos ausentes, excepcionalmente presentes (WRIGHT et al., 2005).



**Figura 11 - Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HGSIL).**  
Fonte: Solomon e Nayar (2005).

## 2.3 COLPOSCOPIA

Em razão das dificuldades para a prevenção de câncer no trato genital inferior, do alto número de falsos negativos, aliados ao fato da colpocitologia oncótica analisar material apenas do óstio, endocérvice e fundo de saco vaginal, não avaliando adequadamente a vagina, Hinselmann, em 1925, criou o colposcópio. Este aparelho é um microscópio com até 40 aumentos, permitindo a visualização do colo, vagina e vulva. Desse modo, para se ter maior probabilidade diagnóstica, nada melhor que incorporar ao arsenal diagnóstico um segundo método de prevenção, a colposcopia. A associação da colpocitologia com a colposcopia contribuiu para diminuir sobremaneira as falhas diagnósticas (PEREYRA et al., 1995).

A principal indicação da colposcopia é a de orientar e escolher a técnica, assim como a extensão da biópsia do colo uterino, selecionando o local mais apropriado em razão do diagnóstico citológico ASC. É indicada também para avaliar se os achados colposcópicos requerem intervenção ou não, através do estudo histopatológico (JACYNTO, 2001).

A colposcopia e biópsia são métodos que se somam, ou seja, a realização somente de colposcopia tem limitações para o canal endocervical (JEC não visível), colo não visualizado, cervicólites intensas e colo muito atróficos (NETO, 2000). Esses dois métodos juntos, tem papel fundamental quando se trata de canal endocervical, quando o índice de falha é próximo de 100%. Um método não supera o outro, apenas se complementam (PEREYRA et al., 1995).

Na colposcopia usa-se uma série de substâncias: ácido acético para exacerbação das lesões pré-existentes, sendo desse modo mais facilmente visualizadas ao colposcópio; Lugol, usado no teste de Schiller para corar epitélios normais, fornecendo informações importantes sobre a anormalidade do colo e vagina; hipossulfito de sódio, que remove o iodo impregnado no citoplasma, possibilitando nova avaliação em caso de dúvidas (PEREYRA et al., 1995).

## 2.4 BIÓPSIA

Quando necessária esta deverá ser orientada pela colposcopia, nas áreas mostradas ou destacadas pelo ácido acético e pelo teste de Schiller. Deverá ser realizada com pinças próprias, sendo necessário, às vezes, a apreensão do colo para evitar a sua mobilidade e, desse modo, facilitar a retirada. São usadas pinças especiais, com retirada de fragmentos de até 5 mm. Uma vez retirada, a peça da biópsia deve ser imediatamente fixada em formol a 10%, sendo devidamente identificada. Após a biópsia, pode ser necessário o tamponamento vaginal ou aplicação de solução hemostática de policlesuleno, caso ocorra sangramento importante (PEREYRA, 1995).

## 2.5 CORRELAÇÃO COLPOCITOLOGIA E HISTOPATOLÓGICO

As ASCs e SILs detectadas na colpocitologia oncótica, sempre necessitam de procedimentos complementares para seu diagnóstico, pois a citologia é um exame de rastreamento. Esses procedimentos, quando justificados, necessitam de orientação do exame de colposcopia, para avaliar a necessidade ou não da biópsia. O resultado do exame histopatológico é que determinará a conduta a ser adotada (GRIFFITHS et al., 1997; MATTOS, 2006).

As possibilidades diagnósticas são: NILM (Normal, Reativo ou Reparativo), ASC-US, ASC-H, LGSIL, HGSIL e Carcinoma.

Na LGSIL (NIC I) existe desarranjo da arquitetura, com perda da estratificação das células do terço inferior do epitélio. Na HGSIL (NIC II e III), quando NIC II, o desarranjo atinge as células do terço inferior e médio da espessura epitelial; quando NIC III, atinge além dessas duas camadas, acometendo também o terço superior do epitélio, determinando perda da estratificação das três camadas. Quando a lesão ultrapassa a lâmina basal se torna um carcinoma de colo do útero, dito *in situ* (GRIFFITHS et al., 1997; MATTOS, 2006)



Vários autores procuraram analisar correspondência entre os achados citológicos e a histologia, desse modo, evitando o risco de detecção subsequente de neoplasia intra-epitelial cervical nesse grupo. Entre esses autores, Lachman e Cavallo-Calvanese (1998), entre outubro de 1995 e março de 1996, realizaram um estudo de prevalência, incluindo todas as colpocitologias oncóticas analisadas em um laboratório independente que recebe material de citologia e biópsia cervical da população norte-americana em geral. Dos 94.100 exames analisados, 4.276 (4,5%) foram interpretados como ASC-US. Foram realizados biópsias de colo uterino ou curetagem endocervical em 560 (13,1%) dos casos de ASC-US, em até 90 dias após o diagnóstico citológico, sendo identificado pelo estudo histológico, as seguintes alterações: 357 (63,7%) alterações benignas ou reativas, 109 (19,5%) LGSIL e 94 (16,8%) HGSIL.

Na Califórnia, um estudo com 3094 mulheres com colpocitologia ASC-US, por meio de Colposcopia e biópsia do colo ou curetagem do canal, evidenciou 2.053 casos (66,3%) sem alterações à colposcopia e histopatológico, 764 casos (24,7%) com LGSIL, 273 casos (8,9%) com HGSIL e 3 casos com carcinoma invasivo. (LONKY et al., 1999).

Em um estudo com realização de biópsia de 1214 pacientes apresentando ASC, verificou-se resultado benigno em 1208 casos (84%), LGSIL em 100 casos (8,2%), HGSIL em 84 casos (6,9%) e câncer invasivo em 2 casos (0,2%) (AUGUST, 1991).

Jones et al. (1987) avaliaram 236 pacientes com histopatológico encontrando 178 (75,4 %) benignos, 48 (20,4%) LGSIL e 10 (4,2%) HGSIL.

Noumoff (1987), após analisar e realizar biópsia em 375 pacientes, encontrou 267 (71,2%) benignos, 70 (18,7%) LGSIL e 38 (8,1%) HGSIL. Desta forma, não há consenso na literatura a respeito dos dados estatísticos das alterações histológicas das colpocitologias atípicas.

O trabalho de Nordstrom et al. (2001) mostra a dificuldade de conduta, quando compara as colpocitologias atípicas com resultados histológicos obtidos dessas citologias. As citologias HGSIL, no exame histopatológico, apresentaram os seguintes resultados: 58% permaneceram HGSIL, 26% LGSIL e 16% outros. Das

citologias com LGSIL o exame histopatológico evidenciou: 24% permaneceram LGSIL, 25% HGSIL, e 51% outros; dos pacientes ASC-US, após histopatológico, 19% eram HGSIL, 20% LGSIL e 61% outros.

As categorias citológicas atípicas continuam motivando discussões importantes referentes à sua prevalência e propedêutica recomendada, pois, segundo Silva et al. (2002) e Santos et al. (2003), em citologias ASC-US não se pode afastar HGSIL. Em citologias LGSIL (NIC I) não se pode afastar HGSIL (NIC II ou NIC III), ou até alterações reativas na avaliação histopatológica (SANTOS et al., 2004).

A evolução da SIL para lesões mais graves existe, embora não se possa prever o seu potencial maligno. Sabe-se que as HGSIL e carcinoma *in situ* são mais propensos a persistir ou a evoluir para câncer, enquanto que as LGSIL tendem a regredir espontaneamente (MELNIKOW, 1998). O acompanhamento prolongado de pacientes com SIL revela que 30% dos casos regridem para normalidade, 49% persistem, 20% progridem para carcinoma *in situ* e 1,3% progridem para carcinoma invasor. Na LGSIL a incidência de regressão foi de 60 a 70%. O tempo médio para evolução de todo tipo de SIL para carcinoma *in situ* é de 44 meses, sendo de 58 meses para LGSIL, 38 meses para HGSIL (NIC II) e de 12 meses para HGSIL (NIC III) (MATTOS, 2006).

Conclui-se na prática que não existe correspondência entre diagnóstico colpocitológico e histopatológico, quer obtido por biópsia ou conização. A possibilidade de uma lesão tornar-se invasora aumenta com a severidade da atipia, porém invasão nem sempre ocorre; mesmo lesões com alto grau de atipia podem regredir. A porcentagem de casos que evoluem para lesões mais graves, como também o tempo para essa evolução, varia de acordo com a idade (ANDRADE; MARANA, 2001).

## 2.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORÊSCENCIA

A Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (EFIL) é uma técnica que tem se mostrado promissora no diagnóstico precoce de uma grande variedade de neoplasias, além de propiciar bons resultados na diferenciação entre tecidos normais dos diversos tipos de câncer (SILVEIRA JR. et al., 2004).

A EFIL vem sendo usada como ferramenta em diagnóstico de aterosclerose, displasias no cólon, câncer no esôfago e alguns tipos de câncer do pulmão e bexiga. A técnica de espectroscopia de fluorescência, que vem sendo denominada de "biópsia óptica", apresenta grande interesse por parte dos cientistas e médicos devido ao fato de que a fluorescência pode ser gerada e coletada remotamente por meio de fibras ópticas. Desta maneira, cateteres baseados em fibras ópticas podem ser facilmente introduzidos em endoscópios e outros instrumentos de inspeção, permitindo assim uma análise in vivo em tempo real, sem a necessidade de remoção de tecido. Daí a denominação de "biópsia óptica", uma vez que a identificação do tecido é feita pelo uso da radiação luminosa (ZÂNGARO et al., 1996).

Esta aplicação é particularmente interessante para detecção de displasias em tecidos biológicos. A técnica de análise espectral através da multi-excitação da fluorescência dá origem aos mapas de contornos (EEMs), que são bastante utilizados em análises biológicas, para a detecção de microorganismos, produtos resultantes de metabolismos celulares e alvos fluorescentes, onde certos microorganismos possuem a habilidade de absorver determinados corantes. A aplicação desta técnica vem sendo conduzida para a determinação dos comprimentos de onda de excitação ideais para diferenciação entre os diversos tipos de disfunções (ZÂNGARO et al., 1996).

Deve tornar-se uma importante ferramenta de diagnóstico diferencial em casos de colpocitologia oncológica, com alterações SIL. Essa técnica baseia-se na excitação da amostra por radiação em comprimentos de onda curtos (ultravioleta e visível) e a observação da resposta luminescente da amostra em comprimentos de onda longos (visível). A identificação dos tecidos baseia-se na determinação das diferenças espectrais entre os fluoróforos presentes nos tecidos normais e

displásicos, basicamente havendo uma evidente mudança na composição destes na cérvix, à medida que estes tecidos evoluem para neoplasia intra-epitelial cervical (RIVORE et al., 2004; WU; HONG-TAK, 2005; SILVEIRA JR. et al., 2004).

Alguns autores vêm investigando essa técnica em tecidos *in vivo* e *in vitro* em diversos comprimentos de onda de excitação, visando detectar qual deles tem mais capacidade diagnóstica. Utilizando tecido *in vivo*, Ramanujan et.al. (1994) excitaram com  $\lambda = 337\text{nm}$ ; Ramanujam et al. (1996) excitaram com  $\lambda = 337, 380$  e  $460\text{nm}$ ; Agrawal et al. (1999) excitaram com  $\lambda = 337\text{nm}$ ; Nordstrom et al., (2001) excitaram com  $\lambda = 355\text{nm}$  e Weingandt et al. (2002) excitaram com  $\lambda = 375$  e  $440\text{nm}$ .

Manoharan et al. (1995) e Lohmann et al. (1989) excitaram em  $\lambda = 365\text{nm}$ , Glassman et al. (1992) excitaram com  $\lambda = 460\text{ nm}$ , Mahadevan et al. (1993) excitaram com  $\lambda = 340, 380,$  e  $460\text{nm}$ , usando amostras *in vitro*.

De acordo com Lohaman et al. (1989), o grau da intensidade de fluorescência é proporcional ao grau da lesão intra-epitelial.

Na avaliação da fluorescência, demonstrou-se que à medida que os comprimentos de onda de excitação aumentavam, a emissão de fluorescência em tecidos cervicais normais foi menor que em tecidos alterados (MAHADEVAM, 1993).

A avaliação da fluorescência de colo de útero normal e neoplásico por microscopia de fluorescência, foi detectada alta fluorescência na região da cérvix no tecido normal, enquanto que a região ocupada pelo câncer a fluorescência era pequena.(LOHMANN et al., 1989). Portanto, levando-se em conta uma maior sensibilidade dessa técnica com relação à capacidade de avaliar o tecido, reforça-se o papel adjuvante atual da fluorescência na diferenciação de tecidos normais, pré-neoplásicos e neoplásicos.

Essa capacidade da Espectroscopia de Fluorescência em diferenciar ASC e SIL, se baseia nas propriedades que as células epiteliais, em razão da alteração de seu metabolismo e proporcional à gravidade da atipia, necessitam de maior aporte energético para seu desenvolvimento alterado (acelerado), e esta alteração pode ser detectada através de moléculas presentes no citoplasma, nas mitocôndrias, e nas chamadas moléculas carreadoras ativadas, como exemplo o  $\text{NADH}_2$  e  $\text{FADH}_2$  (oxidado) (ALBERTS et al., 2006).

Esse processo, chamado de fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias e envolve consumo de oxigênio e síntese de ATP pela adição de fosfato ao ADP (ALBERTS et al., 2006).

Portanto, as moléculas carreadoras  $\text{NADH}_2$  e  $\text{FADH}_2$ , presentes nas mitocôndrias, doam seus elétrons energizados às membranas das mitocôndrias e, no final do processo, sintetizam ATP, que será usado para as necessidades celulares aumentadas. É de conhecimento que o NADH (reduzido), FAD (oxidado) e colágeno têm propriedades fluorescentes quando excitados por luz ultravioleta/azul (RICHARD-KORTUN; SEVICK-MURACA, 1996; PAVLOVA et al., 2003).

De todos os fluóforos do corpo humano, dois podem ser considerados os mais importantes “marcadores bioquímicos”: o NAD(P)H e o Colágeno. Existem evidências detectáveis e descritas através do trabalho de Georgakoudi et al. (2002); Rivoire et al. (2004); DeClerk (2000); Wu et al. (2005); Rebekah et al. (2001), Pavlova et al. (2003) e Sokolov, Follen, Kortum (2002) de que o NAD(P)H e o colágeno podem ser usados como marcadores bioquímicos de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da cérvix.

A fluorescência do NAD(P)H é encontrada mais freqüentemente nas células superficiais do epitélio cervical, sendo sensível às alterações metabólicas do estado normal do tecido. O colágeno é o maior componente da matriz extracelular e representa o principal fluoróforo do estroma, concluindo-se que a fluorescência depende do ambiente local do fluoróforos, condição essencial para a análise da fluorescência intrínseca do colágeno e do NAD(P)H *in vivo* (GEORGAKOUDI et al., 2002).

Os tecidos epiteliais sofrem alterações estruturais e bioquímicas, culminando com modificações na sua atividade metabólica durante a sua evolução para lesões pré-neoplásicas e neoplásicas (DECLERCK, 2000).

Pavlova et al. (2003), utilizando a microscopia confocal, concluíram que em lesão intra-epitelial do colo, a fluorescência aumentada reflete um acréscimo do número de mitocôndrias metabolicamente ativas em células epiteliais e uma redução da fluorescência do estroma. Afirmam que isto pode ser indicativo de comunicação alterada entre epitélio e estroma, existindo um aumento da fluorescência do

colágeno quando as lesões progridem para neoplasia. As emissões foram atribuídas a alterações mitocondriais, através do aumento da forma reduzida do NADH e oxidada do FAD.

Portanto, quando as lesões intra-epiteliais cervicais estão restritas ao epitélio e não há ruptura da membrana basal, a emissão de fluorescência é alta, baseada nas propriedades fluorescentes do NAD(P)H presentes em maior quantidade nesses tecidos epiteliais alterados. Na ruptura da membrana basal por invasão das lesões intra-epiteliais (carcinoma Invasivo), a fluorescência do NAD(P)H é baixa, piorada pela absorção nas hemácias presentes nos vasos do estroma.

Atualmente, almeja-se o desenvolvimento de um espectrofluorímetro a laser de múltiplos comprimentos de onda de excitação. O sistema desenvolvido visa a obtenção da autofluorescência em tecidos humanos, em diferentes comprimentos de onda de excitação, durante procedimentos clínicos. Este instrumento seria capaz de excitar amostras de tecidos biológicos em até dez comprimentos de onda, na faixa de 337 a 500nm, coletar a autofluorescência em faixa de 360 a 700nm, de uma maneira fácil e confiável, em um tempo inferior a 1s (ZÂNGARO et al., 1996). Existe também a versatilidade de utilização dessa técnica para excitação de amostras em comprimento de onda único (otimizado), para caracterização de tecido normal e neoplásico em animais e humanos *in vivo* (SILVEIRA JR et al., 2004).

**OBJETIVO**

### **3 OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho é estabelecer critérios de diferenciação diagnóstica em Cervicite Crônica, LGSIL e HGSIL em material de biópsia de colo de útero, de pacientes com atipias (ASC-US e ASC-H) e lesões (LGSIL e HGSIL), rastreados na colpocitologia oncótica utilizando a técnica de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser, em comprimento de onda 488 nm.



## **MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 AMOSTRAS**

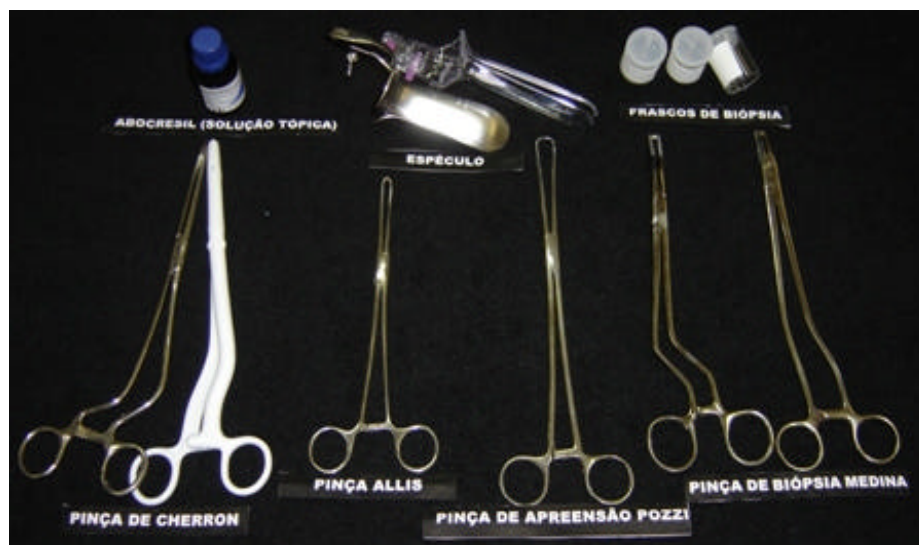
As amostras utilizadas neste trabalho foram constituídas por 97 biópsias, realizadas em 32 pacientes residentes no município de Fernandópolis - SP, todas provenientes das Unidades Básicas de Saúde, Unidades de Saúde da Família e do Centro de Atendimento à Doenças Infecto-Contagiosas e Parasitárias de Fernandópolis (ANEXO A).

As pacientes apresentavam idade entre 18 e 65 anos, com vida sexual ativa, e colpocitologia oncótica, com atipias ASC (ASC-US, ASC-H) e SIL (LGSIL e HGSIL). Todas as pacientes foram encaminhadas ao consultório do mestrando para realização da biópsias.

#### **4.2 PROCEDIMENTOS PARA COLETA DOS DADOS**

Após a obtenção de parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP (L208/2005/CEP), as usuárias receberam as orientações detalhadas sobre objetivos e métodos da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após consentimento livre e esclarecido, as pacientes foram submetidas à avaliação colposcópica e biópsia do colo de útero.

Para a realização deste procedimento, que é uma rotina em ginecologia, foi utilizada uma mesa ginecológica para posicionamento da usuária, espelho vaginal descartável para visualização do colo uterino, pinça de Cheron (porta algodão) para assepsia, pinça de Pozzi ou pinça de Allis para tração do colo e pinça de Medina para as biópsias (Figura 12).



**Figura 12 - Material e instrumental utilizados para coleta das biópsias.**

Para a localização da região ideal para o procedimento, na zona de transformação, mais precisamente na JEC (junção escamo-colunar), foi utilizado o vídeo-colposcópico (modelo M 900M, nº 0681, marca DF Vasconcelos), binocular, foco de luz fria, com 3/4/7/13/17 aumentos (Figura 13 A e B). As peças foram imersas em nitrogênio líquido, para seu rápido congelamento, armazenamento e transporte (Figura 13 C). Na ocorrência de sangramento foi utilizada solução de albocresil, para cauterização química. Este procedimento já é utilizado rotineiramente, ensejando desconforto mínimo.



**Figura 13 - A. Sala de realização dos exames e coleta das biópsias, B.colposcópico, C. tambor de nitrogênio líquido para armazenamento e transporte.**

No procedimento de rotina, precedendo a retirada de fragmento para biópsia orientada pelo colposcópico, realiza-se a limpeza com algodão embebido em soro fisiológico 0,9%, e procede-se então aplicação de ácido acético de 3% a 5%, por 3 a 5 min, o que provoca alteração na cor e superfície da mucosa, pela

ocorrência de modificações bioquímicas no núcleo e no citoplasma das células, que coagulam as proteínas do núcleo e do citoplasma, tornando-as, de acordo com Hatch (1989), opacas e brancas.

No presente estudo, foi realizada assepsia com soro fisiológico a 0,9%, e não houve aplicação de ácido acético. De acordo com trabalho de Agrawal *et al.* (1999), a aplicação de ácido acético melhora a sensibilidade da fluorescência para localizar as lesões aceto-branco e desse modo possibilitar exames *in vivo*, pois também propiciaria uma melhor diferenciação das alterações do colo para retirada da biópsia. No entanto, Ramanujam *et al.* (1994) recomendam a realização de estudos adicionais para avaliar o curso de uma eventual mudança da fluorescência induzida pelo ácido acético. Também não foi utilizado o teste de Schiller, pois são conhecidas, no meio científico, as propriedades fluorescentes do iodo, base do teste.

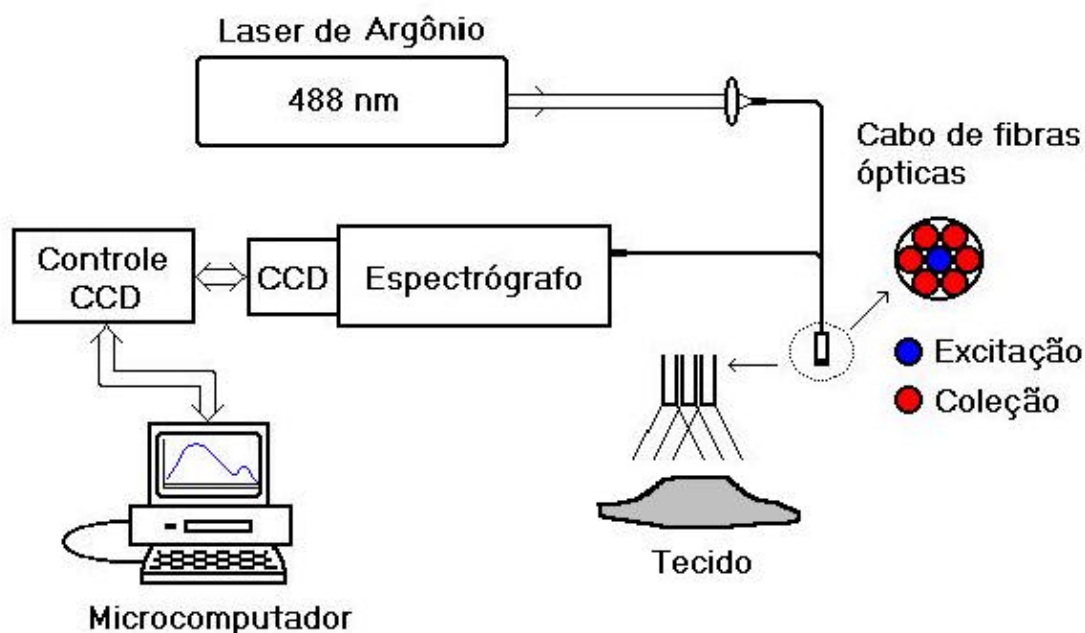
As biópsias foram realizadas em número de duas no lábio anterior e uma no lábio posterior do colo uterino, preferencialmente na região das criptas cervicais, ou seja, nos contornos da JEC funcional e atual (HATCH; HACKER, 1998).

Os fragmentos obtidos, a partir da biópsias, foram devidamente identificadas e armazenados em nitrogênio líquido em um botijão criogênico (marca Cryometal - DS 18) e transportados até o Laboratório de Espectroscopia de Fluorescência do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP, em São José dos Campos - SP.

No laboratório cada amostra foi excitada em dois pontos, utilizando como fonte de excitação um laser de argônio (modelo Stabilite 2017), com potência de 1,5mW, no comprimento de onda 488nm (azul). Este feixe de luz monocromático foi desviado por um prisma, que dirige o feixe para uma lente convergente, acoplado à extremidade proximal de excitação de um cateter de fibras ópticas (2mm de diâmetro total, sendo o diâmetro de cada fibra de 250  $\mu$ m). Através da sua fibra central, na qual a radiação laser é acoplada, o cateter incide o feixe laser sobre o tecido (extremidade distal), e após a interação (absorção), foi emitido um sinal de autofluorescência do tecido, sendo este sinal captado pelas fibras ópticas laterais do cateter na mesma extremidade distal. A extremidade proximal de coleta do cateter foi acoplada no espectrógrafo (Chromex 3100) que dispersa a radiação em

comprimentos de onda na faixa de 500 a 700nm, antes passando por um filtro passa-baixas (comprimentos de onda maiores) com freqüência de corte em 500nm, que absorve o comprimento de onda do laser, sendo então detectado pelo detector do tipo CCD, que converte a radiação luminosa em sinal elétrico, este por sua vez armazenado pelo computador.

Os espectros foram calibrados em comprimento de onda e intensidade por uma rotina desenvolvida no Laboratório de Espectroscopia de Fluorescência utilizando o software Matlab e plotados utilizando o software Excel.



**Figura 14 - Diagrama esquemático do espectrofluorímetro com utilização de laser de Argônio (488 nm) para coleta de espectros de fluorescência de biópsias de colo de útero.**

Os fragmentos da biópsia, já submetidos à espectroscopia de fluorescência, foram fixados em formol a 10%, rotulados e transportados até a cidade de Fernandópolis, onde foram preparados e submetidos a exame histopatológico.

A partir dos resultados dos exames histopatológicos, os espectros foram separados em três grupos, de acordo com o tipo de lesão encontrada. Os espectros de autofluorescência foram analisados para se estabelecer um critério de diferenciação através dos padrões observados na espectroscopia, através da

comparação dos espectros médios dos tecidos, do cálculo da razão e mediação para cada alteração presente na biópsia (cervicite crônica, LGSIL e HGSIL).

Visando a análise estatística e plotagem dos espectros, todos os espectros de CC, LGSIL e HGSIL foram colocados em planilhas Excel. Os espectros médios de cada tipo de tecido foram calculados e plotados comparativamente, sendo o eixo das ordenadas (eixo x) o comprimento de onda e o eixo das abscissas (eixo y) a intensidade relativa dos espectros.

Com o intuito de diferenciar os três tipos de alterações via diferenças obtidas nos espectros de fluorescência, em função da variação de suas intensidades e dos perfis de emissão observados, realizou-se o cálculo das razões e médias das razões entre a intensidade dos espectros nos comprimentos de onda de 500nm e em 600nm.

Visando determinar se o comprimento de onda escolhido para o cálculo da razão teria capacidade de diferenciação, foi realizado o teste estatístico de Kolmogorov and Smirnov para teste de normalidade (se as amostras obedecem à distribuição normal) e análise paramétrica *t-student*, caso dados normais ou Kruskal Wallis, caso dados não normais (não paramétricos), para se avaliar o nível de significância entre as amostras de CC com LGSIL, CC com HGSIL, e LGSIL com HGSIL, utilizando o programa GraphPad InStat.

Utilizou-se um teste estatístico, que compara a presença ou não de doença, para cálculo da sensibilidade das razões de HGSIL, e a especificidade de CC e LGSIL em relação a HGSIL (BEAGLEHOLE; BONITA; KJELLTRÖN, 2003).

## **RESULTADOS**



## 5 RESULTADOS

Os espectros de fluorescência foram obtidos em 97 biópsias de colo do útero de 32 pacientes com as alterações estudadas, tipo atipias de células escamosas (ASC-US e ASC-H), lesões intra-epiteliais escamosas (LGSIL e HGSIL) e carcinoma invasivo de colo de útero, detectadas na colpocitologia oncótica. As biópsias foram obtidas de pacientes com idade entre 18 e 65 anos, sendo a média de idade 32,8 anos e desvio padrão de 12,2 anos.

A Tabela 1 mostra as principais alterações encontradas na colpocitologia oncótica e os resultados histopatológicos obtidos nas biópsias.

**Tabela 1 - Alterações obtidas na colpocitologia oncótica e resultados histopatológicos.**

Resultado da Colpocitologia oncótica	Nº de pacientes	Total de biópsias	Resultado Histopatológico		
			CC	LGSIL	HGSIL
ASC-US	22	65*	45	19	01
ASC-H	01	03	00	00	03
LGSIL	05	15	06	09	00
HGSIL	03	11	01	03	07**
CA INVASIVO	01	3	00	01	02
TOTAL	32	97	52	32	13

\* desprezada uma biópsia em paciente ASC-US

\*\* em uma paciente de colpocitologia HGSIL foram realizadas mais duas biópsias, além das três pré-estabelecidas

## 5.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Tabela 2 - Diagnóstico histopatológico das biópsias.

Diagnóstico	Fragmentos de Biópsia	%
	S	
Cervicite Crônica	52	54
LGSIL	32	33
HGSIL	13	13
Total	97	100

Dos 97 fragmentos de biópsia analisados histologicamente, 54% foram classificados como cervicite crônica, sendo considerados neste estudo como normais. Estes fragmentos de colo de útero apresentam como características gerais a ectocérvice, mostrando epitélio escamoso com polaridade mantida, núcleos com cromatina monocromática, área focal com leve infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear no cório adjacente e discreta congestão vascular (Figura 15).

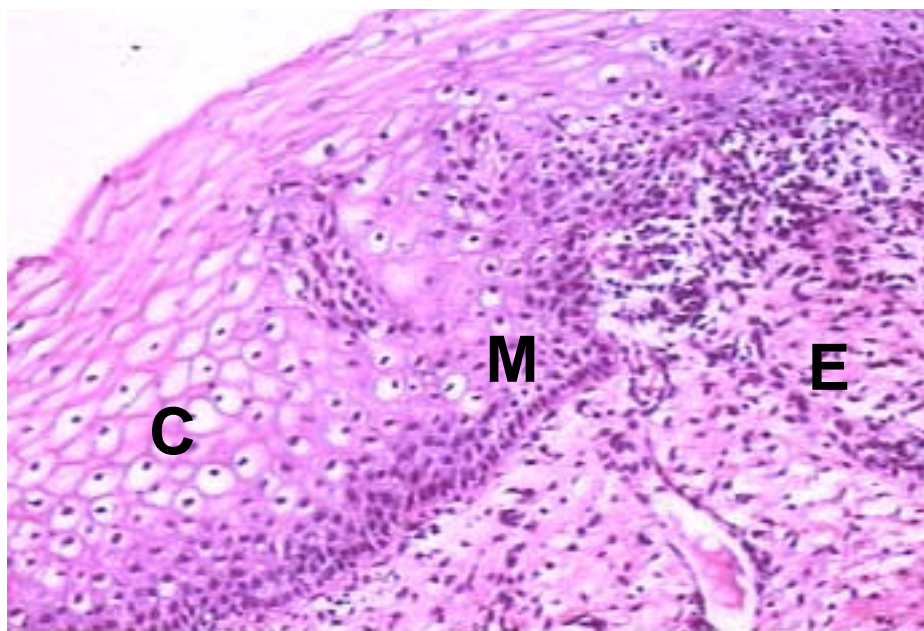
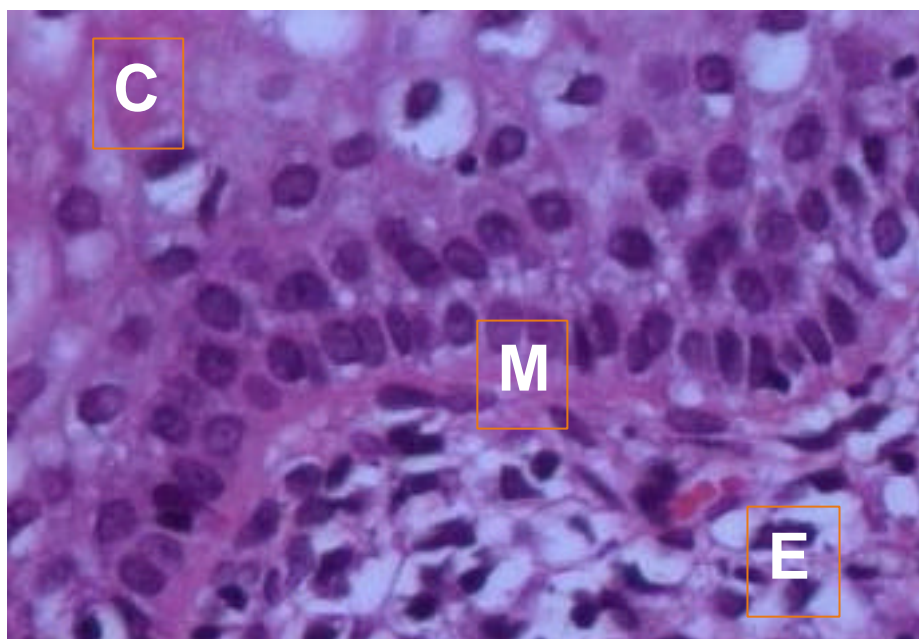


Figura 15- Fotomicrografia de biópsia de colo de útero, em corte transversal. C - epitélio cervical; M - membrana basal; E- matriz extra celular (estroma). Diagnóstico Histopatológico de Cervicite Crônica Inespecífica (H&E, 100x). Fonte: LAPAT (2006)<sup>1</sup>

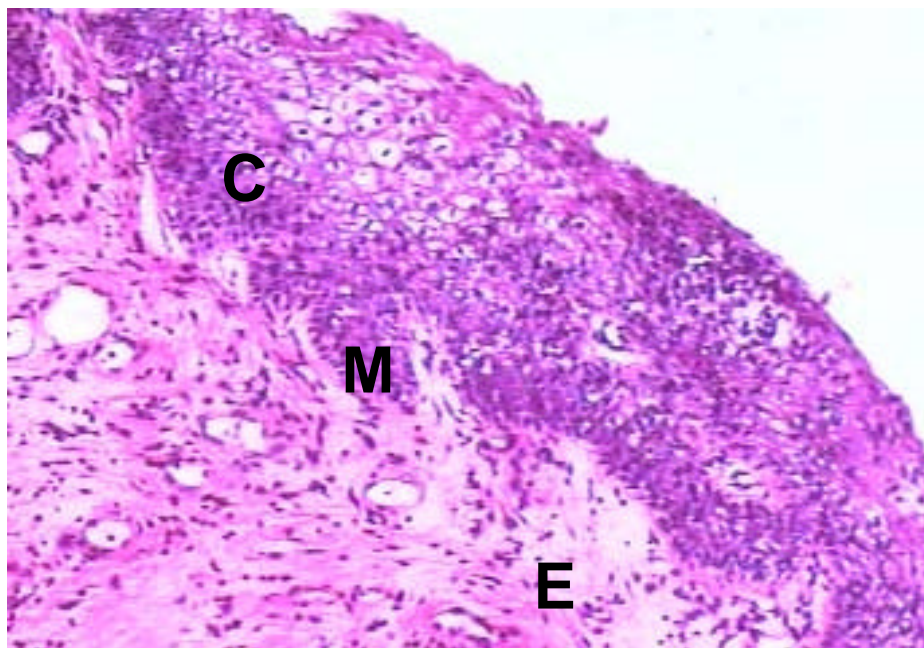
<sup>1</sup> LAPAT - LABORATÓRIO DE PATOLOGIA - Diagnósticos Médicos Patologista Responsável - Dr. P.R. Grimaldi de Oliveira - Cremesp- 16114 Rua Espírito Santo - 1355 - Fernandópolis SP.

Estes fragmentos de colo uterino mostram ainda discreta hiperplasia com atipias da camada basal, presença de discreta hiper Cromasia dos núcleos destas células, leve edema e infiltrado inflamatório crônico no cório adjacente. Não há sinais de malignidade (Figura 16).



**Figura 16 - Fotomicrografia de biópsia de colo de útero, em corte transversal. C - epitélio cervical; M - membrana basal; E- matriz extra celular (estroma), Diagnóstico Histopatológico de Cervicite Crônica Inespecífica (H&E, 400x). Fonte: LAPAT (2006).**

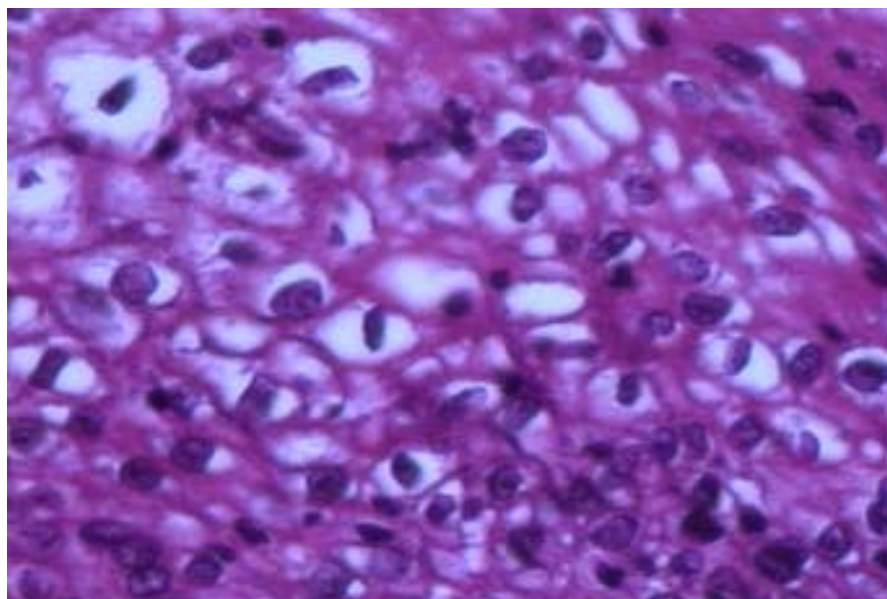
Do total de fragmentos analisados, 33% foram considerados como lesão intra-epitelial de baixo grau, tendo como características ectocérvice mostrando neoplasia intra-epitelial cervical grau I (NIC I - SIL), com discreta hiperplasia basal atípica envolvendo o 1/3 profundo do epitélio onde se evidencia despolaridade e algumas células com esboço de coilocitose. No cório adjacente vê-se discreto edema e infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 17).



**Figura 17 - Fotomicrografia de biópsia de colo de útero, em corte transversal. C-epitélio cervical; M - membrana basal; E - matriz extracelular (estroma). Diagnóstico Histopatológico de Lesão Intra-epitelial de Baixo Grau (NIC I) - (H&E, 100x).**

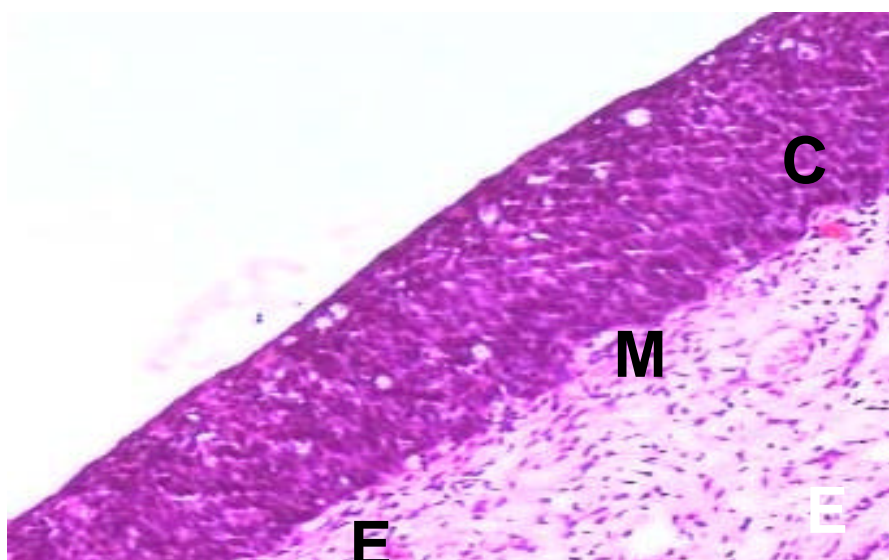
Fonte: LAPAT (2006).

Observa-se ainda nestes fragmentos área do epitélio endocervical mostrando coilocitose, núcleos irregulares, levemente hiper cromáticos, envolvidos em halo perinuclear, variação de tamanho, formato e disposição das células do epitélio (Figura 18).

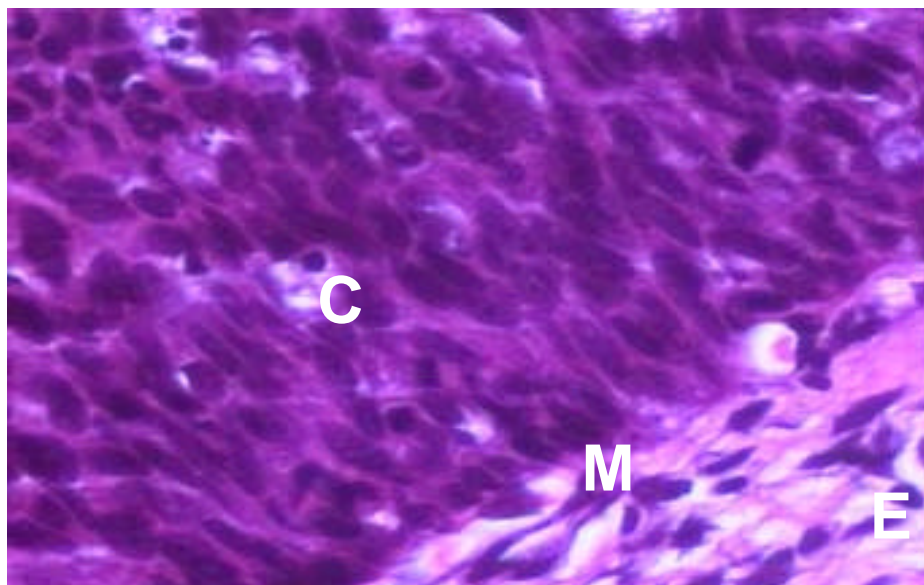


**Figura 18 - Fotomicrografia de biópsia de colo de útero, em corte transversal. Diagnóstico Histopatológico: Lesão Intra-epitelial de Baixo Grau (NIC I) – (H&E, 400x).  
Fonte: LAPAT (2006).**

Lesão intra-epitelial de alto grau foi detectada em 13% dos fragmentos analisados, tendo como características ectocérvice com neoplasia intra-epitelial grau III, atipia e despolarização envolvendo toda a espessura do epitélio, cório adjacente com discreto infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (Figuras 19 e 20).



**Figura 19- Fotomicrografia de biópsia de colo de útero, em corte transversal. C- epitélio cervical; M - membrana basal; E - matriz extracelular (estroma). Diagnóstico Histopatológico: Lesão Intra-epitelial de Alto Grau (NIC III) - (H&E, 200x).  
Fonte: LAPAT (2006).**



**Figura 20- Fotomicrografia de biópsia de colo de útero corte transversal. C- epitélio cervical; M - membrana basal; E - matriz extracelular (estroma). Diagnóstico Histopatológico: Lesão Intra-epitelila de Alto Grau (NIC III) – (H&E, 400x).  
Fonte: LAPAT (2006).**

## 5.2 ANÁLISE ESPECTRAL DOS FRAGMENTOS DE BIÓPSIA

Cada fragmento de tecido histopatológico foi analisado espectralmente por intermédio da excitação em comprimento de onda de 488 nm e coleta do espectro de fluorescência na região de 500 a 700nm, em duas regiões aleatórias da amostra, obtendo-se 194 espectros de fluorescência, dos quais 10 espectros foram eliminados pelo fato de apresentarem “relação sinal-ruído baixa”.

Os espectros de fluorescência obtidos foram separados em 3 grupos, dependendo do resultado da histopatologia: 95 espectros de cervicite crônica (CC), 61 espectros de lesão intra-epitelial de baixo grau (LGSIL) e 28 espectros de lesão de alto grau (HGSIL).

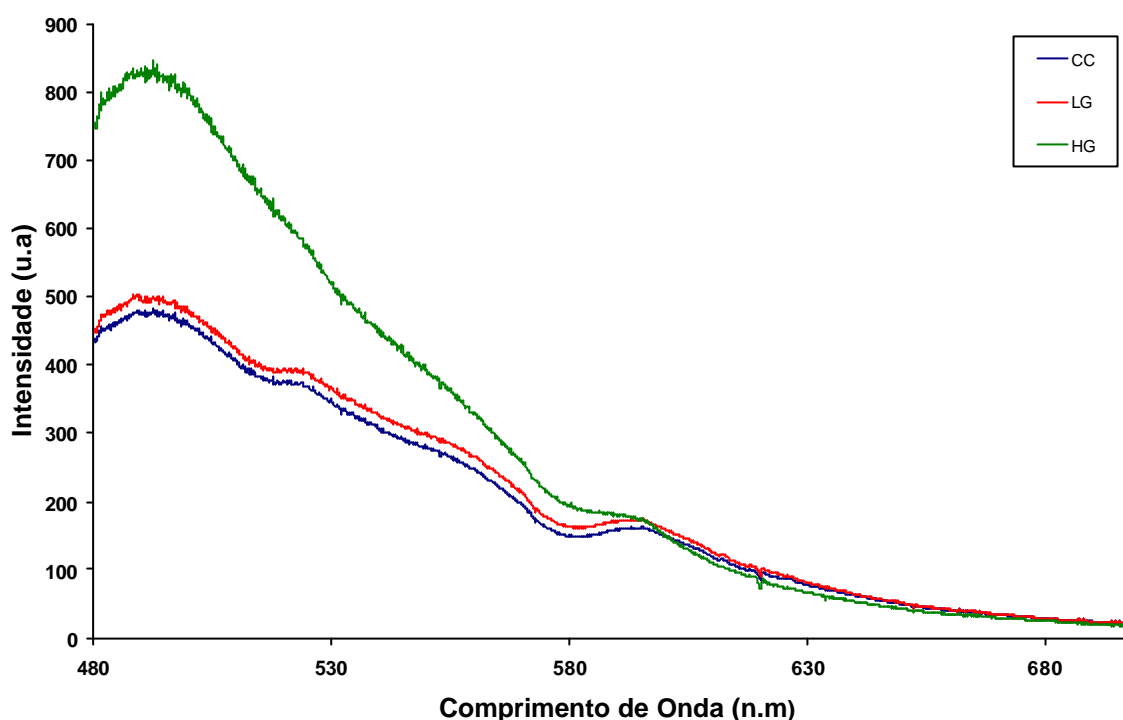
Todos os espectros de CC, LGSIL e HGSIL foram carregados em uma planilha eletrônica (Microsoft Excel) e os espectros de cada tipo de lesão foram então plotados individualmente. Observou-se que os espectros dos tecidos CC e LGSIL apresentaram grande variação de intensidade. Porém, ao calcular-se a média aritmética do conjunto de espectros do mesmo tipo de tecido, notou-se uma

importante característica: os tecidos CC e LGSIL apresentaram médias com características espectrais semelhantes (Figura 21). Em razão destes resultados, optou-se por calcular os espectros médios das 3 atípias separadamente, visando demonstrar as maiores diferenças espectrais observadas no conjunto de dados, que posteriormente foram unidas em uma nova planilha eletrônica onde o eixo “x” é o comprimento de onda e o eixo “y” a intensidade do espectro.

Analisando os espectros médios da emissão fluorescente excitada a partir de 488nm, pode-se relatar a existência de dois padrões de espectros médios com perfis semelhantes (CC e LGSIL), havendo uma pequena variação de intensidade nos pontos entre 500 e 600nm. A partir do comprimento de onda de 600nm, os dois espectros médios se igualaram numericamente, sobrepondo-se (Figura 21).

Fazendo-se uma análise das intensidades dos espectros em posições específicas, na posição de comprimento de onda de 500nm (eixo “x”), obtêm-se valores de 425 u.a. (unidades arbitrárias) para CC e 447 u.a. para LGSIL. Na posição de comprimento de onda 600nm, as intensidades são iguais a 136 u.a. para ambos os tipos de tecidos.

Os espectros médios obtidos com excitação em comprimento de onda 488nm, com a inclusão do espectro do tecido histologicamente classificado como HGSIL, são apresentados na Figura 21.



**Figura 21 - Espectro médio da autofluorescência de biópsia de colo de útero com excitação de 488nm obtidos de CC, LGSIL e HGSIL.**

A intensidade do espectro de fluorescência médio do HGSIL, em relação aos espectros médios de emissão do CC e LGSIL, no comprimento de onda de 500nm, apresenta uma considerável variação, sendo os valores obtidos pelo gráfico do HGSIL:808 u.a., em contraste com 425 u.a. para CC e 447 u.a. para LGSIL (já apresentados).

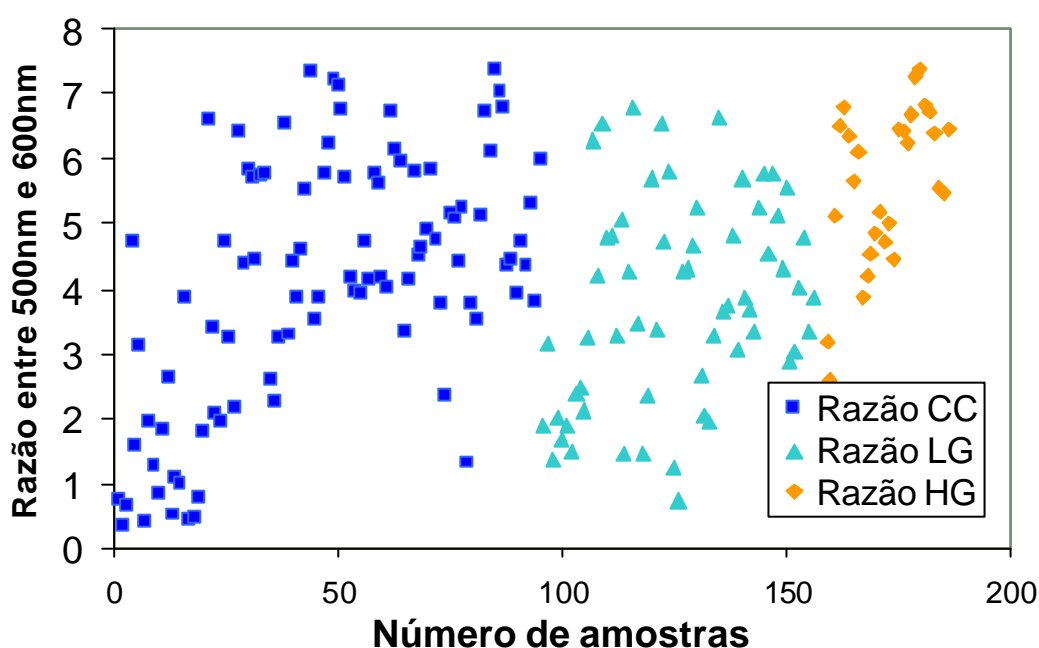
A partir do comprimento de onda de 600nm, as intensidades dos espectros de emissão médios (CC, LGSIL e HGSIL) se igualaram, com uma intensidade média aproximada de 140 u.a. (Figura 21).

Os padrões espectrais médios dos tipos de tecido CC e LGSIL apresentam características semelhantes, entretanto, o padrão espectral médio do HGSIL apresenta uma considerável diferença.

Os espectros médios apresentam um vale na região de comprimento de onda de 580nm, vale esse que é atribuído à absorção pela hemoglobina do sangue (banda de absorção Q) (JOHANSSON, 1993).



Visando obter uma forma de separar os espectros nos três tipos de tecidos CC, LGSIL e HGSIL, baseada na diferença espectral observada nos espectros médios, foi proposto o cálculo da razão entre as intensidades no comprimento de onda de 500nm pelas intensidades no comprimento de onda de 600nm dos espectros de fluorescência utilizando o software Excel. Esta razão foi então plotada em um gráfico de espalhamento com o objetivo de evidenciar as possíveis diferenças nas razões.



**Figura 22 - Razões entre as intensidades dos espectros médios entre comprimento de onda de 500 e 600nm.**

A análise do gráfico da Figura 22 evidenciou pouca diferenciação no valor das razões nas alterações estudadas de CC, LGSIL e HGSIL. Porém, observou-se uma tendência de agrupamento dos dados do HGSIL com valores de razão mais altos que os espectros de CC e LGSIL (Não HGSIL). Com esta informação resolveu-se estabelecer um novo algoritmo baseado na média aritmética das razões.

Pelo cálculo da média das razões entre as intensidades no comprimento de onda de 500nm pelas intensidades no comprimento de onda de 600nm dos três espectros (CC, LGSIL e HGSIL), obtiveram-se pontos plotados na Figura 23.

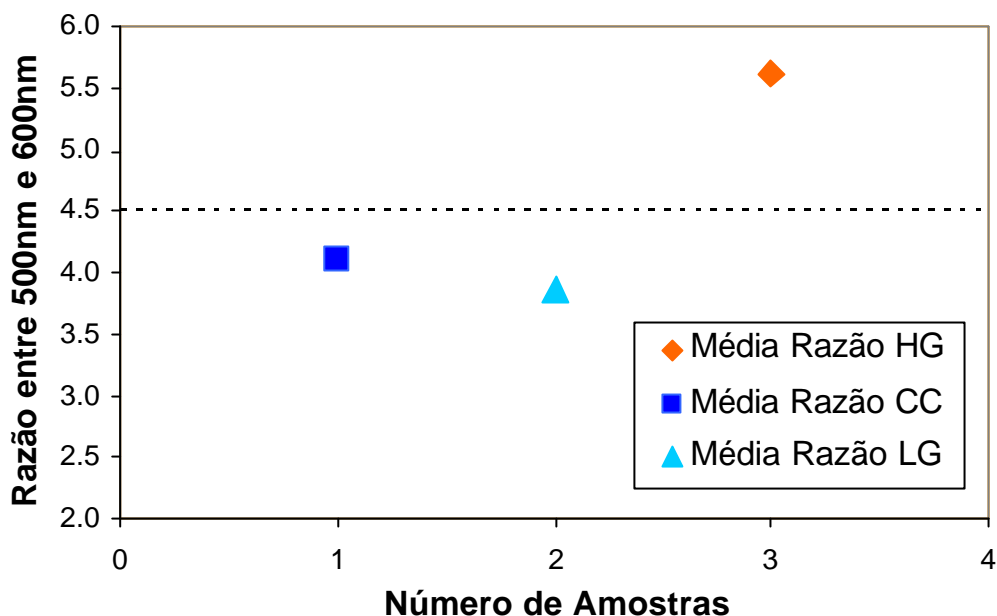
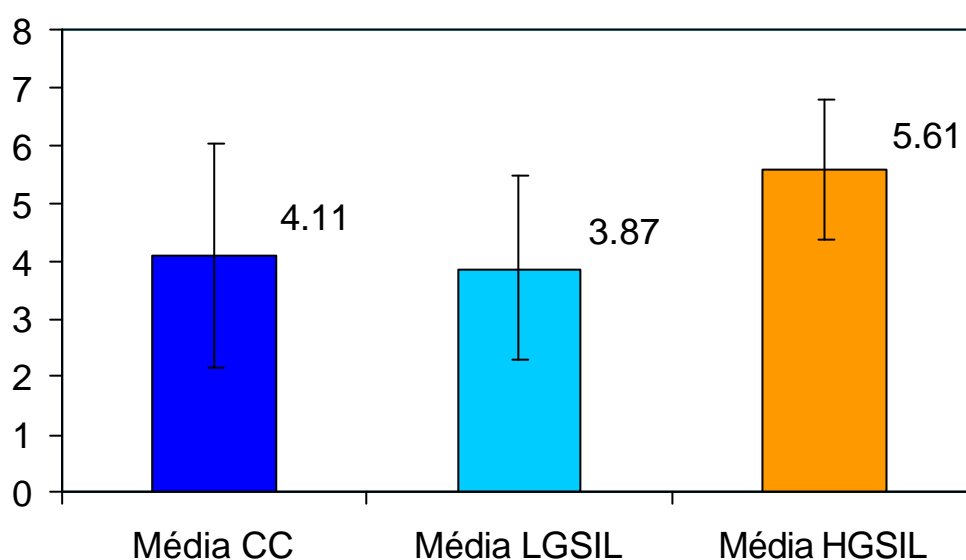


Figura 23 - Média das razões entre as intensidades dos espectros médios entre comprimento de onda de 500 e 600nm. A linha de diagnóstico (tracejada) foi empiricamente determinada em 4,5, separando os espectros médios de CC e LGSIL do espectro médio de HGSIL

A partir desta figura, pode-se desenhar uma linha que delimita as médias das razões dos espectros médios de CC e LGSIL (não HGSIL) com os HGSIL, entre comprimento de onda de 500 e 600nm, observando-se uma nítida separação entre valores obtidos para CC e LGSIL (não HGSIL) em com relação aos valores obtidos para HGSIL.

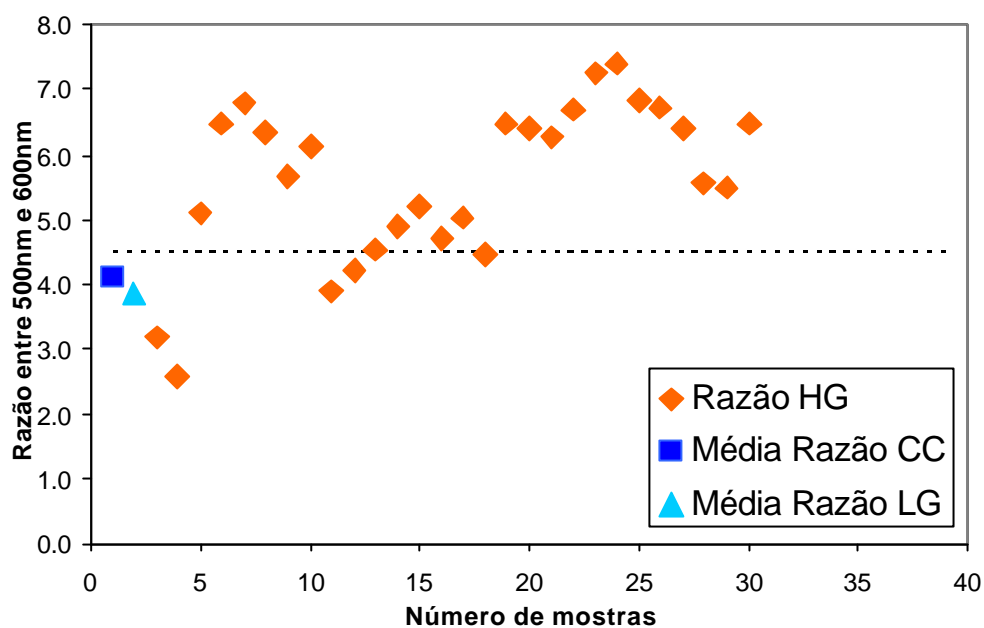
Verifica-se que as médias das razões de CC e LGSIL (não HGSIL) estão muito próximas uma da outra, com valores 4,11 e 3,87, respectivamente. Já o valor médio da razão obtido para HGSIL foi de 5,61, ou seja, 36 % acima do maior valor obtido de CC e LGSIL (Figura 23). Através dos valores das razões, calculou-se os valores do desvio padrão para CC = 1,93, para LGSIL = 1,56 e para HGSIL = 1,22.

Foi aplicado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov (programa GraphPad InStat), que pode-se verificar que os valores das razões apresentam distribuição normal (gaussiana) ( $p < 0,05$ ). O teste *t-student* (paramétrico) foi aplicado para testar a hipótese da semelhança entre os valores das razões dos três grupos (programa GraphPad InStat), onde constatou-se o alto nível de significância das amostras de CC e LGSIL (Não HGSIL), hipotetizando que são semelhantes ( $p = 0,2$ ). Relacionando a média das razões de CC e LGSIL com os tecidos do tipo HGSIL, foi encontrado um nível de significância bastante pequeno ( $p < 0,0001$ ) para as duas razões, hipotetizando que as amostras possuem características diferentes.



**Figura24 - Médias das razões de CC, LGSIL e HGSIL com seus respectivos desvios padrões.**

Pelo comportamento da média das razões obtidas dos tecidos CC e LGSIL (não HGSIL) em comparação com as razões de todos os espectros de HGSIL, e tendo a linha de separação dos grupos desenhada na Figura 23 como parâmetro de diagnóstico, obteve-se que 23 pontos estão localizados acima da linha de separação e cinco casos encontram-se abaixo da mesma. Calculou-se a sensibilidade do valor das razões de HGSIL como sendo 82% (Figura 25).



**Figura 25 - Gráfico da média das razões das intensidades dos espectros de CC e LGSIL e razão dos espectros HGSIL nos comprimentos de onda 500 e 600nm. A linha de diagnóstico (vide Figura 23) separa os espectros médios de CC e LGSIL das razões dos espectros de HGSIL**

Como a cervicite crônica é a alteração inflamatória crônica do colo do útero, muito freqüente, e não classificada como ASC ou SIL. Demonstrou-se através do teste de significância *t-student* que as razões de CC e LGSIL são iguais, não havendo diferença espectroscópica.

As razões de CC e LGSIL (não HGSIL) foram delimitadas, sendo que as localizadas abaixo da linha arbitrária foram consideradas como verdadeiro negativo, e as razões acima da linha como falso positivo. Estabeleceu-se com a utilização de um teste diagnóstico que considera a presença ou não de doença, que a especificidade de CC e LGSIL (não HGSIL) em relação ao HGSIL foi de 60% (Figura 26).

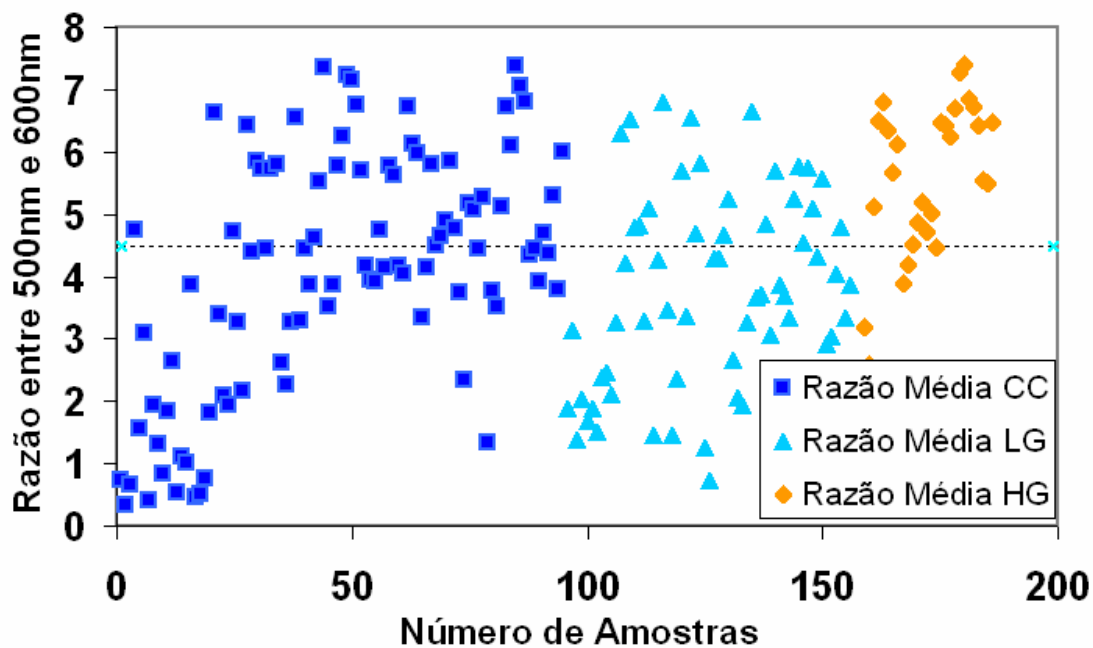


Figura 26 - Razões entre as intensidades dos espectros nos comprimentos de onda de 500 e 600nm. A linha de diagnóstico separa as razões dos espectros médios de CC e LGSIL em falso positivo e verdadeiro negativo, e de HGSIL em verdadeiro positivo e falso negativo.

**DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

Foram encontrados 54% de CC, 33% de LGSIL e 13% de HGSIL de 97 biópsias de pacientes com atipias e lesões intra-epiteliais escamosas de colo de útero diagnosticadas anteriormente pelo colpocitologia oncótica

Nas análises histológicas das biópsias, nota-se que ocorre uma perda do padrão estratificado regular, proporcionalmente à piora da lesão intra-epitelial, com aumento da proporção núcleo citoplasma e grande variação quanto a forma e tamanho, além do aumento da atividade mitótica. Sendo outro parâmetro de evolução das lesões, à medida que se evolui de CC para LGSIL e para HGSIL, é o comprometimento da camada do epitélio cervical. No acometimento do 1/3 profundo-LGSIL (NIC I - displasia leve), quando compromete os 2/3 profundo - HGSIL (NIC II - displasia moderada) e quando compromete todas as camadas chamamos de HGSIL (NIC III - displasia grave/carcinoma *in situ*) (MATTOS, 2006).

Nestas três alterações, a membrana basal está intacta, isto é, não há invasão da matriz extracelular. Quando esta invasão ocorre, é chamado de carcinoma invasivo, no qual as células tumorais ganham acesso aos vasos sanguíneos e linfáticos, que é a rota para disseminação para outros locais (STEVENS; LOWE, 2001).

Após a excitação das amostras de biópsias com laser em comprimento de onda de 488nm e a obtenção dos espectros de fluorescência, os espectros foram separados de acordo como a alteração obtida no exame histopatológico: CC, LGSIL e HGSIL.

A média da idade dos pacientes foi de 32,8 anos, reforçando o conceito de que a idade de incidência de câncer está diminuindo, e vem cada vez mais acometendo a população jovem (DERCHAIN et al., 1991). Este fato deve-se ao aumento da incidência de Papilomavirus Humano (LORINEZ et al., 1992). O pré-câncer e o câncer de colo de útero podem, no entanto, acometer qualquer idade, inclusive acima de 65 anos (FAHS et al., 1992). Esta afirmação justifica o desvio padrão de 12,4 anos em relação à idade das pacientes dessa pesquisa.

Sabe-se que a colpocitologia oncótica (esfregaço cervico-vaginal) é um exame de rastreamento, e que necessita de exames comprobatórios, sendo o

exame histopatológico que realmente oferece diagnóstico. Na colpocitologia oncótica a alteração mais freqüente e mais prevalente é a ASC-US. A conduta neste caso é controversa, uma vez que já pode estar presente qualquer outra alteração mais grave, e que eventualmente pode estar sendo tratada como uma patologia de menor gravidade. Nesta pesquisa, 68,7% dos esfregaços apresentaram alterações ASC-US, e destes 69,2% foram diagnosticados como CC, 29,2% como LGSIL e 1,6% como HGSIL.

Em relação às outras alterações encontradas na colpocitologia oncótica e sua correspondência com o exame histopatológico, obteve-se que as alterações LGSIL corresponderam a 40% de CC, 60% de LGSIL e 0% de HGSIL. No estudo de Nordestron (2001), essa correspondência foram respectivamente 51%, 24% e 25%.

Nas citologias HGSIL, a correspondência foi 9,1% para CC, 27,3% LGSIL e 63,6% HGSIL, sendo que para Nordestron (2001) esta correspondência foi respectivamente de 16%, 26% e 58%.

Em razão das discrepâncias observadas entre as citologias e sua correspondência histopatológica nas diversas alterações e atipias nos trabalhos de vários autores, o desenvolvimento da espectroscopia de fluorescência como um método diagnóstico imediato, seguro, confiável e eficaz, muito provavelmente traria diminuição dos procedimentos invasivos, fornecendo uma conduta mais adequada e imediata, evitando, dentre outros, sofrimento humano e custos.

Em relação à análise pela espectroscopia de fluorescência das peças de biópsias, notou-se que na média dos espectros de CC e LGSIL eram muito semelhantes tanto em intensidade quanto em padrão espectral, havendo apenas uma diferença de intensidade não relevante entre 500 e 600nm (Figura 21).

Baseado neste trabalho pode-se afirmar que, em relação ao gráfico dos espectros médios da intensidade versus comprimento de onda, não é possível a diferenciação entre CC e LGSIL. Isto provavelmente se deve ao fato de que o material para biópsia foi retirado na JEC, ou seja, na transição do epitélio pavimentoso/colunar, onde predomina tecido glandular vascularizado, ocasionando absorção de parte da luz emitida, resultando em espectros de CC e LGSIL próximos.



Ao excitar separadamente *in vivo*, tecido do epitélio colunar, escamoso e lesões intra-epiteliais, em comprimento de onda de 460nm, Ramanujam et al. (1996), obtiveram espectros de fluorescência de LGSIL e de epitélio colunar bastante parecidos.

Ao analisar-se conjuntamente os espectros dos três gráficos médios (CC, LGSIL e HGSIL) resultantes da emissão de fluorescência nas biópsias de colo de útero, nota-se uma diferença considerável do espectro de HGSIL em comparação a LGSIL e CC, sendo que esta variação de intensidade é mais importante na região de comprimento de onda de 500 a 600nm. No entanto, houve uma diferenciação do espectro médio de HGSIL em relação à CC e LGSIL.

Através do valor da razão das intensidades 500nm e 600nm dos espectros das alterações estudadas, não foi possível uma definição diagnóstica, pois estas se mostravam com alto grau de variações, inclusive com sobreposições, semelhantes ao trabalho de Ramanujan et al. (1996).

As diferenças entre os espectros CC, LGSIL e HGSIL foram também analisadas através da média das razões entre as intensidades dos espectros em comprimento de onda 500 e 600nm. (Figura 23). Traçando-se uma linha de separação pode-se afirmar que as médias das razões de CC e LGSIL estão próximas e abaixo da linha, e que a razão média de HGSIL está acima desta linha.

Avaliando-se também a média das razões dos espectros CC e LGSIL em comparação aos valores da razão de HGSIL (Figura 25), e baseado na linha de separação, pode-se afirmar que existe uma capacidade de diferenciação de HGSIL com sensibilidade de 82%.

A especificidade de 60%, foi calculada baseada nas razões de CC, LGSIL e HGSIL, delimitada pela linha arbitrária, sendo as razões de CC, LGSIL e HGSIL, abaixo da curva considerados verdadeiro negativo e falso negativo respectivamente, e as razões de CC e LGSIL acima da curva como falsos positivos, ou seja, pode se afirmar que 60% das pacientes estão sadias e a Espectroscopia de fluorescência reafirma esse resultado.

Avaliando-se os espectros médios de todas as alterações e notadamente a de HGSIL, verificou-se um perfil de intensidade diferenciado nos comprimentos de

ondas entre 500 e 600nm. Esse resultado é embasado por inúmeros trabalhos que atestam a capacidade da espectroscopia de fluorescência de diferenciar lesões intra-epiteliais do colo do útero, uma vez que variações no padrão de intensidade e perfil da fluorescência ocorrem em função de aumento da atividade metabólica dos fluoróforos NAD(P)H e FAD e colágeno, sendo o NAD(P)H presente na mitocôndria o mais importante deles, alterações estas presentes nas lesões HGSIL (DREZEC et al., 2001; DREZEC et al., 2001; GEORGAKOUDI et al., 2002; GEORGAKOUDI et al., 2002; SOKOLOV; FOLLES; RICHARD-KORTUM, 2002; PAVLOVA et al., 2003).

Nesta pesquisa foi possível, através dos espectros médios da fluorescência e das médias das razões das três alterações intra-epiteliais, diferenciarem a lesão intra-epitelial de alto grau da cervicite crônica e da lesão intra-epitelial de baixo grau. Não foi possível, no entanto, diferenciar cervicite crônica de lesão intra-epitelial de baixo grau, pois ambas tem perfis semelhantes de emissão nos comprimentos de onda a partir de 500nm. Estas hipóteses foram confirmadas quando se calculou os níveis de significância dos resultados das razões de CC com LGSIL, de CC com HGSIL e LGSIL com HGSIL, utilizando-se o teste estatístico de *t-student*.

Na área médica, essa diferenciação é oportuna e importante, uma vez que na CC (benigno), a paciente deverá continuar a se submeter a rastreamento por esfregaço cervico-vaginal a cada ano. Na LGSIL, que em 90% das pacientes se deve a infecção por Papilomavirus Humano, a conduta clássica é a de seguimento com colpocitologia oncótica de 6 em 6 meses até que a lesão regrida, o que normalmente ocorre em 60 a 70% dos casos para Mattos (2006) e em 47% dos casos para Melkinov et al. (1998), após 24 meses.

Entretanto, a conduta no HGSIL exige a realização de procedimentos complementares imediatos, na maioria cirúrgica, uma vez que essa alteração pode ensejar uma NIC II, NIC III e até um carcinoma *in situ*, situações nas quais condutas em tempo hábil são primordiais para a cura.

A espectroscopia de fluorescência se apresenta como um exame rápido e efetivo, podendo em futuro próximo constituir um meio diagnóstico eficaz, evitando procedimentos muitas vezes agressivos e desnecessários. A utilização de espectrofluorímetros com múltiplos comprimentos de onda de excitação, especialmente nos comprimentos de ondas menores que 488 nm, possibilita uma melhor diferenciação diagnóstica, basicamente nos comprimentos de onda que excitem a autofluorescência em 400, 440, 460 e 515nm. Esses comprimentos de onda são conhecidos na literatura como ideais para emissão de colágeno, NADH e FAD, respectivamente (RICHARD-KORTUN; SEVICK-MURACA, 1996).

**CONCLUSÃO**

## 7 CONCLUSÃO

A espectroscopia de fluorescência, em comprimento de onda de 488nm, aplicada ao diagnóstico de alterações e lesões intra-epiteliais de colo de útero, pode oferecer importante informação para a diferenciação diagnóstica entre a lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HGSIL), de lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LGSIL) e cervicite crônica (CC).

Este trabalho demonstrou diferenças significativas para diagnóstico de HGSIL, em comparação com CC e LGSIL (não HGSIL), pela avaliação do perfil médio de intensidade dos espectros, bem como da análise das razões e médias das razões entre dois pontos do espectro (500 e 600nm). No entanto, a diferenciação entre CC e LGSIL somente pôde ser feita através da análise histopatológica.

Esta possibilidade indica a necessidade de realização de novas pesquisas visando à determinação dos comprimentos de onda ideais para a utilização nos tecidos cervicais, possibilitando a melhora no resultado diagnóstico para CC e LGSIL.

## REFERÊNCIAS

AGRAWAL A., et al. Fluorescence Spectroscopy of the Cervix: Influence of Acetic Acid, Cervical Muçus, and Vaginal Medications. **Lasers surg. med.**, v.25, p. 237-249, 1999

ALBERTS, B., et al. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ANDRADE, J.M., MARANA, H.R.C., Lesões Pré-Neoplásicas do Colo do Útero. In: OLIVEIRA, H. C.; LEMGRUBER, I. -**Tratado de Ginecologia da Febrasgo**, Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

AUGUST, N. Cervicography for evaluating the [quot ]atypical[quot ] Papanicolaou smear. **J. reprod. med.**, Chicago, v.36, n.2, p.89-94, 1991.

BEAGLEHOLE R.; BONITA R.; KJELLTRÖN T. **Epidemiologia Básica**. 2º ed, São Paulo: Ed. Santos, 2003

BERG, A.O.; ARKINS, D. Screening fo cervical cancer. Recommendations and Rationale. **US Preventive Service Task Force. AHRQ Pub.** , n. 03-515A, January, 2003.

BOLIC D., HELLMAN D.J., Laboratory implementation andi efficacy assesment of ThinPrep cervical cancer screening system. **Acta Cytol.**, Baltimore, v. 42, p. 209-213, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Câncer do colo de útero**. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=326](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=326)>. Acesso em: 27 ago. 2006.

CRUM, C. P. Aparelho genital feminino. In: ROBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

DAVEY, D. D., et al. Atypical epithelial cells and specimen adequacy. Current laboratory practices of participants in the College of American Pathologist Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. **Arch. pathol. lab. med.**, Chicago, v.124, p.203-211, 2000.

DECLERCK, Y.A. Interactions tetween tumour cells and stromal cells and proteolyt modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. **Eur. j. câncer**, Oxford, v. 36, p.1258-1268, 2000.

DERCHAIN, S.F.M et al. Infecção por papilomavírus humano e neoplasia intra-epitelial cervical em adolescentes. **J. bras. ginecol.**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 11/12, p. 499-503, 1991.

DREZEC, R. et al. I. Autofluorescente microscopy of fresh cervical-tissue sections reveals alterations in tissue biochemistry with dysplasia. **Photochen. Photobiol.**, v. 73, p. 636-641, 2001.

DREZEC, R. et al. U. Understanding the contributions of NADH na cikkagen to cervical tissue fluorescence spectra: modelling, measurements , and inplications. **J. biomed. Opt.**, v. 6, p. 385-396, 2001.

ELTABBAKH, G.H., et al. Significance of atypical squamous cells of undertemined significance on ThinPrep Papanicolaou smears. **Obstet. gynecol.**, Hagerstown, v. 79, p. 44-49, 2000.

FAHS, M.C., et al. Cost effectiveness of cervical cancer screening for the elderly. **Ann. intern. med.**, Philadelphia, v.117, n. 6, p. 520-527,1992.

GEORGAKOUDI, I., et al. NAD(H)P and Collagen as *in Vivo* Quantitative Fluorescent Biomarkrs of Epithelial Precancerous Chances. **Cancer res.**, Baltimore, v. 62, p.682-687, 2002.

GEORKAKOUDI, L.; et al. Trimodal spectroscopy for the detection and characterization of cervical precanceres in vivo. **Am. j. obstet. Gynecol.**, v.186, p.374-382, 2002.

GLASSMAN W.S. et al. Ultraviolet excited fluorescence spectra from nom-malignant tissues of the gynecological tract. **Laser in the Lifes Sciences**, v. 5, p. 49-58,1992.

GOMPEL, C.; KOSS L, G. **Citologia do Aparelho genital: citologia ginecológica e suas bases anatomo-clínicas**. São Paulo: Manole, 1997.

GRIFFITHS, C.T. et al. **Triagem de Moléstia Pré-Invasiva: Oncologia ginecológica**. São Paulo: Artes Médicas, 1997

HARTMANN, M.D., et al. **Screening for a Cervical: Systematic Evidence Review**. N. 25. Rockville, MF: Agency for Health Care Research and Quality, 2002. (Prepared by: Research Triangle Institute/University of North Carolina 3040 Evidence-based Practice Center under contract No. 290-97-0011). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=hstat3.chapter.4180>>. Acesso em: 23 jul. 2006

HATCH, K.D.; HACKER, N.F. Doença intra-epitelial do colo, vagina e vulva. In: BEREK, J. S.; ADASHI, E. Y.; HILLARD, P. A. **Tratado de ginecologia**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

HORTA, A.L.A. Colpocitologia. In: OLIVEIRA, H. C.; LEMGRUBER, I. **Tratado de Ginecologia da Febrasgo**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

JACYINTO C. Propedêutica Complementar - Indicações e Descrição dos Métodos (Colposcopia, Vulvoscopia e Pensicopia) In: OLIVEIRA, H. C.; LEMGRUBER, I. **Tratado de Ginecologia da Febrasgo**, Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

JOHANSSON, J. **Fluorescence Spectroscopy for Medical and Enviromental Analysis**, Tese (Doutorado) Lund Institute of Technology, Suecia 1993.

JONES, D.E., et al. Evaluation of the atypical Pap smear. **Am. j. obstet. gynecol.**, St. Louis, v.157, n.3, p. 544-549, 1987.

KINNEY, W.K, et al. Where's the hight-grade cervical neoplasia ? The importance of the minimally abnormal pap smear. **Obstet. gynecol.**, Hagerstown, v. 92, p. 973-976, 1998.

KURMAN R.J. et al. The National Cancer Institute Workshop. Interim. guidelines for management of abnormal cervical cytology. **JAMA**, Chicago, v. 271, p.1866-1869, 1994.

KURMAN, Sistema Bethesda uma Perspectiva Histórica. In: SOLOMOM, D; NAYAR, R. **O sistema Bethesda para citopatologia cervicovaginal** : Definição, Critérios e Notas Explicativas. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.

LACHMAN, M. F.; CAVALLO- CALVANESE, C. Qualification of atypical squamous cells of undetermined significance in an independent laboratory: is it useful or significant? **Am. j. obstet. gynecol.**, St. Louis, v.179, n. 2, p. 421-429, 1998.

LEE, N.; KIM, D.; PARK, J.T.; KIM, A. Is the human papillomavirus test in combination with the papillomavirus test useful for management of patients with diagnoses of atypical squamous cells of undetermined significance/low grade squamous intraepithelial lesions? **Arch. pathol. lab. med.**, Chicago, v 125, p.1453-1457, Nov. 2001

LOHMANN W et al. Native fluorecence of the cervix uteri as a marker for dysplasia and invasive carcinoma. **Eur. j. obstet. gynecol. reprod. biol.**, v. 31, n. 3, p. 249-53, 1989.

LONKY, N.M., et al. The clinical significance of the poor correlation of cervical dysplasia and cervical malignancy whit referral cytologic results. **Am. j. obstet. gynecol.**, St. Louis, v.181, n.3, p. 560-566, 1999.

LORINEZ, A.T.et al. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obstet. gynecol**, Hagerstown, v.79, n.3, p.328-337, 1992.

MAHADEVAN, A, et al. Study of the fluorecence properties of normal and neoplastic human cervical tissue. **Lasers surg. med.**, v.13, n.6, p.647-655, 1993.



MANOS, M. M et al. Identifying women with cervical neoplasia: Using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.281, p.1605-1610, 1999.

MARCOS, J. B., **Colposcopia e Patologia Cervical**, São Paulo: Fundação BYK, 1997

MATTOS, M.C.F.I., In: MONTENEGRO, M.R; FRANCO, M., **Patologia: processos gerais**, 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006

MCCRORY, D. C., et al. Evaluation of Cervical Cytology. **Evid. Rep. technol. Assess (Summ)**, n. 5, p.1-6, Jan. 1999. (. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=hstat1.chapter.6794>>. Acesso em: 23 Jul. 2006.

MELNIKOV, J., NUOVO J., WILLIAN A.R., Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. **Obstet. gynecol**, Hagerstown, v. 85, p. 727-735, 1998.

MILLER A. B., et al., Report on consensus conference on cervical cancer screening and management. **Int. j. cancer**, New York, v. 86, n.3, p. 440-447, 2000.

NASIEL, K.; ROGER, V.; NASIELL, M. Behavior of mild cervical dysplasia during a long-term follow-up. **Obstet. gynecol**, Hagerstown, v. 67, n.5, p. 665-669, 1986.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer of the cervix uteri**. Disponível em: <<http://seer.cancer.gov/staffacts/html/cervix.html>>. Acesso em: 23 jul. 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. The revised Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses : Report of the 1991 Bethesda Workshop. **Acta Cytol.**, Baltimore, v. 36, p. 73-275, 1991.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Cervical Cancer. **NIH Consensus Statement**, v. 14, p.1-38, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=hstat4.chapter.15709>>. Acesso em: 23 Jul 2006

NETO J.B.L. **Atlas de citopatologia e histopatologia do colo uterino**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000.

NORDSTROM, R. J.; BURKE, L.; NILOFF, J. M.; MYRTLE, J. F. Identification of cervical intraepithelial neoplasia (cin) using UV - Excited Fluorescence and diffuse - reflectance tissue spectroscopy. **Lasers surg. med.**, New York, v. 29, p.118-127, 2001

NOUMOFF, J. S. Atypia in cervical cytology as a risk factor for intraepithelial neoplasia. **Am. j. obstet. gynecol.**, St. Louis, v.157, n.3, p.628-631, 1987.

PAVLOVA, I. et al. Microanatomical and biochemical origins of normal and precancerous cervical autofluorescence using laser scanning fluorescence confocal microscopy. **Photochem. photobiol.**, Oxford, v. 77, p.550-5, 2003.

PEDROSA, M.L. et al.. Atipias escamosas de significado indeterminado: uma revisão da literatura. **DST j. bras. doenças sex. transm.**, Rio de Janeiro, v.15, n. 4, p. 46-51, 2003.

PEREYRA, E.A.G. et al. **Atlas de colposcopia**. São Paulo: Fundação BYK, 1995.

RAMANUJAM, N. et al. Cervical Precancer Detection Using a Multivariate Statistical Algorithm Based on Laser-Induced Fluorescence Spectra at Multiple Excitation Wavelengths. **Photochemistry and Photobiology**, Austin, v.64, n.4, p. 720-735, 1996

RAMANUJAM, N. et al. *In vivo* diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser-induced fluorescence. **Medical Science**, Houston, vol. 91, pp. 10193-10197, 1994.

RICHARD-KORTUN R.; SEVICK-MURACA E. Quantitative Optical Spectroscopy for Tissue Diagnosis. **Amnu. Rev. Phys. Chem.** Austin, v. 47: p. 555-606, 1996

RIES, L.A. et al., **SEER cancer statistics review 1973 -1996**. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1999.

RIVOIRE, K., et al. The effects of repeated spectroscopic pressure measurements on fluorescence intensity in the cervix. **Am. j. obstet. gynecol.**, St. Louis, v. 191, p. 1606-1617, 2004

RIVOIRE, K. et al., The effects of repeated spectroscopic pressure measurements on fluorescence intensity in the cervix. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Houston: Elsevier, v.191, p. 1606-1617, 2004.

SANTOS, A. L. F., et al. Resultados histológicos e detecção do HPV em mulheres com células escamosas atípicas de significado indeterminado e lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau na colpocitologia oncológica. **Rev. bras. ginecol. obstet.**, Rio de Janeiro, v.21,n.1, p. 457-462, 2004.

SANTOS, A. L. Performance of cervical cytology with review by different observers and hybrid capture II in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia grades 2 and 3. **Cad. saúde pública**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p. 1029-1037, 2003.

SCHIFFMAN, M. H. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 84, p.398-399, 1992.

SHERMAN, M. E., et al. Células Escamosas Atípicas. In: SOLOMOM, D; NAYAR, R. **O sistema Bethesda para citopatologia cervicovaginal** : Definição, Critérios e Notas Explicativas. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.

SHLAY, J. C. et al. Prediction of cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3 using risk assessment and human Papillomavirus testing in women with atypia on papanicolaou smears. **Obstet. Gynecol.**, Hagerstown, v. 96, p. 410-416, 2000.

SILVA, S. M. M. Detecção do DNA-HPV e carga viral associada a Colposcopia com fatores preditivos de lesões histológicas em mulheres com atipia de células escamosas: ASC na colpocitologia. **DST j. bras. doenças sex. transm.**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 6, p.18-21, 2002.

SILVEIRA JUNIOR, L. et al. Detecção de lesões neoplásicas induzidas em mucosa oral de hamster utilizando espectroscopia de fluorescência. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v.50, n.3, p.297-301, 2004.

SMITH, R. A., et al, American Cancer Society Guideline for the Early Detection of Cervical Neoplasia and Cancer. **CA cancer j. clin.** New York, v. 52, n.1, p.8-22, 2002.

SOKOLOV, K.; FOLLEN, M.; RICHARD-KORTUM, R. Optical spectroscopy for detection of neoplasia. **Elsevier Science Ltd.** Austin, vol. 6: p. 651-658, 2002.

SOLOMOM, D.; NAYAR, R. **O sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal**: Definições, Critérios e Notas Explicativas. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.

SOLOMON, D. et al. Terminology for reporting Results of Cervical Cytology. **J Am. Med. Ass.**, Chicago, v. 87, p.2114-2119, 2002.

SOLOMON, D.; SCHIFFMAN, M.; TARONE, R. Comparison of three management strategies for patients with atypical cells squamous of undetermined significance: baseline results from a randomized trial **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v.93, p.293-299, 2001.

STEVENS A.; LOWE J. **Histologia Humana**: Células Epiteliais. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001

SYRJANEM, K. et al., Comparing PAP smear cytology, aided visual inspection, screening colposcopy, cervicography and HPV testing as optional screening tools in Latin America study design and baseline data for the LAMS study. **Anticancer res.**, Athens, v. 25, n. 5, p.3469-3480, 2005.

TRINDADE, E. S. Etiopatogenia, Diagnóstico e Estadiamento do Colo do Útero. In: OLIVEIRA, H. C.; LEMGRUBER, I.; **Tratado de Ginecologia da Febrasgo**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001

UNION INTERNATIONALE CONTROL LE CANCER - **UICC. Global Câncer Control**. 2006. Disponível em: < <http://www.uicc.org/index.php?id=1848>>. Acesso em: 09 set. 2006.

WEINGANDT H. et al. Autofluorescencia spectroscopy for the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. **Int. j. gynaecol. obstet.**, Baltimore, v. 109, p. 947-951, 2002.

WRIGHT, T. C.; GATSCHA, R. M.; LUFF, R. D.; PREY, M. U. Anormalidades epiteliais: escamosas. In: SOLOMOM, D; NAYAR, R. **O Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal** : Definição, Critérios e Notas Explicativas. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.

WRITH, T. C.; SUM, X. W.; KOULOS J. Comparison of management algorithms for the evolution of women with low grade cytology abnormalities. **Obstet. Gynecol.**, Hagerstown, v. 85, p. 202-210, 1995

WU, Y., et al., Depth-resolved fluorescence spectroscopy of normal and dysplastic cervical tissue. **Opt. express**, New York, v.13, n. 2, p. 382, 2005.

YOUNG, N. A. et al. Achados não-neoplásicos. In: SOLOMOM, D; NAYAR, R. **O Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal** : Definição, Critérios e Notas Explicativas. 2. ed. Rio de Janeiro : Revinter, 2005.

ZANGARO, R. A., et al. Rapid multiexcitation fluorescence spectroscopy system for *in vivo* tissue diagnosis. **App. opt.**, New York, v.35, n. 25, p. 5211-5219, 1996.

ZANINETTI, P. et al. Characteristics of women under 20 with cervical intraepithelial neoplasia. **Int. j. epidemiol.**, London, v. 15, p. 477-482, 1986.

## APENDICE A - Comparação entre sistema Bethesda, Papanicolaou, sistema NIC e Displasia

Quadro 1 - Comparação entre Sistema Bethesda, Papanicolaou, Sistema NIC, e Displasia

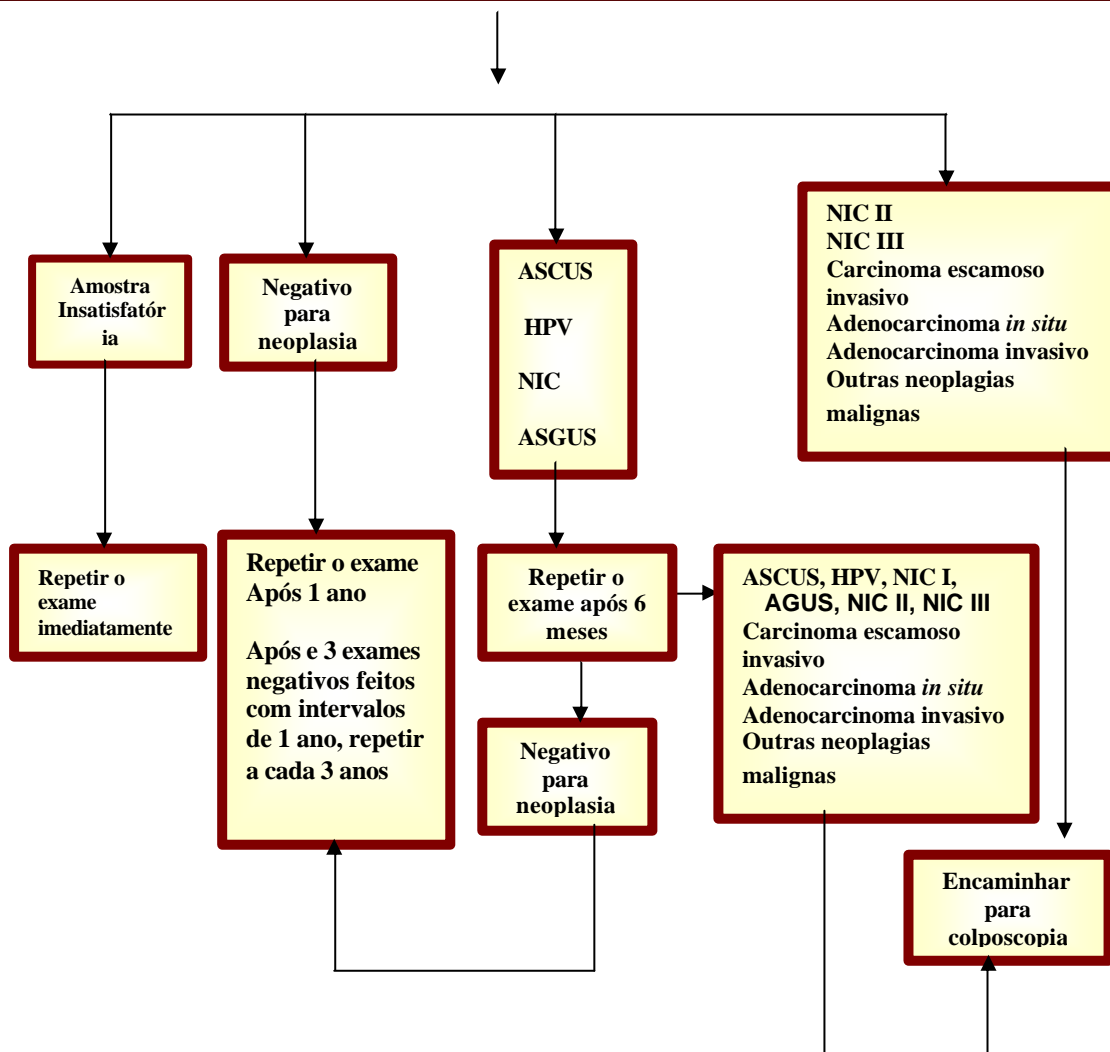
CLASSES PAPANICOLAOU	DESCRIÇÃO	GRADAÇÃO NIC	SISTEMA BETHESDA
I	Normal	Normal	Normal
II	Atipia reativa / inflamatória	Atipia	Normal
II / III	Atipia suspeita	Atipia	ASCUS
II / III	Atipia com HPV	Atipia, atipia condilomatosa ou coilocitótica	SIL de baixo grau (LSIL)
III	Displasia leve	NIC I	SIL de baixo grau (LSIL)
III	Displasia moderada	NIC II	SIL de alto grau (HSIL)
III	Displasia acentuada	NIC III	SIL de alto grau (HSIL)
IV	Carcinoma <i>in situ</i>	NIC III	SIL de alto grau (HSIL)
V	Câncer invasivo	Câncer invasivo	Câncer invasivo

Correspondência entre Sistema Papanicolaou, OMS, Gradação NIC (Richard) e Sistema Bethesda.

Fonte: Montenegro; Franco (2006)

## APENDICE B - Condutas Clínicas após o exame

# CONDUTAS CLÍNICAS APÓS O EXAME Colpocitologia do colo do útero



Fluxograma de seguimento de pacientes baseado no resultado de colpocitologia oncológica

Fonte: Ministério da Saúde (2005).

## ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

#### DECLARAÇÃO

Declaro que o Protocolo n.º L208/2005/CEP, teve o título alterado para “*Uso da Espectroscopia de Fluorescência, em 488nm, para diferenciação diagnóstica em biópsias de colo de útero de pacientes com colpocotologia atípica*”, sob a responsabilidade do Prof. Landulfo Silveira Jr, e encontra-se **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa, conforme correspondência encaminhada a este CEP nesta data.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação, em novembro de 2005.

**PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR**

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Univap

## ANEXO B - TERMO DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL

### Autorizações Institucionais



**PREFEITURA DE FERNANDÓPOLIS**

CNPJ 47.842.836/0001-05  
www.fernandopolis.com.br



Fernandópolis, 14 de Outubro de 2005.

OFÍCIO Nº 555/2005 – DMS.

EMENTA: Autorização para utilização das Unidades de Saúde para pesquisa.

A DIRETORIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE FERNANDÓPOLIS, por intermédio de seu Diretor, o Sr. Dr. AVENOR ESMENIO BIM, vem por meio deste, declarar para quaisquer fins que AUTORIZA, conforme solicitação do Sr. Dr. ADEMIR BARIANNI RODERO, mestrado de bioengenharia, da Universidade do Vale do Paraíba/SP, o uso pelo mesmo da estrutura físico-funcional das Unidades de Saúde do Município, a saber: PSF –Caic \* Dr. Antonio Milton Zambom\*, Rua Benedita Cruz nº 747, Bernardo Pessuto, PSF "André Malavazzi", Rua: E nº 12, Cecap, PSF – "Germano Hernandes" – Araguata, Rua das Araras nº 106, Jd. Araguata, PSF – Ipanema: "Carlos Gandolfi", Rua Ailton Marques de Souza nº 269, Jd. Ipanema, PSF – "Uirapuru", Av. Anhanguera nº 577, Uirapuru, PSF – "Paulo Sano", Rua Pastor Alcides Pereira de Souza nº 174, CDHU Albino Mininel, U.B.S Por do Sol – "Dr. Gercino Mazzi", Av. Pedro Ferrari nº 1595, Jd. Por do Sol, U.B.S "Waltrudes Baraldi", Av. da Saudade nº 1011, Jd. Planalto, U.B.S Brasilândia: " Dr. Alexandre Zilenoviski", Av. Carlos Barozi Nº 515, Brasilândia, U.B.S " Antonio Santilho" Cohab, Av. Paulino M. Duran nº 319 Cohab Antonio Brandini, U.B.S Brasilândia, rua das Américas nº 765 – centro, Distrito de Brasilândia, U.B.S \* José Verissimo de Mendonça Filho", Rua Pernambuco nº 3728, Jardim Guanabara, para 'O uso da Espectroscopia de Fluorescência para diferenciação diagnóstica em biópsia de colo uterino de pacientes com colpocitologia atípica'.

Atenciosamente,

DR. AVENOR ESMENIO BIM  
Diretor Municipal de Saúde



## ANEXO C – CADIP

**PREFEITURA DE FERNANDÓPOLIS**CNPJ 47.842.836/0001-05  
www.fernandopolis.com.br

Fernandópolis, 14 de Outubro de 2005.

OFÍCIO N. 556/2005 – DMS.

EMENTA: Autorização para utilização físico-funcional do CADIP para pesquisa.

A Diretoria Municipal de Saúde de Fernandópolis, por intermédio de seu Diretor, o Sr. Dr. Avenor Esmenio Bim, e o Sr. Dr. Márcio César Reino Gtaggini, médico-chefe-coordenador do CADIP – Centro Atendimento a Doenças Infecto-Contagiosas e Parasitárias, vem por meio deste, declarar para quaisquer fins que autorizam, conforme solicitação do Sr. Dr. Ademir Barianni Rodero, mestrado de Bioengenharia, da Universidade do Vale do Paraíba/SP, o uso pelo mesmo da estrutura físico-funcional do CADIP – Centro de Atendimento a Doenças Infecto-Contagiosas e Parasitárias, para desenvolvimento de sua pesquisa intitulada: 'O uso da Espectroscopia de Fluorescência para diferenciação diagnóstica em biópsia de colo uterino de pacientes com colpocitologia atípica'.

Atenciosamente,

DR. AVENOR ESMENIO BIM  
Diretor Municipal de SaúdeDR. MÁRCIO CESAR REINO GAGGINI  
Médico-Chefe-Coordenador

## **ANEXO D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

### **1. IDENTIFICAÇÃO DA PESQUISA**

Titulo da Pesquisa : O uso da espectroscopia de fluorescência, em ? 488 nm, para diferenciação diagnóstico em biópsia de colo de útero de pacientes com colpocitologias citologias atípicas

Pesquisador : Ademir Barianni Rodero

Orientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Junior

Endereço do Pesquisador: Rua Rio de Janeiro , nº 2055, Centro

CEP: 15600.000 Fernandópolis/SP

Telefone do Pesquisador: (17) 3442-3266

### **2. INFORMAÇÕES AOS SUJEITOS DA PESQUISA**

Você esta sendo convidada a participar de uma pesquisa sobre um exame do colo do útero.

Nós estamos preocupados em estudar este assunto, pois o câncer de colo de útero é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres no Brasil. O câncer do útero é a quarta causa de morte por câncer entre as mulheres.

O Papanicolaou é o exame usado no Brasil para descobrir o câncer de colo de útero ainda no começo, tornando o tratamento mais fácil e com resultados melhores. As mulheres de 25 a 59 anos devem realizar este exame 1 vez por ano, e após 2 exames pode realizar a cada 3 anos.

O resultado deste exame pode mostrar que a mulher não tem nenhuma alteração, ou que ela tem câncer e ainda mostrar que ela tem algumas alterações, que pode ser apenas uma inflamação ou já estar caminhando para um começo de câncer.

Neste caso, destas alterações o Ministério da Saúde orienta o médico para esperar 6 meses e pedir outro exame de Papanicolaou para a mulher, neste momento você esta nesta condição.

Acreditamos que seja importante pesquisar e descobrir formas fáceis, que causem pouco desconforto para a mulher e permita descobrir logo se esta alteração do colo do útero é apenas uma inflamação ou pode ser um começo de câncer.

É isso que estamos querendo pesquisar, e por isso estamos convidando várias mulheres para participarem da pesquisa. Queremos deixar claro que você tem toda liberdade de se recusar a participar e garantimos que isso não lhe trará prejuízos na assistência médica na sua unidade de saúde.

Caso resolva participar, eu farei uma biópsia do colo do seu útero. A biópsia é um exame, de rotina, em que você fica na mesma posição do exame Papancicolaou. Depois que a mulher esta nessa posição, o médico tira um pequeno pedaço do colo do útero.

A mulher não precisa tomar anestesia, ela não sente dor, apenas um pequeno desconforto. Pode ser que após a biópsia você tenha um pequeno sangramento, neste caso o médico coloca um tampão na vagina, e após 2 a 4 horas, a própria mulher o retira.

Este pedacinho do colo do útero das mulheres que concordarem em participar da pesquisa será levado para a Universidade do Vale do Paraíba, em São José dos Campos/SP onde será examinado em um aparelho novo.

Depois disto, os “pedaçinhos” do colo do útero das mulheres serão trazidos de volta para Fernandópolis e serão novamente examinados.

Esclarecemos que participando deste estudo você não terá nenhum ganho financeiro e também gasto. Todas as despesas correrão por nossa conta, inclusive o passe de ônibus para você vir ate a clinica para fazer a biópsia.

Em caso de qualquer problema causado pela biópsia você terá direito a tratamento médico e medicamentos gratuitamente até que se resolva o problema.

Garantimos que seu nome não será divulgado, divulgaremos apenas os resultados da pesquisa, mas sem mencionar os nomes das mulheres que participarem.

Após os exames você será comunicada sobre o resultado e se necessário será encaminhada para o tratamento adequado.

Você terá direito a esclarecer as dúvidas, em qualquer momento da pesquisa.

### 3. IDENTIFICAÇÃO E CONSENTIMENTO DO SUJEITO

Eu.....

RG nº ....., abaixo assinado, após ter recebido as informações sobre a realização desta pesquisa, concordo em participar da mesma tendo garantido os meus direitos abaixo relacionados.

1 - O direito de receber resposta a qualquer pergunta ou dúvida sobre o conteúdo da pesquisa.

2 - O direito de deixar de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo futuro.

3 - O direito de não ser identificado e ter minha privacidade preservada.

4 - O direito de que se existirem gastos adicionais estes serão incluídos no orçamento da pesquisa.

Declaro que tenho conhecimento dos direitos acima descritos e consinto em me submeter e participar da pesquisa, realizada pelo pesquisador que subscreve o termo.

Fernandópolis, ....., de .....de .....

.....  
Assinatura do paciente/representante legal

.....  
Assinatura da testemunha

Fernandópolis, .....de .....de .....

Para os casos de pacientes analfabetas, semi-alfabetizadas ou portadoras de deficiência auditiva ou visual.

.....  
Dr. Ademir Barianni Rodero

Fernandópolis, ..... de .....de .....