

**Universidade do Vale do Paraíba**  
**Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

**MARIA CHRISTINA BOTELHO MENDONÇA YASSOYAMA**

**ESTUDO DO COLO UTERINO POR ESPECTROSCOPIA  
FT-RAMAN**

São José dos Campos, SP  
2006

**MARIA CHRISTINA BOTELHO MENDONÇA YASSOYAMA**

**ESTUDO DO COLO UTERINO POR ESPECTROSCOPIA  
FT-RAMAN**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioengenharia, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Emília Ângela Loschiavo Arisawa

Co-orientador:

Prof. Dr. Airton Abrahão Martin

São José dos Campos, SP  
2006

2006

Y84e

Yassoyama, Maria Christina Botelho Mendonça

Estudo do colo uterino por Espectroscopia FT- Raman / Maria Christina Botelho Mendonça Yassoyama. São José dos Campos: UniVap, 2006.

1 disco laser, color

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

1. HPV 2. Colo uterino 3. Análise Espectral Raman  
I. Arisawa, Emília Angela Loschiavo, Orient. I. Título

CDU: 618.146

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

Aluno:

*Yassoyama*

Data:

*23/10/107*

“ESTUDO DO COLO UTERINO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN”

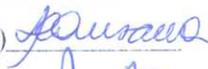
Maria Christina Botelho Mendonça

Banca Examinadora:

Prof. Dr. AIRTON A. MARTIN (UNIVAP)



Profª Dra EMÍLIA ÂNGELA LOSCHIAVO ARISAWA (UNIVAP)



Profª Dra MARIA STEELA A. COSTA ZÖLLNER (UNITAU)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

*Dedico este trabalho as pacientes que cederam as amostras de colo uterino e a todos aqueles que estudam e trabalham em prol da erradicação do HPV e do câncer do colo uterino.*

*Dedico também à meu pai Francisco Félix de Mendonça (in memorian) que foi grande no desempenho da Medicina.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que me dá forças todos os dias e ter me proporcionado que eu cumprisse com sucesso mais esta jornada.

Agradeço ao meu esposo Kiyoshi pelo exemplo de dedicação e perseverança e pela muita ajuda que me foi dada nesta jornada.

Agradeço aos meus filhos Franco e Caio pelo carinho, incentivo e compreensão dos muitos dias que estiveram sozinhos enquanto estávamos em aula e elaborando este trabalho.

Agradeço ao meu orientador Profa. Dra. Emília Ângela Loschiavo Arisawa pelo incentivo, paciência e pelo seu grande carinho, que resultou na elaboração deste trabalho.

Agradeço as Dr. Cláudio Menezes, Patologista da CIPAX, que colaborou gratuitamente na leitura de metade das lâminas.

Agradeço ao Prof. Dr. Airton Abrahão Martin, a Prof.Dra. Ana Maria Espírito Santo e ao Prof. Dr. Herculano pelas ajudas que facilitaram a conclusão deste trabalho.

Agradeço as Secretárias Ivone Paranaíba Villela Monteiro e Valéria Maeda Alves da Silva e a todos os funcionários do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento que de forma direta ou indireta contribuíram na realização deste trabalho.

Agradeço a bibliotecária Rosângela Regis Cavalcanti pelas correções finais das citações e referências e formatação desta Dissertação.

E finalmente aos colegas queridos que me ajudaram solícitamente, a eles devo toda a gratidão, Bruno Telles, Patrícia Oliveira de Andrade, Renata Bitar, muito obrigado de coração.

## **ESTUDO DO COLO UTERINO POR ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN**

### **RESUMO**

A liberdade e a independência feminina, associadas ao uso de anticoncepcionais orais, permitiram aumento no número de parceiros sexuais, contribuindo para o aumento nas taxas de DST associadas a neoplasias intra-epiteliais do colo uterino (NIC). A infecção do colo uterino por HPV pode apresentar-se nas formas clínica, sub-clínica e latente, muitas vezes de difícil diagnóstico. Este pode ser realizado através de exame citopatológico, seguido de colposcopia e biópsia dirigida. A Espectroscopia FT-Raman surge como uma nova técnica de diagnóstico e tem permitido a caracterização dos componentes moleculares presentes em tecidos biológicos. Este estudo objetivou obter espectros de mucosa de colo uterino, normais e alterados, visando identificar diferenças espectrais através da Espectroscopia FT-Raman. Visou também comparar esses resultados aos diagnósticos histopatológicos das amostras. Foram analisados 78 espécimes teciduais, coletados de 71 pacientes, permitindo a obtenção de 300 espectros Raman. Para esse fim utilizou-se o Espectrômetro RFS 100 Bruker®, associado ao laser de Nd:YAG, com potência máxima de 300mW e potência ajustada de 132 mW na amostra. Foram realizadas 300 varreduras em cada amostra, com resolução espectral de  $4\text{cm}^{-1}$ . Os resultados obtidos permitiram observar que a Espectroscopia FT-Raman caracterizou os componentes moleculares dos distintos tecidos analisados com 88,54% de sensibilidade e 82,1% de especificidade entre tecidos normais, cervicite e NIC I. Assim, os resultados obtidos nas condições experimentais sugerem que a Espectroscopia FT-Raman pode ser um importante instrumento no diagnóstico de patologias em colo de útero num futuro próximo.

Palavras-chaves: Espectroscopia FT-Raman, HPV, colo uterino.

## **STUDY OF THE UTERINE CERVIX BY FT-RAMAN SPECTROSCOPY ABSTRACT**

The freedom and independence of women, together with the use of oral contraceptives, have led to an increase in the number of sexual partners and a consequent increase in the prevalence of sexually transmitted diseases associated with intraepithelial neoplasms of the uterine cervix (CIN). Infection of the uterine cervix with HPV can be divided into clinical, subclinical and latent forms, which are often difficult to diagnose. This diagnosis can be made by cytopathological examination, followed by colposcopy and guided biopsy. The advent of a new diagnostic technique, FT-Raman spectroscopy, has permitted the characterization of molecular components present in biological tissues. The objective of the present study was to obtain spectra of normal and altered cervical mucosa in order to identify spectral differences by FT-Raman spectroscopy. In addition, these results were compared to the histopathological diagnoses of these samples. Seventy-eight tissue specimens collected from 71 patients were analyzed. A total of 300 Raman spectra were obtained with a Bruker® RFS 100 spectrometer coupled to an Nd-YAG laser with a maximum power of 300 mW and a power adjusted at the sample of 132 mW. For each sample, 300 scans were performed at a spectral resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$ . The results showed 88.54% sensitivity and 82.1% specificity of FT-Raman spectroscopy in the characterization of the molecular components of normal tissues and specimens with cervicitis and CIN I. In conclusion, the results obtained under the present experimental conditions suggest that Raman spectroscopy might become an important tool for the diagnosis of uterine cervical diseases in the future.

**Key words:** FT-Raman spectroscopy, HPV, uterine cervix.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema representativo do colo uterino .....	32
Figura 2	Imagem de colo uterino normal .....	33
Figura 3	Esquema representativo da junção escamocolunar .....	34
Figura 4	Zona de transformação normal - área de metaplasia .....	35
Figura 5	Citologia do colo normal .....	36
Figura 6	Histologia do epitélio escamoso normal .....	37
Figura 7	Histologia do epitélio glandular normal .....	37
Figura 8	Citologia inflamatória .....	39
Figura 9	NIC I - Displasia leve .....	40
Figura 10	NIC II - Displasia moderada .....	40
Figura 11	NIC III - Displasia moderada .....	41
Figura 12	Ca <i>in situ</i> - Displasia grave .....	41
Figura 13	Atipias de significado indeterminado em células escamosas .....	42
Figura 14	Atipias de significado indeterminado em células endocervicais .....	43
Figura 15	Histologia inflamatória.....	43
Figura 16	NIC I - Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau.....	44
Figura 17	NIC II - Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau.....	45
Figura 18	NICIII - Lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau.....	45
Figura 19	Ca <i>in situ</i> - Lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau.....	46
Figura 20	Condiloma do colo uterino .....	50
Figura 21	Leucoplasia (forma subclínica) .....	50
Figura 22	Halo coilocítico .....	52
Figura 23	Coilocitose.....	53
Figura 24	Desenho esquemático do ganho de energia ( $E_f =$ energia de fóton) .....	58
Figura 25	Desenho esquemático do espalhamento Rayleigh $E_s$ .....	58
Figura 26	Desenho esquemático do espalhamento Raman Stokes. ( $E_f < E_1$ ) .....	59
Figura 27	Desenho esquemático do espalhamento Raman Anti-Stokes ( $E_f > E_1$ ) .....	59
Figura 28	Material utilizado para a preparação da amostra.....	71
Figura 29	Galões de Nitrogênio.....	72

Figura 30 A - Porta amostra com escavação central.....	73
Figura 31 Representação gráfica dos pontos da leitura das amostras.....	73
Figura 32 Aparelho Espectrômetro FT- Raman RFS 100 .....	74
Figura 33 Representação do dendograma. Objetos A,B,C,D e F. ....	75
Figura 34 Dendograma representativo do cálculo do coeficiente de correlação .....	79
Figura 35 Lâmina histológica de colo normal (20x) .....	80
Figura 36 Lâmina histológica de colo normal (20x) .....	80
Figura 37 Dendograma representativo do cálculo do coeficiente de correlação entre os espectros .....	81
Figura 38 Lâmina histopatológica de cervicite (20 x) .....	82
Figura 39 Lâmina histopatológica de cervicite (20x) .....	82
Figura 40 Dendograma representativo do cálculo do coeficiente de correlação entre os	83
Figura 41 Lâmina histopatológica de NIC I (20x).....	84
Figura 42 Lâmina histopatológica de NIC I (20x).....	84
Figura 43 Dendograma representativo do cálculo do coeficiente de correlação entre os espectros de tecido epitelial cervical normal, cervicite e NIC I: 72,26 % similaridade .....	85
Figura 44 Dispersão entre espectros normal x cervicite x NIC I.....	86
Figura 45 Dispersão entre espectros normal x cervicite x NIC I.....	87
Figura 46 Média dos 117 espectros FT-Raman de amostras de colo uterino normal entre .....	88
Figura 47 Médias obtidas de todos os espectros FT-Raman de amostras de colo uterino .....	89
Figura 48 Média e Desvio- Padrão dos espectros de tecidos normais.....	90
Figura 49 Média e Desvio-Padrão dos espectros de cervicite .....	91
Figura 50 Média e Desvio –Padrão dos espectros de NIC I.....	92
Figura 51 Média e Desvio-Padrão dos espectros de NIC II .....	92
Figura 52 Média e Desvio –Padrão dos espectros de NIC III .....	93

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Modos vibracionais das moléculas teciduais-----	50
<b>Tabela 2</b> – Localização e intensidade dos picos em tecidos com lesão de baixo grau ----- -----	53
<b>Tabela 3</b> - Classificação das amostras por diagnóstico histológico -----	63
<b>Tabela 4</b> - Classificação dos espectros por diagnóstico histológico -----	64
<b>Tabela 5</b> - Equivalência dos picos espectrais e constituintes moleculares da média dos espectros de colo uterino normal -----	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ASCUS	Atipias de significado indeterminado em células escamosas
AGUS	Atipias de significado indeterminado em células glandulares
DST	Doença sexualmente transmissível
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
$E_0$	Estado Fundamental de energia da molécula
$E_1$	Nível de energia
$E_f$	Energia do fóton espalhado
$E_v$	Nível de energia maior que $E_1$
$E_s$	Espalhamento <i>Rayleigh</i>
FT	Transformada de Fourier
He	Hélio
Hz	Hertz
IP&D	Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IR	Infrared – Infravermelho
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JEC	Junção escamocolunar
LEVB	Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica
$m_1$ - $m_2$	Massa dos Átomos

NIC ----- Neoplasia intra-epitelial cervical  
Nd ----- Neodímio  
Ne ----- Neônio  
nm ----- Nanômetro =  $1 \times 10^{-9}$  metro  
PC ----- Principais Componentes  
UNIVAP ----- Universidade do Vale do Paraíba  
YAG ----- Ytrium - Aluminium – Garnet  
p ----- Dipolo Induzido  
a ----- Polarizabilidade  
d ----- Modo dobramento  
? ----- Estiramento  
? ----- Constante de Força  
 $\mu$  ----- Massa Reduzida  
 $\nu_1$  ----- Estiramento Simétrico  
 $\nu_2$  ----- Dobramento  
 $\nu_3$  ----- Estiramento Assimétrico  
? ----- Frequência vibracional

# SUMÁRIO

1	Introdução .....	29
2	Revisão de Literatura .....	32
2.1	Anatomia do colo uterino .....	32
2.1.1	Junção escamo colunar .....	33
2.2	Histologia e citologia do colo uterino normal .....	35
2.3	Citologia do colo uterino anormal.....	38
2.3.1	Alterações inflamatórias .....	38
2.3.2	Alterações epiteliais escamosas atípicas.....	39
2.3.3	Alterações epiteliais glandulares atípicas .....	42
2.4	Histologia do colo uterino anormal .....	43
2.5	Características das células neoplásicas .....	46
2.6	Neoplasia do colo e infecção por HPV .....	47
2.7	Métodos de diagnóstico:.....	52
2.8	Espectroscopia Raman.....	55
2.8.1	ER com Transformada de Fourier (FT) .....	60
2.8.2	ER em tecidos biológicos .....	60
2.8.2.1	Proteínas .....	61
2.8.2.2	Ácidos nucleicos .....	62
2.8.2.3	Lipídios .....	63
2.8.2.4	Carboidratos.....	63
2.9	Modos vibracionais Raman de moléculas teciduais .....	64
2.10	Espectroscopia Raman em Ginecologia .....	65
3	Objetivos .....	68
4	Material e métodos .....	69
4.1	Aprovação da Comitê de Ética em Pesquisa .....	69
4.2	Obtenção das amostras de colo uterino .....	69
4.3	Realização da Espectroscopia Raman .....	72
4.4	Processamento e análise estatística dos dados espectrais .....	74
5	Resultados .....	77
5.1	Tecido Normal.....	79
5.2	Cervicite.....	81
5.3	NIC I.....	83
5.4	Normal, cervicite e NIC I .....	85
6	Discussão .....	94
7	Conclusões.....	101
8	Sugestões para estudos futuros .....	102
	Referências .....	103
	Anexo – A.....	107
	Anexo - B.....	108

## 1 Introdução

O carcinoma invasivo do colo uterino é o mais comum dos cânceres do mundo. Nos países em desenvolvimento é também a principal causa de morte em mulheres com idade entre 35 e 45 anos (ALFREDO NETTO, 2002). Constitui verdadeiro problema de saúde pública no Brasil, visto que, a grande maioria dos casos é diagnosticada em fase avançada, levando à custos terapêuticos elevados e baixa possibilidade de cura (CORDEIRO, 2005).

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) tem sido descrita como um co-fator relevante para a ocorrência do carcinoma do colo uterino. Em relação à epidemiologia da infecção por HPV é importante salientar que a infecção por esse vírus pode ocorrer em três formas distintas: clínica, subclínica e latente (BORGES *et al.*, 2004). Os HPVs são vírus da família *Papovaviridae*, capazes de induzir lesões de pele ou mucosa, as quais mostram um crescimento limitado e habitualmente regridem espontaneamente. Existem mais de 200 subtipos diferentes de HPV. Entretanto, somente os de alto risco estão relacionados a neoplasias malignos (INCA, 2006).

Os tipos oncogênicos do papilomavírus (HPV) têm papel fundamental na etiologia do carcinoma epidermóide da cérvix uterina e suas lesões precursoras: as neoplasias intra-epiteliais cervicais (NICs). Também pode ser imputada à ação do HPV, a maioria das anormalidades citológicas encontradas nos exames de Papanicolaou (SARIAN *et al.*, 2003).

A integração do genoma de alguns tipos de HPV (16,18,31,35) com o genoma da célula hospedeira é que leva à formação de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, dependendo de co-fatores como o estado imunológico, a infecção pelo herpes vírus tipo II, a clamidíase, a vaginose bacteriana, o tabagismo, a deficiência de vitamina C e os agressores traumáticos ou infecciosos. Esses fatores facilitam a carcinogênese, porque o HPV por si só, não é capaz de induzir neoplasia (JACYNTO *et al.*, 1999).

O câncer de colo uterino normalmente leva muitos anos para se desenvolver, em média 7 a 10 anos, sendo que a maioria dos casos apresenta-se em mulheres que nunca fizeram um exame preventivo ou o fizeram há cinco anos ou mais (MELO, 2006).

A história natural do carcinoma do colo uterino pode ser dividida em três fases: a primeira quando está presente a infecção pelo HPV, sem outras manifestações detectáveis; a segunda quando já estão presentes alterações morfológicas das células epiteliais do colo, neoplasia intra-epitelial (NIC), chamada de lesão precursora; a terceira quando a lesão atravessa a membrana basal do epitélio, caracterizada por carcinoma invasivo (ZEFERINO, 2002).

A detecção precoce das lesões precursoras da neoplasia cervical e sua erradicação é que permite o declínio dos índices de carcinoma invasivo. Na maioria dos países em desenvolvimento, rastreamentos citológicos não são viáveis para grandes populações, devido ao baixo nível de qualidade dos exames. Por isso, outras técnicas, como a colposcopia e a histologia somaram-se à citologia melhorando sua sensibilidade e especificidade tornando-se, os três métodos, em conjunto o “padrão ouro” de rastreamento do câncer cervical nos países desenvolvidos (ALFREDO NETTO, 2002).

A colposcopia, para De Palo 1996, é indispensável para o diagnóstico de infecção sub-clínica por HPV, e permite avaliar o tipo e a extensão da lesão. É ainda fundamental para a biópsia dirigida, mas não é adequada para diferenciar infecção por HPV de neoplasia intra-epitelial do colo (NIC).

Como o diagnóstico definitivo não é dado somente pelo exame de Papanicolaou, e a adição de novas técnicas, como a colposcopia e histologia, apresentam alto custo, é imperativo pesquisar novos caminhos para a detecção do carcinoma de colo uterino. Dentre as novas técnicas para detecção do câncer de colo, objetivando minimizar as desvantagens da biópsia convencional, a biópsia óptica foi o método utilizado nesta pesquisa. Consiste na utilização da luz do laser, permitindo obter informações morfológicas, estruturais e moleculares da mucosa.

Este estudo teve por objetivo a caracterização, através da Espectroscopia FT-Raman, das vibrações moleculares em tecidos do colo uterino humano, visando detectar e identificar alterações bioquímicas, que freqüentemente acometem esse tecido.

## 2 Revisão de Literatura

### 2.1 Anatomia do colo uterino

O útero de uma mulher não grávida é um órgão muscular oco, piriforme, de paredes espessas, localizado entre a bexiga e o reto. Tem de 7 a 8 cm de comprimento, 5 a 7 cm de largura e 2 a 3 cm de espessura. Projeta-se normalmente para cima e para frente sobre a bexiga urinária. Compõem-se de duas porções principais, dois terços superiores expandidos (corpo) e o terço inferior, cilíndrico (denominado colo do útero) (KEITH, 1994).

O colo uterino é dividido em porção vaginal (ectocérnix) e endocérnix. A porção vaginal é visível a olho nu, ao exame vaginal, sendo coberta por epitélio escamoso estratificado não queratinizado contínuo com a cúpula vaginal. O epitélio escamoso converge centralmente para uma pequena abertura denominada orifício externo, conforme esquema representado na Figura 1. Na nulípara esse orifício está praticamente fechado (ROBBINS, 2005).

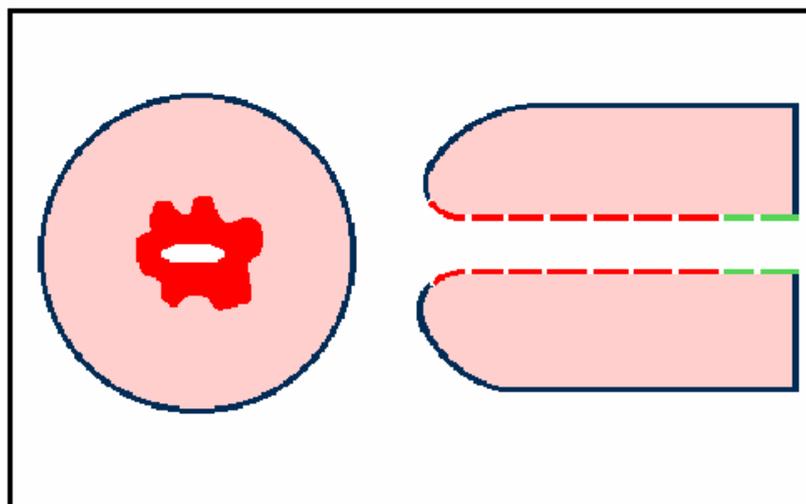


Figura 1 Esquema representativo do colo uterino (ARAÚJO, 1999)

Ainda de acordo com esse autor em uma posição cranial ao orifício encontra-se a endocérnix, que é revestida por um epitélio colunar secretor de muco; esse epitélio mergulha no estroma subjacente, formando criptas (glândulas endocervicais). O ponto no qual o epitélio escamoso e o epitélio colunar mülleriano encontram-se é denominado junção escamo colunar (JEC).



Figura 2 Imagem de colo uterino normal (ARAÚJO, 1999)

### **2.1.1 Junção escamocolunar**

Esse ponto fixo onde os epitélios colunar e escamoso juntam-se é chamado de junção escamocolunar original. O epitélio colunar é de localização endocervical e o epitélio escamoso ectocervical. A JEC é fixa, porém move-se em relação a todo o colo quando a eversão do epitélio colunar endocervical ocorre, como acontece durante a adolescência e a gravidez (SINGER, 2002).

Essa é a região de maior incidência do tipo histológico mais comum de câncer do colo uterino, o adenocarcinoma de células escamosas. Por esta razão é importante que a JEC seja alcançada durante a coleta do material para o exame de Papanicolaou. A junção

escamocolunar, em um colo padrão, encontram-se sobre o orifício anatômico externo do colo uterino (Figura 3). Quando a JEC é deslocada para fora, fala-se de ectopia ou ectrópio. Quando ocorre o deslocamento para dentro do canal, denomina-se entrópio ou entropia (LIRA NETO, 2000).

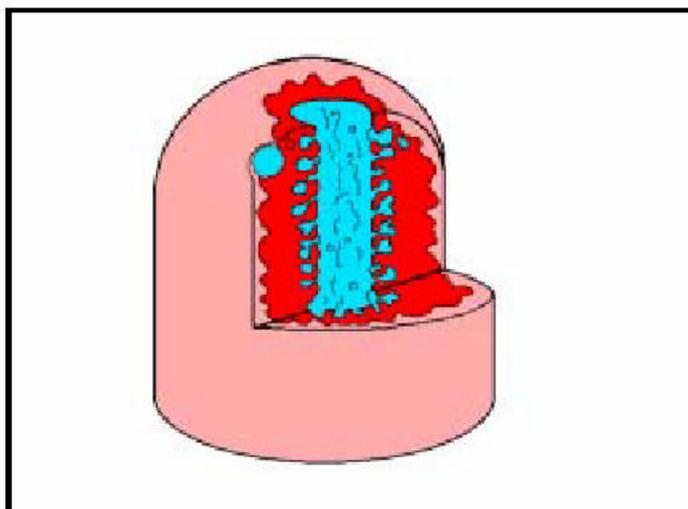


Figura 3 Esquema representativo da junção escamocolunar (ARAÚJO, 1999)

Em alguns fetos, a área entre o epitélio colunar original e o epitélio escamoso é tomada por um terceiro tipo de epitélio o metaplásico original, presente também em outros períodos na vida da mulher (a adolescência e a gravidez), nos quais a cérvix está sujeita às mudanças hormonais que induzem às modificações epiteliais. É como se as mudanças hormonais resultassem na exposição do epitélio colunar a um meio vaginal ácido, que parece ser estimulador para a transformação metaplásica (SINGER, 2002).

Esse epitélio passa por um processo de transformação, até converter-se em epitélio escamoso maduro, produtor de glicogênio, contendo basicamente as mesmas características morfológicas do epitélio escamoso original. Esse processo chamado de metaplasia escamosa, inicia-se através da hiperplasia das células subcilíndricas de reserva que, por um processo de “alteração do dicionário genético”, passam a diferenciar-se em células escamosas imaturas, com resquícios de células glandulares (vacuolização) possuidoras de núcleos muito parecidos

com os das células endocervicais, até alcançarem a completa maturidade. Nesse estágio, a diferenciação dessas células com as células escamosas originais é muito difícil. Caso ocorra infecção por HPV, pode resultar um epitélio displásico (Figura 4). Na colposcopia, a metaplasia é observada como a terceira mucosa ou zona de transformação normal (LIRA NETO, 2000).

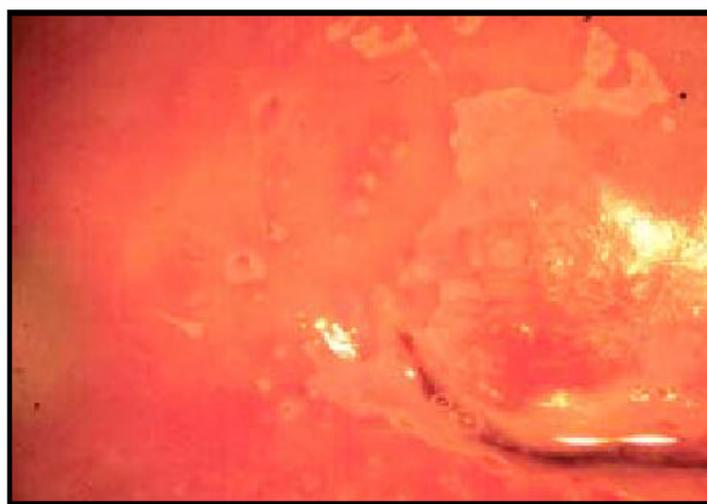


Figura 4 Zona de transformação normal - área de metaplasia (ARAÚJO, 1999)

Esse mesmo autor comenta que o ideal seria que todas as mulheres apresentassem um colo uterino padrão, JEC em zero e ausência de zona de transformação, pois é nessa região que os agentes oncogênicos encontram substrato ideal para malignização, isto é, um epitélio imaturo, em transformação metaplásica, com mitoses frequentes e células totipotentes, com características embrionárias e sem função bem definidas.

## 2.2 Histologia e citologia do colo uterino normal

As células superficiais normais do epitélio cervico-vaginal são oriundas de células profundas do mesmo epitélio por divisão celular e progressiva maturação. Todas as células superficiais, intermediárias e profundas, originadas de um epitélio hígido são muito semelhantes entre si. As variações da afinidade tintorial da espessura e morfologia

citoplasmática são mínimas quando comparadas entre elementos da mesma camada (Figura 5). Assim também são os núcleos apresentando contorno, forma, tamanho e afinidade tintorial semelhantes caracterizando um epitélio normal (LIRA NETO, 2000).

Todas as células têm como estrutura básica: a membrana celular que é composta por dupla camada lipídica representada pelos fosfolipídios, colesterol e glicolipídios e contém também proteínas especializadas em associação com carboidratos de superfície. O líquido intracelular, o citosol, que contém muitas enzimas essenciais e metabólitos, as organelas e o núcleo, que contém o DNA cuja estrutura básica são os ácidos nucleicos e os nucleotídeos (STEVENS, 2001).



Figura 5 Citologia do colo normal (ARAÚJO, 1999)

Histologicamente, o colo uterino difere do corpo do útero por ser formado predominantemente, por tecido conjuntivo, em detrimento das fibras musculares. A vagina e a ectocérvice são revestidas por epitélio pavimentoso estratificado, altamente influenciável a ações hormônio, apresentando na mulher em idade fértil, inúmeras camadas. Num corte histológico da mucosa ectocervical (Figura 6), à medida que as células se afastam da membrana basal, o citoplasma aumenta de tamanho adquirindo formato poligonal quase

transparente e núcleo diminuído. Na superfície epitelial os núcleos tornam-se puntiformes, intensamente corados (núcleos picnóticos) e cromatina indistinta. A endocérvice está revestida por epitélio colunar simples, mucíparo, raramente ciliado, com saliências e reentrâncias da mucosa endocervical aparentando formações glandulares (Figura 7). Este epitélio cilíndrico é responsável pela produção do muco cervical (LIRA NETO, 2000).

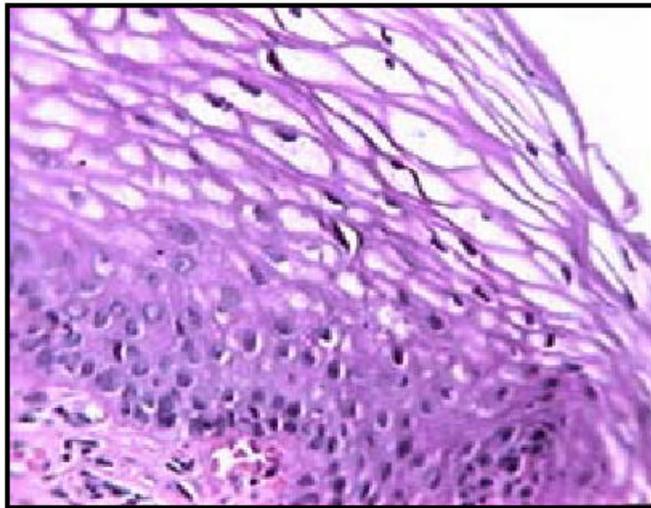


Figura 6 Histologia do epitélio escamoso normal (ARAÚJO, 1999)

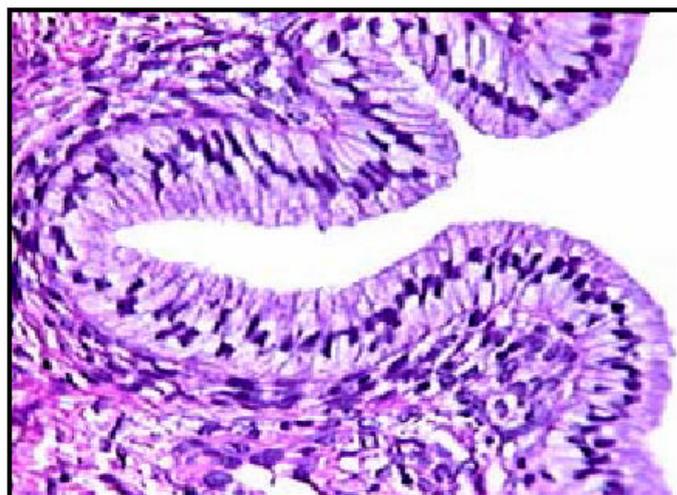


Figura 7 Histologia do epitélio glandular normal (ARAÚJO, 1999)

## 2.3 Citologia do colo uterino anormal

### 2.2.1 Alterações inflamatórias

No início da menarca, a produção de estrogênios pelo ovário estimula a maturação da mucosa escamosa vaginal e cervical. Quando essas células se desprendem do epitélio, seu conteúdo de glicogênio fornece substrato para os microrganismos aeróbios e anaeróbios endógenos da vagina e também para estreptococos, enterococos, *Escherichia coli* e estafilococos. O crescimento das bactérias produz queda no PH da vagina. A endocérvix exposta é sensível a essas mudanças químicas e à flora bacteriana, respondendo por meio de alterações que incluem a proliferação das células de reserva, a qual leva à metaplasia escamosa. Esse processo de transformação de revestimento colunar para escamoso, também é desencadeado por traumas e por outras infecções que ocorrem durante o período reprodutivo. Podendo haver a formação de cistos mucosos (cistos de Naboth), e esse processo está associado a um infiltrado inflamatório composto de uma mistura de leucócitos polimorfonucleares e células mononucleares, sendo que quando o processo é mais intenso pode levar à perda do revestimento epitelial (erosão) ou a um reparo epitelial (atipia reparadora). Todos esses componentes caracterizam a cervicite crônica. Algum grau de inflamação cervical pode ser encontrado em praticamente todas as multíparas e em muitas mulheres adultas nulíparas, sendo em geral com pouca importância clínica (ROBBINS, 2005).

As nuances celulares da inflamação, características de qualquer agente inflamatório, só são visualizadas no esfregaço corado pelo Papanicolaou (Figura 8). Segundo Lira Neto, 2000, esses esfregaços caracterizam-se por:

1- aumento numérico de polimorfonucleares neutrófilos e ou mononucleares (histiócitos, linfócitos e plasmócitos), que podem conferir ao esfregaço um padrão purulento, qualificando a amostra como insatisfatória;

2- alterações celulares como falsa eosinofilia, anfofilia ou policromasia, vacuolização citoplasmática, perda da nitidez das bordas citoplasmáticas, inclusão citoplasmática de leucócitos, bactérias e restos celulares, cariomegalia, hipercromasia e multinucleação.

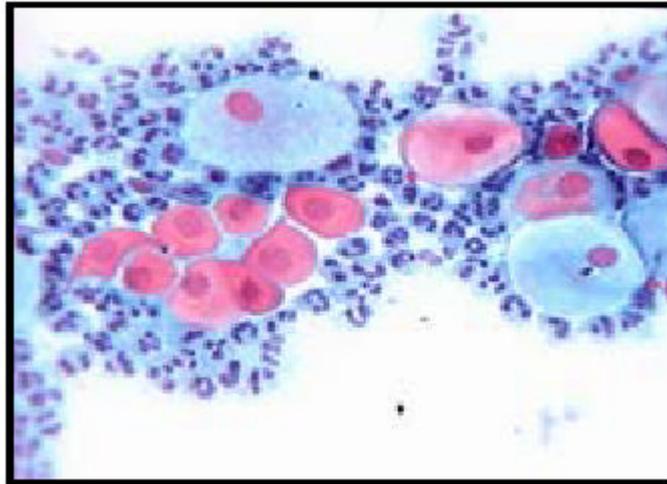


Figura 8 Citologia inflamatória (ARAÚJO, 1999)

### 2.2.2 Alterações epiteliais escamosas atípicas

O rastreamento com o esfregaço Papanicolaou é muito eficaz na prevenção do câncer cervical, porque a maioria dos cânceres é precedida por uma lesão pré-cancerosa. Os pré-cânceres cervicais já foram classificados de diversas maneiras, displasias, carcinoma *in situ*, neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) ou ainda lesão intra-epitelial de baixo e alto grau, sendo que todas essas classificações referem-se a lesões não invasivas, porém com epitélios atípicos (ROBBINS, 2005).

Em epitélios atípicos, onde existem alterações nucleares e citoplasmáticas, à medida que aumenta o grau de atipia, aumenta o grau de alterações arquiteturais. Segundo Lira Neto 2000, tais alterações são citologicamente classificadas em:

- Displasias leves ou lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (Figura 9);

- Displasias moderadas e graves ou lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (Figuras 10 e 11);
- Carcinoma *in situ* (Figura 12),;
- Carcinoma invasor, tanto de origem escamosa quanto glandular.

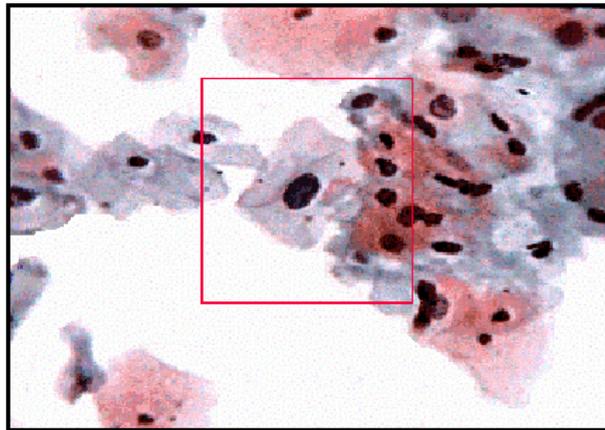


Figura 9 NIC I - Displasia leve- (ARAÚJO, 1999)

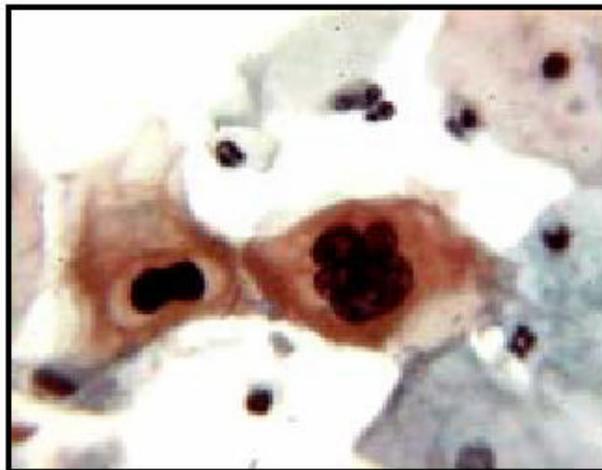


Figura 10 NIC II - Displasia moderada (ARAÚJO, 1999)



Figura 11 NIC III - Displasia moderada (ARAÚJO, 1999)

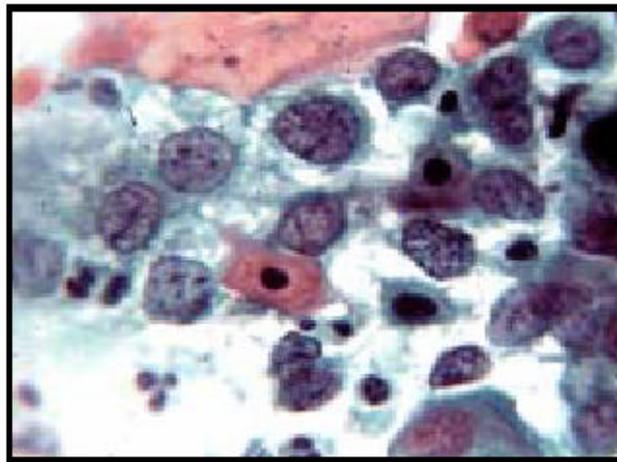


Figura 12 Ca *in situ* - Displasia grave (ARAÚJO, 1999)

Conceito introduzido em 1988 com a criação do sistema Bethesda de classificação citológica em reunião do Nacional Cancer Institute Workshop, as atipias de células de significado indeterminado (ASCUS), são anormalidades em células epiteliais escamosas, mais severas que modificações inflamatórias e/ou regenerativas, porém menos que as necessárias para diagnóstico definitivo de lesão intra-epitelial escamosa (Figura 13). Segundo Lira Neto, 2000 cerca de 6 a 8% das pacientes com ASCUS têm de fato, uma lesão escamosa de grau leve (LSIL). Tal lesão caracteriza-se por crescimento nuclear atingindo duas a três

vezes o tamanho original do núcleo de uma célula intermediária normal, discreta hipercromasia, variação da forma nuclear, além de discreta irregularidade da membrana nuclear.

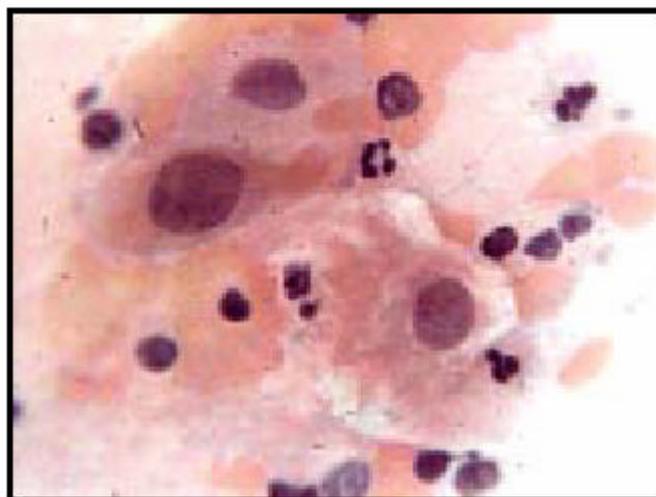


Figura 13 Atipias de significado indeterminado em células escamosas (ARAÚJO, 1999)

### 2.2.3 Alterações epiteliais glandulares atípicas

Ainda de acordo com Lira Neto 2000, as alterações de significado indeterminado em células endocervicais (AGUS), também são modificações morfológicas que excedem as alterações inflamatórias, sem preencher as características de malignidade, podendo apresentar desde alterações celulares mínimas até adenocarcinoma *in situ* (Figura 14), sendo, portanto atipias citológicas inconclusivas.

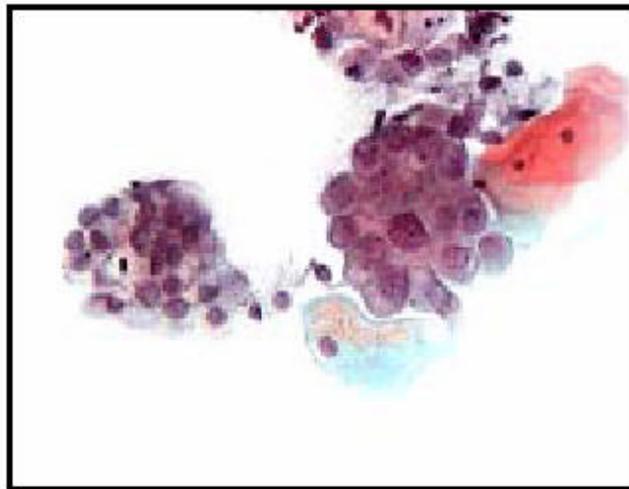


Figura 14 Atipias de significado indeterminado em células endocervicais (ARAÚJO, 1999)

### 2.3 Histologia do colo uterino anormal

Segundo Lira Neto, 2000 na presença de clamídia, HPV ou candidose crônica, o estroma do colo uterino apresenta-se com rico infiltrado mononuclear, observando-se linfócitos, plasmócitos e histiócitos mononucleares, caracterizando cervicite (Figura 15).

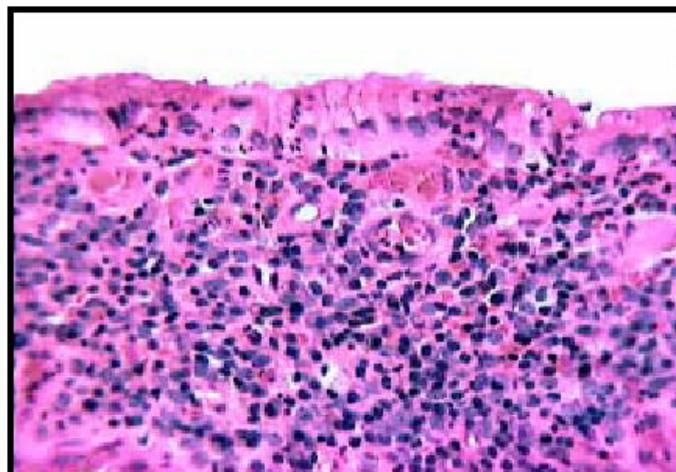


Figura 15 Histologia inflamatória (ARAÚJO, 1999)

As células epiteliais superficiais das lesões HPV induzidas geralmente exibem hiperchromasia e aumento do tamanho do núcleo, representando o efeito citopático do vírus. As alterações nucleares podem estar ou não acompanhadas de halos citoplasmáticos, e as células epiteliais inferiores podem apresentar poucas alterações. A NIC I contém com frequência uma grande quantidade de ácido nucléico do papilomavírus (ROBBINS, 2005).

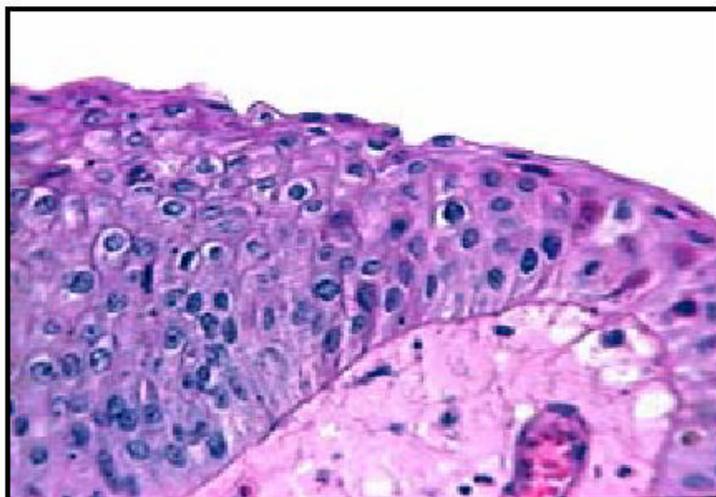


Figura 16 NIC I - Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (ARAÚJO, 1999)

As lesões intra-epiteliais de alto grau caracterizam-se por alterações mais graves da diferenciação e da polaridade celular e à medida que o grau da alteração celular avança, o epitélio perde a capacidade de se diferenciar nos seus três estratos funcionais.

As lesões intra-epiteliais de alto grau podem ser denominadas: NIC II, NIC III e CA *in situ*. Na NIC II, Figura 17, os dois terços internos do epitélio são constituídos por células basais atípicas, enquanto que nas NIC III (Figura 18) o epitélio apresenta-se com pequeno potencial de diferenciação, toda sua espessura sendo constituída por células basais atípicas, com freqüentes mitoses atípicas, restando apenas uma pequena faixa superficial de células com morfologia parabasal. Quando toda a espessura do epitélio está constituída por células basais acentuadamente atípicas com mitoses atípicas, que podem se estender até a superfície

dessa camada, falamos em Carcinoma *in situ*, que pode ser observado na Figura 19 (LIRA NETO, 2000).

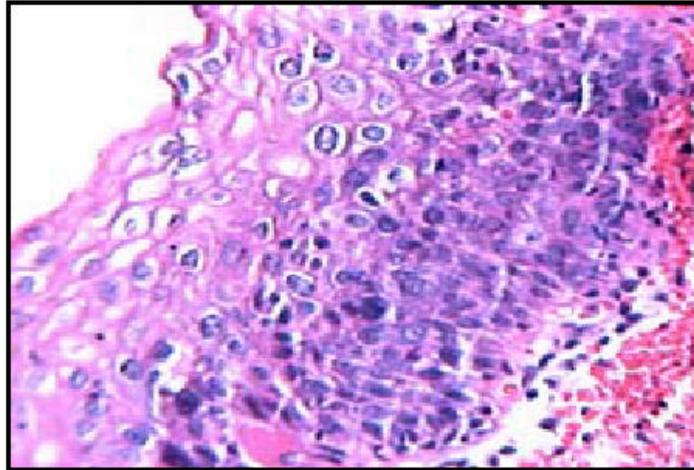


Figura 17 NIC II - Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (ARAÚJO, 1999)

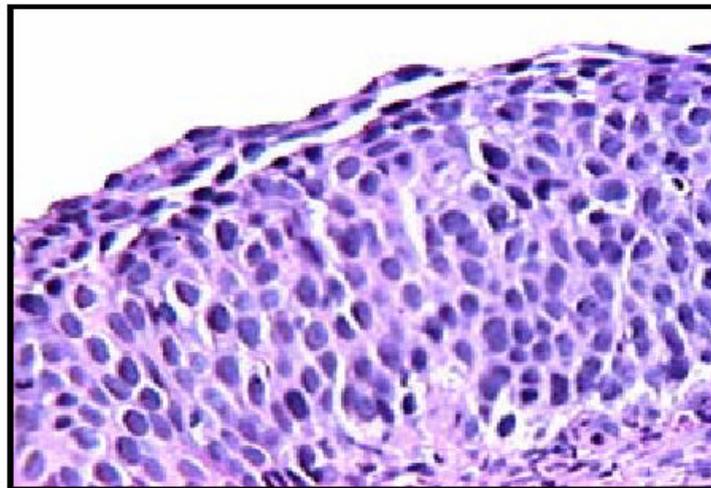


Figura 18 NICIII - Lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (ARAÚJO, 1999)

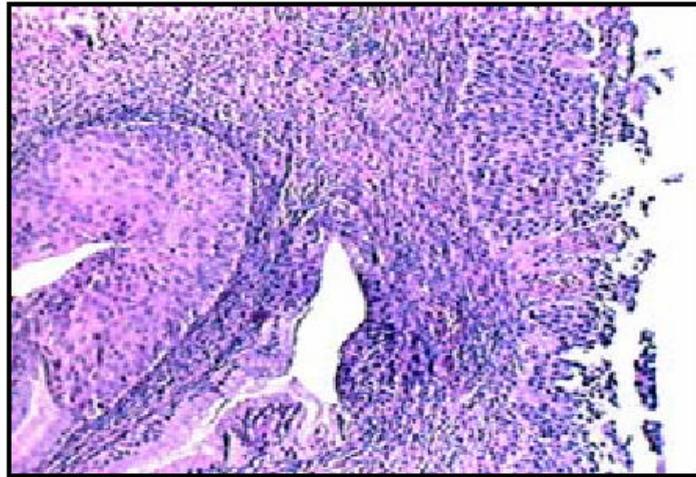


Figura 19 Ca *in situ* - Lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (ARAÚJO,1999)

## 2.4 Características das células neoplásicas

As células neoplásicas caracterizam-se pelo incremento do material nuclear, aumento da relação núcleo/citoplasma que pode chegar a 1:1 em vez do normal 1:4 ou 1:6. Observa-se ainda maior atividade mitótica, distribuição anormal de cromatina e falta da diferenciação celular com progressiva perda da maturação celular. A proliferação destas células indiferenciadas resulta em grande atividade metabólica, caracterizada histologicamente pelo agrupamento e pela desorganização celular (MAHADEVAN-JANSEN; RICHARDS-KORTUM, 1996). Em nível citoplasmático, ocorrem modificações como o aumento da taxa metabólica, com conseqüente aumento da glicólise aeróbica e do consumo de oxigênio. Observa-se também, captação de grandes quantidades de aminoácidos, muito além das necessidades das células normais. As perturbações em nível nuclear são detectadas pela grande variedade de tamanho e forma dos núcleos devido à divisão poliplóide. A membrana citoplasmática apresenta uma estrutura química diferente, com modificações no teor de polissacarídeos provocando perturbações funcionais (DOUGLAS, 2000).

As características gerais do tecido neoplásico resultam, portanto, de mudanças específicas nos ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos, bem como aumento na produção de lactato. Muitas oncoproteínas, que mimetizam atividades das proteínas

citoplasmáticas normais, foram encontradas em células cancerosas. A interação DNA-proteína sofre interferências nas transformações malignas, assim as proteínas nucleares que normalmente regulam a replicação do DNA ficam alteradas, resultando em proliferação celular. Em resumo, pode-se afirmar que são múltiplos os marcadores moleculares, localizados na membrana, no citoplasma, núcleo e no espaço extracelular usado como indicadores de neoplasia. As moléculas marcadoras incluem as proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos (MAHADEVAN-JANSEN; RICHARDS-KORTUM, 1996).

## **2.5 Neoplasia do colo e infecção por HPV**

Atualmente é indiscutível a associação do papilomavírus humano (HPV) com o carcinoma do colo uterino, como estabeleceu estudo de Walboomers *et al.*, (1999) apud Zeferino (2002). A partir de 900 amostras oriundas de 32 hospitais de 22 países da Europa, Ásia, América (Norte, Central e Sul) e África, os autores detectaram a presença de HPV em 99,7% dos casos pela reação de polimerase em cadeia (PCR) associada à sorologia.

Após o diagnóstico da infecção do colo uterino por HPV, a maioria das infecções terá regressão espontânea. O tempo necessário para que esta regressão ocorra varia de 6 a 18 meses. Algumas mulheres, porém, apresentarão persistência de doença ou progressão, podendo desenvolver uma lesão pré-cancerosa. Isso pode levar anos e depende também de outros fatores, dentre os quais o mais importante é a imunidade baixa. Só certos tipos de HPV estão relacionados com câncer cervical. Estes normalmente são chamados “tipos de alto risco”. Os tipos de HPV que causam verrugas genitais externas são chamados “tipos de baixo risco”. É comum que a pessoa seja exposta a mais de um tipo de HPV e a vários “tipos de alto risco”. Ainda assim, a maioria das mulheres não desenvolve câncer cervical. O câncer de colo uterino pode ser prevenido se a mulher fizer um exame preventivo a intervalos regulares. Deste modo, se são encontradas alterações nas células examinadas, esta mulher pode ser monitorada e/ou tratada muito antes da progressão para o câncer (MELO, 2006).

A história natural do carcinoma do colo uterino pode ser dividida em três fases: a primeira quando está presente a infecção por HPV sem outras manifestações detectáveis; a

segunda quando se observam alterações morfológicas nas células epiteliais do colo uterino que caracterizam as lesões intra-epiteliais, designadas genericamente como lesões precursoras ou pré-cancerosas. A terceira caracteriza-se pela presença de lesão atravessando a membrana basal do epitélio, denominada de carcinoma invasivo, fase essa que se não tratada, levará a óbito (ZEFERINO, 2002).

O HPV pertence à família dos Papovírus ou Papoviríade, que compreende vírus de DNA e que divide-se em dois gêneros: A e B. Os vírus A, ou Papiloma Vírus, não são cultiváveis, replicando-se apenas em células diferenciadas, sendo específicos para cada espécie. Têm pequeno diâmetro (50µ), possuindo um genoma com 8.000 pares de bases e peso molecular de  $5,2 \times 10,6$  dalton. O capsídio viral contém 72 subunidades, existindo mais de 200 subtipos diferentes de HPV. Entretanto, somente os subtipos de alto risco estão relacionados a neoplasias malignas. Os HPV são classificados em tipos de baixo e de alto risco de câncer. Assim, os HPV de tipo 6 e 11, encontrados na maioria das verrugas genitais (ou condilomas genitais) e papilomas laríngeos, parecem não oferecer nenhum risco de progressão para malignidade, apesar de serem encontrados em pequena proporção de tumores malignos. Os vírus de alto risco (HPV tipos 16, 18, 31, 33, 45, 58 e outros) têm probabilidade maior de persistir e associar-se a lesões pré-cancerígenas (DE PALO, 1996; INCA, 2006).

De acordo com Marcos 1997, nas infecções induzidas por HPV achamos uma fase produtiva e outra não produtiva. Na fase produtiva, o HPV é liberado para novas e repetidas infecções, somente após a morte da célula. Os vírus são produzidos no núcleo da célula infectada e reinfectam outras células, sendo chamados de formas infectantes, surgindo daí as formas clínicas e subclínicas de infecção por HPV. Na fase não produtiva, a célula já infectada, com características microscópicas atípicas, reproduz células com o DNA do vírus infectante (HPV) e esse DNA incorpora-se ao genoma da célula hospedeira. As células filhas já terão HPV no DNA de seus cromossomos com bloqueio das funções normais da célula hospedeira, de modo que, a mesma passará a se dividir incontrolada e livremente. As células com o HPV já incorporado ao seu DNA, ou seja, ao seu genoma, não são mais transmissoras de HPV e sim atípicas (displásicas ou neoplásicas), perpetuando assim nas suas células filhas o DNA-HPV oncogênico.

Ainda de acordo com Marcos 1997, o HPV pode instalar-se no órgão genital inferior de forma clínica, subclínica e latente. A infecção genital pelo HPV é considerada uma doença sexualmente transmissível, com maior incidência entre os 20 e 40 anos de idade, mais freqüente em indivíduos com promiscuidade sexual, ou seja, que têm vários parceiros, ou com um parceiro que têm vários outros parceiros.

De Palo 1996, considera que as formas clínicas são aquelas evidenciáveis como o condiloma, que pode ser observado a olho nu e por isso não apresentam dificuldade de diagnóstico. O termo condiloma acuminado deriva do grego *Kondylus*, que quer dizer excrescência carnosa, ou tumor, sendo bem conhecido desde a antiguidade, recebendo vulgarmente a denominação de “crista de galo”.

De Palo 1996, refere que

*“ os condilomas localizam-se mais nas áreas úmidas, particularmente naquelas expostas ao atrito do coito. As localizações mais comuns na mulher são nos lábios menores e no vestíbulo, no homem localizam-se mais na glande, prepúcio e sulco bálano-prepucial, e em ambos os sexos nas regiões anal e perianal. Menos comumente, comprometem a glande do clitóris, o clitóris, os lábios maiores e o corpo do pênis. Nas áreas com pelos, os condilomas são mais queratósicos, menos papilares e semelhantes à verruga comum. As lesões aumentam com o passar do tempo, crescem rapidamente, mas geralmente são auto-limitadas. A grande maioria das lesões exofíticas relaciona-se com o HPV 6 (65%) e o 11 (20%), o restante com outros tipos comuns.... A infecção clínica é rara no colo uterino”.* (Figura 20)



Figura 20 Condiloma do colo uterino (ARAÚJO, 1999)

De Palo 1996, descreve que a forma subclínica de infecção por HPV, é evidenciável apenas com o uso do colposcópico ( ou de uma lente de aumento) e após aplicação de ácido acético a 5%. A infecção subclínica por HPV e os condilomas planos foram recentemente identificados (Figura 21). A forma mais freqüente de contaminação por HPV no colo uterino é a subclínica, podendo estar associada à neoplasia intra-epitelial.



Figura 21 Leucoplasia (forma subclínica) (ARAÚJO, 1999)

Na infecção latente, para Marcos1997,

*“Não se observa lesão clínica, nem sintomatologia. Demonstra-se apenas a presença do HPV através de hibridização do DNA viral ou PCR.”*

Neste tipo de infecção, De Palo 1996, afirma que o vírus pode desaparecer após o contágio, vencido pelas defesas do organismo ou permanecer latente por um longo período. A permanência do vírus no estado latente explica as recidivas e também a flutuação na presença do HPV-DNA nos tecidos. Também se desconhece quanto tempo o vírus pode ficar latente num organismo e quantos desses casos progridem para a infecção clínica ou subclínica, mas certamente esta latência é a responsável pela ocorrência da infecção após tratamento ou recidivas.

Jacyntho *et al.*1999, relataram que a integração do genoma de alguns tipos de HPV (16, 18, 31, 35), com o genoma da célula hospedeira depende de co-fatores como estado imunológico, infecção por Herpes vírus tipo II, clamidíase, vaginose bacteriana, tabagismo, deficiência de vitamina C e agressores traumáticos ou infecciosos. Só a partir de então é que poderá haver a formação de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas. Tais co-fatores facilitam a instalação da carcinogênese porque o HPV, por si só não é capaz de induzir a neoplasia.

Segundo Abrão 1995, várias lesões estão relacionadas ao HPV, desde anormalidades citológicas incipientes e displasias, até o carcinoma invasor. O material genético do HPV é encontrado em 90% dos casos de neoplasias de colo do útero e a progressão tumoral não depende só do HPV, mas de outros fatores como hormônios, herança genética e reposta imune. Também é reconhecido que no colo uterino, displasias cervicais associadas à infecção por HPV podem evoluir para carcinoma, demorando 10 a 20 anos.

Ainda segundo esse autor, nas lesões benignas o genoma viral está livre, é extra cromossomal ou episomal, como nas lesões precursoras de neoplasias intra-epiteliais cervicais de baixo grau. Nas lesões malignas, com as displasias severas NIC II, NIC III e no Ca *in situ*, o DNA do HPV está integrado aos cromossomos das células.

## 2.6 Métodos de diagnóstico:

São vários os métodos de diagnóstico todos têm seu valor e suas limitações, citando entre outros a histologia, a colposcopia, a citologia, a microscopia eletrônica, a imunohistoquímica e a biologia molecular.

O esfregaço citológico com coloração de Papanicolaou constitui um meio bastante conveniente para o diagnóstico de infecção por HPV, sendo um procedimento ambulatorial não invasivo que pode facilmente ser repetido e reproduzido. A alteração citológica básica para o diagnóstico sugestivo de HPV é a coilocitose (do grego *koilos*, que significa halo ou cavidade). O coilócito é uma célula escamosa que apresenta aumento e arredondamento, fazendo lembrar uma célula metaplásica ou intermediária.

A coilocitose caracteriza-se por clareamento citoplasmático perinuclear e contorno suave, com reforço periférico e demarcação abrupta, diferentemente de outros tipos de halos menores e menos definidos comumente observados em associação com processos inflamatórios não relacionados ao HPV. Associa-se a alterações nucleares dos tipos bi ou multinucleação, cariomegalia, hiper cromasia, irregularidade do contorno nuclear que se encontra frequentemente angular ou recortado (CAMPOS, 2006).



Figura 22 Halo coilocítico (ARAÚJO, 1999)

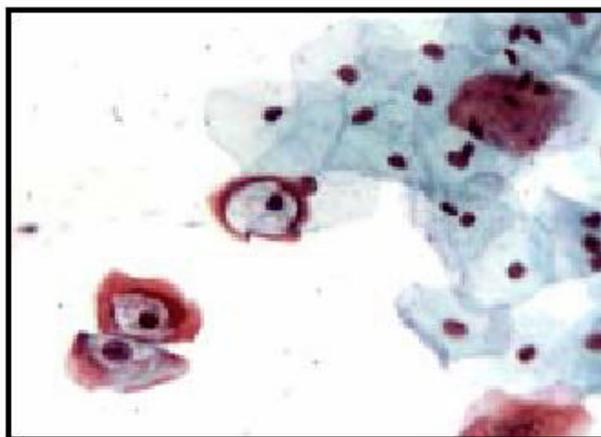


Figura 23 Coilocitose (ARAÚJO, 1999)

Apesar das enormes possibilidades que nos oferecem os métodos diagnósticos, a presença do HPV só pode ser irrefutavelmente definida com os métodos biomoleculares, que detectam o DNA do vírus. Dentre esses métodos podemos citar os de hibridização molecular (*Dot Blot*, *in situ* e *Southern Blot*), a reação da polimerase em cadeia (PCR) e mais recentemente a hibridização molecular recombinante, conhecida como captura híbrida (NUOVO, apud PIATO, 2002).

Os métodos *Dot Blot* e hibridização *in situ* são realizados por meio de *kits* existentes no mercado, com tipos de vírus previamente definidos e possíveis de serem pesquisados. A hibridização molecular *in situ* oferece a vantagem de poder ser efetuada em tecidos, permitindo localizar nos mesmos a área comprometida pelo HPV; é portanto, método de grande valia para as pesquisas mas, na maioria das vezes, limitado por possibilitar a avaliação de número reduzido de tipos virais. Restrições também se encontram no método *Southern Blot* que, apesar de ser o mais fidedigno, é trabalhoso e requer estrutura laboratorial bastante complexa (NUOVO, apud PIATO, 2002).

A hibridização *blot*, (na qual o alvo é o ácido nucléico do HPV extraído de células rotas), e a hibridização *in situ* que é uma técnica mista, morfológica e molecular, (onde o alvo é o ácido nucléico viral contido no núcleo das células infectadas), são realizadas em cortes histológicos normais e interpretadas ao microscópio óptico. É o teste de escolha, por ser o único que de fato correlaciona a distribuição e o tipo de vírus com o tipo de célula e, portanto

com o tipo de lesão, ou seja, permite ver se o vírus está albergado nas células tumorais ou nos tecidos subjacentes. Essa técnica não permite a avaliação do estado físico do vírus, integrado ou não (DE PALO, 1996).

A técnica do PCR vale-se, como as anteriores, da hibridização molecular. Sua vantagem reside no fato de promover a replicação do vírus, conseguindo-se maior quantidade de DNA viral, possibilitando sua detecção mesmo quando em ínfimas proporções. Na hibridização molecular recombinante, associa-se o método clássico de *Dot Blot* com o de anticorpos monoclonais, conseguindo-se desta forma produzir teste com alta acurácia e baixo custo (PIATO, 2002).

Para De Palo (1996), a colposcopia é indispensável para o diagnóstico de infecção subclínica por HPV, permitindo avaliar o tipo de lesão e a extensão da mesma, além de ser fundamental em uma biópsia dirigida, embora não permita diferenciar infecção por HPV de neoplasia intra-epitelial do colo (NIC).

Para Lira Neto (2000), a colposcopia é usada eminentemente para a localização da lesão e direcionamento da biópsia. De acordo com o mesmo autor, os achados colposcópicos são inumeráveis e dependem dos elementos epiteliais, conjuntivos e vasculares. A nova classificação colposcópica divide os achados em:

- 1- Achados colposcópicos normais
  - 1a) epitélio escamoso original
  - 1b) epitélio colunar
  - 1c) zona de transformação típica ou normal
  
- 2- Achados colposcópicos anormais (dentro ou fora da zona de transformação)
  - 2a) epitélio aceto-branco
  - 2b) pontilhado
  - 2c) leucoplasia
  - 2d) zona iodo negativa
  - 2e) vasos atípicos

3- Achados colposcópicos sugestivos de Ca invasor

4- Achados colposcópicos insatisfatórios

4a) junção escamo colunar não-visível

4b) inflamação ou atrofia intensa

4c) cérvix não-visível

5- Achados vários

5a) superfície papilar não-aceto-branca

5b) condiloma exofítico

5c) inflamação

5d) atrofia

5e) outros

O advento da medicina molecular abre oportunidade sem precedentes para investigações baseadas em detecção precoce de câncer de colo uterino. Tecnologias ópticas oferecem a constituição bioquímica em tempo real e a morfologia da composição dos tecidos, constituindo importante e poderosa ferramenta na detecção precoce da doença.

## **2.7 Espectroscopia Raman**

O primeiro pesquisador a descobrir a região do infravermelho do espectro eletromagnético foi um astrônomo inglês chamado Willian Hershel em 1800. Em 1923, Smekal descreveu teoricamente o fenômeno da dispersão da luz. Em 1928, um físico indiano chamado Chandrasekhara Venkata Raman observou, experimentalmente pela primeira vez, este fenômeno, que ficou conhecido como efeito Raman, proporcionando ao pesquisador o prêmio Nobel no ano de 1930 (RAMAN, 1929).

A utilização de *lasers* como fonte de radiação excitante na Espectroscopia Raman, em 1970, permitiu a utilização dessa técnica na área biológica em larga escala. Ao mesmo tempo, o uso do método de transformada de Fourier (FT) e o acoplamento de

espectrofotômetros na computação dos dados adquiridos e processamento dos sistemas, têm permitido a investigação rotineira de sistemas biológicos por espectroscopia de absorção no infravermelho, técnica complementar para a Espectroscopia Raman para o estudo de vibrações moleculares (TWARDOWSKI, 1994).

No efeito Raman, quando um composto químico é irradiado por uma luz monocromática, uma pequena fração da radiação dispersada difere em intensidade, frequência ou comprimento de onda (?) da radiação incidente. A relação entre as radiações incidente e espalhada depende da estrutura química das moléculas (WEENER, 2001).

A maioria dos constituintes moleculares dos sistemas vivos, encontrados na natureza, é composto de átomos de carbono unidos covalentemente a outros átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio. As propriedades especiais de ligações do carbono permitem a formação de uma grande variedade de moléculas que se estruturam formando as macromoléculas (NELSON, 2002).

As ligações covalentes entre átomos de uma molécula possuem uma vibração periódica própria, de modo que, ao incidir uma energia externa a esta molécula ocorre momentaneamente um aumento vibracional destas ligações. Quando esta molécula retorna ao seu estado vibracional original, a energia emitida (ou espalhada) pode ser detectada através da técnica da espectroscopia Raman fornecendo assim, informações estruturais da bioquímica molecular do tecido (WEENER, 2001).

Devido à simetria e às propriedades vibracionais das moléculas estas podem apresentar três modos diferentes de vibrações entre seus átomos. O primeiro é chamado de: modo de estiramento simétrico, o segundo modo de estiramento assimétrico e o terceiro modo de desdobramento. Fisicamente, o processo que resulta no efeito Raman pode ser descrito da seguinte maneira: quando se incide uma fonte de energia (luz e temperatura, entre outras) numa molécula, seus átomos absorvem esta energia, passando do estado fundamental para um estado de maior nível energético ou estado excitado. As ligações entre seus átomos podem admitir qualquer um dos modos vibracionais normais acima descritos ou uma combinação de todos eles. Entretanto, o estado excitado não é estável, de modo que há uma

tendência de retorno ao estado fundamental, liberando a energia recebida. Esta energia liberada pode ou não possuir a mesma frequência, o mesmo comprimento de onda ou a mesma intensidade de energia recebida (WEENER, 2001).

Na Espectroscopia Raman, a amostra a ser analisada é irradiada através de uma forte luz monocromática proveniente de um laser. Quando esta amostra recebe a energia incidente ocorre o fenômeno do espalhamento. A maior parte da luz espalhada apresenta o mesmo comprimento de onda da luz incidente e este espalhamento é conhecido como espalhamento Rayleigh ou espalhamento elástico. No entanto uma pequena parcela desta luz espalhada, apresenta um comprimento de onda diferente da luz incidente, denominada de espalhamento inelástico, e sua existência constitui o efeito Raman. A proporção de fótons espalhados inelasticamente em relação aos espalhados elasticamente é da ordem de um por um milhão ou 0,0001% (WEENER, 2001).

Para entendermos como a luz interage com as vibrações moleculares representa-se esquematicamente as energias dos estados de vibração com um diagrama de níveis, supondo que cada modo normal de vibração só tem dois estados ou níveis de energia possíveis. O mais baixo corresponde a uma molécula, com energia  $E_0$  denominado estado fundamental. O outro nível correspondendo à energia  $E_1$  (Figura 24) que a molécula adquire quando em vibração num de seus modos normais e denominado de estado excitado. Para que isto ocorra é necessário que haja excitação desta molécula, ou seja, a molécula precisa de ganho de energia  $E_f$ .

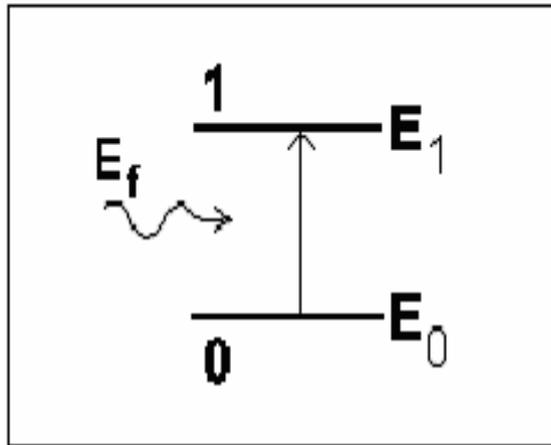


Figura 24 Desenho esquemático do ganho de energia ( $E_f$  = energia de fóton) (UFC, 2005)

A molécula volta então ao estado fundamental  $E_0$ , reemitindo um fóton com a mesma energia do fóton incidente, neste caso, o fóton foi simplesmente espalhado sem perda da sua energia inicial, denominado então Espalhamento elástico ou *Rayleigh* (Figura 25).

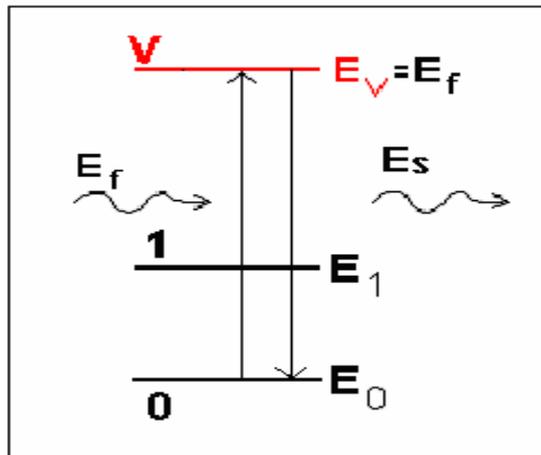


Figura 25 Desenho esquemático do espalhamento Rayleigh  $E_s$  (UFC, 2005).

Ao decair a molécula pode ficar no estado vibracional com energia  $E_1$ , emitindo então um fóton com energia menor ( $E_f < E_1$ ), e a este processo denomina-se espalhamento inelástico Raman *Stokes* (Figura 26).

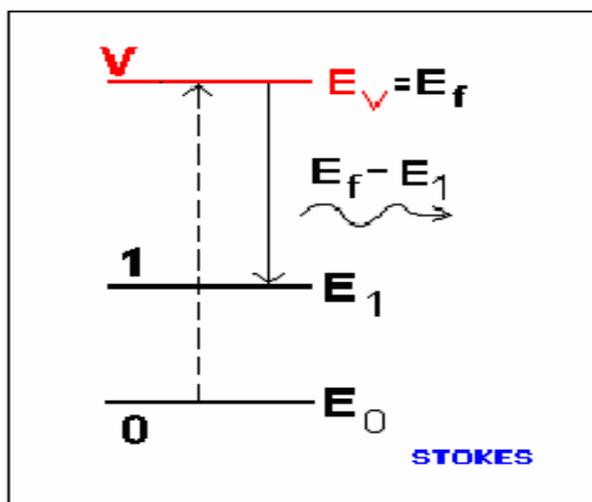


Figura 26 Desenho esquemático do espalhamento Raman Stokes. ( $E_f < E_1$ ) (UFC, 2005)

Existe uma outra possibilidade na qual a molécula encontra-se vibrando com uma energia ( $E_1$ ), recebe o fóton incidente, passando assim, para um nível energético maior,  $E_V$ . Entretanto, quando o fóton é emitido, ele passa para o estado fundamental ( $E_0$ ). Neste caso o fóton emitido tem energia superior ao do fóton incidente  $E_f + E_1$  (Figura 27). Este tipo de espalhamento é conhecido como Raman Anti-Stokes (TWARDOWSKI, 1994).

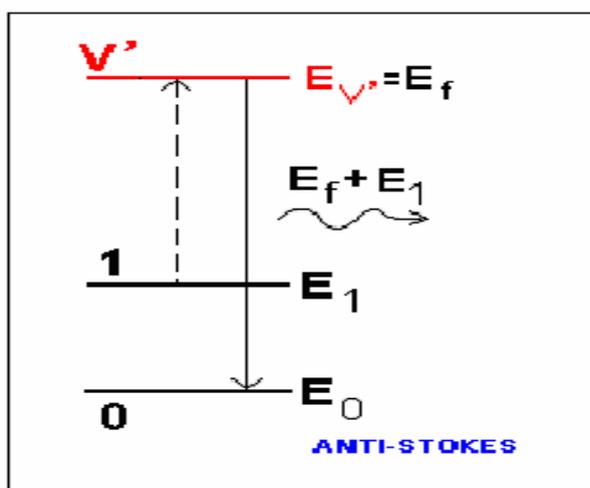


Figura 27 Desenho esquemático do espalhamento Raman Anti-Stokes ( $E_f > E_1$ ) (UFC, 2005)

### **2.7.1 ER com Transformada de Fourier (FT)**

ER com TF utiliza como fonte de excitação o *laser* Nd: YAG (1064 nm) que mantém a maioria das bandas de absorção dos fluoróforos fora do espectro Raman, um interferômetro de Maxwell (TF) e um detector Ge para a coleta de sinais Raman livres de fluorescência e possui a capacidade de coletar vários comprimentos de onda em um curto período de tempo. A excitação no infravermelho próximo, a 1064 nm também minimiza a degradação fotolítica da amostra, permitindo que uma maior potência de incidência do laser seja utilizada para compensar o espalhamento Raman (HANLON *et al.*, 2000; MANOHARAN; WANG; FELD, 1996).

### **2.7.2 ER em tecidos biológicos**

O advento da medicina molecular abriu oportunidade sem precedentes para investigações baseadas em detecção precoce de câncer de colo uterino. Tecnologias ópticas oferecem em tempo real a constituição bioquímica e a morfologia da composição dos tecidos, constituindo importante e poderosa ferramenta na detecção precoce da doença.

A Espectroscopia Raman tem sido empregada em grandes centros para estudo dos componentes da estrutura molecular. Essa técnica permite determinar a composição bioquímica de um sistema biológico e monitorar o estado físico dos mesmos, bem como, detectar mudanças na composição celular e mudanças nas interações intramoleculares de uma célula.

Segundo Neviliappan (2002), a utilização da Espectroscopia Raman transformada de Fourier (FT-Raman) permite, por exemplo, a avaliação e comparação entre células cervicais normais e cancerígenas que apresentam diferenças espectrais que permitiu a caracterização de ambas.

Uytzinger (2001), também utilizando a Espectroscopia Raman no infra-vermelho detectou *in vivo* casos de displasia escamosa, precursora do câncer cervical. Áreas

colposcopicamente normais e anormais foram biopsiadas e posteriormente estudadas. Constataram que a intensidade dos picos em  $1454\text{ cm}^{-1}$  e  $1656\text{ cm}^{-1}$  é maior em displasias escamosas do que em outros tipos de tecido, enquanto que para estes outros os picos foram em  $1330\text{ cm}^{-1}$  e  $1454\text{ cm}^{-1}$ .

Outros estudos foram e estão sendo desenvolvidos para detecção de células malignas em vários tecidos como mamário, gástrico, ocular, cerebral e cutâneo. Como exemplo, podemos citar: investigações histopatológicas em câncer de pele (CRUPI *et al.*, 2002); (HATA *et al.*, 2000); (HUANG *et al.*, 2001); gastrointestinal (DA COSTA *et al.*, 2002); (SONG *et al.*, 2000), mama (SHAFER-PELTIER *et al.*, 2002), pulmão (KAMINAKA, 2002), próstata (MARSHALL, 2001), laringe (STONE, 2002), identificação de placas de aterosclerose (CHOO-SMITH *et al.*, 2002), estudo de células, ácidos nucleicos, vírus e bactérias (PAPAS, 2000).

A tecnologia óptica emerge mostrando-se promissora para detecção de lesões pré-cancerígenas cervicais, tal como o exame de Papanicolaou e a biópsia dirigida na colposcopia, com sensibilidade e especificidade próxima de 80-90% em um pequeno e moderado número de experimentos (UTZINGER, 2001).

### **2.7.2.1 Proteínas**

Constituem o componente celular mais abundante, e são as moléculas mais diversificadas quanto à sua função e forma, desempenhando funções estruturais e dinâmicas. Participam na composição do esqueleto celular e das estruturas de sustentação como o colágeno e a elastina. Participam dos processos biológicos, como enzimas, catalizando milhares de reações químicas no organismo (MARZZOCO; TORRES, 1999). Assim, como as demais macromoléculas biológicas, são constituídas por unidades menores que polimerizam para formarem as estruturas mais complexas que existem nas células.

No caso das proteínas, a unidade mais simples é o aminoácido, existindo 20 tipos diferentes na natureza (VIEIRA *et al.*, 1999). Os aminoácidos são compostos que contém em sua molécula um grupo amina ( $\text{H}_3\text{N}^+$ ) e um grupo carboxila ( $\text{COO}^-$ ), com exceção da

prolina que contém um grupo imino (NH-) no lugar do grupo amina. A fórmula básica comum, consiste de grupos amina e carboxila ligados ao carbono  $\alpha$ , ao qual também se liga um átomo de hidrogênio e um grupo variável chamado cadeia lateral ou grupo R (MARZZOCO; TORRES, 1999).

As ligações peptídicas dos aminoácidos de ligação do grupo carboxila (-COOH-) com um grupo amina (NH<sub>2</sub>) apresentam 7 tipos de vibrações, denominadas de amida I, II, III, IV, V, VI e VII e são utilizadas na espectroscopia para identificação das estruturas secundárias das proteínas. As bandas amida I e III são estudadas pela espectroscopia Raman as demais vibrações não são detectadas porque não apresentam atividade Raman (TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994).

### **2.7.2.2 Ácidos nucleicos**

Os ácidos nucleicos pertencem à classe das macromoléculas e da mesma forma que os polissacarídeos e as proteínas, são formados por unidades mais simples que se unem para formar moléculas mais complexas. Sua unidade básica é o nucleotídeo, que por sua vez, é composto de três moléculas ainda mais simples: uma base nitrogenada, uma pentose e ácido fosfórico (VIEIRA, 1999).

Os três componentes dos nucleotídeos são Raman ativos. Na região entre 500-800  $\text{cm}^{-1}$  aparecem vibrações dos anéis heterocíclicos das bases nitrogenadas com forte pico em 770  $\text{cm}^{-1}$  devido à vibração do anel aromático das bases pirimídicas citosina e timina e também uma linha de moderada intensidade em 670  $\text{cm}^{-1}$  devido às bases purínicas/adenina e guanina. A região entre 1100-1700  $\text{cm}^{-1}$  é também rica em bandas devidas às vibrações das bases nitrogenadas. As bases pirimídicas apresentam vibrações características em 1240  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto que as purinas têm vibrações em 1480 e 1580  $\text{cm}^{-1}$ . As pentoses contribuem com bandas fracas entre 800 -1100  $\text{cm}^{-1}$  assim como a vibração da pentose que ocorre em 1460  $\text{cm}^{-1}$  pela deformação da ligação CH<sub>2</sub> (MAHADEVAN-JANSEN; RICHARDS KORTUM, 1996).

### 2.7.2.3 Lipídios

Os lipídios constituem uma classe de compostos com estrutura bastante variada, caracterizados por sua baixa solubilidade em água. São representados pelos ácidos graxos, triacilgliceróis, glicerofosfolipídios, os esteróides e os esfingolipídios. Exercem diversas funções biológicas, como componentes de membranas, isolantes térmicos e reserva de energia, exercendo também a função de hormônios e vitaminas (MARZZOCO; TORRES, 1999). Os fosfolipídios ou esfingolipídios são os principais componentes das membranas celulares, sendo que cada molécula de fosfolipídio contém uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica (MAHADEVAN-JANSEN; RICHARDS-KORTUM, 1996).

O espectro Raman dos fosfolipídios contém vibrações de ambas as partes, embora a maioria dos picos seja relativa à parte hidrofóbica. A deformação da ligação (CH<sub>2</sub>) possui pico Raman em 1303 cm<sup>-1</sup>, enquanto a deformação (=C-H) contribui com pico em 1267 cm<sup>-1</sup>. Os modos vibracionais dos isômeros *cis* e *trans* da ligação (C=C) da cadeia dos ácidos graxos ocorrem em 1650 - 1666 cm<sup>-1</sup>, respectivamente (MAHADEVAN-JANSEN; RICHARDS-KORTUM, 1996).

### 2.7.2.4 Carboidratos

Os carboidratos são compostos que, em geral, apresentam a fórmula empírica (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>. São poliidroxiáldeídos ou poliidroxicetonas. O tipo mais simples é constituído pelos monossacarídeos, chamados de aldoses ou cetoses, segundo o grupo funcional que apresentam: aldeído ou cetona. Os oligossacarídeos são carboidratos formados por pequeno número de monossacarídeos. Entre os oligossacarídeos os mais comuns são os dissacarídeos, que incluem a sacarose e a lactose. Os polissacarídeos são polímeros de centenas ou milhares de monossacarídeos, por exemplo, a celulose, o glicogênio e o amido (MARZZOCO; TORRES, 1999). Os carboidratos são componentes importantes da matéria viva, por estarem envolvidos na utilização da energia solar através da fotossíntese, participarem da formação dos ácidos nucleicos e comporem a parede celular e constituírem reserva energética (TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994).

## 2.8 Modos vibracionais Raman de moléculas teciduais

A Tabela 1 apresenta as posições de pico (em  $\text{cm}^{-1}$ ) dos espectros Raman das estruturas que promovem a vibração e as respectivas moléculas. Onde d = modo dobramento e ? = estiramento.

Tabela 1 – Modos vibracionais das moléculas teciduais

Posição do pico ( $\text{cm}^{-1}$ )	Tipo de estrutura	Compostos Moleculares	Referências
920	?(C-C)	Prolina, glicose ácido láctico	a, b
932	(C-C)	a-hélice proteínas	a, b
935	?(C-C)	prolina valina, a-hélice Glicogênio	a, d
938	?(C-C)		a, d
1001	d ? anel	Fenilalanina	a, c
1064	?(C-C)	Lipídios	a,b,c,d
1083	? (C-N)	Proteínas	a
1087- 1090	? (C-C), ?(O-P-O <sup>-</sup> )	ácido nucléico	a,d
1123	?(C-C) ? (C-N)	Proteínas	a
1243	Amida III		a,b,c,d
1258	Amida III		a,d
1260	Amida III		a, d
1264	d (=C-H) ?(C-N)	Lipídios Proteínas( conformação a	a
1279	Amida III: a-helix		a, b
1335- 1345	d (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> )	Colágeno	a
1336		DNA- Bases purinas	a
1446	d (CH <sub>2</sub> )	Proteínas	a
1603	d (C=C)	Fenilalanina e tirosina	a
1654- 1655	Amida I	Proteínas(a-helice) Lipídios	acd
1746	? (C=O)	Lipídios	a

(a) Stone *et al.*,(2003)

(b) Barry *et al.*,(1992)

(c) Frushour *et al.*,(1975)

(d) Mahadevan-Jansen;Richards- Kortum., (1996)

## 2.9 Espectroscopia Raman em Ginecologia

Liu *et al.*, (1992), foram os primeiros a relatar a praticidade de usar Espectroscopia Raman FT-IR para detectar cânceres originários de vários tecidos ginecológicos. Traços característicos de tecidos normais e neoplasias malignas da cérvix, útero, endométrio e ovário foram descritos. O tecido ginecológico estudado difere estruturalmente, assim como sua funcionalidade. A ectocérvix consiste de epitélio escamoso não queratinizado com estroma de fibras colágenas. Cânceres cervicais de origem epitelial podem ser detectados em estágio de pré-câncer, com a rotina de acompanhamento citológico. A ecto e a endo cérvix são separadas pela junção escamocolunar, com a endocérvix distinguindo-se por possuir epitélio colunar muco secretor. O câncer endocervical é tipicamente adenocarcinoma e aparece dentro da endocérvix, oposto das lesões cervicais epiteliais, que aparecem na junção escamocolunar.

Três picos significantes são notados para diferenciar espectros Raman normais e benignos comparados com lesões cancerosas. No tecido pré-canceroso a frequência da vibração da amida I está em  $1657\text{ cm}^{-1}$  sendo menor que a intensidade da banda vibracional de C-H em  $1445\text{ cm}^{-1}$ . A banda da amida III está em  $1262\text{ cm}^{-1}$  e apresenta-se alargada em lesões cancerosas. Um pico não identificado em  $934\text{ cm}^{-1}$  foi observado somente em amostras cervicais normais e benignas (MAHADEVAN-JANSEN; RICHARDS-KORTUM, 1996).

Segundo os autores, um possível diagnóstico pode ser possível observando-se a intensidade relativa destes dois picos, primeiramente atribuídos ao colágeno e a elastina, visto que  $1657\text{ cm}^{-1}$  é maior que  $1445\text{ cm}^{-1}$  em tecidos normais e benignos e  $1657\text{ cm}^{-1}$  menor que  $1445\text{ cm}^{-1}$  em amostras cancerígenas. O coeficiente de intensidade de  $1657\text{ cm}^{-1}$  a  $1445\text{ cm}^{-1}$  pode muito bem ser usado para diferenciação em outros tecidos ginecológicos. Os picos em  $1262$ ,  $1445$  e  $1657\text{ cm}^{-1}$  são frequentemente observados em tecidos ovarianos. Em amostras de tecido uterino, o comportamento do coeficiente de intensidade foi similar ao da cérvix.

Embora espectros Raman tenham sido obtidos de tecidos cervicais normais, benignos e malignos, Mahadevan-Jansen e Richards-Kortum, 1996, não fizeram estudo comparativo entre esses tipos de tecido. O potencial da Espectroscopia Raman NIR para diferenciar displasias cervicais de tecidos normais, inflamatórios, metaplasia e para diagnóstico diferencial entre lesões de baixo e alto grau estudado por Liu *et al.*, Mahadevan-Jansen e Richards-Kortum,(1996).

Espectros Raman NIR são obtidos usando excitação 789 nm para tecidos normais, benignos (inflamatórios e metaplasias) e biópsias de tecidos displásicos. Espectros Raman de tecidos normais e displásicos, indicaram características espectrais distintas com diagnóstico potencial. A intensidade da banda amida I em  $1656\text{ cm}^{-1}$  é maior em tecidos displásicos que em outros tecidos. A banda em  $1325\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída aos ácidos nucléicos e foi descoberto que é mais intenso em tecidos displásicos (MAHADEVAN-JANSEN; RICHARDS-KORTUM, 1996).

Técnicas de estatística multivariadas podem ser também usadas para análise e classificação visando incluir todas as informações espectrais disponíveis. Foram identificadas oito intensidades de frequências, sendo usadas para diferenciar alterações pré-neoplásicas das demais alterações com uma taxa de falso negativo e falso positivo de 18% e 4% respectivamente. Esses resultados sugerem o potencial da Espectroscopia Raman NIR para o diagnóstico da displasia cervical (MAHADEVAN-JANSEN; RICHARDS-KORTUM, 1996).

Mahadevan-Jansen *et al.*, (1998), demonstraram o potencial da Espectroscopia Raman NIR para o diagnóstico diferencial de displasias cervicais. Um estudo piloto habilitou consistente discriminação de lesões displásicas cervicais com inflamação, metaplasia e tecidos normais, apresentando especificidade e sensibilidade de 82% a 92%, ou maior. Baseado no sucesso desse estudo com Espectroscopia Raman *in vitro*, os autores desenvolveram e testaram um sistema para medir espectros Raman em tecidos cervicais *in vivo*. Entretanto, o sinal Raman é relativamente fraco comparado à fluorescência. Muitos materiais usados na fabricação do cateter de fibra óptica são ativos, e o baixo sinal do sistema Raman *in vivo* não teve sensibilidade suficiente para permitir a medida de tecidos de um

grupo clínico. O objetivo desse projeto era desenvolver um cateter compacto de fibra óptica para coletar espectros Raman da cérvix uterina *in vivo* sem interferência significativa do sinal da fibra. Analisando os espectros entre 900 e 1800  $\text{cm}^{-1}$  indicaram que os picos foram observados em 936, 1066, 1147, 1175, 1204, 1252, 1321, 1343, 1452, 1570 e 1659  $\text{cm}^{-1}$ . Previamente trabalhos *in vitro* indicaram que taxas de intensidades sem normalização de 1659 para 1321  $\text{cm}^{-1}$  e de 1659 para 1452  $\text{cm}^{-1}$  (Tabela 2) são usualmente identificados como displasias cervicais (MAHADEVAN-JANSEN *et al.*, 1998).

Tabela 2 - Localização e intensidade dos picos em tecidos com lesão de baixo grau (MAHADEVAN-JANSEN *et al.*, 1998)

Localização do pico	Componentes do pico na região	Mudança de intensidade em tecidos com lesão de baixo grau
1656 $\text{cm}^{-1}$	Colágeno	Decrescente
1453 $\text{cm}^{-1}$	Fosfolipídios e colágeno	Crescente
1330 $\text{cm}^{-1}$	Fosfolipídios e DNA	Crescente
1246 $\text{cm}^{-1}$	Colágeno e DNA	Crescente
1070 $\text{cm}^{-1}$	Colágeno, glucose Fosfato	Decrescente
978 $\text{cm}^{-1}$	Fosfolipídios, glucose fosfato	Crescente

### **3 Objetivos**

Tendo em vista as possíveis vantagens da Espectroscopia Raman e a contribuição que essa técnica pode trazer para a clínica ginecológica esse trabalho teve por objetivos:

**1-** Obter espectros Raman de mucosas de colo uterino normal e alterado, analisadas previamente ao colposcópico, visando identificar a existência de diferenças espectrais entre esses dois tipos de mucosas.

**2-** Comparar os resultados obtidos pela espectroscopia Raman com aqueles obtidos através da análise histopatológica das referidas amostras teciduais, para um possível diagnóstico através desse novo método.

**3-** Associar os modos vibracionais da banda dos espectros Raman aos compostos moleculares e estrutura bioquímica responsáveis pela vibração.

**4-** Realizar estudo qualitativo das bandas espectrais características de cada tecido correlacionando-as com as possíveis alterações bioquímicas.

## **4 Material e métodos**

### **4.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa**

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa UniVap, sendo aprovado através do Protocolo nº L 168/2004/CEP, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

### **4.2 Obtenção das amostras de colo uterino**

As mulheres participantes deste estudo, representaram um total de 71 mulheres sexualmente ativas, sem distinção de etnia. Parte dessas mulheres foram encaminhadas dos centros de saúde do município de Fernandópolis, SP, para o consultório particular, outras eram pacientes particulares. Todas foram submetidas ao exame ginecológico a colposcopia e a biópsia, realizadas no consultório.

Previamente ao exame foi oferecido às pacientes, na sala de espera o termo de responsabilidade para que todas tivessem a liberdade de ler e assinar espontaneamente.

Todas as pacientes encaminhadas dos centros de saúde realizaram previamente o exame de Papanicolaou e o resultado histopatológico dos mesmos indicava alterações citológicas. Realizou-se biópsia do colo de locais alterados e também de local da cérvix aparentemente normal à colposcopia.

O exame colposcópico sempre é realizado após a coleta do Papanicolaou, no local em que o epitélio escamoso translúcido normal reflete o tecido conjuntivo vascular subjacente. Uma vez que o ácido acético foi aplicado sobre esse tecido e a coagulação das proteínas celulares ocorreu, o epitélio escamoso torna-se progressivamente opaco, desenvolvendo

principalmente uma aparência plana e opaca que mascara o reflexo do tecido conjuntivo subjacente. Se houver um epitélio espesso ou extremamente celular, como é encontrado nas lesões NIC de alto grau, então a opacidade é tamanha que a lesão torna-se progressivamente mais branca (SINGER, 2002).

Para De Palo (1996), o teste com o ácido acético é fundamental para o diagnóstico colposcópico. O ácido acético em solução aquosa de 3 a 5% determina um considerável aumento da visibilidade das áreas normais e anormais do epitélio ectocervical. O mecanismo de ação do ácido acético não é bem conhecido. Sua ação inicia-se em 10-30 segundos. Após aplicada, a solução remove o muco cervical, determina contração dos vasos, edema das papilas do epitélio cilíndrico e seu empalidecimento, evidenciando assim o característico aspecto em cacho de uva desse epitélio. Essa substância não penetra no epitélio pavimentoso bem diferenciado normal, no entanto devido às conexões celulares mais frouxas, penetra no epitélio metaplásico, displásico ou neoplásico, levando a uma coloração branco opaca, reversível e reproduzível, mais ou menos acentuada.

É importante lembrar que a acentuação dos diversos epitélios pelo ácido acético ocorre após período variável de tempo. A ectopia, por exemplo, aparece imediatamente, mas após 1-2 minutos fica menos evidente, sobretudo pela vasodilatação reativa. Por outro lado o epitélio branco manifesta-se mais tardiamente, principalmente se é tênue. O comportamento é análogo para as lesões subclínicas pelo HPV (DE PALO, 1996).

No decorrer dos exames colposcópicos foram coletados dois fragmentos teciduais utilizando-se pinça de biópsia Medina de 3 mm de cada paciente com epitélios alterados após assepsia do colo uterino com ácido acético. Um dos fragmentos foi enviado para o Laboratório de Anatomia Patológica da cidade de Fernandópolis (LAPAT) e outro utilizado para a análise óptica.

Se mesmo após a assepsia do colo uterino, este se apresentava normal à colposcopia, ainda assim foi coletada uma amostra para a análise óptica comparativa no Laboratório de Anatomia Patológica em São José dos Campos (CIPAX).

As amostras coletadas mediam aproximadamente 3 mm, sendo imediatamente identificadas e numeradas, mantendo a identidade da paciente em sigilo. Os espécimes para espectroscopia Raman foram armazenados, imediatamente após coletados em tubos criogênicos de 1,2 ml Nalgene® (Figura 28) em galão de nitrogênio líquido (Figura 29), numa temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ , para preservação e manutenção de todas as estruturas teciduais do fragmento até a realização da análise.



Figura 28 Material utilizado para a preparação da amostra  
(1) tubos criogênicos Nalgene  
(2) cabo de bisturi com lâmina nº 15  
(3) tesoura de íris  
(4) pinça anatômica simples  
(5) lamínula com o porta amostra



Figura 29 Galões de Nitrogênio

### 4.3 Realização da Espectroscopia Raman

A leitura da Espectroscopia FT-Raman, foi realizada no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB) da Universidade do Vale do Paraíba (UniVap) em São José dos Campos (SP). Para a realização da Espectroscopia, as amostras foram descongeladas individualmente em solução de soro fisiológico 0,9%, para que a amostra atingisse a temperatura ambiente e se mantivesse úmida durante a realização da leitura espectroscópica, evitando assim desidratação ou degradação das amostras. Essas foram fixadas em porta-amostras de alumínio de 1cm de diâmetro com porção central receptora das amostras escavada de 1,5 mm (Figura 30 A), pressionadas com lamínulas de vidro e posicionadas frontalmente ao feixe de laser (Figura 30 B), onde foram coletados os espectros FT-Raman. Os espectros foram colhidos inicialmente em cinco diferentes pontos da amostra. Depois como eram de tamanho reduzido, algumas com menos de 3mm, foram coletados espectros em três pontos para reduzir o tempo de exposição ao laser, prevenindo o ressecamento da mesma e evitando assim um eventual prejuízo da leitura Raman. Cada ponto da amostra corresponde a um espectro obtido.

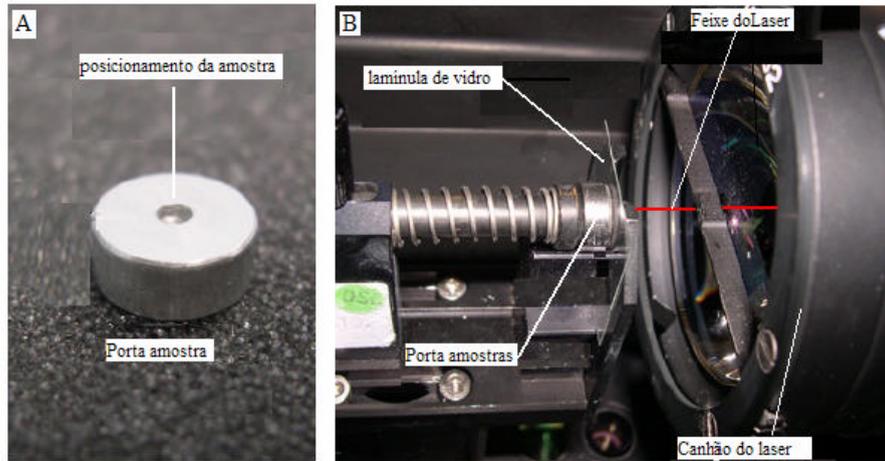


Figura 30 A - Porta amostra com escavação central  
 B - Posicionamento da amostra pressionada pela laminula de vidro

Para o posicionamento dos pontos foi utilizado o estágio motorizado, onde os eixos “y” e “z” foram mantidos em torno de 100 a 102, enquanto que o eixo “x” foi alterado entre 80 a 120, resultando em pontos A, B, C, D e F. Conforme figura 31:

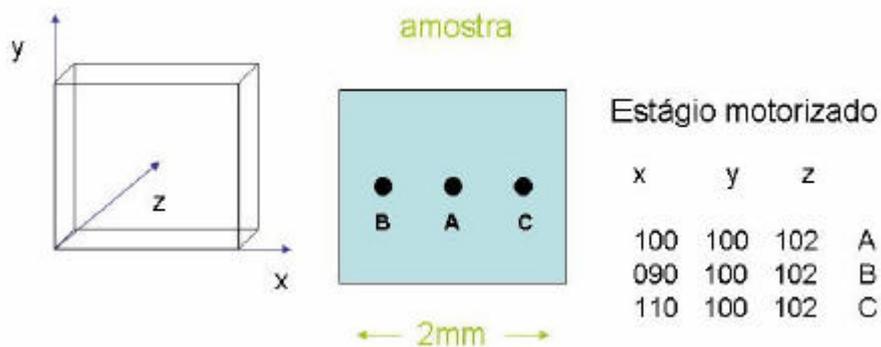


Figura 31 Representação gráfica dos pontos da leitura das amostras

O tempo médio de aquisição dos espectros foi de 600 segundos por amostra. Das amostras coletadas das 71 mulheres e submetidas à análise Raman, foram obtidos 300 espectros. Após a obtenção dos espectros as amostras foram devidamente acondicionadas em solução de formol (10%) em volume dez vezes maior que o volume da amostra, e encaminhadas para a análise histopatológica.

O equipamento utilizado para obtenção dos espectros das amostras de colo uterino foi o Espectrômetro RFS 100 da Bruker® Alemanha (Figura 32). O laser utilizado foi o Nd:YAG (Neodímio: Ítrio Alumínio Granada) que emite alta intensidade de radiação em 1064 nm. A potência máxima do laser é de 300mW. Foram realizadas 300 “scans” ou varreduras em cada ponto amostra, com resolução espectral de  $4\text{ cm}^{-1}$  e o diâmetro do feixe do laser na amostra foi de  $200\ \mu$ . A potência ajustada para o laser foi de 132 mW, potência máxima ajustada para a coleta dos sinais com melhor razão sinal/ruído, sem que houvesse aquecimento ou degradação das amostras.



Figura 32 Aparelho Espectrômetro FT- Raman RFS 100

#### 4.4 Processamento e análise estatística dos dados espectrais

Dependendo do nível de agrupamento e quantidade de *clusters* desejada, pode-se tomar um determinado valor para se estabelecer a resposta de quais objetos estão contidos em quais *clusters*. Por exemplo, um valor entre  $d_1$  e  $d_2$  na figura 33, haverá dois *clusters*:  $\{C,D\}$  e  $\{E\}$ . Com isso, devem ser medidas a distância entre dois objetos individuais e a distância entre dois grupos de objetos. O grau de diferença entre dois grupos, medido através de sua distância, sugere algum tipo de média das distâncias individuais ou soma das distâncias entre os centros dos conglomerados.

A média é calculada com a soma de todas as observações de um conjunto de dados, dividida pelo número total de medidas. O desvio-padrão tem a mesma unidade de medida que a média, sendo assim quantifica a variabilidade ao redor da média das medidas (PAGANO, 2000).

A análise dos espectros foi feita por dendograma (análise “clustering”) ou teste de identidade. A análise “clustering” é usada quando se possui  $n$  itens (objetos variáveis) estruturando uma matriz de distâncias entre os elementos, sendo útil para se estabelecer similaridades. Os dois elementos mais próximos, com menor distância entre eles, são unificados, formando uma matriz (dimensões  $(n-1) \times (n-1)$ ), assim gerando um novo grupo (MILLIGAN; COOPER, 1988). Isso se repetiu até formar um só grupo, e todas as etapas foram registradas pela construção de um dendograma.

O dendograma é representado graficamente por uma raiz principal, formada por dois grupos principais, que por sua vez foram formados por outros dois grupos, e assim por diante. Apresenta uma escala de distâncias que indica o nível em que dois grupos formam um (Figura 33).

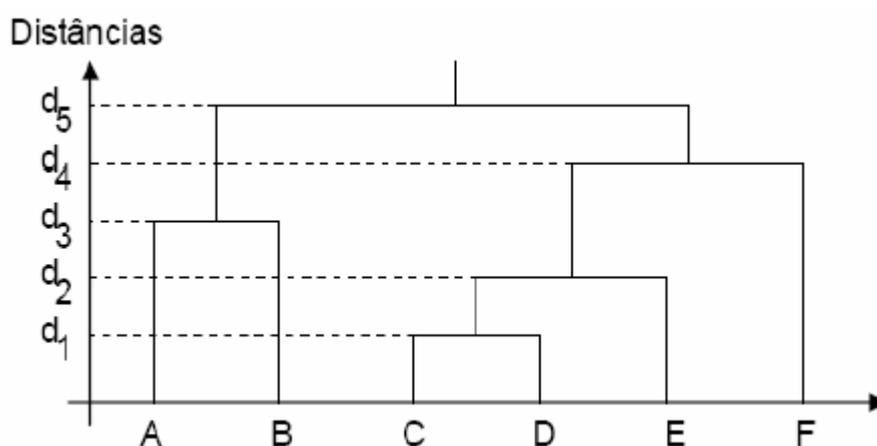


Figura 33 Representação do dendograma. Objetos A,B,C,D e F.  
Notar que as distâncias entre  $d_1$   $d_2$   $d_3$   $d_4$  e  $d_5$  representam o ponto em que os agrupamentos foram formados.

A Análise dos Componentes Principais (ACP) é utilizada para reduzir dimensionalmente uma quantia de dados através da análise de covariância. A covariância é sempre medida entre dois fatores. Quando mais de dois fatores são envolvidos, os valores de covariância podem ser colocados em uma matriz. É quando a ACP torna-se útil. Assim grande quantidade de dados como resultante de um estudo de expressão gênica, por exemplo, pode ser organizada em pequenos grupos de componentes semelhantes dentro da amostra (SMITH, 2002).

A classificação dos espectros Raman de tecidos displásicos e normais é ponto importante porque evidencia o potencial discriminativo e a especificidade dos espectros Raman coletados. Desta maneira os espectros a serem classificados foram submetidos à ACP através do Software MINITAB<sup>®</sup> Release 12.20.

Posteriormente, foram relacionados os componentes principais entre si como por exemplo PC1 versus PC2, PC1 versus PC3, PC1 versus PC4 e assim por diante de forma que cada agrupamento resultou na construção de gráficos de Dispersão, onde foram obtidas as classificações dos espectros, utilizando o software ORIGIN 7.0.

## 5 Resultados

Foram coletadas amostras de colo uterino de 71 pacientes, com idade variável entre 16 e 61 anos, e com idade média de 38,5 anos. Foram coletadas 50 amostras em locais do colo que apresentavam alteração por HPV, e 6 amostras das mesmas pacientes em locais caracterizados visualmente como normais. O total de 78 amostras de colo uterino foi completado através da coleta de 22 amostras sem nenhuma anormalidade aparente ao colposcópico.

Os diagnósticos histológicos variaram desde mucosa de colo uterino normal até NIC III, conforme relacionados abaixo:

Tabela 3- Classificação das amostras de acordo com o diagnóstico histopatológico

Número de resultados	Diagnóstico histopatológico
36	Mucosa malphigian
28	Cervicite ou exocervicite crônica
9	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (NIC I)
4	Lesão Intraepitelial Escamosa de alto Grau (NIC II)
1	Lesão Intraepitelial Escamosa de alto Grau (NIC III)

A análise das amostras por Espectroscopia FT-Raman totalizaram 300 espectros. Esses foram separados de acordo com os resultados histológicos, como mostrado na tabela abaixo.

Tabela 4- Classificação dos espectros por diagnóstico histológico

Número de espectros	Diagnóstico histopatológico
117	Mucosa malphigiana normal
142	Cervicite ou exocervicite crônica
28	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (NIC I)
8	Lesão Intraepitelial Escamosa de alto Grau (NIC II)
5	Lesão Intraepitelial Escamosa de alto Grau (NIC III)

Os dados obtidos através dos espectros Raman das amostras foram visualmente analisados para verificar os principais picos comuns e as diferenças espectrais existentes entre os grupos formados.

Os espectros FT-Raman de tecidos normais e anormais de colo uterino foram tratados através do software OPUS<sup>®</sup> versão 4.2 e, utilizando-se as ferramentas estatísticas do software e foi realizada clusterização. As análises foram baseadas nas variações de intensidade, deslocamento dos picos e surgimento de novas bandas entre os espectros de tecidos do colo uterino através da associação dos espectros e dados da análise histológica.

## 5.1 Tecido Normal

Dos 117 espectros FT-Raman obtidos de tecido de colo normal, formaram-se dois *clusters* que ao serem comparados aos diagnósticos histopatológicos das amostras resultaram em 84,16 % de similaridade entre si (Figura 34). Sob o aspecto histopatológico, os grupos apresentaram predominantemente tecido epitelial escamoso cervical com quantidades variáveis de tecido conjuntivo, e alguns espécimes epitélio tipo glandular. Analisando esses grupos não foi possível separá-los quanto ao tipo de tecido ou quantidade de tecido epitelial ou conjuntivo presentes nas amostras estudadas.

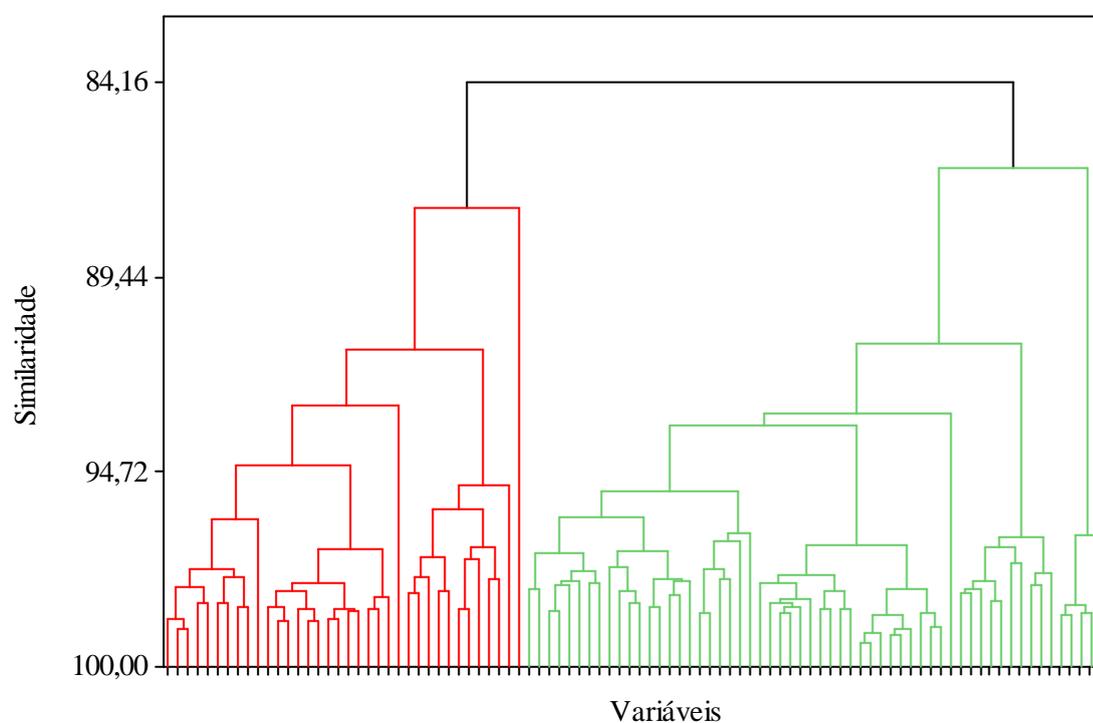


Figura 34 Dendrograma representativo do cálculo do coeficiente de correlação entre os espectros de tecido cervical normal: 84,16 % similaridade

A figura 35 representa o tecido epitelial observado em algumas das amostras de tecido normal analisadas, onde havia escassez de tecido conjuntivo.

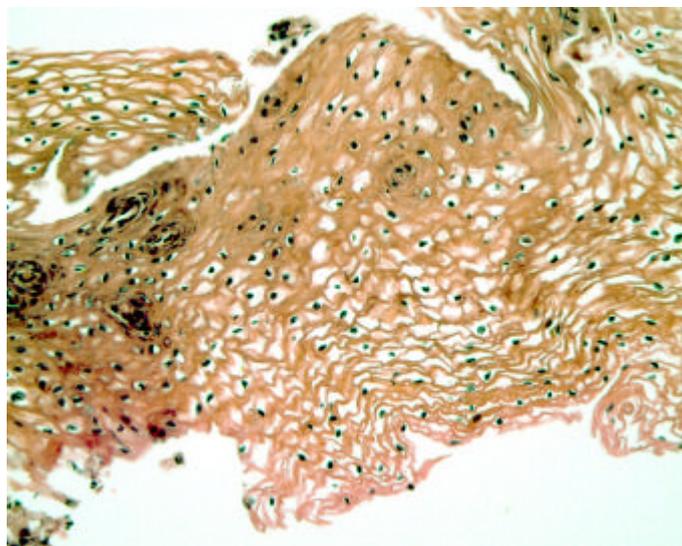


Figura 35 Lâmina histológica de colo normal (20x)

Representando amostras de tecido normal com componentes tissulares comuns observados no ectocérvice normal, (Figura 36). Tecido epitelial estratificado pavimentoso não queratinizado, e a presença de lâmina própria constituída por tecido conjuntivo frouxo, bem celularizado característicos dessa região.

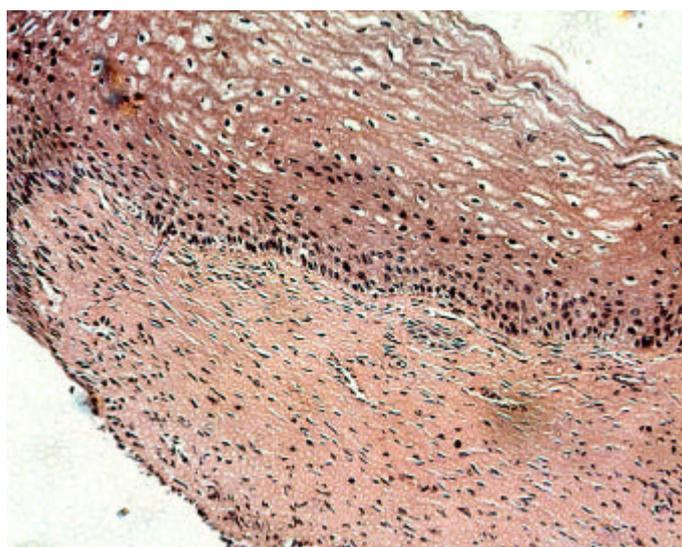


Figura 36 Lâmina histológica de colo normal (20x)

## 5.2 Cervicite

Dos espécimes coletados e classificados através da análise histopatológica como cervicite (n=28) foram obtidos 142 espectros FT-Raman que ao serem submetidos ao índice de correlação foram separados em dois *clusters*, posteriormente comparados aos resultados microscópicos (Figura 37).

A análise por Espectroscopia Raman dos espécimes classificados histologicamente como cervicite apresentaram similaridade de 73,03 % entre si, formando dois grupos, representados em vermelho e verde (Figura 37).

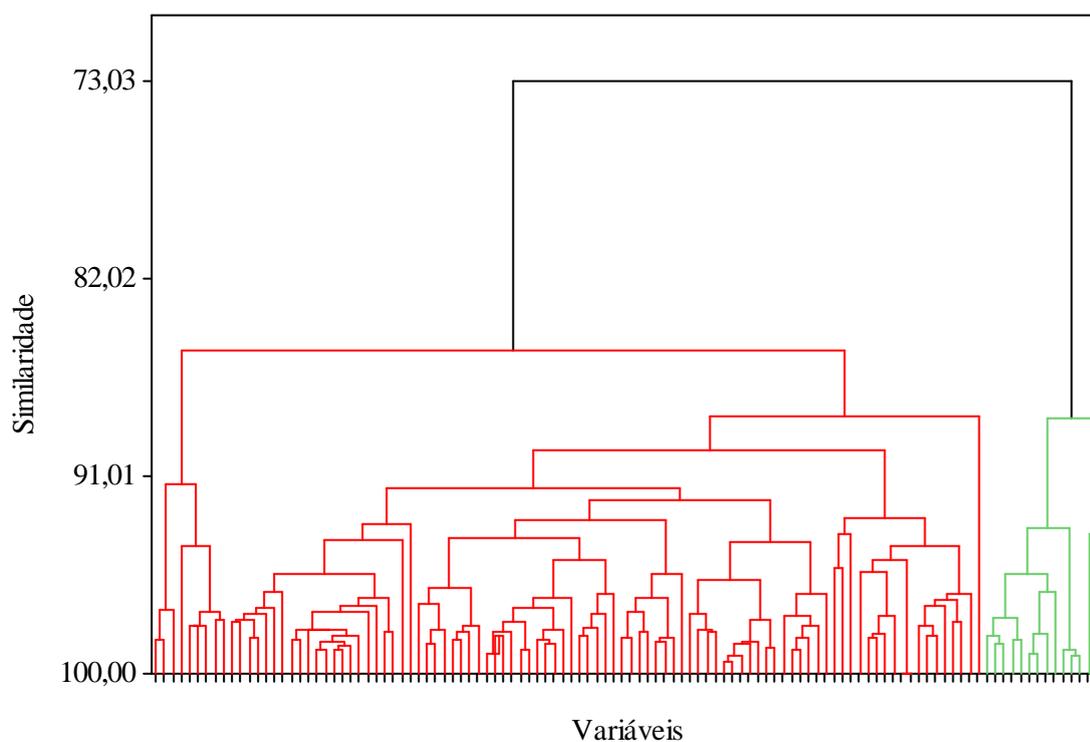


Figura 37 Dendrograma representativo do cálculo do coeficiente de correlação entre os espectros de tecido epitelial com cervicite: 73,03 % similaridade.

Alguns dos cortes histopatológicos estudados apresentavam espécimes com componentes teciduais em proporções semelhantes (epitélio/conjuntivo), predominando tecido epitelial estratificado pavimentoso não queratinizado com aspecto de normalidade e

lâmina própria, de tecido conjuntivo frouxo com intenso infiltrado inflamatório mononuclear difuso (Figura 38).

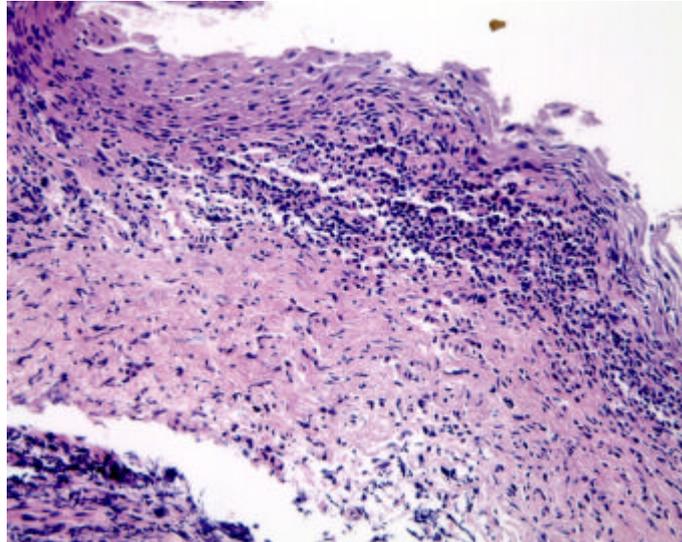


Figura 38 Lâmina histopatológica de cervicite (20 x)

Observou-se em oito amostras, epitélio cilíndrico simples, com células secretoras e lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo com intenso infiltrado inflamatório crônico, representado na Figura 39.

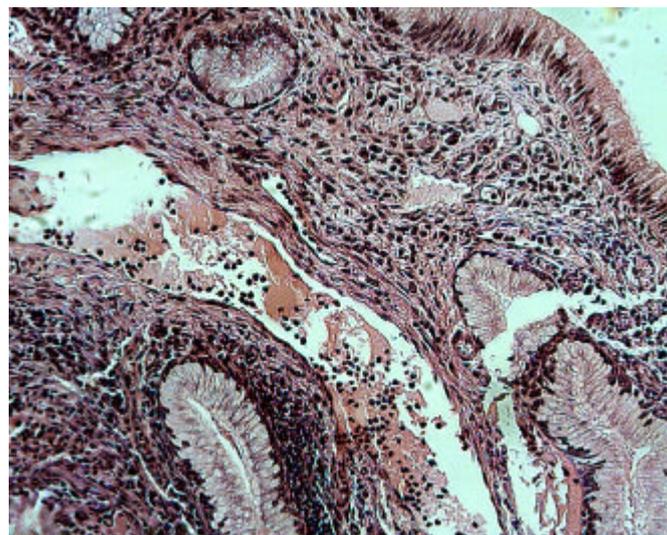


Figura 39 Lâmina histopatológica de cervicite (20x)



camada basal. A lâmina própria, de tecido conjuntivo frouxo, apresentou intenso infiltrado inflamatório mononuclear difuso (Figuras 41 e 42).

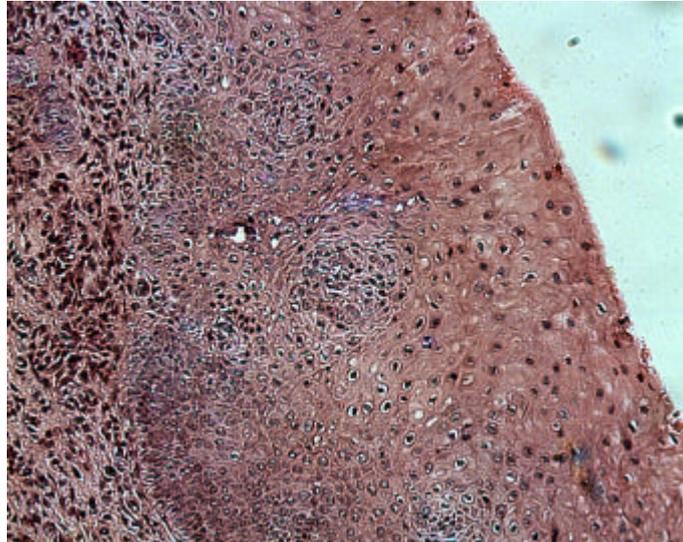


Figura 41 Lâmina histopatológica de NIC I (20x)



Figura 42 Lâmina histopatológica de NIC I (20x)

#### 5.4 Normal, cervicite e NIC I

Foram obtidos ao todo 300 espectros FT-Raman que apresentaram resultados histopatológicos variados entre si, representando desde tecido ectocervical normal sem atipias, algumas amostras com acantose ou paraceratose, cervicite ou exocervicite aguda ou crônica, até lesão intra-epitelial escamosa de baixo e de alto grau. O dendograma representado na figura 43, apresenta todos os espectros de mucosa normal, cervicite e NIC I, permitindo visualizar que a similaridade entre esses espectros é de mais de 72,26 %. Em todos os grupos formados nesse dendograma, representado em vermelho, verde e azul, encontramos espectros de espécimes classificados anátomo-patologicamente como colo normal, cervicite e displasia leve. Isto sugere que não foi possível distinguir os espectros com relação à equivalência histopatológica para esse grupo.

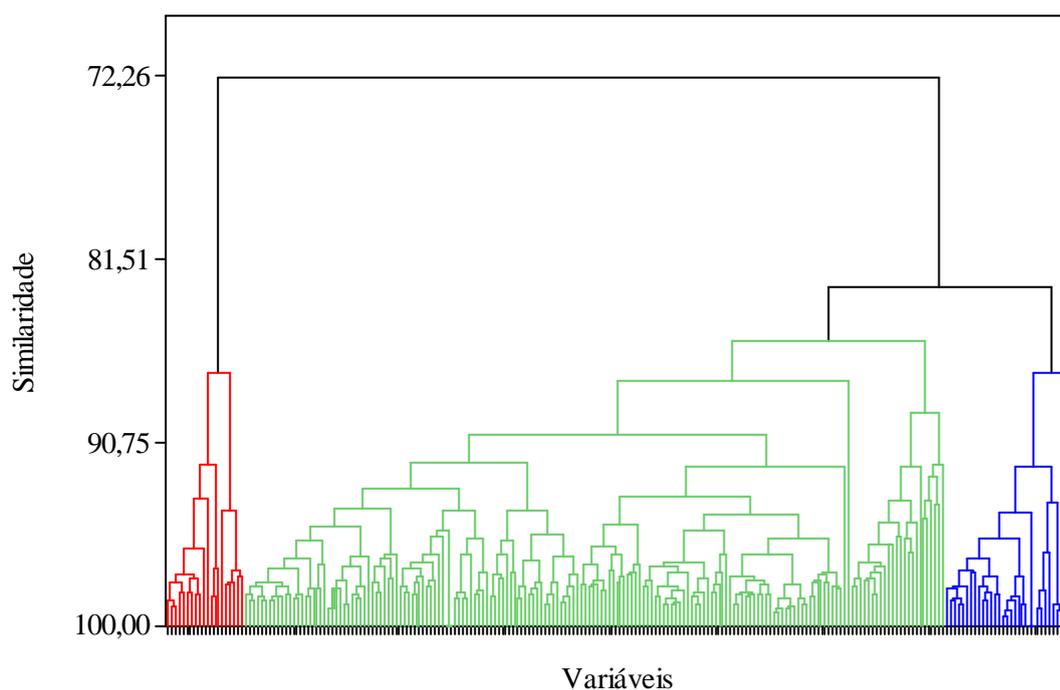


Figura 43 Dendograma representativo do cálculo do coeficiente de correlação entre os espectros de tecido epitelial cervical normal, cervicite e NIC I: 72,26 % similaridade

Subsequentemente esses espectros foram submetidos à ACP através do *software* MINITAB ® Release 14.20. Esta análise fornece informações sobre os quatro primeiros componentes principais: PC1, PC2, PC3 e PC4.

A escolha desses grupos para realização da análise ocorreu de forma proposital, ressaltando a importância da discriminação clínica e histopatológica entre os mesmos. Os grupos sugeridos para análise classificatória foram: Colo normal *versus* cervicite *versus* NIC I.

Posteriormente, foram relacionados os componentes principais entre si como por exemplo PC1 versus PC2, representando o grupo normal *versus* cervicite e NIC I (Figura 44) demonstrando que os espectros não se separaram em grupos distintos.

A Figura 44 mostra PC1 versus PC3, PC1 versus PC4, também comparando espectros do grupo normal com cervicite e NIC I de forma que cada agrupamento resultou na construção de gráficos de dispersão, onde foram obtidas as classificações dos espectros. Nessa figura, os espectros apresentaram-se sem agrupamento específico.

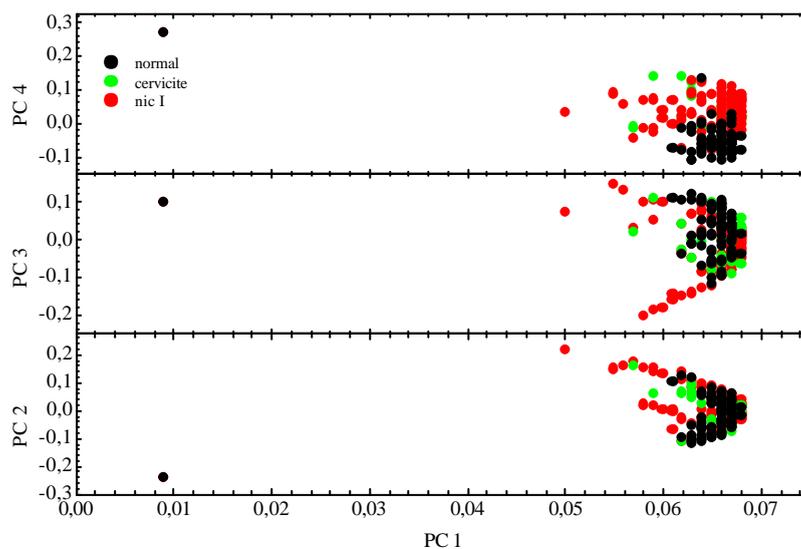


Figura 44 Dispersão entre espectros normal x cervicite x NIC I

A análise dos gráficos representativos da ACP com os critérios PC2 *versus* PC4 permitiu separar *clusters* de espécimes de colo normal *versus* cervicite e NIC I.

A partir dessa classificação foi traçada uma linha aleatória entre os clusters PC2 *versus* PC4 para calcular a sensibilidade e especificidade dos achados, que foram de sensibilidade 88,54% e especificidade de 82,1% respectivamente, utilizando o software ORIGIN 7.0. (Figura 45).

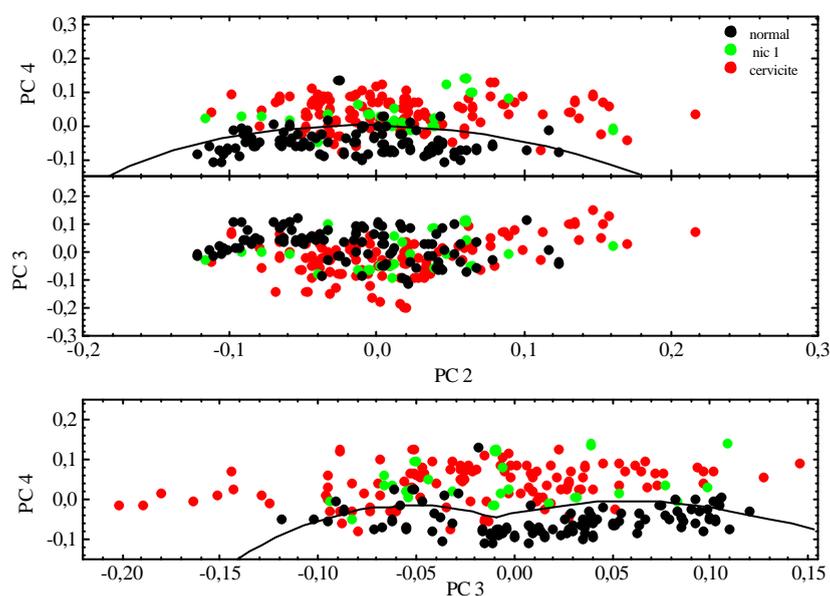


Figura 45 Dispersão entre espectros normal x cervicite x NIC I

A média entre os espectros Raman de tecidos normais de colo uterino, no intervalo de frequência de 800 a 1800  $\text{cm}^{-1}$  é mostrada na figura 46. Foi definida esta região porque bandas espectrais deste intervalo podem ser utilizadas para estudar os principais constituintes moleculares dos tecidos de colo uterino.

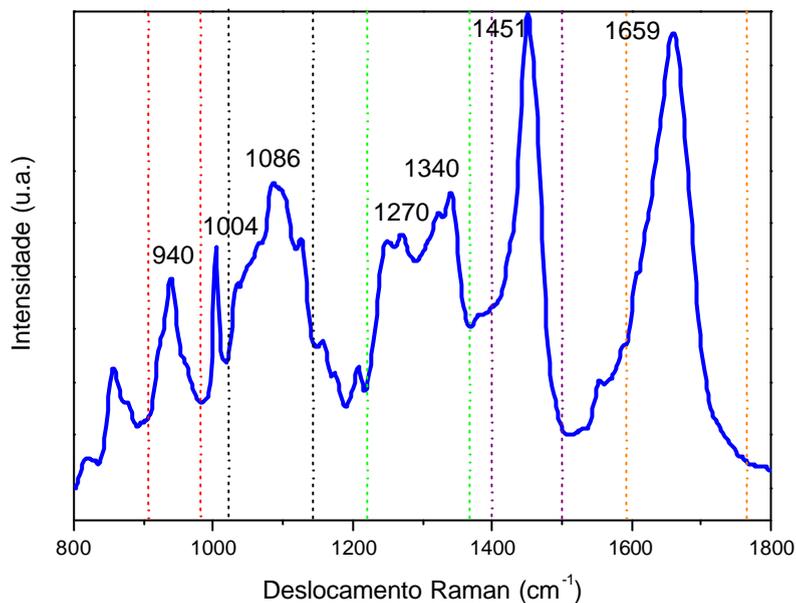


Figura 46 Média dos 117 espectros FT-Raman de amostras de colo uterino normal entre 800 e 1800  $\text{cm}^{-1}$  com linhas de base corrigidas e normalizadas vetorialmente

Tabela 5 - Equivalência dos picos espectrais e constituintes moleculares da média dos espectros de colo uterino normal observados na Figura 46.

Pico dos espectros	constituintes moleculares
$940 \text{ cm}^{-1}$	prolina, valina, proteína e glicogênio
$1000 \text{ cm}^{-1}$	Fenilalanina
$1086 \text{ cm}^{-1}$	$\text{PO}_2$ , ácidos nucleicos
$1270 \text{ cm}^{-1}$ $1340 \text{ cm}^{-1}$	Lipídios, proteínas e amida III
$1451 \text{ cm}^{-1}$	Proteínas e lipídios
$1659 \text{ cm}^{-1}$	Amida I, banda de proteínas

Objetivando estabelecer as características espectrais Raman, calculamos a média entre os espectros Raman de todos os tecidos de colo uterino coletados e estudados neste trabalho, representado na Figura 47.

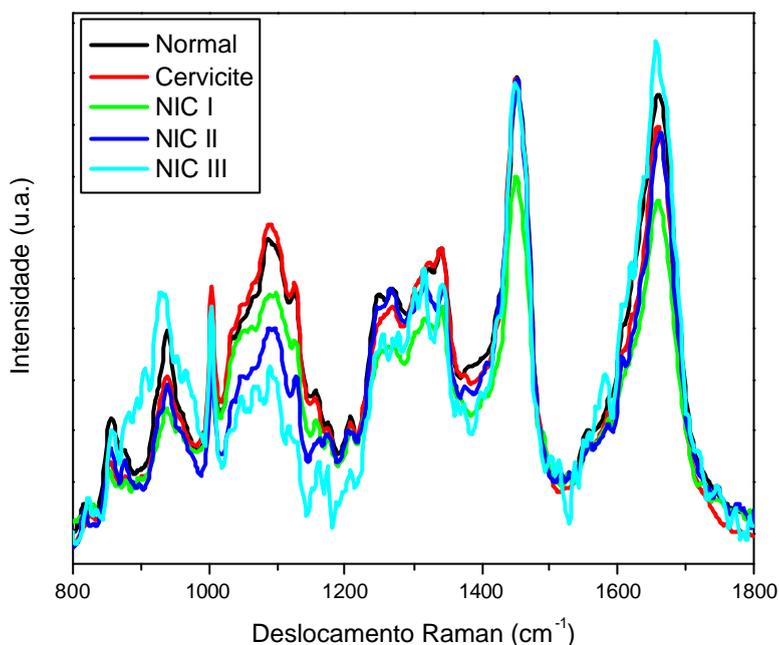


Figura 47 Médias obtidas de todos os espectros FT-Raman de amostras de colo uterino normal, cervicite e displasias com linhas de base corrigidas e normalizadas vetorialmente de 800 a 1800  $\text{cm}^{-1}$

Utilizando a média e o desvio-padrão para estudo dos espectros obtidos por Espectroscopia Raman, obtivemos resultados espectrais de mucosa cervical normal e estes mostraram discreto desvio-padrão, entre a banda 1021 a 1144  $\text{cm}^{-1}$ , região que corresponde ao PO<sub>2</sub> e ácidos nucleicos e da banda 1640 a 1680  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a região de proteínas e amida I (Figura 48).

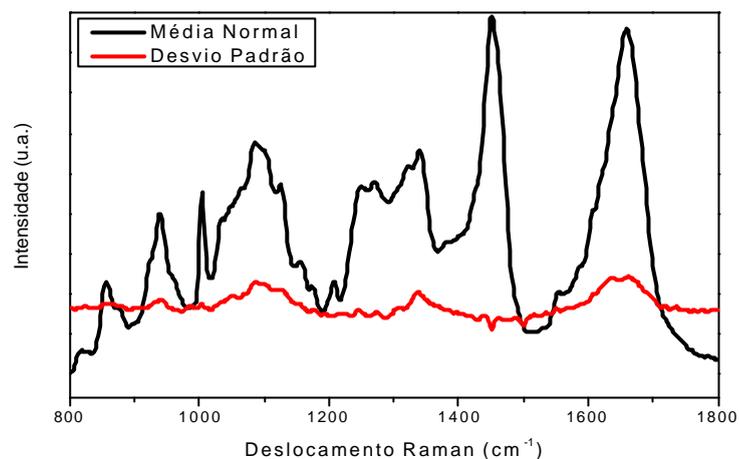


Figura 48 Média e Desvio- Padrão dos espectros de tecidos normais

A descrição dos laudos histopatológicos dos espécimes com diagnóstico de normalidade, apresentou discretas diferenças com relação aos tecidos presentes nas amostras, diferenças estas que podem decorrer do tamanho da amostra coletada. Muitos fragmentos apresentavam somente tecido epitelial característico do ectocérvice, outros, tecido epitelial e conjuntivo, além de amostras que apresentavam tecido epitelial glandular característico do endocérvice. Diante dessas diferenças sugere-se que as alterações observadas no desvio-padrão da média dos espectros possam ocorrer devido a diferenças nas amostras.

Por sua vez, as diferenças encontradas nas amostras de tecido com diagnóstico histopatológico de cervicite podem ter como causa os diferentes graus de infiltrado inflamatório, que diferiam nas distintas amostras, além das mesmas diferenças citadas anteriormente para os tecidos normais. No entanto, o desvio-padrão da média dos espectros das amostras estudadas presentes neste grupo, ocorreu de forma mais intensa entre as bandas 1021 a 1144  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde aos picos de PO2 e ácidos nucléicos respectivamente. A discreta alteração no desvio padrão observada entre as bandas 1640 e 1680  $\text{cm}^{-1}$ , também pode ser explicada como o relatado para os tecidos normais (Figura 49).

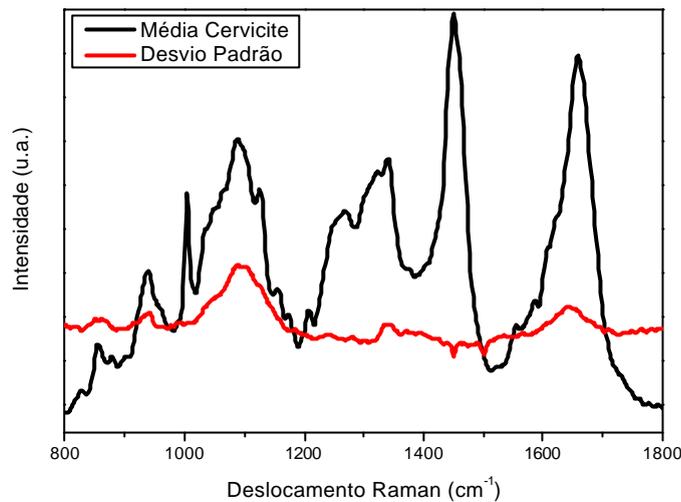


Figura 49 Média e Desvio-Padrão dos espectros de cervicite

A análise dos diagnósticos anátomo-patológicos das amostras classificadas como NIC I também revelaram diferenças com relação ao tamanho da amostra e à sua composição tecidual. Os laudos relataram diferentes tipos de revestimento epitelial, conforme a região de coleta da amostra, bem como variação na proporção de atipias celulares presentes.

Na Figura 50 que representa a média dos espectros referentes aos espécimes de NIC I observou-se que o desvio padrão apresentou-se intenso entre as seguintes bandas: 1021 e 1044  $\text{cm}^{-1}$  que correspondem respectivamente as bandas de  $\text{PO}_2$  e ácidos nucleicos; 1222 e 1362  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem as bandas de lipídios, proteínas e amida III, 1400 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  que correspondem as bandas de proteínas e lipídios; e 1640 e 1680  $\text{cm}^{-1}$  que correspondem as bandas de proteínas e amida I. Todas essas bandas correspondem aos componentes nucleares das células, podendo justificar o tipo de desvio padrão ocorrido nessas regiões.

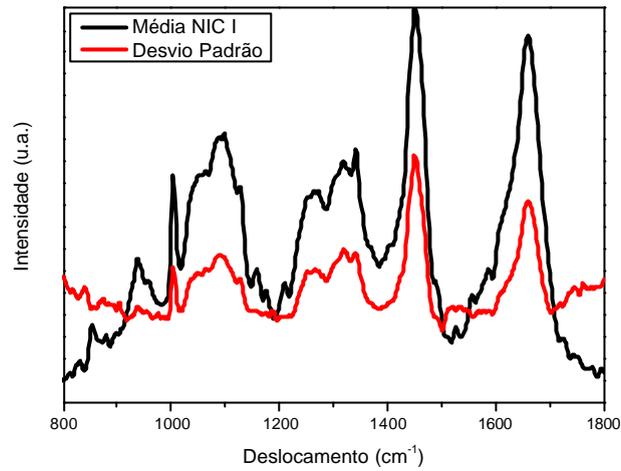


Figura 50 Média e Desvio- Padrão dos espectros de NIC I

As alterações teciduais encontradas na displasia intra-epitelial grau II são maiores que as encontradas na displasia grau I, sendo que o maior número de células modificadas, atingindo dois terços do epitélio, caracteriza esta patologia. Na Figura 51 a demonstraram-se a média e o desvio padrão que representam os espectros estudados de NIC II, observando-se discreto desvio padrão entre às bandas 1021 e 1044  $\text{cm}^{-1}$  que correspondem as bandas de  $\text{PO}_2$  e ácidos nucléicos, respectivamente.

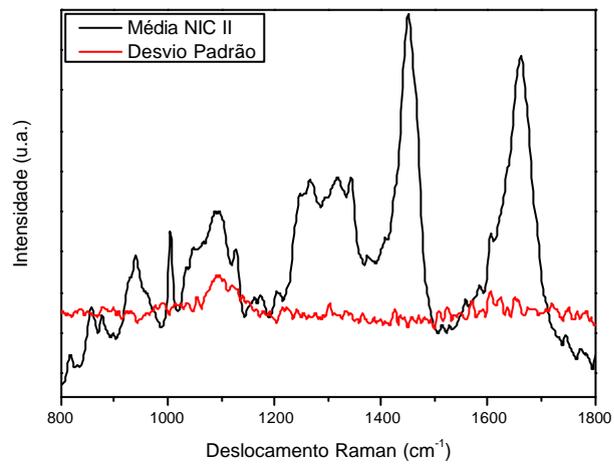


Figura 51 Média e Desvio- Padrão dos espectros de NIC II

As alterações encontradas na lâmina de NIC III, representam a totalidade de núcleos alterados em todo o epitélio escamoso, contabilizando somente uma paciente com esta patologia. O desvio padrão da média desses espectros estudados foi discreto entre as bandas de 1590 e 1765  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde à banda de amida I e proteínas, respectivamente (Figura 52).

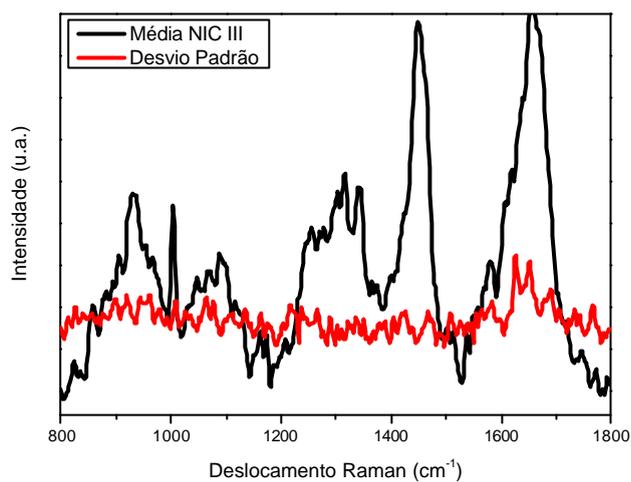


Figura 52 Média e Desvio –Padrão dos espectros de NIC III

## 6 Discussão

Métodos como a citologia ou a colposcopia não fazem diagnóstico individualmente, sendo imprescindível a realização do exame histopatológico, que ainda hoje é o padrão ouro de diagnóstico em patologias cervicais.

Muitos fatores podem complicar e dificultar o trabalho do patologista chegar a um diagnóstico definitivo, a começar pela coleta dos esfregaços endocervical e ectocervical e posteriormente a execução da colposcopia e biópsia.

Ciente das dificuldades, Lira Neto (2000), relatou que é importante saber que na presença de inflamação é necessário repetir o exame após o tratamento antiinflamatório local e/ou sistêmico. Os processos inflamatórios podem levar a resultados falso-positivos, tais como observados com a tricomoníase, a candidose e a gardenerose, que podem determinar uma reação inflamatória tão intensa, que torna muito difícil a separação entre benigno, inflamatório/reacional e neoplásico. Os mímicos de HPV são provavelmente o principal fator de falso positividade. Halos perinucleares, hipertrofia nuclear e binucleação, observados em processos inflamatórios, podem dificultar de tal maneira o diagnóstico diferencial com alterações HPV-induzidas, que a exclusão ou afirmação da condição neoplásica fica impossível, tanto em nível citológico quanto histopatológico. Nesses casos é importante repetir o exame após tratamento.

A histologia, apesar de ser padrão ouro para o diagnóstico final, também pode apresentar limitações. Os fragmentos devem ter em média 3 mm, visto que fragmentos menores são considerados insatisfatórios e maiores necessitam ser seccionados em frações menores.

De acordo com Lira Neto (2000), nem todos os achados colposcópicos alterados possuem correspondência histológica com neoplasias epiteliais. Oitenta por cento dos casos de achados colposcópicos anormais são descritos como tênues, discretos, leves ou grau 1 e não apresentam significado oncológico imediato, tais como acantose, paraqueratose, queratose, depleção glicogênica, hiperplasia basal reacional, espongiose e

exocitose. Apenas 18% dessas alterações colposcópicas apresentam as características histológicas das neoplasias intra-epiteliais, geralmente de grau I.

O mesmo autor ainda comenta que menos de um terço das lesões histológicas não apresenta características clássicas ou bem definidas das lesões clássicas de NIC I, II ou III. Assim é possível que haja discordância entre patologistas, principalmente quando as lesões são limítrofes (alterações histológicas entre NIC I e II, ou entre NIC II e III). No caso de dúvida sugere-se que outro patologista revise a lâmina, mas é bom lembrar que nem sempre o laudo da revisão é o correto. Se houver discordância entre o primeiro e o segundo laudo, torna-se obrigatória a realização de uma terceira análise por um terceiro patologista.

Estatisticamente, 80% das amostras teciduais analisadas histologicamente com lesão HPV induzida, apresentam infiltrado inflamatório crônico sem presença de displasia. No presente estudo, das 50 amostras coletadas de colo uterino com lesão HPV induzida o resultado histopatológico demonstrou 28 cervicites, 14 displasias leves e 5 displasias graves. Este fato pode ser explicado pelo fato do HPV inicialmente, não conseguir integrar-se ao DNA da célula hospedeira, devido à imunidade celular própria de cada indivíduo: Somente após um período aproximado de 2 anos é que o vírus pode vencer ou não as barreiras imunológicas, conseguindo ou não integrar-se ao DNA da célula infectada (LIRA NETO,2000).

É importante salientar que todas as pacientes examinadas e submetidas à biópsia do colo uterino, não haviam sido submetidas a tratamento medicamentoso, antes da realização da biópsia. Ressalta-se ainda, que haviam amostras de colo uterino com dimensões inferiores a 3mm, podendo gerar dificuldades para a análise anátomo-patológica

As amostras coletadas permitiram catalogar 300 espectros provenientes de 71 pacientes. O maior número de amostras coletadas foi de pacientes que apresentavam colo uterino normal, isso, porque havia um interesse primário em se comparar amostras de colo uterino normal e colo uterino com lesões HPV induzidas. É importante salientar que as

pacientes submetidas a biópsia do colo uterino não foram prejudicadas em seus tratamentos em nenhum momento.

Os espectros encontrados neste estudo representam dois tipos de tecido presentes no colo uterino humano, o endocervical e o ectocervical. Portanto, pode-se sugerir que os diversos espectros Raman encontrados corresponderiam aos diferentes componentes presentes em cada tipo de tecido característico de distintos locais anatômicos ou de diferentes patologias.

As análises estatísticas aplicadas neste estudo permitiram notar que, assim como referido por Mahadevan-Jansen *et al.*, (1998), displasias de baixo grau apresentavam espectros com picos em 1070 e 1656  $\text{cm}^{-1}$ , menos intensos do que os espectros de tecido normal nessas regiões. No entanto, esses autores relataram que tecidos com displasia leve apresentavam maior intensidade no pico em 1451  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto no presente estudo os espectros de displasia leve apresentavam menor intensidade do que a observada em amostras de tecido normal nesta região (Figura 47).

Quando correlacionada a média dos espectros de colo normal à média dos espectros de NIC II, notou-se que somente o pico 1086  $\text{cm}^{-1}$  representado pelo  $\text{PO}_2$  e ácidos nucleicos, apresentava intensidade menor em relação aos espectros de tecido normal e NIC I. Neste mesma região a média dos espectros de NIC III, foi ainda menos intensa com relação a todas as outras médias.

Quando comparadas amostras de colo uterino com diagnóstico de cervicite e colo normal, não foram observadas alterações espectrais nas médias dos espectros, quanto à intensidade. Assim sendo, pode-se sugerir que não houve diferença espectral entre cervicite e colo normal, por este tipo de análise estatística (Figura 47). A visualização da figura 47 permite notar discreta sobreposição espectral de NIC III nos picos em 940 e 1659  $\text{cm}^{-1}$  em relação aos outros demais espectros dos tecidos que compunham a amostra, referentes a tecido normal, cervicite, NIC I e NIC II.

Na Figura 44 e 45 podem ser observados os PCs entre os dados de colo uterino normal, cervicite e NIC I. Na figura 45, que representa PC 2 *versus* PC4, constatamos que os espectros de colo uterino normal separaram-se daqueles com cervicite e NIC I. Esta representação mostrou que a Espectroscopia Raman foi eficiente na distinção entre tecido normal e tecido alterado de colo uterino

Encontrou-se, na dispersão do PC 2 *versus* PC4 (Figura 45), sensibilidade de 88,54% e especificidade de 82,1%, permitindo considerar esse resultado próximo da realidade. A sensibilidade de 88,54%, observada na dispersão, mostrou resultados classificados como falso-positivos em 11,5% dos espectros que compunham a presente amostra. Por sua vez, a probabilidade de ocorrerem resultados falso-negativos era de 17,9%, decorrente da especificidade de 82,1% observada neste estudo.

A representação gráfica dos espectros dos espécimes estudados através de dendogramas permitiu observar que amostras de colo uterino, com resultado histopatológico de mucosa normal, situam-se em dois grandes grupos, mostrando assim que os espectros normais têm 84,16% de similaridade entre si, concordando com os resultados histopatológicos.

O dendograma correlacionado ao grupo histopatológico de cervicite, mostrou 73,03% de similaridade entre os espectros, notando-se que a Espectroscopia Raman permitiu separar os espectros em dois grupos. Sob o aspecto histopatológico, as lâminas de cervicite apresentavam-se com variedade na intensidade inflamatória e tecidual (Figura 37, 38 e 39).

Os espectros de NIC I também foram separados no dendograma em dois grupos, um maior e outro menor. Neste último, encontravam-se 4 espectros pertencentes a 2 pacientes que não apresentaram laudos histopatológicos diferentes em relação às outras pacientes.

No dendograma da Figura 43, onde foram estudadas todas as amostras caracterizadas histopatologicamente como normais, cervicite e NIC I, os espectros destes

grupos se misturaram e formaram 3 grupos. Todos os grupos formados contendo amostras de colo uterino normal, com cervicite e com NIC I.

Ao estudar a média e desvio padrão dos espectros normais (Figura 48) verificou-se discreto desvio padrão nos picos de  $1086\text{ cm}^{-1}$  e  $1656\text{ cm}^{-1}$ , que são as bandas dos  $\text{PO}_2$ , ácidos nucléicos, amida I e proteínas respectivamente. Sabe-se que estes elementos participam na composição do esqueleto celular (ácidos nucléicos, como o DNA, e proteínas que formam o citoesqueleto) e de estruturas de sustentação teciduais como, por exemplo, o colágeno e a elastina.

Segundo Lira Neto (2000), o epitélio escamoso apresenta um número determinado de células que varia de acordo com o momento endócrino da mulher. Como as participantes deste estudo submetidas à biópsia apresentaram idade que variaram entre 16 e 61 anos, sugere-se que estes desvios no pico  $1086\text{ cm}^{-1}$ , possam decorrer da variação da espessura desses epitélios, e conseqüente variação na quantidade de núcleos nesta região. Isto pode ser explicado pelos variados níveis hormonais observados nas diversas faixas etárias do gênero feminino, como, por exemplo, o estrogênio, que na mulher mais jovem é abundante e deixa o epitélio com todas as camadas arquiteturalmente perfeitas. Nas mulheres idosas, principalmente nas menopausadas, o epitélio cervical apresenta-se atrófico, com menor quantidade de tecido conjuntivo e vascular. O epitélio apresenta espessura reduzida e pouca vascularização, o que poderia explicar o discreto aumento no desvio-padrão na região do pico  $1656\text{ cm}^{-1}$ , onde predominam as proteínas que participam na composição do esqueleto celular e das estruturas de sustentação.

Por outro lado, no grupo das pacientes com cervicite (Figura 49), o desvio padrão no pico  $1656\text{ cm}^{-1}$ , banda da amida I, que apresenta predomínio de proteínas, pode decorrer de hiperplasia epitelial ou de diferenças quantitativas/qualitativas no volume das amostras estudadas. No pico  $1086\text{ cm}^{-1}$ , que representa a banda do  $\text{PO}_2$  e ácidos nucléicos, o aumento no desvio padrão da média dos espectros, pode ser atribuído ao fator inflamatório encontrado nestas amostras. Inflamações vaginais provocadas por *Trichomonas*, *Candida*, *Gardnerella vaginalis* e os mímicos de HPV, dificultam o diagnóstico, pela formação de halos perinucleares, hipertrofia nuclear e binucleação.

Na média do grupo dos espectros que apresentaram como resultado histopatológico NIC I (Figura 50), ocorreram alterações acentuadas no desvio-padrão nos picos de 1086, 1270, 1340, 1452 e 1659  $\text{cm}^{-1}$ . No pico 1086  $\text{cm}^{-1}$ , o desvio foi da mesma intensidade observada nos espécimes com cervicite, devido, provavelmente, ao fator inflamatório, aos mimicos de HPV, e também ao próprio HPV. Na banda de 1659  $\text{cm}^{-1}$  encontrou-se desvio-padrão discretamente maior, se comparado aos referentes a cervicite. Processos inflamatórios intensos poderiam prejudicar a análise histopatológica pelo excesso de estruturas celulares presentes no campo histológico, bem como pela presença de necrose celular. Outros processos poderiam estar associados, como a presença de paraceratose, onde há queratinização das células epiteliais e hiperplasia reacional da camada basal, representada pela duplicação da camada de células germinativas e presença de núcleos hipertrofiados.

A banda entre 1222 e 1362  $\text{cm}^{-1}$  inclui os picos 1270 e 1340  $\text{cm}^{-1}$ , e corresponde aos lipídios, proteínas e amida III respectivamente. Na média dos espectros obtidos das amostras de NIC I o desvio padrão aparece com intensidade mediana nesses picos (Figura 50). Alterações decorrentes de infecção por HPV, determinam grandes alterações epiteliais, como hiperkeratose, hiperplasia basal e discariose, lembrando que se observa, em todos esses processos, grande quantidade de proteínas, o que pode explicar o desvio encontrado nesta região nas amostras estudadas.

O desvio padrão encontrado no pico de 1452  $\text{cm}^{-1}$  da média dos espectros com resultado histopatológico de NIC I (Figura 50) foi de grande intensidade, o que não aconteceu nas outras patologias, com relação a essa banda, onde predominam proteínas e lipídios. Na região compreendida entre os picos 1222 e 1362  $\text{cm}^{-1}$ , a intensidade do desvio padrão pode decorrer da presença de infiltrado inflamatório abundante, com conseqüente aumento da celularidade no espécime estudado, o que é característico de cervicite e NIC I. Ainda, é importante ressaltar que na displasia leve, ocorrem alterações celulares que não estão presentes na cervicite. Por conta disto, essa alteração epitelial apresentaria maior quantidade de proteínas. A grande variedade nas características das amostras histopatológicas, mostra a dificuldade do diagnóstico de NIC I, pois nesse estágio as

alterações epiteliais são discretas quando comparadas ao tecido com processo inflamatório.

Portanto, nessa fase, em que os componentes teciduais apresentam composição bioquímica semelhante, fica difícil a diferenciação entre processos inflamatórios crônicos e alterações displásicas. A presença do processo inflamatório associado às atipias celulares observadas nos casos de NIC poderia explicar o aumento na intensidade do desvio-padrão encontrado na média dos espectros de NIC I.

Na média dos espectros de NIC II (Figura 51) visualiza-se exclusivamente um discreto desvio na banda do pico  $1086\text{ cm}^{-1}$ , novamente o pico que corresponde à banda do  $\text{PO}_2$  e ácidos nucléicos, banda onde vibra o DNA.

É importante ressaltar que, apesar das diferenças histológicas e anatômicas associadas à importante influência hormonal e inflamatória a que estão sujeitos os tecidos presentes no colo uterino, a utilização da Espectroscopia FT-Raman permitiu caracterizar e diferenciar amostras de tecidos normais daqueles com diagnóstico de cervicite e NIC I, apresentando sensibilidade de 88,14 % e especificidade de 82,1%, quando comparados aos resultados anátomo-patológicos.

## 7 Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo permitem sugerir que a utilização da Espectroscopia FT-Raman:

- 1- possibilitou identificar a existência de diferenças espectrais entre tecido de colo de útero normal, cervicite e NIC I, confirmadas através da análise histopatológica das referidas amostras teciduais.
- 2- Correlacionou os espectros dos grupos de colo normal, cervicite e NIC I e identificou que as variáveis possuíam similaridade igual ou maior a 72,26 %.
- 3- A dispersão do PC2 *versus* PC4, demonstrou sensibilidade de 88,54 % e especificidade de 82,1 % entre os achados espectrais e resultados histopatológicos de tecido normal x cervicite e NIC I.

## 8 Sugestões para estudos futuros

Após a conclusão deste estudo com tecidos de colo uterino normal e HPV positivos sugere-se para outros estudos:

- 1- Realização de estudo com maior número de amostras de colo uterino tanto normal quanto HPV induzidas.
- 2- Realizar estudos comparativos de amostras de colo uterino normal com amostras de lesões de lesões HPV induzidas, porque mais de 90% dos carcinomas de colo do útero são HPV induzidos.
- 3- Estudar a possibilidade de desenvolvimento de uma fibra óptica para medir espectros Raman, que possa diagnosticar lesões epiteliais de baixo e alto grau no colo uterino *in vivo*, durante o exame colposcópico.

## Referências

ABRÃO, F.S. **Tratado de Oncologia genital e Mamária**. São Paulo: Roca, 1995. p. 39-48.

ARAÚJO, S. R. **Citologia e histopatologia básicas do colo uterino para ginecologistas: “Uma sessão de slides”. A mente aprende melhor por imagens**. Curitiba: VP Editora, 1999. Disponível em: [WWW.aprp.org.br/livrototalpdf](http://WWW.aprp.org.br/livrototalpdf). Acesso em: 26 fev. 2006.

BARRY, B, M.; EDWARDS, H, G, M.; WILLIAMS, A, C. Fourier Transform Raman and Infrared Vibrational Study of Human Skin: Assignment of Spectral Bands. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 23, p. 641-645, 1992.

BORGES, S. C. V.; et al. Taxa de Detecção do Papilomavírus Humano pela Captura Híbrida II, em mulheres com Neoplasia Intra-epiteliais Cervical. **RBGO**, v. 26, n. 2, p. 105-106, 2004.

CAMPOS, S. HPV –Ginecologia mulher [www.drashirleydecampos.com.br](http://www.drashirleydecampos.com.br) Acesso dia 22/11/2006

CHOO-SMITH, L.P. *et al.* Medical applications of Raman spectroscopy: From proof of principle to clinical implementation. **Biopolymers**, n.67, v.1, p.1-9, 2002.

CRUPI, V. *et al.* Recent results on biomedical problems: A Fourier transform infrared (FT-IR) study. **Spectroscopy- An International Journal**, v.16, n. 3-4, p. 245-250, 2002.

CORDEIRO, M. R. A. *et al.* Inspeção visual do colo uterino após aplicação de ácido acético no rastreamento das neoplasias intra-epiteliais e lesões induzidas por HPV. **RBGO**, v.27, n. 2, p. 52, 2005.

DE PALO, G. **Colposcopia e patologia do trato genital inferior**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1996. p. 48, 125-189.

DACOSTA, R. S.; WILSON, B. C.; MARCON, N. E. New optical technologies for earlier endoscopic diagnosis of premalignant gastrointestinal lesions. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, p.S85-S104, 2002.

DOUGLAS, C.R. **Patofisiologia Geral**. São Paulo: Robe, 2000. p.1110-1125,.

FRUSHOUR, B, G.; KOENIG, J, L. **Raman scattering of collagen, gelatin and Elastin**. **Biopolymers**, v.14, p.379-391, 1975.

HANLON, E. B. et al. Prospect for in vivo Raman spectroscopy. **Phys Med Biol**. v.45, p.1-59, 2000.

HATA, T. R. *et al.* Non-invasive Raman spectroscopy detection of carotenoids in human skin. **J. Invest Dermatol.**, v. 115, n 3, 2000.

HUANG, Z. W. *et al.* Rapid near-infrared Raman spectroscopy system for real-time in vivo skin measurements. **Optics letters**, v. 26, n.22, p. 1783-1784, 2001

**INCA -Programa Nacional de controle do câncer do colo do útero e de mama – Viva mulher: HPV, perguntas e respostas mais frequentes.** Disponível em : [www.inca.gov.br/](http://www.inca.gov.br/). Acesso em 01 mar. 2006.

JACYNTHO, C; BARCELOS, C. Infecção pelo HPV e lesões pré-neoplásicas genitais. **Rev. Femina**, v.27, n. 9, p. 681, 1999.

KAMINAKA, S. *et al.* Near-infrared multichannel Raman spectroscopy toward real-time in vivo cancer diagnosis. **J Raman spectrosc**, v. 33, n. 7, p. 511-516, 2002.

KEITH, M. L. **Anatomia orientada para a clínica.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 253.

LAKOVISC, J.R. **Principles of Fluorescence spectroscopy.** New York: Plenum, 1983.

LIRA NETO, J. B. L. **Atlas de citopatologia e histologia do colo uterino.** Rio de Janeiro: Medsi, p.4-6, 10, 15-18, 47-50, 69-71, 74-78, 87- 89, 2000.

LIU, C.H. *et al.* Raman Fluorescence and time-resolved light scattering as optical diagnostic techniques to separate diseased and normal biomedical media. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v.16, p.187-209, 1992.

MARCOS, J. B. **Colposcopia e Patologia Cervical.** São Paulo: BYK, p.29, 1997.

MAHADEVAN-JANSEN, A; RICHARDS-KORTUM, R. Raman Spectroscopy for the detection of cancer and precancers. **Journal of Biomedical optics**, v.1, n.1, p.31-70, 1996.

MANOHARAN, M.; WANG, Y.; FELD, M. S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. **Spectrochimica ACTA.** v.52, p.215-249, 1995.

MAHADEVAN-JANSEN, A; *et al.* Development of a Fiber Optic Probe to Measure NIR Raman Spectra of Cervical Tissue in Vivo. **Photochemistry and Photobiology** v. 68, n. 3, p. 427-431, 1998.

MAHADEVAN-JANSEN, A; *et al.* Near-Infrared Spectroscopy for in vitro detections of cervical precancers. **Photochemistry and Photobiology** v. 68, n1, p. 123-132, 1998.

MARSHALL, F. F. Spectroscopy in prostate cancer: hope or hype? **Oncology-New York**, v.15, n.11, p.1418, 2001.

MARTIN, A, A.; BITTAR, R, A.; NUNES, L, O.; ARISAWA, E, A.; SILVEIRA JR, L. Principal Components Analysis of FT-Raman spectra of *ex-vivo* basal cell carcinoma. **Biomedical Vibrational Spectroscopy**, v.5321, n.7, p.198, 2003.

MARZZOCO, A; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica.** 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara

Koogan.1999.360p.

MELO, I. **A infecção pelo Papilomavirus Humano**. Disponível em [www.colposcopia.org.br](http://www.colposcopia.org.br). Acesso em 20 nov. 2006.

MILLIGAN, G.W.; COOPER, M.C. A study of variable standardization. **Journal of classification**. v.5, p 181-204.1988.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

NETTO, A. R. *et al.*, Alternativas para o Rastreamento do Câncer do Colo Uterino. **Rev. Femina**, v. 30, n. 10, p. 693-694, 2002.

NEVILIAPPAN, S.; KAN, L. F.; WALTER, T. T. L.; ARULKUMARANN, S. Infrared spectral features of exfoliated cervical cells, cervical adenocarcinoma tissue, and an adenocarcinoma cell line. **Gynecologic oncology**. v. 85, p. 170-174, 2002

PAPAS, D.; SMITH, B.W.; WINEFORDNER, J. D. **Raman spectroscopy in bioanalysis**. **Talanta**, n.51, p.131-144, 2000.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K.; **Princípios de Bioestatística. (Principles of Bioestatistic)**. Trad. Luis Sérgio de Castro Paiva: Medidas-Resumo Numéricas. 2ª ed. São Paulo: Thomson. p.35-47, 2000.

PETICOLAS, W. L.; EVERTSZ, E. **Conformation of DNA in vitro and in vivo from laser Raman Scattering**. *Methods Enzymology*, v. 211, p 335-352, 1992.

PIATO, S. **Tratado de Ginecologia**. 2ª ed. São Paulo: Artes Médicas, 2002. p. 319-322.

RAMAN, C.V.; KRISHNAN, K. S. **Nature**, v. 121, p. 501-711, 1929.

ROBBIN, S. L.; COTRAN, R. S.; **Patologia Bases Patológicas das Doenças**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.1058-1093, 1105-1108, 1119-1124, 2005.

SARIAN, L. O. Z.; *et al.* Carga viral do Papilomavírus Humano na Predição da Gravidade de Lesões Cervicais em Mulheres com Atipias Celulares na Colpocitologia Oncótica. **RBGO**, v. 25, n. 5, p. 365-366, 2003.

SHAFER-PELTIER, K. E. *et al.* Raman microspectroscopic model of human breast tissue: implications for breast cancer diagnosis in vivo. **J Raman spectrosc**, v. 33, n.7, p.552-563, 2002.

STRYER, L. **Biochemistry**, Freeman, New York, 1988.

STONE, S.; KENDALL, C.; SMITH, J.; CROW, P.; BARR, H. Raman Spectroscopy for identification of epithelial cancers. **Farady Discuss**, v.126, p.141-157, 2003.

SONG, L. M. W. K. *et al.* Spectral diagnosis of colon cancer in an animal model and spectral calssification of human colon polyps using Raman spectroscopy. **Gastroenterology**, v.78, n.1, p.1538, 2000.

SINGER, A. MONAGHAN, J.M. **Colposcopia-Patologia e Tratamento doTrato Genital inferior**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. p. 43-44, 105.

SMITH, L. I. A tutorial on principal component analysis. Disponível em: [http://csnet.otago.ac.nz/cosc453/student\\_tutorials/principal\\_components.pdf](http://csnet.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf). Acesso em: 10 set 2006.

STEVENS, A; LOWE, J. S. **Histologia Humana**. 2.ed. São Paulo: Manole , 2001. p.5-9.

TWARDOWSKI, J.; AZENBACHER,P. Raman and IR Spectroscopy in biology and biochemistry. New York: Ellis Horwood, 1994.

UYTZINGER, U., *et al.*, Near-infrared Raman spectroscopy for in vivo detection of cervical precancers. **Appl. Spectrosc.** v.55, n.8, p. 955-959, 2001

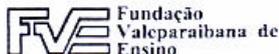
U.F.C.- Universidade Federal do Ceará .**Efeito Raman**.Disponível em: <<http://www.seara.ufc.br/ufc/fisica/raman/raman.html>> Acesso em: 14 agos. 2005.

VIEIRA,E,C.; GAZZINELLI,G.; MARES-GUIA,M. **Bioquímica Celular e Biologia Molecular**. 2.ed SãoPaulo: Atheneu, 1999. p.45-76.

WEENER, F .; LONGMIRE, M . **Dispersive and Fourier Transform Raman Spectroscopy**, v.16, n.2, 2001.

ZEFERINO, L. C.; AMARET AL.,R.G.; DUFLOTH, R. M. HPV e a Neoplasia do Colo do Útero. **Rev. Femina**, v.30, n. 7, p.471-475, 2002.

## Anexo – A



UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º L168/2004/CEP, sobre “*Estudo das lesões do colo uterino por espectroscopia Raman*”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Airton Abrahão Martin, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, conforme Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

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.

São José dos Campos, 11 de maio de 2005

---

**PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR**

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Univap

## **Anexo - B**

### **Formulário de consentimento ao paciente**

Obter dados que permitam diagnosticar, avaliar e propor bases moleculares para o estudo do desenvolvimento do Câncer de colo uterino, são objetivos de pesquisadores de estudos clínicos científicos. É por meio destes, que são obtidas novas informações sobre os mecanismos envolvidos nessa doença, podendo oferecer novas possibilidades de diagnóstico precoce e tratamento adequado para essa patologia.

Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa a utilização da espectroscopia Raman para diferenciação entre um tecido normal e um tecido anormal em amostras de biópsia de colo uterino, que estão sendo por este serviço tratadas.

É rotineiro o envio de amostras teciduais para exame histopatológico, exame este necessário para um diagnóstico definitivo, uma destas amostras será encaminhada para o exame histopatológico e outra amostra para a pesquisa com espectroscopia Raman.

A obtenção e o estudo do referido fragmento não implicará em riscos adicionais no seu tratamento.

Este estudo foi previamente apresentado à Comissão de Ética em Pesquisa da UNIVAP. Trata-se de uma nova técnica chamada Biópsia Óptica ou também Espectroscopia Raman a qual através da emissão de uma luz laser sobre a amostra, irá obter respostas com detalhes de suas ligações bioquímicas.

A espectroscopia é uma técnica não invasiva e de resultados em tempos real que trará muitas vantagens na área de Oncologia com diagnóstico precoce do câncer.

Os fragmentos de mucosa biopsiada foram identificados no laboratório por código formado por números e letras, permitindo manter a privacidade e identidade do paciente. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato das pacientes.

Concordando com o uso do material para os fins acima descritos, é necessário esclarecer que não existe qualquer benefício ou direito financeiro a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa, mas também não há qualquer tipo de despesa adicional para fazer parte deste estudo. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos

procedimentos propostos neste estudo, o participante tem o direito a tratamento médico no consultório da pesquisadora.

Se não houver concordância na doação do material para pesquisa, esta decisão não influenciará de modo algum no tratamento.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a mestrandia Maria Christina Botelho Mendonça Yassoyama, que pode ser encontrada no endereço, Rua Shishima Hifumi, 2911- Urbanova, São José dos Campos- SP, tel:(12) 3947-1165 (Universidade do Vale do Paraíba – Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica).

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o “Estudo comparativo de lesões de colo uterino por Espectroscopia Raman e histopatologia”.

Eu discuti com o Dr.(a)\_\_\_\_\_ sobre a minha decisão em participar nesse estudo, ficando claro para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e risco, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também, que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de atendimento ambulatorial quando necessário. Concordo voluntariamente em participar do mesmo, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício no meu atendimento ou que eu possa ter adquirido neste serviço.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

.....

Assinatura do paciente/ representante legal

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

.....

Assinatura da testemunha

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Para casos de pacientes menores de 18 anos de idade, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

.....

Assinatura do responsável pelo estudo

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_