

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA

ȘCOALA DOCTORALĂ

**STUDIU CLINIC, MORFOLOGIC ȘI
COLPOSCOPIC AL NEOPLAZIILOR
CERVICALE INTRAEPITELIALE**

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

Conducător de doctorat,

Prof. Univ. Dr. Sabina BERCEANU

Student - doctorand,

Ștefan PAITICI

CRAIOVA

2018

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ

1. ELEMENTE DE ANATOMIE ȘI HISTOLOGIE A COLULUI UTERIN.....	2
2. ELEMENTE DE BAZĂ ALE EXAMINĂRII COLPOSCOPICE.....	2
3. ZONA DE TRANSFORMARE A COLULUI UTERIN.....	3
4. PARTICULARITĂȚI PRIVIND IMPORTANȚA ȘI BIOLOGIA VIRUSULUI HPV ÎN INFECȚIA GENITALĂ.....	3
5. ELEMENTE DE MANAGEMENT CONSERVATOR ȘI TEHNICI CHIRURGICALE LA NIVELUL COLULUI UTERIN ANORMAL.....	3

PARTEA SPECIALĂ

1. INTRODUCERE.....	4
<i>1.1. OBIECTIVELE STUDIULUI.....</i>	<i>4</i>
2. MATERIAL ȘI METODĂ.....	4
<i>2.1. STUDIUL CLINIC.....</i>	<i>5</i>
<i>2.2. STUDIUL COLPOSCOPIC.....</i>	<i>6</i>
<i>2.3. STUDIUL PRIVIND CHIRURGIA COLULUI UTERIN.....</i>	<i>7</i>
<i>2.4. STUDIUL MORFOLOGIC MICROSCOPIC.....</i>	<i>8</i>
<i>2.5. STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC.....</i>	<i>8</i>
3. REZULTATE.....	9
4. DISCUȚII.....	11
5. CONCLUZII.....	13
6. BIBLIOGRAFIE.....	14

CUVINTE CHEIE: COL UTERIN, CITOLOGIE, HPV, LSIL, HSIL, NEOPLAZII INTRAEPITELIALE, COLPOSCOPIE, CHIRURGIE, MORFOLOGIE, IMUNOHISTOCHIMIE.

PARTEA GENERALĂ

1. ELEMENTE DE ANATOMIE ȘI HISTOLOGIE A COLULUI UTERIN

Tractul genital inferior feminin include cervixul, vaginul și vulva și este unic prin faptul că aceste zone sunt ușor accesibile evaluării clinice dar și paraclinice. O subspecialitate medicală – citopatologia cervico-vaginală - și o explorare imagistică - colposcopia sunt dedicate screening-ului, diagnosticului, și monitorizării leziunilor premaligne și cancerelor intraepiteliale de la acest nivel.

Când este examinat cu speculul deschis, colul apare ca o structură circulară. În consecință, zone topografice de pe suprafața cervicală sunt identificate convențional prin analogie cu un cadran de ceas. Cervixul uterin normal are o lungime de aproximativ 3 cm și diametrul de aproximativ 2 cm, la pacientele nulipare reprezentând aproximativ 50% din volumul uterin [1, 2].

Majoritatea regiunii cervicale externe este acoperită cu epiteliu scuamos stratificat nekeratinizat. Această zonă este, de asemenea, cunoscută sub numele de ectocervix sau exocervix.

Celulele scuamoase cervicale sunt arbitrar împărțite în patru straturi distincte [3, 4]. Stratul celulelor bazale sau germinale este compus dintr-unul până la două straturi de celule cuboide mici, care conțin nucleii mari în formă rotund-ovalară de culoare închisă. Mitozele sunt prezente ocazional la acest nivel. Stratul celular parabazal sau spinocelular este compus din celule poliedrice neregulate cu nucleii mari, întunecați, ovalari. Nucleolii pot fi văzuți în majoritatea cazurilor la aceste celule. Stratul intermediar sau navicular constă în celule aplatizate, cu citoplasmă bogată în glicogen și cuprinde majoritatea celulelor scuamoase. Nucleii sunt mici, întunecați și rotunzi, iar nucleolii nu sunt foarte vizibili. Stratul superficial sau stratul cornos este alcătuit din celule plate, alungite cu nucleii mici picnotici. Colagenul este prezent în celulele mai superficiale [3].

Probele testului Papanicolaou (Pap) din cervix implică răzuirea din suprafața exocervicală și o porțiune a suprafeței nevizualizate endocervical utilizând diferite dispozitive de eșantionare. Pe măsura maturării continue evoluând către straturile superficiale, celulele scuamoase își pierd desmosomii funcționali și se separă una de cealaltă. Prin urmare, celulele exocervicale extrase pentru examinarea citologică sunt celule care s-au exfoliat de pe suprafață și apar sub microscop ca celule individuale în probele Papanicolaou. Pe de altă parte, celulele endocervicale nu sunt stratificate și în general, nu sunt exfoliate. Când sunt răzuite, celule endocervicale sunt de obicei eliminate în aglomerări care apar ca și clustere de celule examinate microscopic. Astfel, recoltat pe vârful screției estrogenice specimenul citologic va conține în majoritate celule superficiale și intermediare [4].

2. ELEMENTE DE BAZĂ ALE EXAMINĂRII COLPOSCOPICE

Colposcopul reprezintă instrumentul optic ce permite iluminarea și examinarea mărită a tractului genital inferior. Lumina intensă transiluminează

epiteliul și mărirea permite examinarea atentă a epiteliului de suprafață și a vaselor de sânge subepiteliale [5, 6].

În acest capitol am abordat aspecte curente cu privire la: instrumentele necesare examinării colposcopice (speculul vaginal, forcepsul de biopsie, chiuretele endocervicale sau retractoare ale pereților vaginali laterali), tehnica examinării colposcopice, obținerea și procesarea datelor și a imaginilor, dar și particularitățile examinării colposcopice în sarcină.

3. ZONA DE TRANSFORMARE A COLULUI UTERIN

Examinarea colposcopică are rolul de a detecta leziunea, în momentul în care rezultatul examenului citologic este unul anormal. Cel mai important obiectiv al examinării colposcopice este acela de a detecta zona de transformare anormală [7, 8].

În cadrul acestui capitol am analizat următoarele aspecte: zona de transformare normală, modificarea neoplazică a zonei normale de transformare și zona de transformare anormală.

În continuare, am structurat informații actuale în ceea ce privește: epiteliul aceto-alb, epiteliul iod-negativ, punctația, mozaicul, vasele atipice, leucoplazia, eroziunea și ulcerația și vegetațiile cervicale.

4. PARTICULARITĂȚI PRIVIND IMPORTANȚA ȘI BIOLOGIA VIRUSULUI HPV ÎN INFECȚIA GENITALĂ

Relația dintre HPV și cancerul cervical este acum bine stabilită [9-15]. Infecția HPV provoacă teoretic aproape toate cazurile de CIN3 și cancer cervical și aproximativ 40-50% dintre cancerele vaginale și vulvare, 50% dintre cancerele peniene, și 90% dintre cancerele anale [15-19].

Diferite studii caz-control au demonstrat că marea majoritate a femeilor cu neoplazie cervicală, prezintă niveluri detectabile de ADN HPV [37-48], și că prezența HPV cu risc crescut este predictivă pentru un risc crescut de CIN cu grad înalt [20-23].

Aspectele abordate în acest capitol se referă în mod special la: istoria naturală și ciclul de viață al HPV, mecanismele infecției genitale cu HPV, particularități ale transmiterii HPV pe cale genitală, co-factori ai infecției HPV prin prisma apariției neoplaziilor cervicale și progresia infecției HPV spre neoplazii intraepiteliale și cancer cervical.

5. ELEMENTE DE MANAGEMENT CONSERVATOR ȘI TEHNICI CHIRURGICALE LA NIVELUL COLULUI UTERIN ANORMAL

În acest ultim capitol al părții generale m-am referit atât la elemente de management, cât și la anumite tehnici chirurgicale utilizate în tratamentul leziunilor cervicale intraepiteliale. Managementul leziunilor cervicale a fost abordat prin prisma următoarelor aspecte: managementul leziunilor LSIL la adolescente, în sarcină și la

femeile după menopauză, managementul leziunilor HSIL la adolescente, femei tinere sau în sarcină, managementul leziunilor CIN2 și CIN3 la adolescente și în sarcină, dar și managementul exciziei cu margini pozitive.

În ceea ce privește tehnicile chirurgicale utilizate am structurat informații curente cu privire la electroexcizia cu ansa (LEEP), conizația electrochirurgicală și nu în ultimul rând conizația cu bisturiul rece.

PARTEA SPECIALĂ

1. INTRODUCERE

Screeningul citologic cervical reprezintă unul dintre succesele majore în controlul și prevenția cancerului de col uterin [24]. Testul Babeș-Papanicolaou (Pap) se bazează pe principiul conform căruia celulele scuamoase epiteliale se exfoliază în mod repetat, astfel încât celulele epiteliale normale sau anormale sunt descumate la nivel cervical și prelevate pentru examinarea citologică [25].

Deși performanța citologiei exfoliative a crescut capacitatea de identificare indirectă a neoplaziei cervicale, aceasta are cu siguranță limite, însă îmbunătățirea frotiului Papanicolaou convențional, așa cum este prelevarea în mediu lichid și procesarea electronică, a generat rezultate mai performante ale acestui test [26].

Este vast acceptat faptul că infecția cu HPV precede apariția bolii neoplazice într-un interval de timp variabil, iar testarea HPV poate detecta cu 30-100% mai multe leziuni preinvazive, comparativ cu citologia convențională și cu 20-50% mai multe leziuni precanceroase decât citologia în mediu lichid [27-31].

1.1. OBIECTIVELE STUDIULUI

Obiectivul studiului doctoral a fost acela de a căuta corelații clinice cu influență asupra patologiei colului uterin în general și asupra leziunilor preinvazive intraepiteliale cervicale în special.

De asemenea, scopul lucrării de doctorat a fost reprezentat și de analiza caracteristicilor citologice și colposcopice ale leziunilor cervicale LSIL și HSIL și de a realiza corelații histologice și imunohistochimice în aceste leziuni CIN1, CIN2 și CIN3.

2. MATERIAL ȘI METODĂ

Studiul doctoral retrospectiv și prospectiv observațional, s-a desfășurat în perioada Octombrie 2016 - August 2018, pe un lot constituit din 137 de paciente cu citologie cervicală recoltată în mediu lichid, pozitivă pentru LSIL sau HSIL, respectiv ASC-US, ASC-H, AGC și HR-HPV.

Cazurile din loturile de studiu au fost selectate din cazuistica Clinicii II Obstetrică-Ginecologie, Spitalul Clinic Județean de Urgență Craiova, Clinicii II Chirurgie generală, Spitalul Clinic Județean de Urgență Craiova, și practica privată a unui Centru Medical de Obstetrică - Ginecologie din Craiova.

Vârsta medie a pacientelor din seria mea a fost de 35 de ani (16-54 de ani).

2.1. STUDIUL CLINIC

Prin perspectiva studiului clinic au fost luate în considerație următoarele variabile (**Tabelul 1**): vârsta, multiparitatea, sarcina, utilizarea anterioară a dispozitivului intrauterin, prezența dispozitivului intrauterin la momentul includerii în studiu, menopauza, fumatul, patologia ginecologică asociată.

Tabelul 1. Caracteristici clinice și criteriile de includere în studiu

Criteriul de includere în studiu		N (%)	
Anomalie citologică identificată prin Pap test	ASC-US	20 (14.59)	
	HR-HPV	43 (31.38)	
	ASC-H	3 (2.18)	
	LSIL	28 (20.43)	
	HSIL	57 (41.6)	
	AGC	6 (4.37)	
Sângerare postcoitală aparent inexplicabilă		78 (56.93)	
Leziune HPV vulvară sau vaginală asociată		19 (13.86)	
Eroziune cervicală la examinarea ginecologică de rutină		21 (15.32)	
Ulcerație la nivelul colului uterin la examinarea ginecologică de rutină		16 (11.67)	
Tumoră cervicală la examinarea ginecologică de rutină		5 (3.64)	
Partener diagnosticat cu leziune sau condiloame la nivelul tractului genital inferior		13 (9.48)	
Tipul de citologie pe întreg lotul de studiu		LSIL	HSIL
N (%)		28 (20.43)	57 (41.6)
Testare HPV	HR-HPV	Atle tipuri HPV *	HR-HPV + Alte tipuri HPV *
	N (%)	N (%)	N (%)
	24 (17.51)	16 (11.67)	19 (13.86)
Caracteristici clinice			
Vârsta (ani) N (%)	16-21	32 (23.35)	
	21-30	40 (29.19)	
	30-40	33 (24.08)	
	40-50	23 (16.78)	
	50-60	9 (6.56)	
Multiparitatea		28 (20.43)	
Sarcina		17 (12.4)	
Utilizarea anterioară a dispozitivului intrauterin		41 (29.92)	
Prezența dispozitivului intrauterin la momentul includerii în studiu		6 (4.37)	
Menopauza		8 (5.83)	

Fumatul	54 (39.41)
Patologie ginecologică asociată	32 (23.35)
N - număr de cazuri; ASC-US - Atypical squamous cells of undetermined significance/ Celule scuamoase atipice cu semnificație nedeterminată; HR-HPV - High risk HPV/ HPV cu risc crescut; ASC-H - Atypical squamous cells - cannot exclude HSIL/ Celule scuamoase atipice - nu se poate exclude HSIL; LSIL - Low-grade squamous intraepithelial lesion/ Leziune scuamoasă intraepitelială cu grad scăzut; HSIL - High-grade squamous intraepithelial lesion/ Leziune scuamoasă intraepitelială cu grad înalt; AGC - Atypical glandular cells/ Celule glandulare atipice.	
* <i>Tipurile - 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66.</i>	

2.2. STUDIUL COLPOSCOPIC

Evaluarea colposcopică a fost efectuată utilizând un echipament videocolposcopic care permite captarea și stocarea imaginilor pentru a configura baza de date a studiului.

Evaluarea coloposopică a fost efectuată prin aplicarea inițială a soluției saline normale (soluție de clorură de sodiu 0,9%). Următorul pas în evaluarea leziunilor cervicale a fost aplicarea acidului acetic 3-5%, menținând contactul tisular timp de 2 minute. Ultima etapă a examinării colposcopice a fost aplicarea soluției de iod diluate Lugol (soluția de iod diluată la jumătate sau la o pătrime), verificând anterior dacă pacienta nu este alergică la iod (**Tabelul 2**).

Tabelul 2. Evaluarea colposcopică

Scopul examinării colposcopice * ¹	Identificare/ diferențiere	Soluții utilizate	Magnificare
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Vizualizarea colului uterin și stocarea imaginilor; ➤ Descrierea detaliată a joncțiunii scuamo-columnare: <ul style="list-style-type: none"> • Identificarea zonei de transformare; • Dimensiunea, forma, conturul, localizarea și extinderea leziunilor; • Corelații cu testul Pap; • Augmentarea 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Leucoplazia; ▪ Vascularizația anormală. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Soluție salină (0.9% Clorură de Sodiu) *² 	Minimă (3.75x)
			Medie (7.5x)
			Maximă (15x)
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diferențierea dintre epiteliul normal și anormal; ▪ Intensitatea tisulară aceto-albă. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Acetic acid (3-5%) 	Minimă (3.75x)
			Medie (7.5x)
			Maximă (15x)
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Captarea soluției iodate; ▪ Marginile leziunii; 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Soluție Lugol (soluție de iod) 	Minimă (3.75x)
			Medie (7.5x)
			Maximă

managementului terapeutic.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Caracteristicile conturului leziunii; ▪ Extensia leziunii. 	diluată la jumătate sau la o pătrime)	(15x)
* ¹ Colposcopia a fost efectuată numai de către medici instruiți și certificați, conform legislației; * ² Evaluare nativă și cu filtru verde.			

2.3. STUDIUL PRIVIND CHIRURGIA COLULUI UTERIN

În studiul de față au fost practicate biopsia excizională și intervenții chirurgicale ablativă. În seria mea am avut cazuri diagnosticate cu LSIL și HSIL (CIN1, 2 și 3) și, prin urmare, tehnicile folosite pentru chirurgia ablativă au fost LEEP (loop electrosurgical excision procedure/ electrorezeecția cu ansa diatermică), excizia cu bisturiul electric și conizația electrochirurgicală sau procedura de electrorezeecție cu ansa diatermică *top hat* (**Tabelul 3**).

Intervenția chirurgicală a fost practică în 98 de cazuri din lotul meu de studiu, în timp ce conduita conservatoare, cu sau fără biopsie excizională a fost adoptată în 39 dintre cazuri (**Tabelul 4**).

Tabelul 3. Conduita chirurgicală

Tehnica chirurgicală	Control colposcopic	
LEEP/ electrorezeecția cu ansa diatermică	Secțiune unică (o singură tură a ansei de rezeecție)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aplicarea soluției Lugol pentru delimitarea marginilor lezionale; ▪ Marcarea zonei inițiale și finale (start/ stop) a turei de ansă (ora 3 respectiv ora 9); ▪ Diferite dimensiuni de anse - adaptate extinderii lezionale; ▪ Profunzimea de secțiune: 5-8 mm; ▪ Margine de siguranță de 4-6 mm exterior de leziune; ▪ Putere de secțiune de 30-50 Watt; ▪ Acționarea curentului anterior contactului tisular; ▪ Tura de ansă efectuată lent și continuu; ▪ Controlul hemostazei; ▪ Aspirație.
	Secțiuni multiple (mai multe ture ale ansei de rezeecție)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Similar cu secțiunea unică; ▪ Marcarea zonei inițiale și finale (start/ stop) a turei de ansă (ora 6 respectiv ora 12); ▪ Una sau două dimensiuni de anse; ▪ Două sau mai multe specimene tisulare.
Excizia cu bisturiul electric	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lame pentru electro-bisturiu de diferite dimensiuni; ▪ Secțiune unică sau multiplă (una sau mai multe ture 	

<p>Electrorezeția cu ansa diatermică top hat</p> <p>Conizația electrochirurgicală</p>	<p>ale lamei de rezeție)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Profunzimea de secțiune: 15 mm; ▪ Incizie circulară de aproximativ 8 mm la nivelul colului uterin; ▪ Putere de secțiune de 40-50 Watt; <ul style="list-style-type: none"> ○ Mișcare continuă; ○ Control hemostază; ○ Aspirație.
---	--

Tabelul 4. Managementul cazurilor din lotul de studiu

<p>Conduită chirurgicală N = 98 (71,53%)</p>	<p>LEEP N (%)</p>	<p>45 (45.91)</p>
	<p>Conizația electrochirurgicală N (%)</p>	<p>39 (39.79)</p>
	<p>Electrorezeția cu ansa diatermică top hat N (%)</p>	<p>14 (14.28)</p>
<p>Conduită conservatoare N = 39 (28,46%)</p>	<p>Biopsie excizională N (%)</p>	<p>14 (35.89)</p>
	<p>Tratament conservator medical (± reevaluare colposcopică*) N (%)</p>	<p>25 (64.1)</p>
<p>N - număr de cazuri; LEEP - loop electrosurgical excision procedure/ electrorezeția cu ansa diatermică; * 6-8 luni sau 8-12 luni.</p>		

2.4. STUDIUL MORFOLOGIC MICROSCOPIC

În cadrul studiului morfologic microscopic au fost analizate speci­me­nele tisulare provenite atât prin biopsie excizională, cât și cele provenite prin intervențiile chirurgicale ablativ­e.

Toate speci­me­nele tisulare au fost fixate în prealabil în soluție de formaldehidă neutră 10%, la temperatura ambien­tală, incluse ulterior la parafină după protocolul histopatologic.

Speci­me­nele au fost secțion­ate utilizând un microtom HM350, echipat cu un sistem de transfer al secțiunilor pe apă (STS, microM).

În vederea studiului histologic, au fost realizate secțiuni cu o grosimea de 5 microni, evidențiate ulterior prin colorații histologice clasice.

2.5. STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC

Pentru colorarea imunohistochimică lamele au fost deparafinate și hidratate în mod similar cu tehnica pentru Hematoxină-Eozină. După hidratare, s-a realizat

demascarea antigenului prin căldură cu ajutorul microundelor, iar pH-ul soluțiilor, temperatura acestora și durata tratamentului au reprezentat cei mai importanți factori (Tabelul 5).

Tabelul 5. Anticorpii utilizați pentru tehnica imunohistochimică

Anticorpul primar	Producător	Clona	Soluție de demascare antigenică	Diluție anticorp primar	Anticorp secundar
Anti Ki67	Dako	Clone MIB-1	EDTA pH 9	1:50	Monoclonal Mouse Anti-Human Ki67
Anti-p53	Dako	DO-7	EDTA, pH 9	1:50	Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein
Anti-HPV	Dako	Clone K1H8	Citrat pH 6	1:50	Monoclonal Mouse Anti-Human Papilloma Virus (HPV)
Anti-p63	Dako	4A4	Citrat, pH=6	1:50	Monoclonal Mouse Anti-Human p63 protein
Anti-BCL-2	Dako	Clone 124	EDTA pH 9	1:50	Monoclonal Mouse Anti-Human BCL-2 Oncoprotein
Anti CD20	Dako	Clone L26	Citrat pH 6	1:50	Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy
Anti CK7	Dako	Clone OV-TL 12/30	Citrat pH 6	1:50	Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 7

3. REZULTATE

Caracteristicile clinice au reliefat, prin prisma vârstei pacientelor, o incidență crescută a anomaliilor cervicale în intervalul 21-40 de ani, respectiv 40 (29.19%) de cazuri în grupa de vârstă 21-30 de ani și 33 (24.08%) de cazuri în intervalul 30-40 de ani, acestea fiind urmate de intervalul 16-21 de ani (23.35%), 40-50 de ani 16.78% și 6.56% în grupa de vârstă 50-60 de ani.

Analiza datelor cu privire la anomaliiile citologice identificate prin testul Babeș-Papanicolaou a arătat prezența HSIL în 57 (41.6%) dintre cazuri, HR-HPV în 43 (31.38%), LSIL 28 (20.43%), ASC-US în 20 (14.59%) de cazuri, iar AGC și ASC-H în 6 (4.37%), respectiv 3 (2.18%) dintre cazurile din lotul analizat în acest studiu.

În ceea ce privește infecția cu HPV în lotul de studiu, în urma genotipării ADN-HPV am diagnosticat 24 (17.51%) de cazuri infectate cu tuplini HPV cu risc crescut (tipurile 16, 18), 16 (11.67%) cazuri prezentând infecții cu alte tipuri HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66), în timp ce 19 (13.86%) dintre cazuri au prezentat infecții mixte (HR-HPV + Alte tipuri HPV). Astfel, incidența generală a infecției HPV la nivelul întregii serii de studiu a fost de 43% (59 cazuri).

De asemenea, analizând criteriile de includere în studiu pe de o parte, dar și indicația pentru colposcopie, pe de altă parte, am constatat că sângerarea postcoitală aparent inexplicabilă a survenit în peste jumătate dintre cazurile studiate (78/ 56.93%). Leziunile HPV vulvare sau vaginale asociate au fost diagnosticate cu o incidență de 13.86% (19 cazuri), în timp ce eroziunea cervicală la examinarea ginecologică de rutină a fost identificată în 21 (15.32%) dintre cazurile studiate.

În aceeași manieră, ulcerarea la nivelul colului uterin la examinarea ginecologică de rutină a fost diagnosticată în 16 (11.67%) cazuri, prezența unei formațiuni tumorale/ pseudotumorale la examinarea ginecologică de rutină a fost constatată în 5 (3.64%) cazuri, în timp ce 13 (9.48%) dintre paciente au avut partener diagnosticat cu leziune sau condiloame la nivelul tractului genital inferior.

Prin perspectiva datelor clinice, am identificat de asemenea 17 (12.4%) paciente gravide, în toate cazurile fiind vorba de sarcini unice. Multiparitatea a fost constatată în 28 (20.43%) dintre cazuri, în timp ce utilizarea anterioară a dispozitivului intrauterin a fost consemnată în 41 (29.92%) de cazuri, iar prezența dispozitivului intrauterin la momentul includerii în studiu în 6 (4.37%) dintre cazurile din lotul de studiu.

Nu în ultimul rând, fumatul a fost identificat în anamneza a 54 (39.41%) de cazuri, prezența menopauzei în 8 (5.83%) cazuri, iar patologia ginecologică asociată a fost diagnosticată în 32 (23.35%) dintre cazurile studiate.

Constatăriile citologice și colposcopice caracteristice pentru LSIL și HSIL, respectiv CIN1 și CIN2, 3 au fost concordante în 113 (82.48%) dintre cele 137 cazuri din studiu și discordante în 24 (17.51%) dintre acestea. Cazurile discordante au fost 13 (54.16%) HR-HPV și alte tipuri HPV pozitive, respectiv 11 (45.83%) HR-HPV pozitive (**Tabelul 6**).

Tabelul 6. Constatări colposcopice

LSIL - N (%)		HSIL - N (%)	
Vascularizație absentă	9 (32.14)	Modificări vasculare groase	40 (70.17)
Mozaic fin	15 (53.57)	Mozaic gros	18 (31.57)
Punctație fină	13 (46.42)	Punctație groasă	24 (42.1)
Contur plat	22 (78.57)	Suprafață netedă	30 (52.63)
Apariție condilomatoasă	2 (7.14)	Iodo-negativitate	57 (100)

elevată și neregulată			
Epiteliu aceto-alb palid și translucid	26 (92.85)	Epiteliu aceto-alb dens	50 (87.71)
Epiteliu alb mat	8 (28.57)	Apariție galbenă (Lugol) într-o regiune anterior dens aceto-albă	39 (68.42)
Margini neclare	7 (25)	Contur extern ferm și ascuțit	54 (94.73)
Margini cu apariție geografică	20 (71.42)	Leziune în vecinătatea SCJ	13 (22.8)
<i>N - număr de cazuri; SCJ - joncțiunea scuamo-cilindrică.</i>			

Conduita chirurgicală ablativă în lotul de studiu a fost reprezentată de LEEP în majoritatea cazurilor (45.91%), urmată de conizația electrochirurgicală în 39 (39.79%) dintre cazuri și electrorezeecția cu ansa diatermică *top hat* în 14 (14.28%) dintre acestea.

Reevaluarea colposcopică post chirurgicală a fost efectuată la 6 luni, respectiv 1 an după intervenție. Colposcopia la 6 luni post-intervenție a fost disponibilă în 94 (95.91%) de cazuri, în timp ce examinarea colposcopică la 1 an a fost realizată în 63 (64.28%) dintre cazurile din grupul care a beneficiat de intervenții chirurgicale ablativă.

Reevaluarea citologică și colposcopică a identificat prezența bolii reziduale în 7 cazuri (7.14%), în timp ce majoritatea cazurilor (92.85%) au beneficiat de vindecare chirurgicală fără boală reziduală.

În ceea ce privește studiul histologic și imunohistochimic, în cazul leziunilor CIN1, elementul celular definitoriu pentru leziunile displazice ușoare a fost reprezentat de koilocite. Aceste structuri sunt localizate în cele două treimi superioare ale epitelului scuamos, fiind caracterizate prin prezența unor celule superficiale sau de tip intermediar cu nucleii care sunt măriți până la de trei ori dimensiunea unui nucleu normal al celulei intermediare.

Leziunile CIN2, sau displaziile moderate, sunt diagnosticate atunci când gradul de proliferare la nivelul celulelor bazale sau parabazale și celulele anormale ajung la nivelul a două treimi din grosimea suprafeței epiteliale. Celulele displazice prezintă dispolaritate, hiperromazie, iar anomaliile mitotice sunt identificate dincolo de treimea inferioară a epitelului.

Displaziile cervicale severe, respectiv leziunile CIN3 au fost diagnosticate prin prezența procesului proliferativ celular imatur în toată grosimea epitelului. Mitozele celulare sunt prezente în acest caz foarte aproape sau chiar la nivelul suprafeței epiteliale. Diferențierea CIN3 de carcinomul in situ este dată de prezența unuia sau mai multor planuri reziduale de celule mature la nivelul planurilor superioare.

4. DISCUȚII

În acest studiu am inclus cazuri cu patologie cervicală intraepitelială CIN1, CIN2 și CIN3, analizând anomaliile citologice, colopscopice și morfologice care apar

la nivelul colului uterin, integrând de asemenea în cercetarea doctorală caracteristicile clinice ale pacientelor, precum și datele de patologie chirurgicală.

Consider că acest studiu este important prin avantajul unei analize complexe a leziunilor cervicale, pe de o parte, iar pe de altă parte prin corelațiile obținute în contextul neoplaziei intraepiteliale cervicale prin citologia în mediu lichid, colposcopie, histologie și imunohistochimie.

Este unanim recunoscut faptul că infecția HPV are un rol extrem de important în apariția leziunilor cervicale și progresia spre leziuni invazive. Infecția cu HPV reprezintă cea mai frecventă boală cu transmitere sexuală. Diferite studii privind incidența infecției HPV prezintă rate ale acesteia care variază între 12-56% la femeile sub 21 de ani, aceste valori diminuându-se la aproximativ 2-7% în cazul femeilor cu vârsta de peste 35 de ani [32-35]. Mai mult decât atât, aproximativ 75% dintre infecțiile HPV *de novo*, apar în intervalul de vârstă 15-24 de ani [35].

Prin prisma datelor studiului meu, am identificat prezența diferitelor tipuri de HPV, incluzându-le în special pe cele cu risc crescut în peste 43% dintre cazurile analizate.

Citologia în mediu lichid prezintă anumite avantaje comparativ cu frotiul Papanicolaou convențional, incluzând prelevarea mai completă a celulelor exfoliate pe lamele de examinare, transferul aleatoriu și probabil mai reprezentativ al celulelor pe lame și o vizualizare microscopică îmbunătățită [36].

În seria mea, toate cazurile au fost examinate prin citologie în mediu lichid, oferind o mai mare precizie examinării citologice.

Mai mult, datele publicate arată că lamele citologice monostrat, obținute în mediu lichid, sunt mai fiabile comparativ cu rezultatele metodei de screening convențional [37].

Prin perspectiva datelor clinice din acest studiu, trebuie remarcat numărul semnificativ de cazuri din grupa de vârstă 16-21 de ani (32/ 23.35%), care au întrunit unul sau mai multe dintre criteriile de includere. Aceste date sunt integrate prin prisma infecției HPV, mult mai frecventă în cazul pacientelor adolescente. Astfel, 12 (37.5%) dintre aceste paciente au prezentat infecție HPV. Raportat la studiul lui de Sanjose și *colab.* [38], aceasta este o prevalență destul de mare, comparativ cu cea de 23% prezentată de acești autori. Altfel, trebuie subliniat faptul că pe de o parte, adolescentele prezintă rate crescute de infectare, iar pe de altă parte, în mod compensator și rate crescute de clearance viral [34, 39, 40].

Infecția HPV este cu precădere o patologie a femeii tinere, iar modificările fiziologice care apar în timpul adolescenței, fac aceste femei și mai vulnerabile la acest virus [41].

Utilitatea colposcopiei în ceea ce privește capacitatea sa de detecție precoce a displaziilor cervicale a crescut de-a lungul timpului, datorită implementării scorului de risc, ce permite integrarea diagnosticului colposcopic cu diagnosticul histopatologic corespunzător [37].

Datele din studiul efectuat indică faptul că sensibilitatea și specificitatea metodelor combinate (citologie - genotipare HPV - colposcopie), împreună cu confirmarea histologică și imunohistochimică în cazurile selectate, asigură un management chirurgical mai eficient și un prognostic îmbunătățit al acestor cazuri.

Bornstein și *colab.* consideră faptul că rezultatele colposcopice pot fi evaluate în contextul unui diagnostic colposcopic, cu exactitate proporțională cu experiența examinatorului, variind de la constatări minore până la cancer invaziv sau alte afecțiuni cum ar fi eroziunea, condilomul, polipul, chistul, endometrioza, inflamația, stenoza vaginală sau anomaliile zonei de transformare [42].

Examinarea colposcopică în timpul perioadei de gestație urmărește în primul rând excluderea diagnosticului de cancer invaziv, iar în al doilea rând oferă detalii suplimentare cu privire la managementul conservator al CIN [43, 44].

În cazul pacientelor gravide din acest studiu, regresia leziunilor a fost observată în 3 (17.64%) cazuri, persistența acestora în 9 (52.94%), în timp ce progresia lezională a fost remarcată în 5 (29.41%) dintre cazuri.

Imunohistochimia folosește o abordare pas cu pas a unui set de markeri generici care au avantajul sensibilității și specificității ridicate și corelația clasică cu parametrii morfologici, completând astfel examinarea histopatologică [45].

Examinarea morfologică a specimenelor tisulare oferă cu siguranță elemente extrem de importante pentru diagnostic, dar tehnicile IHC furnizează informații suplimentare privind prognosticul sau pot fi adaptate și reevaluate retrospectiv pentru a examina țesuturile, permițând astfel un diagnostic mai precis [45, 46].

5. CONCLUZII

Citologia în mediu lichid, împreună cu genotiparea ADN-HPV, asigură o rată crescută în detectarea leziunilor intraepiteliale cervicale.

Senzitivitatea și specificitatea metodelor combinate, citologie, genotipare HPV și colposcopie, împreună cu confirmarea histologică și imunohistochimică în cazurile selectate, asigură un management chirurgical mai eficient și un prognostic îmbunătățit al acestor cazuri.

Chirurgia colului uterin sub control colposcopic, respectând protocoalele actuale, este importantă pentru obținerea limitelor de siguranță în leziunile intraepiteliale cervicale.

Corelația semnificativă dintre citologie, colposcopie, histologie și IHC în acest studiu, susține faptul că asocierea dintre citologia în mediu lichid cu eșantionare corectă pentru a asigura specimene de bună calitate, împreună cu o examinare colposcopică riguroasă reprezintă soluții fiabile atât pentru diagnosticul exact al CIN, cât și pentru managementul chirurgical selectiv sau adecvat.

Datele acestui studiu sugerează faptul că LEEP și conizația electrochirurgicală sunt tehnici chirurgicale sigure în tratamentul CIN.

Chirurgia colului uterin trebuie practică cu multă precauție în special la femeile nulipare, având în vedere riscul de naștere prematură sau ruptură prematură a membranelor, asociat chirurgiei cervicale, indiferent de amploarea acesteia.

Intervenția chirurgicală cervicală în cazul pacientelor adolescente reprezintă în marea majoritate a cazurilor o excepție.

Colposcopia în sarcină urmărește excluderea diagnosticului de cancer invaziv și aduce detalii privitoare la managementul conservator al CIN.

Obiectivul evaluării cervicale în CIN asociat sarcinii este continuarea acesteia și excluderea bolii invazive. Tratamentul patologiei cervicale în sarcină trebuie amânat post-partum, exceptând boala invazivă.

Colorația histologică clasică Hematoxină-Eozină a evidențiat modificări în raportul nucleo-citoplasmatic al celulelor CIN.

IHC a demonstrat faptul că proliferarea celulelor anormale este crescută și corelată cu intensitatea oncogenelor BCL-2 și HPV.

Răspunsul inflamator este puternic pozitiv în zona perilezională, iar CK7 este exprimat în celule glandulare normale și negativ în celulele cu modificări displazice, acesta reprezentând un marker prognostic în CIN.

6. BIBLIOGRAFIE

1. Singer A. Anatomy of the cervix and physiological changes in cervical epithelium. In: Fox H, Well M. eds. Haines and Taylor Obstetrical and Gynaecological Pathology. New York, NY: Churchill Livingstone, 1995:225-48.
2. Hellman LM, Pritchard JA. Williams Obstetrics (14th ed.). New York, NY: Appleton-Century-Crofts, 1970:19-30.
3. Hendrickson MR, Atkins KA, Kempson RL. Uterus and fallopian tubes. In: Mills SM, ed. Histology for Pathologists (3rd ed.). Philadelphia-New York: Lippincott-Raven Publishers, 2007:1011-3.
4. Vooijs GP. Benign proliferative reactions, intraepithelial neoplasia and invasive cancer of the uterine cervix. In: Bibbo M, ed. Diagnostic Cytopathology (2nd ed.). Philadelphia, PA: WB Saunders Co., 1997:161-8.
5. Ferris DG, Willner WA, Ho JJ. Colposcopes: a critical review. J Fam Pract 1991;33:506-15.
6. Ferris DG. Video colposcopy. J Low Genit Tract Dis 1997;1:15-8.
7. Ferris DG, Mayeaux EJ Jr., Cox JT. Normal and abnormal colposcopic features. In: Mayeaux EJ Jr., Cox JT (Eds). Modern colposcopy: Textbook and Atlas, 3rd edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2012, 150-233.
8. O'Connor DM. Normal transformation zone. In: Apgar BS, Brotzman GL, Spitzer M. Colposcopy: Principles and Practice, 2nd edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2008, 125-136.
9. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. Vaccine 2008;26(suppl 10):K1-16.
10. Morrison EA, Ho GF, Vermund SH, et al. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. Int J Cancer 1991;49:6-13.
11. Peng HQ, Liu SL, Mann V, et al. HPV types 16 and 33, Herpes Simplex Type 2, and other risk factors in cervical cancer in Sichuan Province, China. Int J Cancer 1991;47:711-6.
12. Konno R, Sato S, Yajima A. Progression of squamous cell carcinoma of the uterine cervix from cervical intraepithelial neoplasia infected with human papillomavirus: a retrospective follow-up study by in situ hybridization and polymerase chain reaction. Int J Gynecol Pathol 1992;11:105-12.
13. Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, et al. Cohort study of risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 associated with cervical papillomavirus infection. N Engl J Med 1992;327:127-78.
14. Peyton CL, Gravitt PE, Hunt WC, et al. Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. J Infect Dis 2001;183:1554-64.
15. Schiffman M, Wentzensen N. From human papillomavirus to cervical cancer. Obstet Gynecol 2010;116(1):177-85.
16. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. J Natl Cancer Inst 1995;87:796-802.
17. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 1999;189:1-3.

18. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-65.
19. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst (monograph)* 2003;31:14-9.
20. Jones CJ, Brinton LA, Hamman RF, et al. Risk factors for in situ cervical cancer: results from a case-control study. *Cancer Res* 1990;50:3657-62.
21. Cuzick J, Terry G, Ho L, et al. Type specific HPV DNA as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 1994;69:167-71.
22. Nobbenhuis M, Walboomers, JM, Helmerhorst TI, Rozendaal, L. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999;354:20.
23. Jacobs MV, Zielinski D, Meijer CJ, et al. A simplified and reliable HPV testing of archival Papanicolaou-stained cervical smears: application to cervical smears from cancer. *Br J Cancer* 2000;82:1421-6.
24. Davey DD. Cytology. In: Apgar BS, Brotzman GL, Spitzer M (Eds). *Colposcopy: Principles and Practice*, 2nd Edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2008, 45-58.
25. O'Connor DM. The cytology and histology of cervicovaginal abnormalities. In: Mayeaux EJ Jr., Cox JT (Eds). *Modern colposcopy: Textbook and Atlas*, 3rd edition, Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia, 2012, 37-58.
26. Lonky NM. Cervical screening with in vivo and in vitro modalities: speculoscopy combined with cytology. In: Apgar BS, Brotzman GL, Spitzer M. *Colposcopy: Principles and Practice*, 2nd edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2008, p. 91-99.
27. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(5):342-50.
28. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004; 68(2):362-72.
29. Lorincz AT. Human Papillomavirus testing. In: Apgar BS, Brotzman GL, Spitzer M (Eds). *Colposcopy: Principles and Practice*, 2nd edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2008, 79-90.
30. Kjaer S, Høgdall E, Frederiksen K, Munk C, van den Brule A, Svare E, Meijer C, Lorincz A, Iftner T. The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period. *Cancer Res*. 2006; 66(21):10630-6.
31. Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, Wacholder S, Castle PE, Glass AG, Mielzynska-Lohnas I, Rush BB, Schiffman M. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95(1):46-52.
32. Alemany L, Saunier M, Alvarado-Cabrero I et al. Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *Int J Cancer* 2015;136(1):98-107.
33. Muñoz N, Méndez F, Posso H et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis* 2004; 190(12):2077-87.
34. Berceanu C, Cîrstoiu MM, Brătilă E, Berceanu S, Simionescu C, Vlădăreanu S. The prophylaxis, diagnosis and management of the polymorphic lesion profile of genital HPV infection in teenage girls, *Revista Ginecologia* 2015, 3(10): 38-44.
35. Insinga RP, Perez G, Wheeler CM et al. Incident cervical HPV infections in young women: transition probabilities for CIN and infection clearance, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(2):287-96.
36. Díaz-Rosario LA, Kabawat SE. Performance of a fluid-based, thin-layer Papanicolaou smear method in the clinical setting of an independent laboratory and an outpatient screening population in New England. *Arch Pathol Lab Med*. 1999; 123(9):817-21.
37. Stănculescu RV, Brătilă E, Baușic V, Vlădescu TC, Vasilescu F, Baușic A, Berceanu C. Review of the biotechnologies and tests used for precancerous cervical lesions diagnosis. *Rom J Morphol Embryol*. 2017; 58(1):7-14.
38. de Sanjose S, Wheeler CM, Quint WG et al. Age-specific occurrence of HPV16 - and HPV18 - related cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013; 22(7):1313-8.

39. Bosch FX, de Sanjose S, Castellsague X. The prospects of HPV vaccination in cervical cancer prevention: results of a new independent trial. *Cancer Discov.* 2011; (5):377-80.
40. Georgalis L, de Sanjosé S, Esnaola M, Bosch FX, Diaz M. Present and future of cervical cancer prevention in Spain: a cost-effectiveness analysis. *Eur J Cancer Prev.* 2016; 25(5):430-9.
41. Moscicki AB. Human Papillomavirus Infection in Adolescents. In: Apgar BS, Brotzman GL, Spitzer M (Eds). *Colposcopy: Principles and Practice*, 2nd Edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2008, 437-449.
42. Bornstein J, Bentley J, Bösze P, Girardi F, Haefner H, Menton M, Perrotta M, Prendiville W, Russell P, Sideri M, Strander B, Tatti S, Torne A, Walker P. 2011 colposcopic terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol.* 2012; 120(1):166-72.
43. Weismiller DG. Colposcopy in pregnancy. In: Apgar BS, Brotzman GL, Spitzer M. *Colposcopy: Principles and Practice*, 2nd edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2008, 411-426.
44. Berceanu C, Brătilă E, Cîrstoiu MM, Berceanu S, Mehedințu C, Ciorțea R, Gheonea IA, Bohilțea R, Mitran M, Vlădăreanu S. Colposcopic assessment and management of the HPV infection in pregnancy. *Revista Ginecologia* 2016, 4(14): 6-12.
45. Mills AM, Paquette C, Terzic T, Castle PE, Stoler MH. CK7 Immunohistochemistry as a Predictor of CIN1 Progression: A Retrospective Study of Patients From the Quadrivalent HPV Vaccine Trials. *Am J Surg Pathol.* 2017; 41(2):143-152.
46. McCluggage G, McBride H, Maxwell P, Bharucha H. Immunohistochemical detection of p53 and bcl-2 proteins in neoplastic and non-neoplastic endocervical glandular lesions. *Int J Gynecol Pathol.* 1997; 16(1):22-7.