

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica

Resposta humoral ao papilomavirus humano e sua relação
com o risco de neoplasia cervical em mulheres submetidas à
rastreamento para o câncer do colo uterino na Liga Feminina de
Combate ao Câncer de Porto Alegre.

Autora: Bernadete Nonnenmacher

Orientador: Gilberto Schwartzmann

Co-orientadores: Eduardo Luis Fabiano Franco
Mary Clarisse Bozzetti.

Tese de Doutorado

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica

Resposta humoral ao papilomavirus humano e sua relação
com o risco de neoplasia cervical em mulheres submetidas à
rastreamento para o câncer do colo uterino na Liga Feminina de
Combate ao Câncer de Porto Alegre.

Autora: Bernadete Nonnenmacher

Orientador: Gilberto Schwartzmann

Co-orientadores: Eduardo Luis Fabiano Franco
Mary Clarisse Bozzetti.

Tese de Doutorado

FICHA CATALOGRÁFICA

Nonnenmacher, Bernadete

Resposta humoral ao papilomavírus humano e sua correlação com o risco de neoplasia cervical em mulheres submetidas à rastreamento para o câncer do colo uterino na Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre / Bernadete Nonnenmacher ; orient. Gilberto Schwastmann ; co-orient. Eduardo Luis Fabiano Franco e Mary Clarisse Bozzetti . - Porto Alegre: 1999.

095 p

Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica : Epidemiologia.

1. Papilomavírus. 2. Epidemiologia. 3. Mulher. I Schwastmann, Gilberto. II. Franco, Eduardo, Luis Fabiano. III. Bozzetti, Mary Carisse. IV. Título.

Biblioteca FAMED/HCPA

À minha família, Nélio, Paulo e Felipe. Obrigado pelo apoio e carinho nestes anos de convivência.

Dedico esta tese de Doutorado às pacientes da Liga Feminina de Combate ao Câncer, pois sem elas este trabalho não teria sido possível.

Dedico também, com um imenso carinho, à todas as mulheres que trabalham como voluntárias na Liga Feminina de Combate ao Câncer. Este trabalho humanitário de valor inestimável engrandece a nossa sociedade.

Agradeço ao meu orientador Gilberto Schwartsmann e co-orientadores Eduardo Luis Fabiano Franco e Mary Clarisse Bozzetti, que são pessoas à quem admiro e tenho muito orgulho de tê-los ao meu lado neste momento de crescimento intelectual. Obrigado pela sabedoria, inteligência e dedicação de vocês; tenho procurado seguir vosso exemplo e pretendo continuar semeando o que vocês me ensinaram.

Tive a honra de poder trabalhar com duas pessoas fantásticas e apaixonadas pela ciência: Doutores John Schiller e Doug Lowy no Instituto Nacional do Câncer em Bethesda, Estados Unidos. Muito obrigado pela oportunidade que vocês me deram de poder realizar estudos importantes e obrigado também pela acolhida afetuosa.

Gostaria de agradecer também ao Instituto de Saúde e Instituto Nacional do Câncer (EUA). É uma Instituição grandiosa e com um trabalho inestimável. Trabalhar nesta Instituição modificou para sempre a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Luisa Lina Villa: você é um exemplo de mulher em meio à comunidade científica no Brasil e no Mundo. Agradeço todo o apoio recebido na realização das amostras de DNA e seu incentivo durante estes anos em que temos convivido.

O meu agradecimento ao Nilo Ikuta e diretores da Empresa Simbios de Biotecnologia.

A ciência nos põe em contato com pessoas sábias e bondosas: Dr. Attila T. Lőrincz e Iwona Mielzynska; o meu muito obrigado pelo trabalho que pude desenvolver junto à DIGENE.

O meu agradecimento especial em dobro ao Dr. Javier Pintos que analisou estatisticamente os dados deste trabalho. Como parte do pagamento da minha dívida por tê-lo esquecido em 96, uma homenagem ao meu país vizinho, o Uruguai.

Agradeço novamente aos Doutores João Carlos Prolla e Antônio Carlos Pütten, pela avaliação das amostras cito-patológicas.

À Enfermeira Eneida Ratzkowski, que trabalhou comigo na coleta das amostras na Liga Feminina de Combate ao Câncer.

Agradeço o apoio financeiro concedido pela FAPERGS.

Agradeço à CAPES o auxílio recebido como aluna de Doutorado pela UFRGS.

Obrigado aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica e um muito obrigado às nossas secretárias Débora, Helena e Leticia. Vocês estão por trás dos bastidores mas só conseguimos chegar até aqui com a ajuda de vocês.

Obrigado à Universidade McGill em Montreal por ter me recebido por duas vezes.

ABREVIACOES

ASCUS - "atypical squamous cells of undetermined significance" - CEASI

CEASI - células atípicas de significado indeterminado - ASCUS

DNA - cido desoxirribonucléico

DO - densidade ptica

DST - doenças sexualmente transmissíveis

ELISA - "enzyme-linked immunosorbent assay" - ensaio imunoenzimático

HPV - "human papillomavirus" - papilomavírus humano

HSIL - "high grade squamous intraepithelial lesion" - LEIAG

IC - intervalo de confiança

IgG - Imunoglobulina da classe G

LCR - "long control region" - região regulatória longa

LEIAG - lesão escamosa intraepitelial de alto grau

LEIBG - lesão escamosa intraepitelial de baixo grau

Log - logaritmo na base 10

LSIL - "low grade squamous intraepithelial lesion"

NIC - neoplasia intraepitelial cervical

OR - "odds ratio" - razão de chances

ORF - "open reading frame" - fase aberta de leitura

PBS - "phosphate buffered saline" - salina fosfato tamponada

PCR - "polymerase chain reaction" - reação de polimerização em cadeia

RAN - razão de absorvâncias normalizadas

SFB - soro fetal bovino

SIL - "squamous intraepithelial lesion" - lesão intraepitelial escamosa

VLP - "virus-like particles" - partículas semelhante a vírus

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
REVISÃO DA LITERATURA	15
OBJETIVOS.....	33
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	34
ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLES	41
ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS.....	49

INTRODUÇÃO

No Brasil o câncer de colo uterino é o segundo câncer que mais acomete as mulheres nas regiões nordeste, sudeste, sul e centro-oeste. Na região norte esta neoplasia ainda ocupa o primeiro lugar. Em 1998, o Instituto Nacional do Câncer estimou 21.725 casos novos de câncer de cérvix no Brasil apresentando uma taxa específica de câncer estimada em 29,2 por 100.000 mulheres (Brasil/Ministério da Saúde, 1998).

Dados atuais indicam uma queda na incidência e mortalidade por câncer de colo uterino em nosso país e demais países no mundo (Brasil/Ministério da Saúde, 1995 e 1998; Casciato, Lowitz, 1990; WHO, 1995). O rastreamento dessa lesão através do exame Papanicolaou (exame citopatológico de células esfoliadas da cérvix uterina) contribuiu sobremaneira para essa queda, em especial pela eficácia desse exame na detecção de lesões pré-malignas e carcinoma in situ, além da facilidade de seu emprego e baixo custo (Papanicolaou, Traut, 1943; Reid, 1987).

No Rio Grande do Sul, foram registrados 11940 óbitos por câncer no ano de 1997, dos quais 5274 ocorreram em mulheres (44,2%). Destes, o câncer de mama foi responsável por 748 óbitos, enquanto que o colo de útero resultou em 328 óbitos.

Ainda que tenha havido um aumento no coeficiente de mortalidade por câncer do colo uterino em nosso Estado, isto reflete provavelmente a melhoria no processo de notificação da doença e não um aumento real no coeficiente de mortalidade. O coeficiente de mortalidade por câncer do colo uterino no Rio Grande do Sul (6,0/100.000), apesar de ser um dado não ajustado, é muito inferior ao observado para o Brasil como um todo (29,2/100.000), o que posiciona o nosso Estado em um patamar de risco semelhante ao dos países do primeiro mundo, ou seja, classificado como de baixo risco para o desenvolvimento do câncer do colo uterino.

Tabela 1. Coeficiente de mortalidade por 100.000 mulheres no Rio Grande do Sul nas últimas décadas (ajustado por idade).

Tipo de Câncer	Ano			
	1970	1980	1990	1997
COLO UTERINO	2,2	6,4	5,5	6,0

Mais recentemente, os avanços em virologia e na pesquisa epidemiológica têm contribuído para o reconhecimento da importância clínica da infecção genital pelo HPV para o desenvolvimento do câncer do colo uterino. Dentre os mais de 80 tipos de HPV identificados até o presente mais de 30 deles infectam a região genito-anal (Koutsky L, 1997).

Infecções genitais por HPV são bastante prevalentes. Frequências relativamente altas de mulheres normais estão infectadas por este vírus (entre 15-40%), mas a prevalência é maior entre adolescentes e mulheres jovens (Villa LL, 1996). A associação entre HPV e

neoplasia vem sendo estudada em pacientes com carcinoma cervical desde os anos 70. Com a introdução de métodos mais sensíveis na detecção do DNA do HPV, principalmente a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), consegue-se identificá-lo em até 93% das neoplasias cervicais (Koutsky L, 1997).

Na busca de um maior entendimento da história natural desta infecção viral e da resposta imune ao HPV no ser humano, várias pesquisas envolvendo a resposta sorológica a este vírus tem sido desenvolvidas (Wideroff et al., 1995; Nonnenmacher et al., 1995; Nonnenmacher, et al., 1996; Dillner et al., 1996). Neste sentido, a sororeatividade ao HPV têm demonstrado ser um indicador de exposição prévia ao HPV sendo de auxílio na identificação de populações de maior risco para o desenvolvimento do câncer do colo uterino (Nonnenmacher et al., 1995; Nonnenmacher et al., 1996). Da mesma forma, a avaliação da resposta humoral ao HPV pode ser potencialmente útil na monitorização do fenômeno de soroconversão em programas experimentais envolvendo o desenvolvimento de programas de vacinação contra o HPV, na tentativa de prevenir o câncer do colo uterino e outras neoplasias relacionadas ao HPV (Schiller J, Lowy D, 1996).

REVISÃO DA LITERATURA

ESTRUTURA E GENOMA VIRAL

Sendo membros do gênero *Papillomavirus* da família Papoviridae, os papilomavírus medem de 50 a 55 nm de diâmetro, não têm invólucro e possuem capsídeos icosaédricos constituídos por 72 capsômeros que circulam o genoma. A organização genômica de todos os tipos de HPV é semelhante, consistindo em uma região precoce (P), uma região tardia (T) e uma região de controle longo (RCL). As informações genéticas destes vírus estão codificadas em um DNA circular de fita dupla, de aproximadamente 8.000 pares de bases (Villa LL, 1996, Beutner KR, 1997, Reichman RC, 1998). As bandas abertas de leitura do genoma viral são chamadas de ORFs (“Open Reading Frames”), e as sequências do DNA são designadas de E1 a E7 e de L1 a L2. Os genes precoces estão envolvidos na replicação do DNA viral (E1), no controle da transcrição (E2) na maturação do vírus e alteração da matriz celular (E4) e no estímulo de proliferação e transformação celular (E5, E6 e E7). A região tardia compreende dois genes L1 e L2, que representam as proteínas principal e secundária do capsídeo, respectivamente (Villa LL, 1996) (O quadro 1 descreve as bandas abertas de leitura do papilomavírus).

Quadro 1. Funções atribuídas às bandas abertas de leitura do papilomavírus

Função	ORF
Replicação do plasmídeo	E1
Regulação da transcrição	E2
Transformação	E5, E6, E7
Codificação para capsídios de proteínas	L1, L2
Codificação para proteína citoplasmática tardia	E4
Ignorada	E3, E8

Quadro cedido pela Dra. Mary Bosetti (tese de doutorado/ 96)

EPIDEMIOLOGIA

A infecção genital pelo HPV é uma doença sexualmente transmissível, comum entre populações sexualmente ativas de todo o mundo, sendo que a maioria das infecções é subclínica (as lesões não são vistas a olho nú). A infecção pelo HPV pode contribuir para o desenvolvimento tanto de neoplasias benignas como malignas do trato genital (Koutsky L, 1997, Handsfield, 1997). Desde a década de 50, tem-se observado um aumento na prevalência de infecção genital por HPV. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que ocorram cerca de 30 milhões de novos casos ao ano no mundo (Naud et al., 1997). Quanto ao carcinoma cervical invasor, as estimativas são em torno de 437.000 casos novos ao ano, dos quais 200.000 mulheres irão morrer devido à progressão da doença (Instituto Nacional do Câncer, 1998).

Existem vários métodos utilizados para determinar a prevalência da infecção genital pelo HPV. As taxas mais altas de infecção são de estudos nos quais o DNA viral está presente em células esfoliadas do trato genital. Quanto à presença de anticorpos para o HPV, estes podem significar tanto infecção passada como atual (Villa LL, 1996,

Nonnemacher B, et al., 1996). Aproximadamente 10 a 20% de homens e mulheres entre 15 e 49 anos têm evidências moleculares de infecção genital pelo HPV, sendo que as maiores taxas são encontradas em adultos entre 18 e 28 anos de idade. A prevalência do condiloma acuminado é de 4 a 13% em pacientes que procuram clínicas de doenças sexualmente transmissíveis (Koutsky LA, Galloway DA, Holmes KK, 1998).

Há uma redução da prevalência do HPV com o aumento da idade, apesar do número de parceiros sexuais ter a tendência a aumentar nesta faixa etária. A relação HPV-idade vem sendo associada principalmente ao efeito de depuração do sistema imunológico, o que talvez produza um incremento na eliminação da infecção pelo HPV (Villa LL, 1995, Bozzetti MC, 1996).

A infecção pelos chamados subtipos oncogênicos de HPV é o principal fator predisponente para o câncer do colo uterino (Bosch et al., 1992; Franco, 1991; Schiffman et al., 1991). Além da presença do HPV, outros fatores de risco epidemiológicos vêm sendo apontados na gênese desta neoplasia, tais como a história prévia de múltiplos parceiros sexuais, idade precoce da primeira relação sexual e raça (Bauer et al, 1991; Hildesheim et al, 1993; Nonnemacher, 1996; Palefsky et al, 1991; Schiffman, 1992; Tabrizi et al, 1992; Von der Meden et al, 1995; Bozzetti NC, 1996). Outros possíveis fatores de risco incluem o tabagismo (Williams et al, 1993, Bozzetti, 1996), a dieta pobre em vitaminas, principalmente o folato (Vermund et al, 1991; Butterwoth et al., 1992), a multiparidade (Koss, 1989) e o uso de anticoncepcional oral por longo período (Brinton et al, 1990; WHO, 1985). Observa-se um alto risco de carcinoma de cérvix entre esposas de pacientes que tiveram câncer de pênis, havendo uma correlação geográfica entre estes dois tipos de tumores (Franco et al, 1991; Franco, 1993).

Esses dados sugerem que são necessárias outras alterações nas células alvo em adição à infecção pelo HPV para que ocorra a transformação maligna. Outro dado

importante é que a maioria das lesões induzidas pelo HPV de alto risco não progridem para a malignização e, as que o fazem, geralmente levam vários anos para que a lesão se estabeleça (WHO, 1993). Assim sendo, é fundamental a identificação das pacientes de alto e baixo risco para a infecção pelo HPV e câncer de colo uterino.

Dentre os fatores associados com a infecção genital pelo HPV destacam-se o comportamento sexual, o uso de ACO, a gravidez e a deficiência da imunidade celular (Koutsky L, 1997), sendo que os mais relevantes incluem o número de parceiros sexuais e a idade precoce do primeiro coito (Villa LL, 1996, Schiffman MH, Liaw KL, Herrero R et al, 1998). Em homens, a não utilização de preservativos e a presença de verrugas genitais estão associadas ao desenvolvimento de neoplasia cervical em suas companheiras (Kjaer SK, 1998).

O efeito do uso de anticoncepcionais orais (ACO) sobre o desenvolvimento da infecção pelo HPV ou mesmo do câncer cervical é controverso. Alguns estudos sugerem a associação entre o uso de ACO e o risco de câncer cervical (Bosch FX, Munhoz, DeSanjose S et al, 1992), assim como há sugestões de que o uso de ACO aumente o risco de infecção pelo HPV (Hildesheim A, Gravitt, Schiffman MH et al, 1993). A gestação, especialmente gestação adiantada, tem sido atribuída como responsável por uma maior carga viral do HPV na cérvix uterina (Hildesheim A, Gravitt, Schiffman MH et al, 1993, Nonnemacher B, 1996). Esta maior prevalência da infecção pelo HPV na gestação pode ser consequência de um provável processo de reativação viral (Hildesheim A, Gravitt, Schiffman MH et al, 1993).

Desta forma, o estado imunológico do hospedeiro parece ter um impacto significativo na detecção da infecção genital pelo HPV e também no mecanismo de progressão das lesões associadas a este vírus. Isto pode ser ilustrado pela presença de taxas elevadas de infecção pelo HPV em pacientes portadores de HIV. (Hocke C, Leroy V, Morlat P et al, 1998, Rezza G, Giuliani M, Serraino D et al, 1998). A imunossupressão poderia resultar em uma

prevalência mais elevada dessa infecção devido ao maior risco de contrair a infecção ou pela inabilidade do organismo em suprimir a infecção latente (Koutsky L, 1997).

INFECÇÃO GENITAL PELO HPV E CÂNCER CERVICAL

A doença neoplásica que mais acomete mulheres no mundo é o câncer de mama, sendo seguida pelo câncer de colo uterino (Franco EL, 1993). Sabe-se que o câncer da cérvix foi a primeira neoplasia identificada que acomete somente mulheres, induzida por um vírus (Monsonego J, 1998). O tipo mais comum de carcinoma de cérvix uterina, o carcinoma de células escamosas, tem características epidemiológicas em comum com doenças sexualmente transmissíveis, ou seja, é muito raro em mulheres virgens, sendo mais comum naquelas com múltiplos parceiros sexuais (Schiffman MH, 1993). Em mulheres com câncer cervical, as células malignas geralmente se desenvolvem a partir de tecidos com citologia alterada, que pode variar desde uma displasia leve (Lesão Escamosa Intraepitelial de Baixo Grau - LEIBG) até uma displasia moderada a severa (Lesão Escamosa Intraepitelial de Alto Grau - LEIAG). Mulheres com anormalidades cervicais indicativas de infecção por HPV têm uma incidência muito maior de carcinoma cervical do que aquelas com citologia normal (Mitchell H, Drake M, Medley G, 1986).

Os tipos de HPV que mais comumente infectam o trato genital são os HPV 6, 11, 16, e 18. HPV 6 e 11 são denominados de baixo risco, já que raramente estão associados com carcinoma cervical invasivo, sendo encontrados em lesões de baixo grau e lesões exofíticas (verrugas genitais). Em contraste, os HPV 16, 18, 30, 31, 33, 45 e outros são classificados como sendo de alto risco, por estarem freqüentemente associados a câncer cervical invasivo (Duggan et al., 1993). Os HPV 16 e 18 são encontrados em aproximadamente 60% dos casos de neoplasias intraepiteliais de alto grau e carcinoma invasivo, em vários locais do trato genital (Lorincz et al, 1992; Munoz N, Bosch FX, 1992). Alguns estudos sugerem que o HPV-18, em comparação com o HPV-16, está associado

com tipos de carcinoma mais agressivos, e é preferencialmente encontrados em adenocarcinomas (Walker et al., 1989; Koutsky L, 1997).

O risco de câncer cervical escamoso do colo uterino e o seu precursor intraepitelial é maior em prostitutas, mulheres que tiveram a primeira relação sexual muito jovens, com doenças sexualmente transmissíveis, ou as que apresentaram a primeira gravidez em idade muito precoce. A incidência máxima deste câncer ocorre entre 45 e 55 anos, entretanto, um segundo pico de incidência vem surgindo em mulheres entre 30 e 35 anos (Casciato, Lowitz, 1990; De Vita et al, 1997; Prabhakar, Menon, 1995; Nonnenmacher, Schwartzmann, 1996).

O conhecimento da associação causal entre a infecção pelo HPV e o câncer cervical, esforços tem sido feito para a confecção de vacinas para esse vírus (tipos oncogênicos – HPVs 16,18, 30, 31, 31, 45) as quais estão em fase de estudo experimental. Os resultados que vêm sendo apresentados enfatizam o recente trabalho experimental conduzido em bovinos, cães e coelhos, os quais mostram que as vacinas profiláticas (para a prevenção da infecção por papilomavírus) e terapêuticas (para a regressão de lesões induzidas pelo vírus) são eficazes no combate contra tumores associados ao papilomavírus presente nesses animais. Esses trabalhos estimularam e ajudaram no desenvolvimento de vacinas similares para uso humano (Schiller, Okun, 1996).

Em 1973, as displasias e o câncer in situ foram reunidas sob o nome genérico de neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC) (Richart, 1973). Vem sido relatado que o câncer cervical se desenvolve a partir da NIC como lesão precursora, principalmente das NIC II e III (Schiffman, 1992). Do ponto de vista anátomo-histológico ele se origina, na maioria das vezes, na junção escamo-colunar (JEC) (De Vita et al., 1997).

PATOGENIA

Apenas o papilomavírus humano, dentre os membros do gênero *Papillomavirus*, pode causar doenças em humanos. O HPV infecta seletivamente o epitélio da pele e mucosas, mas tipos diferentes de HPV mostram tropismos específicos por tipos celulares distintos. Em geral, os HPVs podem ser divididos em três categorias: aqueles que infectam a mucosa genital, aqueles que infectam sítios cutâneos não-genitais, e tipos específicos para epidermodisplasia verruciforme, uma condição genética rara da pele caracterizada pela disseminação crônica de lesões não-genitais associadas ao HPV (Reichman RC, 1998).

O *virion* do HPV penetra no organismo após um trauma mínimo do epitélio. A maioria das infecções são assintomáticas. O período de incubação da doença é, em média, de 3 a 4 meses, podendo variar de 1 mês a 2 anos (Beutner KR, Tyring S, 1997, Reichman, 1998, Naud et al, 1997). Todos os tipos de epitélio escamoso podem ser infectados pelo HPV. A replicação do HPV começa com a infecção basocelular. A transcrição e a replicação viral estão relacionadas ao grau de diferenciação da célula infectada. Nas camadas mais profundas do epitélio, onde estão as células basais, são encontrados apenas genes das regiões precoces. Estas células não fazem as proteínas dos capsídeos codificadas pelos genes tardios e, assim, não produzem vírus. Genes precoces também são expressos em células transformadas, enquanto genes da região tardia são expressos em células diferenciadas, as quais se encontram na superfície do epitélio. A localização dessas células é propícia à transmissão viral. Os coilócitos, que são grandes células arredondadas com núcleos picnóticos, aparecem na camada granulosa (Beutner KR, Tyring S, 1997, Reichman, 1998).

As bases moleculares da infecção latente ainda são obscuras, mas sugerem ser a carga viral e a imunidade celular fatores muito importantes tanto para a latência como para o desenvolvimento e progressão maligna. Ainda não é claro o mecanismo pelo qual alguns

tipos de HPV podem provocar transformações celulares. Todos os tipos de HPV replicam-se exclusivamente no núcleo celular do hospedeiro. Nas lesões benignas associadas ao HPV, o genoma viral existe tipicamente em separado do DNA da célula do hospedeiro. Nas lesões malignas associadas ao HPV 16 e ao HPV 18, o DNA viral está geralmente integrado ao cromossomo do hospedeiro. Uma quebra no genoma viral ocorre, geralmente nas regiões E1 ou E2, a fim de integrar-se ao DNA celular. O resultado dessa quebra é a perda da função desses dois genes, e a regulação ascendente de E6 e E7. A proteína E6 promove a degradação da proteína supressora tumoral p53, enquanto a proteína E7 liga-se ao produto gênico do retinoblastoma. Ambas são denominadas proteínas “anti-oncogênicas” pelo seu papel em prevenir a transformação celular através da supressão da divisão e proliferação celulares. As proteínas E1 e E2 modulam a replicação do DNA viral e regulam a expressão gênica. Tipicamente, são necessários anos ou mesmo décadas para que uma infecção por HPV transforme-se em uma lesão maligna. A progressão tumoral, desde a infecção pelo HPV, está sujeita a fatores ambientais, como carcinógenos químicos e físicos, ou restritos ao hospedeiro, tais como hormônios, resposta imune, herança genética, entre outros (Villa LL, 1996; Beutner KR, Tyring S, 1997; Reichman RC, 1998).

APRESENTAÇÃO CLÍNICA

A infecção anogenital pelo HPV pode ser dividida em três categorias. As formas clínicas, que representam 2 a 3% dos casos, são aquelas perceptíveis a olho nú. As formas subclínicas têm seu diagnóstico feito através de exames citológicos ou histológicos. São responsáveis por 60% dos casos de HPV anogenital externo, e por 95% dos casos de HPV cervical. A forma de infecção latente é diagnosticada somente por técnicas de hibridização do DNA viral em indivíduos com clínica e exames citológicos e histológicos normais. Estas provavelmente não são transmissíveis, possuindo assim, pouca importância epidemiológica (Handsfield HH, 1997, Naud et al, 1997).

As lesões clínicas são representadas pelas lesões exofíticas que podem aparecer em todo o trato genito-anal (Naud et al, 1997).

As lesões subclínicas são geralmente evidenciáveis apenas após a exposição ao ácido acético a 5%. Caracterizam-se por uma área aceto-branca com margens irregulares, e lesões satélites. Geralmente são lesões micropapilares ou micropapulares. As lesões planas podem ser encontradas na maioria das áreas que apresentam lesões exofíticas. Além de terem uma prevalência muito mais elevada na cérvix, estas lesões são duas vezes mais comuns que as exofíticas observadas na região anogenital. Assim como as verrugas comuns, algumas lesões anogenitais regridem espontaneamente após meses ou, até mesmo, anos. No entanto, a infecção subclínica com lesões planas, ou mesmo a infecção latente provavelmente persistem por toda a vida do indivíduo. As recidivas são comuns em pacientes imunodeprimidos, mas também podem ser vistas em pacientes com uma imunidade normal (Handsfield HH, 1997).

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As lesões pré-malignas são usualmente detectadas nos exames de rotina para rastreamento de neoplasia cervical. As pacientes com lesões pré-malignas e até mesmo aquelas com doença invasiva primária costumam ser assintomáticas (The American Medical Society, 1999). Sangramento vaginal anormal ou corrimento são os sintomas mais comuns do câncer invasor (Casciato, Lowitz, 1990; De Vita et al, 1997; Murad, Katz, 1996; The American Medical Society, 1999). Dor pélvica ou ciática, dificuldade em urinar, e edema de membros inferiores podem ocorrer nos casos de doença avançada. Lesões exofíticas (verrugas) na cérvix algumas vezes sangram após o coito. A palpação pode demonstrar uma cérvix endurecida ou abaulada (The American Medical Society, 1999). Pacientes com tumor em grau mais avançado podem ter hematúria ou incontinência devido a fístula vesico-

vaginal causada pela expansão direta do tumor para a bexiga. A compressão externa do reto pela massa tumoral pode causar constipação (De Vita et al, 1997).

DIAGNÓSTICO DO PAPILOMAVIRUS HUMANO NA INFECÇÃO DO TRATO GENITAL

A infecção pelo HPV pode ser identificada através de achados clínicos, exames citopatológicos, técnicas de biologia molecular para detecção do DNA viral e diagnóstico sorológico.

Clinicamente é possível fazer o diagnóstico de algumas lesões macroscópicas da infecção pelo HPV na região anogenital. Lesões verrucosas são facilmente identificadas à olho nú, enquanto a visualização das lesões planas é melhorada se associada ao exame colposcópico da região genital, após aplicação de ácido acético a 3% (Nonnemacher B, Schwartzmann G, 1996). Embora a técnica de aplicação de ácido acético seja sensível para o diagnóstico da infecção e lesões pelo HPV, ela não é específica, devendo ser utilizada como um método adjunto ao seu diagnóstico (Naud PSV, tese de doutorado em 1998). Os exames citológicos e histológicos de tecido do trato genital têm a vantagem de detectar sinais clinicamente importantes da infecção pelo HPV. Essa detecção pode variar, entretanto, em virtude do observador, dependendo também do local preciso da coleta da amostra. O teste de Papanicolaou é o método mais utilizado para a detecção da infecção por HPV em mulheres (Champion MJ, Reid R, 1990; Greenberg MD, Sedlaker TV, Champion MJ, 1995; Papanicolaou G, Traut HF, 1943). Esse teste é feito em células esfoliadas, geralmente provenientes da cervix ou da vagina. Ele detecta sinais da infecção por HPV, tais como células coilocíticas e neoplasia escamosa intraepitelial. As células coilocíticas são patognomônicas da infecção pelo HPV. Elas têm um núcleo escuro, grande e irregular, circundado por um anel citoplasmático claro. A presença de coilocitos praticamente faz o diagnóstico de infecção pelo HPV, sendo necessária a lembrança de que

muitos tecidos infectados, principalmente aqueles com infecção latente, não apresentam células coilocíticas. A disceratose (queratinização anômala intra-epitelial) também é característica da infecção pelo HPV. Embora a sensibilidade do exame citopatológico na identificação dessa infecção seja alta, em torno de 90%, a sua especificidade varia de 15 a 50% (Trofatter KF, 1997).

TESTE PAPANICOLAOU - DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO

O esfregaço de Papanicolau é um teste de rastreamento para o câncer do colo uterino. O câncer de cérvix uterina tem progressão lenta, sendo necessários geralmente 10 a 20 anos desde as mudanças iniciais até o desenvolvimento do câncer (Nonnenmacher, Schwartzmann, 1996). Vários estudos têm demonstrado que até 64% dos casos de câncer invasivo de cérvix uterina podem ser prevenidos pelo rastreamento através do Papanicolau em intervalos pré-determinados por mais de 5 anos, um adicional de 18% de redução dos casos durante o intervalo de 3-5 anos e menos de 8% para testes realizados por menos de 3 anos (La Vecchia et al, 1984).

Este teste foi introduzido em 1943, e até hoje é tido como o melhor teste de rastreamento para o câncer de cérvix uterina. Este fato é devido tanto ao seu baixo custo quanto à facilidade de sua realização (Papanicolaou, 1943).

Em 1998 surgiu a classificação de Bethesda que vem substituindo as demais classificações citológicas.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

O DNA do HPV pode ser identificado tanto em material de biópsia como em células esfoliativas. Os testes em uso na prática clínica são divididos em dois grupos: aqueles que

identificam diretamente os ácidos nucleicos, como o *Southern blot*, *Filter in situ hybridization*, hibridização *in situ*, dot blot e captura híbrida, e aqueles que primeiramente amplificam o DNA viral para posteriormente identificar os produtos amplificados, como o PCR (Nonnemacher B, Schwartzmann G, 1996). O uso indiscriminado desses testes para a detecção do HPV podem nos levar a manejo e tratamento de vários casos de lesões cervicais auto-limitadas, representando custos maiores do que benefícios. O seu papel é melhor definido na triagem de resultados atípicos ou inconclusivos de um exame citopatológico, no rastreamento de mulheres idosas e de lesões de baixo grau (Schiffman MH, 1993). Outra possibilidade para o seu uso pode ser como elemento de triagem para a colposcopia (Greenberg MD, Sedlaker TV, Champion MJ, 1995). Porém, o seu alto custo tem limitado o uso na prática clínica (Trofatter KF, 1997).

A Captura Híbrida é uma nova e poderosa arma para a detecção do DNA/RNA de diversos agentes infecciosos onde o material para análise passa por cinco procedimentos: Desnaturação - Hibridização - Captura de Híbridos - Reação dos Híbridos com o Conjugado - Detecção dos Híbridos por Quimioluminescência. Reagindo com sonda gênica específica, o material para análise forma híbridos de RNA/DNA que são capturados por anticorpos que revestem as paredes dos tubos. A seguir, os híbridos imobilizados reagem com anticorpos específicos conjugados à fosfatase alcalina, formando um substrato estável, que são detectados por quimioluminescência ultra-sensível. Com essa metodologia pode-se conhecer o resultado em seis horas. Todos os testes de Captura Híbrida são, ao mesmo tempo, qualitativos e quantitativos (Lorincz, 1996).

Diferentemente das outras técnicas que se utilizam da amplificação gênica, com a Captura Híbrida não se observa a existência de falso positivos por contaminação. Além disso, sua reproducibilidade interlaboratorial é de 98% (Lorincz, 1996).

Comparando a Captura Híbrida para HPV com as técnicas de Southern-Blot e Dot-Blot, o tempo de execução destas duas últimas técnicas é muito longo e os resultados não permitem informações precisas quanto ao nível de patógenos presentes. Por sua vez, a hibridização *in situ* tem sensibilidade muito baixa, só detectando a presença viral a partir de 400 cópias por célula. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tem custo elevado e, com a amplificação gênica, observam-se resultados clinicamente não significantes e grande número de falso-positivos principalmente por contaminação da amostra no momento da coleta. Além disso, os estudos mostram índices baixos de reproducibilidade interlaboratorial (Schiffman et al., 1991).

A Captura Híbrida para HPV é capaz de detectar, qualitativamente e quantitativamente, os 18 tipos mais comuns de HPV que infectam o trato anogenital. O Grupo I, possui sondas para os HPV de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44) e, o Grupo II, sondas para os HPV de intermediário/alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68). Na captura híbrida II sua sensibilidade é de 1 pg/ml de DNA-HPV, equivalente a 0,1 cópia de vírus/célula. Por essa sensibilidade, os estudos têm mostrado estreita correlação entre os resultados e a evolução clínica. Esses tipos representam 95% dos vírus que infetam o trato anogenital, sendo que, os do grupo intermediário/alto risco, estão presentes em 99% dos casos (Lorincz, 1996).

As metodologias baseadas em PCR têm uma grande sensibilidade e podem detectar menos de 10 cópias de genomas de HPV no material clínico, não sendo necessária amostra significativa de material cervical para a identificação do DNA. Com o uso de *primers* específicos consegue-se diferenciar os diversos tipos de HPVs. Pode-se também utilizar *primers* genéricos que amplificam uma grande gama de HPVs, com posterior reação para tipagem dos mesmos com sondas específicas (Gaarenstroom et al., 1994; Candeias, 1998).

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

O diagnóstico da infecção pelo HPV através de testes sorológicos apresentou avanços significativos nesses últimos anos, mas ainda encontra-se dificuldade na compreensão da resposta humoral ao HPV (Galloway D, 1992). Em particular, eles são pouco sensíveis e específicos para serem utilizados em programas de rastreamento para infecção genital pelo HPV. Entre os testes utilizados, temos o ELISA, o RIBA e o Western Blot (Nonnemacher B, Schwartzmann G, 1996).

A importância do sistema imunológico na patogênese das infecções pelo HPV já tornou-se evidente nos vários estudos envolvendo pacientes imunossuprimidos, especialmente em transplantados renais e pacientes HIV positivos (Human Papillomavirus. IARC, 1995).

Os papilomavírus humano apresentam proteínas estruturais, que formam o seu capsídeo, e proteínas não estruturais, que são imunogênicas e infectam o hospedeiro (Tindle et al, 1994). Recentemente, esforços foram dispendidos na caracterização da resposta imune do hospedeiro a estes antígenos do HPV e, tais esforços tem sido focados na prevalência de anticorpos anti-HPV em soro humano. Devido as dificuldades em se obter antígenos do HPV através da cultura deste vírus, meios alternativos de obtenção destes antígenos foram desenvolvidos para o estudo da resposta imune no ser humano, entre estes temos a fusão de proteínas recombinantes em bactérias (Galloway, 1992), peptídeos sintéticos (Dillner, 1994) e a produção de *virions* (Hagensee, 1993). Também foram desenvolvidos *in vitro* a produção das proteínas estruturais do vírus HPV, as chamadas *virus like particles* (VLPs), onde os antígenos são oriundos de capsídeos vazios e sem poder infectante no hospedeiro. As VLPs se formam *in vitro* em células eucarióticas infectadas por *baculovirus* que haviam previamente sido infectados por HPVs (Kirnbauer et al, 1992; Rose et al, 1993; Hagensee, 1993; Kirnbauer et al, 1993).

Foi demonstrado em diferentes estudos que a produção *in vitro* das proteínas estruturais do vírus (HPV16 L1 mais L2 VLPs) pode ser utilizada na detecção de anticorpos anti-HPV 16 no soro humano em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (Kirnbauer et al., 1994; Galloway, 1994; Dillner et al., 1995; Nonnenmacher et al., 1995; Wideroff et al., 1995; Wideroff et al., 1996; Nonnenmacher et al., 1996; Svare et al., 1997).

Detalhes sobre a sorologia ELISA para o HPV foram publicados previamente por Kirnbauer, 1994. As VLPs L1 e L1/L2 são co-expressas em células de inseto via recombinante em Baculovirus. Alíquotas (1,0 µg) de partículas VLPs acrescidas de 50 µl de PBS (solução salina) são colocadas em cada um dos 96 orifícios da placa *microtiter* (*Immulon II; Dynatech Laboratories, Chantilly, VA*); a placa é então incubada a 37°C por uma hora e meia, lavada três vezes com PBS livre de cálcio e magnésio. Após, as placas ficam sendo bloqueadas por 2 horas com PBS contendo leite em pó a 0,5% (*Giant Foods, Whashington, DC*) e 0,1% de *newborn calf serum* (soro de bezerro recém-nascido) (*Life Technologies GIBCO BRL, Gaithersburg, MD*). Depois de mais três lavagens com PBS, 10 µl do soro humano diluído em 40 µl de PBS com leite em pó a 0,5% é adicionados aos orifícios da placa. A placa fica então incubando estes soros por duas horas e meia e é lavada mais cinco vezes. O próximo passo é a adição de *anti-human IgG (horseradish peroxidase-conjugated goat F(ab')₂)* diluído numa diluição de 1:10.000 em PBS-leite a 0,5%. Segue-se 1 hora de incubação em temperatura ambiente e nova lavagem das placas por três vezes, quando então 50 µl de substrato (*ABTS; Boehringer Mannheim, Indianápolis*) é adicionado à cada orifício da placa com 45 minutos de incubação novamente em temperatura ambiente. Para a leitura da densidade ótica, é utilizado um *microplate reader* lendo densidade ótica em 405 nm (*Thermo Max; Molecular Devices, Menlo Prk, CA*) e cada placa foi lida três vezes com intervalos de tempos iguais.

Vários estudos vêm tentando mostrar a associação entre câncer cervical e sororeatividade para o HPV 16. Nonnenmacher et al. (1995), em um estudo comparativo

entre duas populações da Colômbia e Espanha com câncer cervical e neoplasia intraepitelial grau III e controles para ambos os grupos, demonstrou uma associação entre positividade no teste ELISA VLP e risco para câncer. Já Wideroff et al, em um estudo casos e controles com casos incidentes de neoplasia cervical, demonstrou que a sororeatividade ao HPV16 pode ser um indicador com relativa sensibilidade à persistência da infecção viral ao HPV. Nonnenmacher et alli (1996), em um estudo comparando 2 populações de baixo risco (Dinamarca) e alto risco (Groenlândia) para o câncer cervical, demonstraram ser a sororeatividade para o HPV 16 um marcador de risco para o câncer cervical na população de alto risco para este câncer. Em outro estudo, Wideroff et al., observou os determinantes epidemiológicos da sororeatividade ao HPV 16-VLP em mulheres HPV16 DNA positivas e negativas. Entre as mulheres com DNA negativo ao HPV 16, os autores observaram que quanto maior o número de parceiros, maior a chance de sororeatividade, o mesmo não ocorrendo entre as mulheres com o DNA positivo ao HPV 16. Ainda neste mesmo estudo a sororeatividade foi independentemente associada ao uso de anticoncepcionais orais por mais de 10 anos, principalmente no grupo de mulheres DNA negativas.

Edith I. Svare *et alli* (ano) fizeram um estudo comparando a sororeatividade ao HPV 16-VLP entre homens e mulheres de duas populações diferentes, ambas de alto risco para a infecção pelo HPV (pacientes de uma clínica de doenças sexualmente transmissíveis da Dinamarca e Groenlândia). Os autores demonstraram ser o ELISA-VLP ao HPV 16 um marcador biológico para a exposição aos HPVs genitais também nos homens, mas com menor sensibilidade do que nas mulheres nestas populações de alto risco.

Olsen *et alli* (ano), mostraram uma associação entre história sexual e soropositividade. Já Dillner *et alli* (ano) investigaram a sorologia para o HPV 16 como um marcador de comportamento sexual e observaram que quanto maior o número de parceiros sexuais, maior a soropositividade. Neste mesmo estudo foi observado que a

soropositividade não esteve significativamente associada à presença do DNA do HPV, sendo inclusive menor nos pacientes com infecções persistentes pelo HPV.

João Candeias, em sua tese de Doutorado, apresentada em 1998 ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, apresentou resultados interessantes com relação à sorologia ELISA VLP ao HPV16. O pesquisador estudou anticorpos contra o HPV 16 em soros de uma população de mulheres com câncer de colo uterino e anticorpos em soros de uma coorte de mulheres assintomáticas e comparou a sororeatividade à variáveis de exposição ao vírus e epidemiologicamente associadas a esta infecção. Em suas conclusões demonstrou uma maior sororeatividade em pacientes com tumores do colo uterino em estágios menos avançados. Encontrou também maior sororeatividade em pacientes com câncer e infecção por múltiplos tipos de HPV. Entre as mulheres assintomáticas, observou maior sororeatividade nas pacientes com infecção persistente ao HPV do que naquelas com infecção transiente. Encontrou também maior sororeatividade nas pacientes infectadas por HPVs de alto risco; quando avaliou soropositividade ao longo da coorte, observou que apresentaram maior sororeatividade aquelas mulheres que tinham infecções persistentes ao HPV; verificou também que mulheres soropositivas à admissão apresentaram maior risco de desenvolvimento de as que desenvolveram lesões de alto grau foram soropositivas consistentemente durante o estudo neoplasia intraepitelial cervical, e. Neste mesmo estudo Candeias encontrou variáveis epidemiológicas positivamente associadas com a soropositividade: número de parceiros sexuais durante a vida, número de parceiros sexuais nos últimos cinco anos e gravidez; as variáveis que apresentaram correlações negativas nesta coorte foram: idade à primeira relação sexual, escolaridade, hábito de fumar, uso de preservativo e sexo oral.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Conhecer a resposta humoral ao HPV e sua relação com a presença de risco de lesões precursoras de neoplasia cervical em mulheres que frequentam a Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1. Definir a positividade sorológica na reação ELISA que melhor caracterize o modelo etiológico para a relação HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical.

2.2. Identificar as variáveis epidemiológicas relacionadas à resposta sorológica anti-HPV.

2.3. Verificar a relação entre a resposta sorológica anti-HPV e a presença de lesões neoplásicas cervicais.

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- BAUER HM, TING Y, GREER CE, et al. *Genital human papillomavirus in female university students as determined by PCR-based method*. JAMA 265: 472-477, 1991.
- BASHI SA. *Cryotherapy versus podophyllin in the treatment of genital warts*. Int J Dermatol 24: 535-6,1985.
- BEUTNER KR, TYRING S. *Human papillomavirus and human disease*. Am J Med 102: 9-15,1997.
- BOSCH FX, MUNOZ N, DE SANJOSE S, et al. *Risk factors for cervical cancer in Columbia and Spain*. Int. J. Cancer 52: 750-758, 1992.
- BOZZETTI MC. *Infecção do trato genital pelo papilomavírus e fatores de risco em mulheres que buscam atendimento no ambulatório de ginecologia do HCPA*. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da UFRGS, 1996.
- BRASIL. Ministério Da Saúde. *Estatísticas de Mortalidade: Brasil 1980-1995, Sistema de Informação Sobre Mortalidade-SIM*. Brasília. FNS/DATASUS, Home Page.
- BRASIL. Ministério Da Saúde.Instituto Nacional do Câncer. *Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro. Pro-Onco/INCA, 1998.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. *Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil em 1998*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, Coordenação de Câncer/Pro-Onco/INCA, 1998.

- BRINTON LA, NASCA PC, MALLIN K, et al. *Case-control study of in situ and invasive carcinoma of the vagina. Gynecologic Oncology* 38: 49-54, 1990.
- BUTTERWORTH CE, HATCH KD, MACALUSO M et al. Folate deficiency and cervical dysplasia. *JAMA* 267: 528-533, 1992.
- CANDEIAS JMG. *Detecção de anticorpos contra HPV-16 em um estudo de história natural de infecções por papilomavírus humano e sua relação com neoplasia cervical (tese de Doutorado)*. São Paulo: Curso de Pós-Graduação Ciências da Univesridade de São Paulo, 1998.
- CASCIATO DA, LOWITZ BL. *Manual de Oncologia Clínica*. 2ed. Medsi, p.233-238, 1990.
- CHAMPION MJ, REID R. *Screening for gynecologic cancer*. *Obstet Gynecol Clinic North Am* 1990; 17: 695-727.
- DE VITA VT JR, HELLMAN S, ROSENBERG SA. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 5th ed. Philadelphia, JB Lippincott, 1997, pp1432-1457.
- DUGGAN M, BENOIT J, MCGREGOR SE et al. The human papillomavirus status of 114 endocervical adenocarcinoma cases by dot blot hybridization. *Human Pathol* 24: 121-125, 1993.
- EDWARDS L, FERENCZY A, ERON L, et al. *Self-administered topical 5% Imiquimod cream for external anogenital warts*. *Arch Dermatol* 134: 25-30, 1998.
- FERENCZY A, MITAO M, NAGAI N, et al. *Latent papillomavirus and recurring genital warts*. *N Engl J Med* 313: 784-788, 1985.
- FRANCO ELF. *Viral etiology of cervical cancer: a critique of the evidence*. *Rev Infect Dis* 13: 1195-1206, 1991.
- FRANCO EL. *Epidemiologia do câncer mamário e ginecológico*. *Tratado de Oncologia Genital e Mamária*, cap.1, p.10-11, 1993.
- FRANCO ELF. *Human Papillomavirus and The Natural History of Cervical Cancer*. *Infections in Medicine*, 1993, pp 57-64.
- FRANCO ELF, CAMPOS-FILHO N, VILLA LL, & TORLONI H. *Correlation patterns of cancer relative frequencies with some socioeconomic and demographic indicators in Brazil: an ecologic study*. *Int J Cancer* 41:24-29, 1998.
- GAARENSTROOM KN, MELKERT P, WALBOOMERS JMM et al. *Human papillomavirus DNA and genotypes: prognostic factors for progression of cervical intraepithelial neoplasia*. *Int Jour of Gynecol and Cancer* 4: 73-78, 1994.
- GALLOWAY D. *Serological assays for the detection of HPV antibodies*. In: Munoz N, Bosch FX, Shah KV, et al. *The Epidemiology of Human Papillomavirus and cervical cancer*. IARC Sci Publ. p. 147-161, 1992.
- GREENBERG MD, SEDLACER TV, CHAMPION MJ. *Cervical neoplasia - Are adjunct test to cervical cytology worthwhile?* *Clinic Obstet Gynecol* 1995; 38: 600-9.

- GODLEY MJ, BRADBEER CS, GELLAN M, et al. *Cryotherapy compared with trichloroacetic acid in treating genital warts*. Genitourin Med 63:390-2, 1987.
- HANGENSEE m, GALLOWAY D. *Growing human papillomavirus and virus-like particles in the laboratory*. Papillomavirus Report., v.5, p. 121-124, 1993.
- HANDSFIELD HH. *Clinical presentation and natural course of anogenital warts*. Am J Med 102: 16-20, 1997.
- HILDESHEIM A, GRAVITT, SCHIFFMAN MH, et al. *Determinants of genital HPV infection in low-income women in Washington, DC*. Sexually Transmitted Disease 20: 279-285, 1993.
- HOCKE C, LEROY V, MORLAT P, et al. *Cervical dysplasia and human immunodeficiency virus infection in women: prevalence and associated factors*. Groupe d'Epidemiologie Clinique du SIDA en Aquitaine (GESCA). Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol Oct; 81(1): 69-76, 1998.
- IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OS CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, 64. Lyon, 1995. *Human Papillomaviruses*. United Kingdom, 1995. P. 409.
- JENSEN SL. *Comparison of podophyllin application with simple surgical excision in clearance and recurrence of perianal condylomata acuminata*. Lancet, 1985, pp1146-1148.
- KEAY S, TENG N, EISENBERG M, STORY B, SELLERS PW, MERIGAN TC. *Topical interferon for treating condyloma acuminata in women*. J Infect Dis 158: 934-9, 1988.
- KIRNBAUER R, TAUB J, GREENSTONE H, RODEN R, DURST M, GISSMANN L, LOWY DR, SCHILLER JT. *Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 plus L2 into virus-like-particles*. J Virol; 67:6929-6936, 1993.
- KOSS LG. *The papanicolaou test for cervical cancer detection: a triumph and a tragedy*. JAMA 261: 737-743,1989.
- KOUTSKY L. *Epidemiology of genital human papillomavirus infection*. Am J Med 102: 3-8, 1997.
- KOUTSKY LA, GALLOWAY DA, HOLMES KK. *Epidemiology of genital human papillomavirus infection*. Epidemiol Ver 10: 122-63, 1998.
- LA VECCHIA CL, FRANCESCHI S, DECARLI A, et al. *"Pap" smear and the risk of cervical neoplasia: quantitative estimate from a case control study*. Lancet 2(8406):779-782, 1984.
- LORINCZ AT. *Hybrid capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens*. Papillomavirus report; 7: 1-5, 1996.
- MITCHELL H, DRAKE M, MEDLEY G. *Prospective evaluation of risk of cervical cancer after cytological evidence of human papillomavirus infection*. Lancet 1986; i: 573-5.
- MONSONEGO J. *Cervical cancer screening: realities and perspectives*. Genital Infections and Neoplasia Update; Jul, p.7-11, 1998.

- MORRISON EAB, BURK RD. Classification of Human papillomavirus infection. JAMA, v. 270, 1993.
- MUNOZ N, BOSCH FX. HPV and cervical cancer: review of case-control and cohort studies. In: *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Edited by IARC Sci., Lyon, n. 19, 1992, pp 251-260.
- MURAD AM, KATZ A. *Oncologia - Bases Clínicas do Tratamento*. Guanabara-Koogan, 1996, pp 199-303.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE WORKSHOP: *The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis*. Acta Cytol 33:567-574, 1989.
- NAUD PSV. *Doenças sexualmente transmissíveis*. In: Freitas F, Menke CH, Rivoire W, Passos EP. *Rotinas em Ginecologia*. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997, pp 85-102.
- NAUD PSV. *Detecção precoce das lesões precursoras de Câncer de colo uterino através de inspeção (tese de Doutorado)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da UFRGS, 1996.
- NONNENMACHER B, HUBBERT NL, KIRNBAUER R, et al. Serologic response to human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles in HPV-16 DNA positive invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia grade III patients and controls from Colombia and Spain. J Infect Dis 172:1, 19-24, 1995.
- NONNENMACHER B, KJAER SK, SVARE EI, et al. Seroreactivity to HPV16 virus-like particles as a marker for cervical cancer risk in high-risk populations. Int J Cancer 68:6, 704-9, 1996.
- NONNENMACHER B. *Correlatos epidemiológicos da infecção pelo papilomavírus humano em mulheres assintomáticas da grande Porto Alegre (tese de mestrado)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da UFRGS, 1996.
- NONNENMACHER B, SCHWARTSMANN G. *Diagnóstico da infecção pelo papilomavírus humano no trato genital inferior*. In: Soares PRB, Bertuol M, eds. *Infecções clínico-cirúrgicas em ginecologia*. Porto Alegre: Editora Artes Médicas; p.120-139, 1996.
- PALEFSKY JM, HOLLY EA, GONZALES J, et al. *Detection of papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer*. Cancer Res., v.51, p.1014-1019, 1991.
- PAPANICOLAOU G, TRAUT HF. *The diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear*. New York. Commonwealth Fund, 1943.
- PRABHAKAR AK, MENON GR. *Age at marriage and cervical cancer incidence*. Indian J Cancer; 32(2):63-8, Jun 1995.
- REID R. *The key to rational triage of cervical neoplasia*. Obstet Gynecol Clin North Am, 14:407-429, 1987.
- REICHMAN RC, OAKES D, BONNES W, et al. *Treatment of condyloma acuminatum with three different interferon alfa preparations administered parenterally: a double-blind, placebo controlled trial*. J infect Dis 162: 1270-6, 1990.

- REICHMAN RC. *Infecções por papilomavírus humano*. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ eds. *Medicina Interna*. 14 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill; 1998, pp 1177-1178.
- REZZA G, GIULIANI M, SERRAINO D, et al. *Risk factors for cervical presence of human papillomavirus DNA among women at risk for HIV infection*. DIANAIDS Collaborative Study Group. *Epidemiol Infect* Aug; 121(1): 173-7, 1998.
- RICHART RM. *Cervical intraepithelial neoplasia*. *Pathol Annu*. 8:301-328, 1973.
- ROSE RC, BONNEZ W, REICHMAN RC, GARCEA RL. *Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of virus-like particles*. *J Virol*, 67:1936-19, 1993.
- SCHIFFMAN MH, BAUER HM, LORINCZ AT et al. *Comparison of Southern Blot hybridization and Polymerase Chain Reaction methods for the detection of human papillomavirus DNA*. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 283-289, 1991.
- SCHIFFMAN MH. *Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia*. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.84, n.6, p.394-398, 1992.
- SCHIFFMAN MH. *Latest HPV findings – Some clinical implications*. *Contemporary OB/GYN* ; p. 27-37, 1993.
- SCHIFFMAN MH, LIAW KL, HERRERO R, et al. *Epidemiologic support for simplified view of cervical carcinogenesis*. *Genital Infections and Neoplasia Update* ,1998, Jul, pp 2-6.
- SCHILLER JT, OKUN MM. *“Papillomavirus Vaccines: Current Status and Future Prospects”*. *Advances in Dermatology, Mosby-Year Book, Inc. Vol. 11, p.355-381, 1996*.
- SCHILLER TJ, LOWY D. *Papillomavirus-like particles and HPV vaccine development*. *Cancer Biology* 7: 1-11, 1996.
- SCHNEIDER A, KOUTSKY LA. *Natural history and epidemiological features of genital HPV infection*. In: *The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus*. N. Munoz, F.X. Bosch, K.V. Shah and A. Meheus, ed. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1992.
- SVARE EI, KJAER SK, NONNENMACHER B, et al. *Seroreactivity to human papillomavirus type 16 virus-like particles is lower in high-risk men than in high-risk women*. *J Infect Dis*, 176:4, 876-83, 1997.
- TABRIZI SN, TAN J, QUINN M, et al. *Detection of genital human papillomavirus (HPV) DNA by PCR and other conventional hybridization techniques in male partners of women with abnormal Papanicolaou smears*. *Genitourin Med.*, v.68, p.370-373, 1992.
- THE AMERICAN MEDICAL SOCIETY. *“Journal of Obstetrics and Gynecology”*. *A Journal of Diagnosis and Treatment in Obstetrics and Gynecology*, March, 1999, pp 81-82.
- TINDLE RW, FRAZER IH. *Imune response to human papillomavirus and the prospects for human papillomavirus-specific immunisation*. In: zur Hausen H. *Human Pathogenic Papillomaviruses*. Berlin: Springer-Verlag, 217-253, 1994.

- TROFATTER KF. *Diagnosis of Human Papillomavirus genital tract infection*. Am J Med; 102: 21-7, 1997.
- VERMUND SH, KELLY KF, KLEIN RS, et al. *High risk of human papillomavirus infection and cervical squamous intraepithelial lesions among women with symptomatic human immunodeficiency virus infection*. Am J Obst Gynecol 165: 392-400, 1991.
- VILLA LL. *Papilomavírus humano e câncer do colo do útero*. Laes & Haes , 1995, pp 60-67.
- VILLA LL. *Biologia e imunologia dos papilomavírus humano*. In: Soares PRB, Bertuol M eds. *Infecções Clínico Cirúrgicas em Ginecologia*. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, 1996, pp 120-9.
- VON DER MEDEN, AJW.; RUIZ MORENO JA.; GARCIA LEON JF. et al. *Cytologic-colposcopic-histopathologic correlations in preinvasive cervical lesions and cervical Human Papillomavirus infections*. Ginecol Obstet Mex, v.63, p. 365-71, 1995.
- WALKER J, BLOSS JD, LIAO SY et al. *HPV genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uteri cervix*. Obstet Gynecol 74: 781-785, 1989.
- WIDEROFF L, SCHIFFMAN MH, NONNENMACHER B, et al. *Evaluation of seroreactivity to human papillomavirus type 16 virus-like particles in a incident case-control study of cervical neoplasia*. J Infect Dis 172:6, 1425-30, 1995.
- WIDEROFF L, SCHIFFMAN MH, NONNENMACHER B, et al. *Epidemiologic determinants of seroreactivity to human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in cervical HPV-16 DNA-positive and-negative women*. J Infect Dis 174:5, 937-43, 1996.
- WILLIAMS HC, POTTIER A, STRACHAN D. *The descriptive epidemiology of warts in British schoolchildren*. British Journal of Dermatology 128:504-511, 1993.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO. *Collaborative study of neoplasia and steroid contraceptives: Invasive squamous-cell cervical carcinoma and combined oral contraceptives: Results from a multinational study*. Int. J. Cancer 55: 228-236, 1993.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO. *Collaborative study of neoplasia and steroid contraceptives. Invasive cervical cancer and combined oral contraceptives*. Br Med J 290: 961-965, 1985.

EPIDEMIOLOGIC CORRELATES OF ANTIBODY RESPONSE TO HUMAN
PAPILLOMAVIRUS AMONG WOMEN AT LOW RISK OF CERVICAL CANCER

Short title: Epidemiologic Correlates to HPV Antibody Response

Nonnenmacher B¹, MD, PhD, Pintos J², PhD, Bozzetti MC¹, MD, PhD, Mielzinska-Lohnas I⁵, Lorincz AT⁵, PhD, Ikuta N⁶, MD, Schwartzmann G¹, MD, PhD, Villa LL⁴, PhD, Schiller JT³, PhD, Franco E², PhD.

¹Posgraduação em Clínica Médica/UFRGS (Porto Alegre, Brazil), ²Departments of Epidemiology and Oncology, McGill University (Montreal, Canada), ³Laboratory of Cellular Oncology, NIH, (Bethesda/MD, USA), ⁴Ludwig Institute for Cancer Research (São Paulo, Brasil), ⁵Digene Company (Gaithsburg, MD, USA).

Financial support: FAPERGS and CAPES (Brazil)

The sera examined in this study were collected under protocols that were approved by the HCPA ethical committee.

Acknowledgements : We thank Drs. Joao Carlos Prolla and Antônio Carlos Pütten for the cytology review.

Reprints or correspondence: Bernadete Nonnenmacher, MD, Rua Comendador Rheingantz 431/401, Porto Alegre, RS, Brazil. Postal code: 90450-020. Telephone/Fax: +55 51 3333-8779. E-mail: 1) bernadet@zaz.com.br; 2) mcb@famed.ufrgs.br

Summary

A population at low risk for developing cervical cancer in Southern Brazil was studied to identify the main determinants of serological response to human papillomavirus (HPV). ELISA tests were performed in 976 women to detect serum IgG antibodies against HPV 16 L1 virus-like particles (VLPs) and HPVs 16, 18, 6 and 11 L1 VLPs as a mixture of antigens. Women with four or more sexual partners were more likely to be seropositive than women with one partner (HPV 16 serology OR=3.06, 95%CI:2.0-4.8; mixed serology OR=4.64, 95%CI:3.0-7.2). HPV DNA and both serological responses were associated. Those positives to HPV 16 serology were twice as likely to have a cytological diagnosis of squamous intraepithelial lesions (SIL) than seronegatives (OR=2.07; 95%CI: 1.0-4.5, and OR=1.73; 95%CI: 0.8-3.8). Seropositivity to HPV 16 and mixed antigens seem to be better markers of past sexual activity than current HPV infection, and humoral response to HPVs may not be a strong indicator of cervical lesions in populations at low risk for cervical lesions.

Key words: Human papillomavirus, ELISA serology, cervical cancer.

INTRODUCTION

During the last decades, several epidemiological studies have shown that markers of sexual activity, such as early age at first intercourse and lifetime number of sexual partners, are the most important determinants of cervical cancer (1, 2). These findings suggested that a sexually transmitted agent was the main cause of cervical cancer, and consensus review has asserted that this agent is the Human Papillomavirus (HPV) (3). There is abundant biological and epidemiological evidence to indicate that cervical infection by some HPV types, especially HPV 16, is the critical event in the genesis of cervical neoplasia (4, 5, 6). More than 90% of malignant and premalignant cervical lesions contain HPV DNA, reinforcing the role of HPVs in the induction of neoplasia (4, 7). In addition, a high proportion (15-40%) of asymptomatic women have detectable cervical HPV infection (3, 8), and the prevalence is higher among teenagers and young adults compared to older women. However, only a small percentage of those women will develop cervical cancer. Studies indicate that the risk of progression of a cervical lesion is significantly higher among those patients infected with high-risk HPV types (9).

Different studies have demonstrated that HPV's structural L1 protein alone, or L1 with L2 protein self-assembles into virus-like particles (VLPs) that can be used as antigens for the detection of type restricted antibodies to HPV16, or other types, in enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17). We used ELISA tests with HPV 16 VLPs as single antigen, and HPV 16, 18, 6 and 11 VLPs as a mixture of antigens, to determine HPV seropositivity in a population of sexually active women who attended an outpatient clinic in the city of Porto Alegre, Southern Brazil. We sought to determine the epidemiological predictors of the humoral response against HPV and the relationship between serology and presence of cervical lesions.

PATIENTS AND METHODS

Study design: The study followed a cross-sectional design. All women who attended the outpatient clinic at the "Liga Feminina de Combate ao Câncer", in Porto Alegre, Southern Brazil, during July and August of 1994 were invited to participate. Women with a history of hysterectomy, conization, or cervical cancer were considered not eligible. Of the 1035 eligible women contacted, 977 consented to participate, and their ages ranged from 15 to 70 years. We collected information on socioeconomic, demographic, and reproductive history using a questionnaire-based interview done by a research nurse trained for this study. Variables known or suspected to be related to cervical cancer and HPV infection were included in the questionnaire, such as age, ethnicity, education, income, smoking habits, marital status, parity, use of contraceptive methods, previous abnormal Papanicolaou test, lifetime and recent number of sexual partners, age at first sexual intercourse, and previous gynecological infection.

Cervical specimens: An endocervical brush was used to collect cervical cells to prepare Pap smears for cytopathological diagnosis. Two different pathologists, blinded to the clinical and colposcopic diagnoses, examined the smears. The Bethesda International Classification (18) was used to assess cytological results. Cells of the squamous-columnar junction were also collected with the endocervical brush, and they were stored in PBS solution at -80 °C for subsequent genital HPV DNA analysis. All samples were tested for viral DNA using two methods: the MY09/11 consensus primer polymerase chain reaction (PCR) protocol (19), and the Hybrid Capture II assay (20).

ELISA technique: Blood specimens were collected by venipuncture. The blood specimens were centrifuged and the serum samples were stored at - 80 °C until tested. Each serum

sample was tested for reactivity to HPV16 VLPs and to a mixture of VLPs from HPVs 16, 18, 6 and 11. The VLP-ELISA technique has been previously described in detail (10). Briefly, L1 VLPs were purified by cesium chloride gradient centrifugation from cell lysate of Sf-9 cells that had previously been infected with recombinant baculovirus vectors expressing L1 from one of the four HPV types. Ninety-six-well polystyrene plates were coated with VLP particles (aliquots containing 1.0 µg) in 50 µL of PBS followed by incubation at 37 °C for 1.5 hours, and washing three times in calcium- and magnesium- free PBS. After a 2-hour blocking step with PBS containing 0.5% nonfat dry milk and 0.1% newborn calf serum with three subsequent washes, 10 µL of serum diluted in 40 µL of 0.5% dry milk in PBS were added to the wells. The plates were incubated for 2.5 hours and washed five times, after which horseradish peroxidase-conjugated goat F(ab')₂ anti-human IgG diluted 1:10,000 in 0.5% milk-PBS was added. After 1-hour incubation at room temperature and three washes, 50 µL of substrate were added to each well with a 45-minute incubation at room temperature. A microplate reader was used to read optical densities at 405 nm. Serum specimens were assayed in triplicate (14).

In order to control the variation of measured reactivity that is inherent to immunoenzymatic techniques we included in every ELISA plate a human serum pool in triplicate diluted in the same way as the specimens. This serum pool was prepared beforehand and kept frozen at -20 °C. It included dozens of blood bank and normal biochemistry lab specimens from adult donors. The same serum pool batch was used throughout the study. The uncorrected serological reactivity was measured as net absorbance values after subtracting from each specimen's average absorbance value the mean blank reactivity from triplicate wells exposed only to diluent instead of diluted serum. Such "noise"-subtracted reactivity was

further corrected by dividing each specimen's mean value by the equivalent result from the serum pool included in the same plate in triplicate. The reactivity of this serum pool control varied between plates and between ELISA runs as a consequence of the vagaries of a complex technique such as the VLP-ELISA, which is prone to be affected by the variation in reactivity of different batches of reagents (antigen, conjugate, and chromogen-substrate mixture) and between-plate and between-run variation due to the fluctuation in efficiency of washing and binding properties of the polystyrene. By taking the ratio of the serological reactivity of each specimen to that of the serum pool from the same plate, we corrected for the net influence of these various reaction parameters, thus reducing the effect of inter- and intra-assay variations. Absorbance ratios represent multiples of reactivity with respect to that of the serum pool, which presumably reflects the average antibody response from many donors of comparable age.

Definition of serological positivity: ELISA absorbance values, either uncorrected or corrected, are continuously distributed. Therefore, to classify samples as either negative or positive for anti-HPV antibodies it was necessary to apply an arbitrary cutoff point to define seropositivity for HPV 16 VLPs, and for the mixture of HPVs 16, 18, 6, and 11 VLPs. The cutoff points were determined based on the percentiles of the distribution of absorbance ratios of a subgroup of women at low risk to develop genital HPV infection. This was defined as those women with age at first sexual intercourse at 19 years or older, with only one lifetime sexual partner, without cytological abnormalities, and whose cervical samples were negative for HPV DNA testing by both PCR and Hybrid Capture. A total of 171 women met this profile. We then estimated for the entire patient population the Odds Ratios (ORs) for cervical HPV infection, as determined by the PCR technique, using each of the cutpoints for serology determined in the low-risk sample. The chosen cutpoints were the ones that maximized the ORs for each antigen preparation. Based on these two cutpoints (one for HPV-16 and one for the mixed-type ELISA), the serological results were classified as negative and positive for each antigenic preparation, and interpreted as such for the analysis of serological response to HPV as a dichotomous outcome.

Statistical analysis: To examine the main predictors of serological response anti-HPV, two binary outcomes were considered: seroreactivity to HPV 16 VLPs, and seroreactivity to the combined HPVs 16, 18, 6, 11 VLPs. Unconditional logistic regression was used to estimate ORs and their 95% confidence intervals (95% CIs) as the measure of magnitude of association between predictors and serological response. Age and presence of cervical HPV DNA by PCR were controlled for in the models. The final model to determine the main predictors of serological response was fitted using the stepwise backwards method (p-value for removal = 0.15, p-value for entry = 0.10).

We also estimated the association between HPV serology and cervical lesions using unconditional logistic regression. Serological response was also used as a binary predictor, while outcomes were defined as cytological or histological diagnosis of squamous intraepithelial lesions (SIL) of either low (LGSIL) or high grade (HGSIL). Diagnoses of

“atypical squamous cells of undetermined significance” (ASCUS) and non-squamous abnormalities were excluded from this analysis.

To confirm the choice of serological cutpoints as defined above for HPV DNA positivity as an outcome, we also evaluated the combined diagnostic accuracy to detect SIL (estimated by sensitivity plus specificity) as a function of distinct percentile cutpoints.

RESULTS

A total of 976 women were included in this study. Most women were married (74.2%), in the age group of 35 to 49 years (46.5%), white ethnicity (85%), with an elementary or lower educational level (70.6%), and never smokers (56%). Regarding their reproductive life, 33.9% of them had had 3 or more children. A significant proportion did not use any contraceptive methods during the six months previous to the interview (34.3%), or used oral contraceptives (32.5%).

Eighty-one percent of the patients reported that they had never had an abnormal Pap test. Most women (51.5%) had started their sexual life before 18 years of age, and had had a single lifetime sexual partner (55.7%). Further, 91.4% of the participating women denied any gynecological infection in the 6 months previous to the interview.

Figure 1 shows the ORs for HPV infection according to the percentile cutpoints for the HPV 16 and the mixed antigen serology. The serological cutpoint that maximized the risk of being HPV positive by PCR was located between the 60th and the 80th percentile (fig. 1, top). Similarly, the cutpoints that maximized the diagnostic accuracy of cytological (SIL) outcomes were also located between the 60th and the 80th percentile (fig. 1, bottom). Based on these

results, we arbitrarily determined the cutpoints as the 75th percentile of the distribution of absorbance ratios for the subset of women considered to be at low risk to acquire genital HPV infection. Using these defined cutpoints — absorbance ratios of 0.678 for HPV 16 and 0.742 for the mixed antigen —, a total of 378 samples (38.7%) were positive for the HPV 16 antigen, and 382 (39.1%) were positive for the mixed antigen.

Table 1 shows the association between socio-demographic characteristics and seropositivity for both antigens. Women aged 35 to 49 years had a higher risk of being seropositive for the HPV 16 and the mixed antigen compared to women under 25. Women 50 years or older had a significant higher risk of being seropositive for the mixed antigen (OR=1.66; 95%CI:1.0-2.7), but not for HPV 16, when controlling for HPV DNA positivity. Married women were less likely to be seropositive for both antigens, compared to single women. Women of non white ethnicity had a slightly higher risk of being seropositive, but the association was not significant.

Likewise, table 2 presents the results for sexual behavior variables and reproductive history as predictors of seropositivity. As expected, a strong positive association was found between lifetime number of sexual partners and seropositivity. Women with 4 or more partners were three to four times more likely to be seropositive than women with one sexual partner. The association was stronger for the mixed-antigen ELISA (OR=4.5, 95%CI:2.9-7.0) than for HPV-16 (OR=2.9; 95%CI:1.9-4.5). Number of partners in the 6 months previous to the interview was not as strongly associated with seroreactivity. Age at first sexual intercourse was associated with both antigens with a significant negative trend in positivity as age at first encounter increased. Women with first intercourse at 22 or older had almost half the risk of being seropositive than women with first intercourse at 16 or younger: OR=0.55; 95%CI:0.4-

0.8 for HPV 16, and $OR=0.58$; $95\%CI:0.4-0.9$ for the mixed HPV antigen. Although parity was not consistently correlated with seroreactivity, nulliparous women with antecedents of miscarriage or abortion had an increased risk of seropositivity for the mixed antigen, but not for HPV 16, compared to nulliparous women without such histories.

Table 3 shows the analysis of HPV DNA in cervical samples as predictor of seropositivity. HPV DNA was detected in 14.6% of the samples using the PCR technique, in 13.6% using Hybrid Capture, and 23.2% using either diagnostic method. The association with the Hybrid

Capture method was stronger for the HPV 16 antigen, whereas detection of HPV DNA by PCR was more strongly associated with the mixed antigen.

Table 4 shows models containing the most significant independent predictors of serological response by antigenic preparation. The final model for seroreactivity anti-HPV 16 as an outcome included age, smoking, parity, lifetime number of sexual partners, and detection of HPV DNA. The model for mixed antigens included as predictors smoking, lifetime number of sexual partners, contraception methods, and detection of HPV DNA. The strongest predictor in both models was number of sexual partners, being the association slightly stronger for the mixed antigen.

Of the 976 Pap smears, 88.7% were diagnosed as within normal limits, 6.3% as ASCUS, 2.1% as LGSIL, and 0.6% as HGSIL. Among the 14.3% women who underwent a cervical biopsy only 3.1% were confirmed histologically as having SIL: 2.7% with LGSIL and 0.4% with HGSIL. Table 5 shows the analysis where serological response is studied as a predictor of SIL defined either cytologically or histologically. The strongest association,

although not significant, was found between anti-HPV 16 seroreactivity SIL by cytology. All associations became attenuated after incremental adjustment for HPV DNA.

DISCUSSION

The characteristics of the study participants are consistent with a population with a low risk profile for genital HPV infection and cervical cancer. Recruitment took place in an outpatient clinic offering a screening program for prevention of cervical cancer. Most women attending this clinic are asymptomatic, and they are concerned with cancer prevention. The majority of the women included in our study have had only one lifetime sexual partner.

In the evaluation of the ELISA results, we controlled for intra and inter-assay fluctuations by including a control serum pool sample. Previous studies have also used the mean of multiple measures corrected for control sera, and the cutoff point for definition of seropositivity was based on serological values of women at low risk to develop HPV infection (12, 14, 15, 16).

In our study, the analysis of determinants of seropositivity for both types of antigens showed that the strongest predictor was lifetime number of sexual partners. This finding is in agreement with results from previous studies (12, 14, 15, 16, 17, 21, 22). Age at first sexual intercourse, another marker of sexual activity used in epidemiologic studies of cervical cancer, was negatively correlated with seropositivity. These results suggest that in this study population serology is primarily a marker of past HPV infection.

Another factor associated with seropositivity for the mixed antigen was multiparity. It is conceivable that every pregnancy increases the chance of acquiring an HPV infection, or exacerbates an already existing infection. Although non-white ethnicity has been shown to be

linked to HPV infection and cervical neoplasia (23), we did not find a significant association with seropositivity. A paradoxical finding in our study is that current and former smokers had lower levels of seropositivity for the both antigens than never smokers. Tobacco smoking reduces the immune response, but on the other hand seems to be a correlate of HPV infection (24). The analysis of detection of HPV DNA showed significant associations between both detection techniques and both serological responses analyzed, although the magnitude of the associations were not as strong as the ones seen in the analysis of number of sexual partners. While detection of HPV DNA using the PCR technique was a better predictor for mixed antigen reactivity, the Hybrid Capture technique was a better predictor for the HPV 16 serology. These results could be tentatively explained by the fact that the latter method is designed to detect high risk HPV types, while the MY09/11 PCR protocol detects a large spectrum of both low and high risk HPV genital types.

The fact that HPV seropositivity was more strongly associated with markers of sexual activity than with detection of cervical HPV DNA suggests that serological response is more a marker of past rather than current HPV infection in this population. These results are in agreement with the findings of a previous study in a population with a high risk for developing cervical cancer in Greenland (16), where seropositivity was associated with number of sexual partners but not with detection of HPV DNA. The participants in our study were relatively old, compared with those of other studies in which a stronger association between VLP serology and concomitant genital HPV was seen (12, 21). Together, these findings reinforce the concept that most genital tract HPV infections in women are transient, but most seroconversions are persistent.

Previous investigations have found strong associations between serological response to HPV-16 and HGSIL (13, 25, 26). In the present study, we found a higher risk of SIL for seropositivity to HPV 16 than for the mixed HPV antigen. The results were not significant, but the estimates were very imprecise due to the small number of LG-SIL and HG-SIL diagnosed among the participants. It is unlikely that the low magnitude of the ORs could be attributable to the wrong choice of cutpoint to determine seroreactivity. The chosen 75th percentiles based on optimizing the association with HPV DNA positivity also yielded the most discriminating combination of sensitivity and specificity for detecting cervical disease.

Our findings suggest that HPV serology is more a marker of past HPV infection rather than a marker of cervical lesions or current HPV infection. Our results support the hypothesis that either single type or mixed-type VLP serologic assays are not good indicators of women at increased risk of cervical cancer in low risk cohorts of the type studied here.

REFERENCES

1. Brinton LA. Epidemiology of cervical cancer -- overview. IARC Sci Publ; 119:3-23, 1992.
2. Franco, E.L. Human Papillomavirus and the natural history of cervical cancer. *Infections in Medicine*; 10: 57-64, 1993.
3. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Human papillomaviruses. vol 64, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1995.
4. Zur Hausen H: Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top* 186: 131-156., 1994.
5. Schiffman, M H: Latest HPV findings – some clinical implications. *Contemporary OB/GYN*. 27-37, 1993.
6. Franco, EL: Cancer causes revisited – human papillomavirus and the cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst*; 87:779-780, 1995.
7. Bosch FX, Manos MM, Munoz, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide prospective. *J Natl Cancer Inst*; 87:796-802, 1995.
8. Schiffmann M, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, et al: Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*; 85:958-964,1993.
9. Schiffman, M.H. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.*, v.84, n.6, p.394-398, 1992.
10. Kimbauer R,Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TB, Lowy DR and Schiller JT: A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus tipe 16. *J Natl Cancer Inst* ; 86:494-504, 1994.

11. Galloway, D. Papillomavirus capsids : a new approach to identify serologic markers of HPV infection. *J Natl Cancer Inst.*, v.86p. 474-475, 1994.
12. Dillner L, Wiklund F, Lenner P, Eklund C, Fredericksson-Shanazarion V, et al. Antibodies against linear and conformational epitopes of human papillomavirus type 16 that independently associate with incident cervical cancer. *Int J Cancer*, Jan, 60:3, 377-82, 1995.
13. Nonnenmacher B, Hubbert NL, Kirnbauer R, Shah KV, Munoz N, Bosch FX, et al. Serologic Response to Human Papillomavirus type 16 (HPV-16) Virus-Like Particles in HPV-16 DNA – Positive Invasive Cervical Cancer and Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade III Patients and Controls from Colombia and Spain. *J Infect Dis*;172:19-24, 1995.
14. Wideroff L, Schiffman MH, Nonnenmacher B, Hubbert N, Kimbauer R, Greer CE, et al. Evaluation of HPV16 virus-like particles seropositivity in na incident case-control study of cervical neoplasia. *J Infect Dis*, 172:6, 1425-30, 1995.
15. Wideroff L, Schiffman MH, Hoover R, Tarone RE, Nonnenmacher B, Hubbert N, et al. Epidemiologic determinants of eroreactivity to human papillomavirus (HPV) type 16 virus like-particles in cervical HPV-16 DNA-positive and negative women. *J Infect Dis*, 174:5, 937-43, 1996.
16. Nonnenmacher B, Kruger Kjaer S, Svare EI, Scott JD, Hubbert NL, van den Brule AJ, et al. Seroreactivity to HPV16 virus-like particles as a marker for cervical cancer risk in high-risk populations. *Int J Cancer*; 68:704-709, 1996.
17. Svare EI, Kjaer SK, Nonnenmacher B, Worm AM, Moi H, Christensen RB, et al. Seroreactivity to human papillomavirus typen16 virus-like particles is lower in high-risk men than in high-risk women. *J Infect Dis*, 176:4, 876-83, 1997.
18. National Cancer Institute Workshop: The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis. *Acta Cytol*; 33: 567-574, 1989.

19. Manos MM, Ting Y, Wright DK, et al. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Molecular Diagnostics of Human Cancer*, p. 209-214, 1989.
20. Lorincz AT, Hybrid capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens. *Papillomavirus report*; 7:1-5, 1996.
21. Carter JJ, Koutsky LA, Wipf GC, Christensen ND, Lee SK, Kuypers J, et al. The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J Infect Dis*; 174:5, 927-36, 1996.
22. Olsen AO, Dillner J, Gjien K; Magnus P. Seropositivity against HPV 16 capsids: a better marker of past sexual behavior than presence of HPV DNA. *Genitourin Med*; 73:2,131-5, 1997.
23. Schairer C, Brinton LA, Devesa SS, Ziegler RG, Fraumeni JF Jr. Racial differences in the risk of invasive squamous-cell cervical cancer. *Cancer Causes and Control*, v.2, p.283-289,1991.
24. Hildesheim A, Gravitt P, Schiffmann MH, Kurman RJ, Barnes W, Jones S, et al. Determinants of Genital human papillomavirus infection in low-income women in Washington DC. *Sex Trans Dis*; 20:279:285, 1993.
25. Olsen AO, Dillner J, Gjoen K, Sauer T, Orstavik I, Magnus P. A population-based case-control study of human papillomavirus-type-16 seropositivity and incident high-grade dysplasia of the uterine cervix. *Int J Cancer*, 68:415-9, 1996.
26. Wideroff L, Schiffman M, Haderer P, Armstrong A, Greer CE, Manos MM, et al. Seroreactivity to human papillomavirus types 16, 18, 31, and 45 virus-like particles in a case-control study of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Infect Dis*, 180:1424-8, 1999.

Table 1. Odds Ratios and 95% confidence intervals (CIs) for seropositivity according to sociodemographic and related variables.

Variable	Categories	N	HPV 16 seropositivity			HPV antigen mix seropositivity		
			%	Age adjusted OR (95%CI)	Age + HPV DNA adj. OR (95%CI)	%	Age adjusted OR (95%CI)	Age + HPV DNA adj. OR (95%CI)
Age (years)	≤ 24	113	30.1	1.0	1.0	32.7	1.0	1.0
	25-34	232	38.8	1.47 (0.9-2.4)	1.56 (1.0-2.5)	38.4	1.28 (0.8-2.1)	1.38 (0.9-2.2)
	35-49	454	42.4	1.71 (1.1-2.7)	1.87 (1.2-2.9)	39.9	1.36 (0.9-2.1)	1.52 (1.0-2.4)
	≥ 50	175	35.4	1.28 (0.8-2.1)	1.37 (0.8-2.3)	42.3	1.50 (0.9-2.5)	1.66 (1.0-2.7)
Race	White	830	37.9	1.0	1.0	38.6	1.0	1.0
	Non-white	134	44.0	1.29 (0.9-1.9)	1.26 (0.9-1.8)	42.5	1.20 (0.8-1.7)	1.17 (0.8-1.7)
Schooling level	< Elementary	473	38.3	1.0	1.0	38.5	1.0	1.0
	Elementary	205	35.1	0.89 (0.6-1.2)	0.87 (0.6-1.2)	34.6	0.86 (0.6-1.2)	0.85 (0.6-1.2)
	High School	225	44.4	1.32 (1.0-1.8)	1.25 (0.9-1.7)	45.3	1.38 (1.0-1.9)	1.29 (0.9-1.8)
	Postsecondary	69	36.2	0.94 (0.6-1.6)	0.90 (0.5-1.5)	37.7	1.00 (0.6-1.7)	0.94 (0.6-1.6)
Income	< 3 minimum wages	503	38.2	1.0	1.0	38.6	1.0	1.0
	> 3 minimum wages	392	39.6	1.05 (0.8-1.4)	1.04 (0.8-1.4)	39.5	1.07 (0.8-1.4)	1.05 (0.8-1.4)
Smoking	Never smoked	547	38.8	1.0	1.0	40.2	1.0	1.0
	Current smoker	283	38.2	0.96 (0.7-1.3)	0.94 (0.7-1.3)	37.5	0.90 (0.7-1.2)	0.87 (0.6-1.2)
	Former smoker	140	38.8	1.00 (0.7-1.5)	0.99 (0.7-1.5)	38.6	0.91 (0.6-1.3)	0.89 (0.6-1.3)
Marital status	Single	114	44.7	1.0	1.0	47.4	1.0	1.0
	Married	725	36.9	0.61 (0.4-0.9)	0.66 (0.4-1.0)	36.7	0.55 (0.4-0.9)	0.61 (0.4-0.9)
	Divorced	83	48.2	0.95 (0.5-1.7)	1.05 (0.6-1.9)	43.4	0.70 (0.4-1.3)	0.78 (0.4-1.4)
	Widowed	51	37.3	0.68 (0.3-1.4)	0.69 (0.3-1.5)	49.0	0.86 (0.4-1.8)	0.89 (0.4-1.8)

Table 2. Odds Ratios and 95% confidence intervals for seropositivity according to reproductive and sexual behavior variables.

Variable	Categories	N	HPV 16 seropositivity			HPV antigen mix seropositivity		
			%	Age adjusted OR (95%CI)	Age + HPV DNA adj. OR (95%CI)	%	Age adjusted OR (95%CI)	Age + HPV DNA adj OR (95%CI)
Parity	Nulliparous	143	33.6	1.0	1.0	39.2	1.0	1.0
	1	197	39.6	1.17 (0.7-1.9)	1.27 (0.8-2.0)	38.6	0.90 (0.6-1.4)	0.99 (0.6-1.6)
	2	262	32.4	0.82 (0.5-1.3)	0.90 (0.6-1.4)	35.5	0.74 (0.5-1.2)	0.82 (0.5-1.3)
	3 or +	331	44.2	1.35 (0.9-2.1)	1.48 (0.9-2.3)	42.0	0.94 (0.6-1.5)	1.06 (0.7-1.7)
	Miscarriage	40	50.0	1.88 (0.9-3.8)	2.06 (1.0-4.3)	42.5	1.09 (0.5-2.2)	1.22 (0.6-2.5)
Contraception last 6 mos	None	335	39.1	1.0	1.0	40.0	1.0	1.0
	OC use	318	34.6	0.80 (0.5-1.2)	0.76 (0.5-1.1)	34.6	0.88 (0.6-1.3)	0.85 (0.6-1.3)
	Tubal ligation	181	43.9	1.09 (0.7-1.6)	1.13 (0.8-1.7)	43.6	1.21 (0.8-1.8)	1.26 (0.9-1.9)
	Other	138	42.0	1.01 (0.7-1.6)	1.01 (0.7-1.6)	42.8	1.18 (0.8-1.8)	1.18 (0.8-1.8)
History of abnormal Pap	No	786	39.0	1.0	1.0	39.8	1.0	1.0
	Yes	180	37.8	0.92 (0.7-1.3)	0.95 (0.7-1.3)	36.1	0.84 (0.6-1.2)	0.87 (0.6-1.2)
Lifetime no. sex partners	1	544	30.9	1.0	1.0	27.9	1.0	1.0
	2	205	45.4	1.92 (1.4-2.7)	1.89 (1.4-2.6)	49.8	2.60 (1.9-3.6)	2.55 (1.8-3.6)
	3	114	45.6	1.88 (1.2-2.8)	1.82 (1.2-2.8)	49.1	2.58 (1.7-3.9)	2.47 (1.6-3.8)
	≥ 4	110	57.3	3.07 (2.0-4.7)	2.95 (1.9-4.5)	63.6	4.78 (3.1-7.4)	4.53 (2.9-7.0)
No. partners last 6 mos	0 or 1	954	38.6	1.0	1.0	38.9	1.0	1.0
	2 or 3	20	50.0	1.65 (0.7-4.0)	1.63 (0.7-4.0)	55.0	2.01 (0.8-4.9)	2.00 (0.8-4.9)
Age at first sexual intercourse	≤ 16	230	43.0	1.0	1.0	43.5	1.0	1.0
	17-18	274	43.4	0.98 (0.7-1.4)	0.96 (0.7-1.4)	40.5	0.86 (0.6-1.2)	0.84 (0.6-1.2)
	19-21	261	35.0	0.64 (0.4-0.9)	0.63 (0.4-0.9)	37.5	0.71 (0.5-1.0)	0.71 (0.5-1.0)

	≥ 22	209	32.5	0.55 (0.4-0.8)	0.55 (0.4-0.8)	34.4	0.59 (0.4-0.9)	0.58 (0.4-0.9)
Genital infection last 6 mos	No	893	38.4	1.0	1.0	39.1	1.0	1.0
	HPV	16	33.3	0.90 (0.3-2.7)	0.78 (0.3-2.4)	31.3	0.79 (0.3-2.3)	0.66 (0.2-2.0)
	Other	46	50.0	1.66 (0.9-3.0)	1.63 (0.9-3.0)	43.5	1.25 (0.7-2.3)	1.23 (0.7-2.3)

Table 3. Odds ratios and 95% confidence intervals for seroreactivity according to detection of HPV DNA.

			HPV 16 seropositivity			HPV antigen mix seropositivity	
			N	%	Age-adjusted OR (95%CI)	%	Age-adjusted OR (95%CI)
Hybrid Capture II	Negative	731	36.1	1.0	37.7	1.0	
	Positive	133	47.4	1.71 (1.2 - 2.5)	45.9	1.45 (1.0 – 2.1)	
PCR	Negative	757	36.6	1.0	36.3	1.0	
	Positive	143	47.6	1.73 (1.2 - 2.5)	52.4	2.04 (1.4 – 2.9)	
Either	Negative	606	35.3	1.0	36.6	1.0	
	Positive	227	44.9	1.61 (1.2 - 2.2)	46.3	1.55 (1.1 – 2.1)	

Table 4. Odds ratios for the most predictive variables * of the anti-HPV seroreactivity according to the type of antigen used in the reaction ELISA.

Variable	Categories compared	Odds ratio and 95%CI	
		HPV 16 Antigen	Mixed HPV antigen
Age (years)	25-34 vs. <25	1.34 (0.8 - 2.3)	
	35-49 vs. <25	1.66 (1.0 - 2.8)	
	50+ vs. <25	1.17 (0.7 - 2.1)	
Smoking	Current smoker vs. never	0.78 (0.6 - 1.1)	0.70 (0.5 - 1.0)
	Former smoker vs. never	0.86 (0.6 - 1.3)	0.74 (0.5 - 1.1)
Parity	1 vs. nulliparous	1.37 (0.8 - 2.2)	
	2 vs. nulliparous	1.16 (0.7 - 1.9)	
	≥ 3 vs. nulliparous	1.81 (1.1 - 2.9)	
	Miscarriage vs. nulliparous	1.79 (0.8 - 3.8)	
Lifetime sexual partners	2 vs. 1	1.97 (1.4 - 2.8)	2.66 (1.9 - 3.7)
	3 vs. 1	1.96 (1.3 - 3.0)	2.56 (1.7 - 3.9)
	≥ 4 vs. 1	3.06 (2.0 - 4.8)	4.64 (3.0 - 7.2)
HPV PCR	positive vs. negative	1.58 (1.1 - 2.3)	1.77 (1.2 - 2.6)
Contraception	Oral Contraceptives vs. none		0.79 (0.6 - 1.1)
	Tubal ligation vs. none		1.32 (0.9 - 2.0)
	Others vs. none		1.19 (0.8 - 1.8)

* By stepwise multiple logistic regression (see methods for details)

Table 5. Odds ratios and confidence intervals (95%CI) for cervical intraepithelial lesions by anti-HPV serological response and diagnostic approach to define lesions.

Lesion definition *	HPV antigen types	Age-adjusted OR (95%CI)	OR adjusted for age and HPV DNA (95%CI)
Cytological **	HPV 16	2.07 (1.0 – 4.5)	1.73 (0.8 – 3.8)
	Mixed HPV	1.50 (0.7 – 3.2)	1.16 (0.5 – 2.6)
Hystological ***	HPV 16	1.13 (0.5 – 2.6)	1.10 (0.5 – 2.6)
	Mixed HPV	1.21 (0.5 – 2.9)	1.14 (0.5 – 2.9)

*Cytology: Comparison between any grade SIL and normal cytological results (ASCUS and other categories excluded). Histology: Comparison between confirmed any grade SILs and negative results among women who underwent biopsy.

** 894 women included in the analysis, 27 of them presented lesions.

*** 133 women included in the analysis, 30 of them presented lesions.

FIGURE LEGEND

Figure 1. Association between serological response and HPV DNA positivity by PCR (top graph) and diagnostic accuracy of HPV serology to detect cervical lesions (bottom graph) according to percentiles of the distribution of cutpoints used to define seroreactivity among the subset of women at low risk for cervical HPV disease (see text for details). Top: Odds ratios of HPV DNA positivity; bottom: combined sensitivity and specificity of serology to detect SIL. Solid line: HPV 16 antigen, broken line: mixed HPV antigen.

VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO

Resumo

Foi utilizado o teste ELISA para o HPV na medida da resposta sorológica aos antígenos HPV 16 e antígeno misto (HPVs 6, 11, 16 e 18) em um estudo transversal de uma população de baixo risco para o câncer do colo uterino em Porto Alegre. Anticorpos IgG para o HPV 16 e HPV misto foram testados em 977 mulheres entre as quais 14,6% tinham o DNA do HPV por PCR em suas células cervicais.

Foi definida a positividade sorológicas através da fórmula RAN, com o intuito de minimizar os efeitos das variações inter e intra ensaios no teste ELISA.

Os fatores epidemiológicos associados e preditivos da resposta sorológica foram selecionados utilizando-se regressão linear múltipla e regressão logística múltipla. As variáveis mais independentemente preditivas do risco de sororeatividade na sorologia com o antígeno HPV 16 foram o número de parceiros sexuais durante a vida (2x1 parceiros, RC= 1,94 e IC 95% = 1,29 - 2,91; 3x1 parceiros, RC = 1,49 e IC 95% = 0,87 - 2,53; \geq 4x1 parceiros, RC = 3,07 e IC = 1,91 - 4,96) e paridade (3x nulípara, RC=1,85 e RC= 1,07 - 3,17). Na sorologia que utilizou o antígeno misto para o HPV, as variáveis mais associadas foram o número de parceiros sexuais ao longo da vida (2x1 parceiros, RC= 3,01 e IC 95% = 1,97 - 4,62; 3x1 parceiros, RC = 1,86 e IC 95% = 1,05 - 3,30; 4x1 parceiros, RC = 4,13 e IC = 2,49 - 6,85); a raça (não branca x branca, RC= 1,60 e IC 95% = 1,00 - 2,55), e a variável tabagismo que se mostrou como fator protetor (fumante atual x nunca fumou, RC= 0,63 e IC 95%= 0,42 - 0,95).

Não houve associação significativa entre a resposta sorológica anti-HPV e a presença de lesões neoplásicas cervicais em ambos os testes ELISA (HPV 16 e HPV misto);

Estes resultados sugerem que a soropositividade ao ELISA VLP antígeno HPV 16 e antígeno misto pode ser um marcador de atividade sexual assim como um marcador de

infecção passada ao HPV mais do que infecção atual. Nossos resultados sugerem que a resposta humoral aos HPVs não possa ser utilizada como marcador de lesões cervicais em populações de baixo risco para o câncer cervical.

Introdução

As pesquisas epidemiológicas realizadas nas três últimas décadas mostram que marcadores da atividade sexual (início precoce da atividade sexual, número de parceiros sexuais na vida, promiscuidade) são sem dúvida os determinantes de risco mais importantes para o desenvolvimento de um câncer cervical (Franco, 1991; Franco, 1993). Isto nos sugere que exista um agente de transmissão sexual que esteja causando o câncer cervical (Franco et al, 1995) e estudos mais recentes afirmam ser o HPV este agente (Coutlée, 1997). Já existem evidências biológicas e epidemiológicas de que a infecção cervical por certos tipos de papilomavírus humano (HPV), especialmente o HPV16, é o evento precursor na gênese da neoplasia cervical (zur Hausen et al, 1992; Schiffman, 1993; Franco, 1995). Em torno de 90% dos tumores malignos e lesões precursoras cervicais contém o material genético de alguns tipos destes vírus, reforçando o seu papel na indução destas neoplasias (Bosch et al, 1995; zur Hausen et al, 1994). Além disto, frequências relativamente altas de mulheres normais estão infectadas por HPV (entre 15-40%) (Schiffman, 1993; IARC: Human Papillomavirus, 1995), sendo que a prevalência é maior entre adolescentes e mulheres jovens. Contudo, somente uma pequena porcentagem destas mulheres desenvolverá o câncer do colo uterino. Estudos estão indicando que o risco de desenvolvimento ou de progressão de uma lesão precursora no colo uterino é significativamente maior naquelas pacientes que portam vírus de alto risco em suas células cervicais (Schiffman, 1992; Franco et al, 1995).

A importância do sistema imunológico na patogênese das infecções pelo HPV já tornou-se evidente nos vários estudos envolvendo pacientes imunossuprimidos, especialmente em transplantados renais e pacientes HIV positivos (IARC: Human Papillomavirus, 1995).

Os papilomavírus humano apresentam proteínas estruturais, que formam o seu capsídeo, e proteínas não estruturais, que são imunogênicas e infectam o hospedeiro (Tindle et al, 1994). Recentemente, esforços foram dispendidos na caracterização da resposta imune do hospedeiro a estes antígenos do HPV e, tais esforços tem sido focados na prevalência de anticorpos anti-HPV em soro humano. Devido as dificuldades em se obter antígenos do HPV através da cultura deste vírus, meios alternativos de obtenção destes antígenos foram desenvolvidos para o estudo da resposta imune no ser humano. Dentre estes meios alternativos temos a fusão de proteínas recombinantes em bactérias (Gallonway, 1992), peptídeos sintéticos (Dillner, 1994), produção de *virions* (Hagense, 1993). Também foram desenvolvidos *in vitro* a produção das proteínas estruturais do vírus HPV, as chamadas “virus like particles” (VLPs), onde os antígenos são oriundos de capsídeos vazios e sem poder infectante no hospedeiro. As VLPs se formam *in vitro* em células eucarióticas infectadas por *baculovirus* que haviam previamente sido infectados por HPVs (Kirnbauer et al, 1992; Rose et al, 1993; Hagnese, 1993; Kirnbauer et al, 1993).

Foi demonstrado em diferentes estudos que a produção *in vitro* das proteínas estruturais do vírus (HPV16 L1 mais L2 VLPs) pode ser utilizada na detecção de anticorpos anti-HPV16 no soro humano em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (Kirnbauer et al, 1994; Gallonway, 1994; Dillner et al, 1995; Nonnenmacher et al, 1995; Wideroff et al, 1995; Wideroff et al, 1996; Nonnenmacher et al, 1996; Svare et al, 1997).

Um teste ELISA-VLP para o HPV16 e um teste ELISA-VLP para os HPVs 16,18, 6 e 11 foram utilizados neste estudo para testar a soropositividade a estes HPVs numa população de mulheres sexualmente ativas que frequentam a Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre.

O objetivo deste estudo foi o de conhecer a resposta humoral ao HPV, as variáveis epidemiológicas correlacionadas com a resposta sorológica, sua correlação com o risco de lesões precursoras de neoplasia cervical na nossa população de mulheres da Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre, que é uma população de baixo risco para o câncer

cervical com relação à sua localização geográfica dentro do Brasil. Tivemos também como objetivo definir a positividade sorológica na reação ELISA que melhor caracterize o modelo etiológico para a relação HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical.

Material e Métodos

Coleta dos dados e testes para o DNA e sorologia

Foi realizado um estudo transversal onde todas as mulheres (1035) que compareceram à Liga Feminina de Combate ao Câncer no período de julho e agosto de 1994) foram convidadas à participar. As mulheres que aceitaram em participar do estudo (977) compuseram o grupo que foi investigado. A idade destas mulheres variou entre 15 e 70 anos. Todas as pacientes responderam à um questionário com perguntas de ordem sócio-demográfica e de saúde reprodutiva. Na elaboração do questionário foram incluídas questões comprovadamente envolvidas na epidemiologia do câncer do colo uterino, visando correlacioná-las com a infecção pelo HPV, como idade, raça, escolaridade, renda, tabagismo, estado civil; ainda, paridade, contracepção nos últimos 6 meses, Papanicolaou alterado no passado, número de parceiros sexuais ao longo da vida e nos últimos seis meses, a idade da primeira relação sexual e presença de infecção ginecológica nos últimos seis meses.

Foram coletadas amostras de células do colo uterino com uma escova endocervical para o exame citopatológico. As lâminas da citologia foram examinadas cegamente por dois patologistas diferentes cegos ao diagnóstico clínico dessas mulheres. O exame citopatológico foi expresso segundo a Classificação Internacional de Bethesda (National Cancer Institute, 1989). Também foram coletadas células da junção escamo-colunar e colocadas em uma solução de PBS, que foi congelada à -80 C para a posterior análise do

DNA viral. Todas as amostras foram testadas para o DNA viral por dois métodos: o PCR (*Polymerase Chain Reaction*)(Manos,1989) e Captura Híbrida II (Lorincz,1996). Nós analisamos os métodos separadamente (*DNA de HPV por PCR* e *DNA de HPV por Captura híbrida II*) e os associamos chamando-o de *DNA de HPV combinado* (PCR/HC II).

A detecção do DNA de HPV nas amostras foi feita através da reação de PCR, utilizando-se os primers MY 09/11, que amplificam uma região muito conservada de 450 pares de bases (pb) do gene L1 de HPV (Bauer et al, 1992). Foram realizadas as seguintes etapas: amplificação do DNA alvo pela reação de PCR na presença de uma mistura de oligonucleotídeos iniciadores específicos (MY09 e MY11). DNA polimerase termoestável de *Thermos-aquaticus* – Taq DNA polimerase (CENTIBIOT, Brasil), os quatro desoxirribonucleotídeos e um tampão contendo 3 MgCl₂, juntamente com 2 oligonucleotídeos, G-73 e G-74, que amplificam para o gene da beta-globina (268 pares de base) e representam o controle interno da reação para avaliação da integridade e da suficiência de DNA de cada amostra para a amplificação. Os primers MY09 e MY11 são primers genéricos, isto é, possuem a capacidade de amplificar vários tipos de HPV dentro de uma região bem conservada de seus genomas (a região tardia L1), originando um produto de amplificação de 450 pares de bases. Todas as amostras de DNA submetidas a amplificação por PCR são então analisadas em gel de agarose a 1%. Em cada gel como controle da reação, tem-se uma amostra de alguma linhagem celular que possua algum tipo de HPV (controle positivo) , SiHA, Hela ou CasKi, devendo amplificar um fragmento de 268 pares de bases (beta-globina) e de 450 pares de bases (HPV 18 ou 16, dependendo da linhagem escolhida); uma amostra de DNA de HPV clonado em um plasmídeo como um controle que amplifique apenas para o fragmento de 450 pares de bases e um controle negativo, que não contém DNA. As reações são feitas empregando-se um ciclador de temperatura programado para as seguintes condições: 95°C, 1 minuto (pareamento dos primers) e 72°C, 2 minutos (extensão dos produtos), repetidas 40 vezes.

As amostras de DNA por PCR foram processadas em conjunto pelo Laboratório SIMBIOS em Porto Alegre e pelo Instituto Ludwig de Pesquisa Contra o Câncer, em São Paulo . As mesmas amostras foram então testadas para DNA por Captura Híbrida II pelo Laboratório DIGENE nos Estados Unidos.

Para a detecção do DNA viral por Captura Híbrida, o material para a análise passou por cinco procedimentos : Denaturação - Hibridização - Captura de Híbridos - Reação dos Híbridos com o Conjugado - Detecção dos Híbridos por Quimioluminescência. Reagindo com sonda gênica específica, o material para análise forma híbridos de RNA/DNA que são capturados por anticorpos que revestem as paredes dos tubos. A seguir, os híbridos imobilizados reagem com anticorpos específicos conjugados à fosfatase alcalina, formando um substrato estável, que são detectados por quimioluminescência ultra-sensível. Com essa metodologia pode-se conhecer o resultado em seis horas. Todos os testes de Captura Híbrida são, ao mesmo tempo, qualitativos e quantitativos (Lorincz, 1996).

Também foram coletadas amostras de sangue nestas pacientes. As amostras de sangue foram centrifugadas para separação do soro que foi congelado à – 80° C. Cada amostra de soro foi testada três vezes em um teste ELISA para o HPV 16 e, posteriormente numa sorologia mista para os HPVs 16, 18, 6 e 11, no Instituto Nacional do Câncer, Estados Unidos, no laboratório dos Doutores John Schiller e Doug Lowy em Bethesda.

Detalhes da sorologia ELISA para o HPV foi publicado previamente por Kirnbauer *et alli* em 1994. As proteínas estruturais “*in vitro*” do HPV são também chamadas de *virus like particles* ou VLPs e são estas proteínas que foram utilizadas como antígeno na placa ELISA para a reação antígeno-anticorpo. As VLPs L1 e L1/L2 são co-expressas via recombinante em vetores baculovirus originárias da infecção do HPV em células de inseto. Alíquotas (1.0µg) de partículas VLPs acrescidas de 50 µl de PBS (solução salina) são colocadas em cada um dos 96 orifícios da placa *microtiter* (*Immulon II; Dynatech Laboratories, Chantilly, VA*); a placa é então incubada à 37°C por uma hora e meia, lavada três vezes com PBS livre

de cálcio e magnésio. Após, as placas ficam sendo bloqueadas por 2 horas com PBS contendo leite em pó à 0.5% (*Giant Foods, Whashington, DC*) e 0.1% de *newborn calf serum* (soro de bezerro recém-nascido) (*Life Technologies GIBCO BRL, Gaithersburg, MD*). Depois de mais três lavagens com PBS, 10 µl do soro humano diluído em 40 µl de PBS com leite em pó à 0.5% é adicionado aos orifícios da placa. A placa fica então incubando estes soros por duas horas e meia e lavada mais cinco vezes. O próximo passo é a adição de *anti-human IgG (horseradish peroxidase-conjugated goat F(ab')₂)* diluída numa diluição de 1:10.000 em PBS-leite à 0.5%. Segue-se 1 hora de incubação em temperatura ambiente e nova lavagem das placas por três vezes, quando então 50 µl de substrato (*ABTS; Boehringer Mannheim, Indianápolis*) é adicionado à cada orifício da placa com 45 minutos de incubação novamente em temperatura ambiente. Para a leitura da densidade ótica, foi utilizado um *microplate reader* lendo densidade ótica em 405 nm (*Thermo Max; Molecular Devices, Menlo Prk, CA*) e cada placa foi lida três vezes com intervalos de tempos iguais.

Todas as amostras de soro foram testadas 3 vezes pela mesma pessoa no teste ELISA, e a reatividade na sorologia foi expressa em RAN (razão de absorbâncias normalizada) ou Absorbância Média.

Métodos de análise

1) Controle da variação dos resultados na reação imuno-enzimática:

A reatividade sorológica em ensaios imuno-enzimáticos é diretamente medida nas absorbâncias colorimétricas dos alvéolos das placas de poliestireno após a subtração das mesmas da reatividade “blank” onde o soro a testar é omitido, para se eliminar do “sinal” de cada reação o “ruído” correspondente à atividade cromogênica basal dos reagentes. A inclusão do pool de soros controle em cada placa indicou uma grande variabilidade de resultados, refletindo as variações inter- e intra-ensaio inerentes a um método sorológico tão

sensível quanto a ELISA. Tal variabilidade também se espera tenha ocorrido com os soros das pacientes do estudo.

A seguinte fórmula foi utilizada para minimizar os efeitos dessa variação: razão de absorvâncias normalizada (RAN). A RAN para cada soro foi calculada de acordo com as seguinte fórmula:

$$\text{RAN} = \frac{\text{média aritmética das absorvâncias das duplicatas do soro testado para um dado antígeno}}{\text{média aritmética das absorvâncias das duplicatas do pool de soros controle testado na mesma diluição e incluído na mesma placa onde o soro teste foi avaliado}}$$

Na fórmula a reatividade “blank” foi automaticamente subtraída zerando-se o colorímetro nos alvéolos onde todos os reagentes foram incluídos na sequência normal exceto pelo soro, o qual foi substituído pelo diluente.

Com a fórmula acima qualquer variação nas condições de reagentes e conduta da ELISA que tenham afetado a reatividade dos soros sendo testados estariam igualmente presentes na reatividade média do pool de soros controle para a mesma placa e diluição. A razão (RAN) entre as duas medidas de reatividade corrigiria então essas flutuações, desde que estas sejam sistemáticas, isto é, semelhantes em intensidade para um dado ensaio e afetando igualmente todos os alvéolos de uma mesma placa.

2) Definição de positividade sorológica:

Para se definir o valor da medida de reatividade (RAN) que indicasse soropositividade anti-HPV baseamos o julgamento na reatividade típica dos soros de um grupo de pacientes considerado como controle negativo. Este grupo foi definido de forma arbitrária e inclui todas as pacientes com baixo risco hipotético de infecção pelo HPV com base nas seguintes combinações de variáveis:

- a) Idade da primeira relação sexual maior ou igual a 19 anos e
- b) No máximo um parceiro sexual ao longo da vida e
- c) Ausência de DNA de HPV na amostra cervical por ambos os métodos (PCR e CH-II) e
- d) Ausência de anomalias citológicas cervicais

O total de mulheres cujos perfis de fatores de risco preencheram os requisitos acima foi 171.

A distribuição da medida de reatividade pela fórmula RAN foi calculada para este grupo controle negativo e o valor correspondente ao percentil 90% foi usado arbitrariamente como discriminante de positividade sorológica em cada definição. Com base nestes valores os resultados sorológicos foram classificados como negativos e positivos e assim interpretados nas análises de associação com os fatores de risco epidemiológicos e risco de lesões cervicais durante o estudo.

3) Fatores preditivos da resposta sorológica:

Como principal objetivo, procurou-se avaliar os fatores associados a resposta sorológica, sendo esta então considerada como variável dependente. Para tais análises usamos a reatividade sorológica (RAN) de forma contínua. A forma logarítmica destas variáveis (RANs para HPV 16 e para antígeno misto) foi utilizada para se obter uma distribuição normalizada dos valores.

A técnica de regressão linear múltipla foi utilizada para tal fim calculando-se os coeficientes de regressão e respectivos valores de p bicaudais para cada categoria das variáveis explanatórias com e sem ajustamento por idade e DNA de HPV (PCR). Todas as variáveis ordinais e nominais foram tratadas como conjuntos de indicadores binários “dummy”. Valores positivos para os coeficientes indicam uma associação positiva com a resposta sorológica, isto é, a presença daquele atributo aumentaria a reatividade, enquanto que valores negativos agiriam no sentido da redução da resposta sorológica.

Numa segunda fase, utilizou-se a resposta sorológica de forma binária, isto é, após definir-se cada valor como negativo ou positivo segundo o valor discriminante descrito acima (percentil 90 da distribuição dos valores RAN para HPV 16 ou antígeno misto no grupo controle). Repetiu-se então as análises de associação com os fatores de risco epidemiológicos medindo-se desta vez a razão de chances (RC) (“odds ratio”) e respectivo intervalo de confiança a 95% (IC95%) para cada categoria de cada variável. O modelo de regressão logística múltipla não condicional foi usado para se estimar as RCs.

Finalmente, utilizamos o modelo de regressão logística para selecionar as variáveis mais independentemente preditivas do risco de sororeatividade em cada preparação antigênica via algoritmo de retenção de variáveis tipo “stepwise backwards” que manteve no modelo todos os fatores que estiveram significativamente associados a sororeatividade ao nível de 10% ($P = 0,1$) para entrada e 15% ($P=0,15$) para saída de variáveis.

4) Associação entre positividade sorológica e risco de lesões:

Para se avaliar as associações entre as respostas sorológicas para cada tipo de antígeno, definidas como variáveis dicotômicas, e presença de lesões cervicais calculou-se as RCs e respectivos IC95% razão de chances (“odds ratios”) para cada combinação de antígeno (HPV 16 ou misto) e critério de definição de lesão (citológico ou histopatológico).

Lesões foram definidas como sendo quaisquer diagnósticos de LEIBG e LEIAG. Casos com diagnósticos de CEASI ou de outras anormalidades foram excluídos das análises. O modelo de regressão logística incondicional foi utilizado no cálculo de RCs ajustados por idade e adicionalmente pela presença de DNA de HPV na amostra cervical (PCR).

Resultados

Foram analisadas 977 pacientes na faixa etária de 15 a 70.

As tabelas 1, 2 e 3 descrevem a distribuição por frequência segundo variáveis sócio-demográficas, de saúde reprodutiva e variáveis clínico-patológicas na população do estudo.

A população do estudo foi na sua grande maioria composta por mulheres casadas (74,2%), na faixa etária de 35 a 49 anos (46,5%), da raça branca (85%) e com um nível de escolaridade menor ou igual ao nível primário (70,6%). Mais da metade das nossas pacientes nunca haviam fumado (56%). Com relação à sua vida reprodutiva, 33,9% delas haviam tido 3 ou mais filhos. Na sua maioria ou não utilizavam método contraceptivo (34,3%) ou utilizavam anticoncepcional oral (32,5%). Oitenta e um por cento destas pacientes referiram nunca ter tido exame Papanicolaou alterado no passado. Em torno de 51,5% iniciaram sua vida sexual antes dos 18 anos de idade enquanto que a maioria destas pacientes (55,7%) havia tido somente um parceiro ao longo da vida. Ainda, 91,4% neste grupo negou infecção ginecológica nos últimos 6 meses.

Quando às variáveis clínico-patológicas, foi observado ser essa uma amostra de baixo risco para neoplasia intraepitelial cervical e, a presença de DNA para HPV foi encontrada em 14,6% para o PCR; 13,6% para captura híbrida e 23,2% na associação dos métodos de DNA.

Tabela 1: Distribuição por frequência segundo variáveis sócio-demográficas entre as mulheres da Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre (n=977).

Variável	Categoria	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Idade (anos)	≤ 24	113	11,6
	25-34	232	23,7
	35-49	454	46,5
	≥ 50	175	17,9
	Ignorada	3	0,3
Raça	Branca	830	85
	Não Branca	134	13,7
	Ignorada	13	1,3
Escolaridade	≤ Primário	690	70,6
	Secundário	225	23
	Profissionalizante/Universitário	57	5,8
	Ignorada	5	0,5
Renda	≤ 3 Salários mínimos	503	51,5
	> 3 Salários mínimos	392	40,1
	Ignorada	82	8,4
Tabagismo	Nunca fumou	547	56,0
	Fumante atual	283	29,0
	Ex-fumante	140	14,3
	Ignorada	7	0,7
Estado Civil	Solteira	114	11,7
	Casada	725	74,2
	Divorciada	83	8,5
	Viúva	51	5,2
	Ignorada	4	0,4

Tabela 2: Distribuição por frequência segundo variáveis de saúde reprodutiva entre as mulheres da Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre (n=977).

Variável	Categoria	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Paridade	Nulípara	143	14,6
	1	197	20,2
	2	262	26,8
	3 ou +	331	33,9
	Aborto	40	4,1
	Ignorada	4	0,4
Contraceção nos últimos 6 meses	Nenhuma	335	34,3
	Anticoncepção oral	318	32,5
	Ligadura tubária	181	18,5
	Outros	138	14,1
	Ignorada	5	0,5
Papanicolaou alterado no Passado?	Não	792	81,1
	Sim	180	18,4
	Ignorada	5	0,5
Nº de parceiros ao longo da vida	1	544	55,7
	2	205	21
	3	114	11,7
	≥ 4	110	11,2
	Ignorada	4	0,4
Nº de parceiros nos últimos 6 meses	0 ou 1	954	97,7
	2 ou 3	20	2,0
	Ignorada	3	0,3
Idade da primeira relação Sexual	≤ 16	230	23,5
	17-18	274	28,0
	19-21	261	26,7
	≥ 22	209	21,4
	Ignorada	3	0,3
Infecção ginecológica nos últimos 6 meses	Não	893	91,4
	HPV	16	1,6
	Outras	46	4,7
	Ignorada	22	2,3

Tabela 3: Distribuição por frequência segundo variáveis Clínico-Patológicas entre as mulheres da Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre (n=977).

Variável	Categoria	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Citologia*	Negativa	867	88.7
	CEASI	62	6.3
	LEIBG	21	2.1
	LEIAG	6	0.6
	Outros	20	2.0
	Ignorada	1	0.1
Colposcopia	Normal	816	83.5
	Alterada	147	15
	Não realizada	7	0.7
	Ignorada	7	0.7
Histologia*	Não realizada	837	85.7
	Normal	103	10.5
	LEIBG	26	2.7
	LEIAG	4	0.4
	Ignorada	9	0.7
DNA de HPV por Captura Híbrida II	Negativo	731	74.8
	Positivo	133	13.6
	Ignorado	113	11.6
DNA de HPV por PCR	Negativo	757	77.5
	Positivo	143	14.6
	Ignorado	77	7.9
DNA de HPV combinado (PCR/CH II)	Negativo	606	62
	Positivo	227	23.2
	Ignorado	144	14.7

* Abreviações: CEASI = células escamosas atípicas de significado indeterminado; LEIBG = Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau; LEIAG = Lesão escamosa intraepitelial de alto grau.

Nas tabelas a seguir, de 4 à 11, foi utilizado a regressão linear múltipla para identificar as variáveis socio-demográficas, de saúde reprodutiva e clínico-patológicas que apresentassem associação positiva, negativa, ou nenhuma com a resposta sorológica anti-HPV 16 e anti-HPV (MIX). Os coeficientes de regressão são apresentados de forma bruta e a seguir ajustados pela idade e DNA do HPV (teste PCR).

Com relação a reatividade sorológica anti-HPV 16, foi encontrada associação positiva com as variáveis idade (> 25 anos), escolaridade em nível secundário, número de parceiros sexuais ao longo da vida (quanto maior o número de parceiros maior a associação) e, todos os três tipos de DNA (PCR, CH II e PCR/CH II). Foi encontrada associação negativa com as variáveis estado civil (ou seja, ser casada era fator protetor para ser soro positiva) e início da primeira relação sexual acima dos 19 anos de idade.

Ao analisar os coeficientes de regressão e significância para a reatividade sorológica anti-HPV (MIX), observou-se que as variáveis com associação positiva foram também a idade (acima de 35 anos), a escolaridade em nível secundário, o número de parceiros sexuais ao longo da vida. No grupo dos DNAs, somente o DNA de HPV por PCR foi positivamente associado com a resposta sorológica ao HPV (MIX). As variáveis que se associaram reduzindo a resposta sorológica foram o tabagismo (ser fumante atual) e ter iniciado tardiamente a vida sexual (acima de 22 anos).

Tabela 4: Correlação bruta e ajustada* (pela infecção pelo HPV e idade) entre as diferentes variáveis sócio-demográficas e reatividade sorológica anti-HPV 16 nas mulheres da Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre (n=977).

Variável	Categorias	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por DNA de HPV** e idade	
		Coeficiente	valor de p***	Coeficiente	valor de p***
Idade (anos)	≤ 24	Referência		Referência	
	25-34	0,0518	0,079	0,0579	0,050
	35-49	0,0851	0,002	0,0939	0,001
	> 50	0,061	0,050	0,0685	0,028
Raça	Branca	Referência		Referência	
	Não Branca	0,0406	0,091	0,0394	0,100
Escolaridade	< Primário	Referência		Referência	
	Primário	- 0,0099	0,647	- 0,0068	0,753
	Secundário	0,0425	0,042	0,0439	0,039
	Profi/UNI	- 0,0217	0,514	- 0,0194	0,560
Renda	≤ 3salários mínimos	Referência		Referência	
	> 3 Salários mínimos	0,0109	0,530	0,0111	0,525
Tabagismo	Nunca fumou	Referência		Referência	
	Fumante atual	- 0,0075	0,691	- 0,0101	0,596
	Ex-fumante	0,0019	0,940	- 0,0030	0,904
Estado Civil	Solteira	Referência		Referência	
	Casada	- 0,05	0,054	-0,0716	0,009
	Divorciada	0,0208	0,577	-0,0081	0,835
	Viúva	- 0,04	0,357	-0,0698	0,136

* Resultados da análise de regressão linear usando reatividade sorológica como variável contínua (transformação logarítmica dos valores da formula RAN, vide metodologia)

** Resultados do teste PCR para DNA de HPV

*** Significância estatística para a comparação entre a categoria em questão e a de referência.

Tabela 5: Correlação bruta e ajustada* (pela infecção pelo HPV e idade) entre as diferentes variáveis de saúde reprodutiva e reatividade sorológica anti-HPV 16 nas mulheres da Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre (n=977).

Variável	Categorias	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por DNA de HPV** e idade	
		Coeficiente	valor de p***	Coeficiente	valor de p***
Paridade	Nulípara	Referência		Referência	
	1	0,0306	0,281	0,0217	0,456
	2	0,0035	0,896	- 0,0146	0,614
	3 ou +	0,059	0,022	0,0374	0,196
	Aborto	0,062	0,178	0,0630	0,173
Contracepção nos últimos 6 meses	Nenhuma	Referência		Referência	
	Anticoncepção oral	- 0,0389	0,054	- 0,0299	0,227
	Ligadura tubária	0,0164	0,492	0,0104	0,676
	Outros	0,0103	0,693	0,0045	0,870
CP alterado no Passado?	Não	Referência		Referência	
	Sim	-0,0077	0,718	- 0,0101	0,637
Nº de parceiros ao longo da vida	1	Referência		Referência	
	2	0,0971	< 0,001	0,0989	< 0,001
	3	0,0962	< 0,001	0,0954	< 0,001
	≥ 4	0,161	< 0,001	0,162	< 0,001

* Resultados da análise de regressão linear usando reatividade sorológica como variável contínua (transformação logarítmica dos valores da fórmula RAN, vide metodologia)

** Resultados do teste PCR para DNA de HPV

*** Significância estatística para a comparação entre a categoria em questão e a de referência.

Tabela 6: Correlação bruta e ajustada* (pela infecção pelo HPV e idade) entre as diferentes variáveis de saúde reprodutiva e reatividade sorológica anti-HPV 16 nas mulheres da Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre (n=977).

Variável	Categorias	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por DNA de HPV** e idade	
		Coeficiente	valor de p***	Coeficiente	valor de p***
Nº parceiros nos últimos 6 meses	0 ou 1	Referência		Referência	
	2 ou 3	0,0417	0,475	0,0473	0,416
Idade da primeira relação sexual (anos)	≤ 16	Referência		Referência	
	17-18	-0,0019	0,934	-0,0101	0,661
	19-21	-0,0374	0,109	-0,0564	0,017
	≥ 22	-0,0512	0,038	-0,0786	0,002
Infecção ginecológica nos últimos 6 meses	Não	Referência		Referência	
	HPV	0,0066	0,922	0,0156	0,817
	Outras	0,0640	0,100	0,0720	0,066

* Resultados da análise de regressão linear usando reatividade sorológica como variável contínua (transformação logarítmica dos valores da formula RAN, vide metodologia)

** Resultados do teste PCR para DNA de HPV

*** Significância estatística para a comparação entre a categoria em questão e a de referência.

Tabela 7: Correlação bruta e ajustada* (pela idade) entre as diferentes variáveis Clínico-Patológicas e reatividade sorológica anti-HPV16 nas mulheres da Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre (n=977).

Variável	Categorias	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por idade	
		Coeficiente	valor de p**	Coeficiente	Valor de p**
DNA de HPV por Captura Híbrida II	Negativo	Referência		Referência	
	Positivo	0,0393	0,106	0,0483	0,049
DNA de HPV por PCR	Negativo	Referência			
	Positivo	0,0500	0,035	0,0616	0,010
DNA de HPV Combinado (PCR e CH II)	Negativo	Referência		Referência	
	Positivo	0,0366	0,072	0,0470	0,022

* Resultados da análise de regressão linear usando reatividade sorológica como variável contínua (transformação logarítmica dos valores da formula RAN, vide metodologia)

** Significância estatística para a comparação entre a categoria em questão e a de referência.

Tabela 8: Correlação bruta e ajustada* (pela infecção pelo HPV e idade) entre as diferentes variáveis sócio-demográficas e reatividade sorológica anti-HPV (antígeno misto) nas mulheres da Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre (n=977).

Variável	Categorias	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por DNA de HPV** e idade	
		Coeficiente	valor de p***	Coeficiente	valor de p***
Idade (anos)	≤ 24	Referência		Referência	
	25-34	0,0318	0,117	0,0358	0,078
	35-49	0,0429	0,021	0,0487	0,009
	> 50	0,0472	0,027	0,0522	0,015
Raça	Branca	Referência		Referência	
	Não Branca	0,0301	0,066	0,0303	0,065
Escolaridade	Primário incompleto	Referência		Referência	
	Primário Completo	0,012	0,419	0,014	0,344
	Secundário	0,0268	0,061	0,0281	0,054
	Profí/UNI	0,0128	0,058	0,0141	0,537
Renda	≤ 3 Salários mínimos	Referência		Referência	
	> 3 Salários Mínimos	0,0068	0,565	0,0083	0,490
Tabagismo	Nunca fumou	Referência		Referência	
	Fumante atual	- 0,029	0,026	- 0,0308	0,019
	Ex-fumante	- 0,0052	0,756	- 0,0094	0,576
Estado Civil	Solteira	Referência		Referência	
	Casada	- 0,0316	0,076	- 0,0427	0,024
	Divorciada	0,0023	0,927	- 0,0135	0,615
	Viúva	- 0,0012	0,947	- 0,0245	0,446

* Resultados da análise de regressão linear usando reatividade sorológica como variável contínua (transformação logarítmica dos valores da formula RAN, vide metodologia)

** Resultados do teste PCR para DNA de HPV

*** Significância estatística para a comparação entre a categoria em questão e a de referência.

Tabela 9: Correlação bruta e ajustada* (pela infecção pelo HPV e idade) entre as diferentes variáveis de saúde reprodutiva e reatividade sorológica anti-HPV (antígeno misto) nas mulheres da Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre (n=977).

Variável	Categorias	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por DNA de HPV** e idade	
		Coeficiente	valor de p***	Coeficiente	valor de p***
Paridade	Nulípara	Referência		Referência	
	1	0,0141	0,468	0,0084	0,673
	2	- 0,0052	0,779	- 0,019	0,347
	3 ou +	0,0207	0,241	0,0041	0,834
	Aborto	0,0525	0,097	0,0524	0,098
Contracepção nos Últimos 6 meses	Nenhum	Referência		Referência	
	Anticoncepção oral	- 0,0217	0,118	- 0,0093	0,585
	Ligadura tubária	- 0,0036	0,825	- 0,0009	0,959
	Outros	0,0025	0,890	0,0062	0,745
CP alterado no Passado?	Não	Referência		Referência	
	Sim	- 0,0025	0,866	- 0,0030	0,836
Nº de parceiros Ao longo da vida	1	Referência		Referência	
	2	0,0840	< 0,0001	0,0839	< 0,001
	3	0,0663	< 0,0001	0,0665	< 0,001
	≥ 4	0,127	< 0,0001	0,128	< 0,001

* Resultados da análise de regressão linear usando reatividade sorológica como variável contínua (transformação logarítmica dos valores da fórmula RAN, vide metodologia)

** Resultados do teste PCR para DNA de HPV

*** Significância estatística para a comparação entre a categoria em questão e a de referência.

Tabela 10: Correlação bruta e ajustada* (pela infecção pelo HPV e idade) entre as diferentes variáveis de saúde reprodutiva e reatividade sorológica anti-HPV (antígeno misto) nas mulheres da Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre (n=977).

Variável	Categorias	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por DNA de HPV** e idade	
		Coeficiente	valor de p***	Coeficiente	valor de p***
Nº parceiros nos últimos 6 meses	0 ou 1	Referência		Referência	
	2 ou 3	0,0639	0,109	0,0679	0,088
Idade da primeira relação sexual (anos)	≤ 16	Referência		Referência	
	17-18	- 0,0117	0,460	- 0,0163	0,302
	19-21	- 0,02	0,211	- 0,0306	0,060
	≥ 22	- 0,0285	0,092	- 0,0445	0,011
Infecção ginecológica nos últimos 6 meses	Não	Referência		Referência	
	HPV	- 0,0394	0,075	- 0,0372	0,407
	Outras	0,0106	0,690	0,0141	0,600

* Resultados da análise de regressão linear usando reatividade sorológica como variável contínua (transformação logarítmica dos valores da formula RAN, vide metodologia)

** Resultados do teste PCR para DNA de HPV

*** Significância estatística para a comparação entre a categoria em questão e a de referência.

Tabela 11: Correlação bruta e ajustada* (pela idade) entre as diferentes variáveis Clínico-Patológicas e reatividade sorológica anti-HPV (antígeno misto) nas mulheres da Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre (n=977).

Variável	Categorias	Coeficiente de regressão e significância			
		Bruta		Ajustada por idade	
		Coeficiente	valor de p**	Coeficiente	Valor de p**
DNA de HPV por Captura Híbrida II	Negativo	Referência		Referência	
	Positivo	0,0065	0,699	0,0109	0,521
DNA de HPV por PCR	Negativo	Referência		Referência	
	Positivo	0,0351	0,031	0,0409	0,013
DNA de HPV Combinado (PCR e CH II)	Negativo	Referência		Referência	
	Positivo	0,0142	0,312	0,0195	0,169

* Resultados da análise de regressão linear usando reatividade sorológica como variável contínua (transformação logarítmica dos valores da formula RAN, vide metodologia)

** Significância estatística para a comparação entre a categoria em questão e a de referência.

A tabela 12 a seguir mostra que, independente do método de detecção do DNA do HPV, não houve diferença significativa para a reatividade sorológica média com antígeno de HPV 16 ou antígeno de HPV misto com relação ao resultado DNA do HPV negativo ou positivo. Isto implica em se concluir que o grupo de mulheres que apresentaram presença de DNA para o HPV em suas células do colo uterino não apresentaram reatividade sorológica anti-HPV mais elevada em ambos antígenos pesquisados (antígeno HPV 16 ou antígeno misto para HPV).

Tabela 12. Reatividade sorológica anti-HPV* segundo a positividade para DNA de HPV no colo uterino.

Método** de detecção de DNA do HPV	Resultado	Reatividade com antígeno de HPV 16		Reatividade com antígeno de HPV misto	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
PCR	Negativo	0,744	0,0203	0,703	0,0113
	Positivo	0,801	0,0462	0,741	0,0241
CH-II	Negativo	0,741	0,0204	0,704	0,0109
	Positivo	0,816	0,0451	0,737	0,0285
Combinado	Negativo	0,744	0,0220	0,703	0,0117
	Positivo	0,779	0,0345	0,725	0,0207

* Reatividade medida pela fórmula RAN (Razão de absorvâncias normalizada), vide metodologia.

** Métodos: PCR = "Polymerase Chain Reaction" (Reação de Polimerase em Cadeia); CH-II = Captura Híbrida segunda geração; Combinado = positividade na PCR ou na CH-II

As tabelas 13 a 18 utilizaram a resposta sorológica de forma binária, como negativa ou positiva como já foi explicado em material e métodos, fatores preditivos da resposta sorológica. Foram realizadas análises de correlação para selecionar as variáveis preditivas do risco de sororeatividade medindo-se a razão de chances (RC) (“odds ratio”) e intervalo de confiança a 95% (IC95%) para cada categoria de cada variável. As razões de chances foram ajustadas por idade e por idade e DNA do HPV para eliminar possíveis fatores de confundimento. Novamente a resposta sorológica foi avaliada para o antígeno HPV 16 e antígeno misto para o HPV.

No teste ELISA HPV-16 os dois grupos ELISA negativo e ELISA positivo foram comparados por regressão logística múltipla não condicional entre as variáveis sócio-econômicas, nenhuma categoria apresentou razão de chance (RC) estatisticamente significativo para sororeatividade. Entre as variáveis de saúde reprodutiva, conforme aumentava o número de parceiros na categoria avaliada aumentava o risco cumulativo para sororeatividade. O início da vida sexual mais tardiamente, após os 19 anos, foi um fator protetor para risco de soropositividade. As demais variáveis de saúde reprodutiva não estiveram significativamente associadas. Na análise das variáveis clínico-patológicas, a positividade para o DNA de HPV por PCR apresentou uma razão de chance de 1,54 para sororeatividade ao HPV 16.

No teste ELISA que utilizou o antígeno misto do HPV, dentre as variáveis sócio-econômicas, a categoria não branca da variável raça apresentou um risco para soropositividade de 1,59 comparada com a categoria branca. As outras variáveis sócio-econômicas não apresentaram risco para soropositividade.

Entre as variáveis de saúde reprodutiva (HPV antígeno misto), o aumento do número de parceiros sexuais ao longo da vida mostrou ser um fator de risco cumulativo importante para a soropositividade. A categoria aborto, dentro da variável paridade apresentou também um risco de 2,75 para que o soro fosse positivo nestas pacientes em relação à categoria de nulíparas. Não foi encontrada explicação para este achado pois o esperado era que o maior

número de filhos fosse risco para soropositividade, sendo que cada gestação aumenta o risco de aquisição ou reativação do HPV pela imunodeficiência que ocorre durante a gestação.

Na avaliação das variáveis clínico-patológicas na sorologia com o antígeno misto, nenhuma das variáveis de DNA (PCR, CH II e PCR/CH II) apresentou risco para a positividade na sorologia.

Tabela 13. Razões de chances e intervalos de confiança a 95% (IC95%) para positividade sorológica segundo variáveis sócio-econômicas. Análise baseada no teste ELISA que utilizou como antígeno o HPV 16.

Variável	Categoria	Frequência relativa (%) Positividade Sorológica	RC* ajustada por idade (IC95%)	RC ajustada por Idade e DNA do HPV (IC95%)
Idade (anos)	≤ 24	15,9	1,0	1,0
	25-34	20,7	1,38 (0,76 - 2,50)	1,45 (0,79 - 2,63)
	35-49	20,3	1,35 (0,77 - 2,34)	1,44 (0,82 - 2,52)
	≥ 50	16,0	1,01 (0,53 - 1,92)	1,07 (0,56 - 2,04)
Raça	Branca	18,3	1,0	1,0
	Não branca	23,1	1,33 (0,86 - 2,06)	1,32 (0,85 - 2,05)
Escolaridade	< Primário	18,0	1,0	1,0
	Primário	16,6	0,91 (0,59 - 1,41)	0,90 (0,58 - 1,39)
	Secundário	24,9	1,50 (1,02 - 2,22)	1,43 (0,97 - 2,13)
	Profissionalizante/ Universitário	15,9	0,87 (0,44 - 1,72)	0,83 (0,42 - 1,67)
Renda	≤ 3 salários mínimos	17,7	1,0	1,0
	> 3 salários mínimos	21,0	1,22 (0,87 - 1,71)	1,21 (0,86 - 1,69)
Tabagismo	Nunca fumou	18,6	1,0	1,0
	Fumante atual	20,1	1,07 (0,74 - 1,54)	1,04 (0,72 - 1,51)
	Ex-fumante	18,7	1,01 (0,62 - 1,63)	0,99 (0,61 - 1,61)
Estado civil	Solteira	22,8	1,0	1,0
	Casada	18,1	0,69 (0,42 - 1,14)	0,74 (0,44 - 1,23)
	Divorciada	25,3	1,08 (0,54 - 2,17)	1,15 (0,57 - 2,33)
	Viúva	15,7	0,67 (0,26 - 1,73)	0,68 (0,27 - 1,75)

* RC: razão de chance

Tabela 14. Razões de chance para reatividade sorológica segundo variáveis de saúde reprodutiva. Análise baseada no teste ELISA que utilizou como antígeno o HPV 16.

Variável	Categoria	Frequência relativa (%) Positividade Sorológica	RC* ajustado por idade (IC** - 95%)	RC *ajustado por Idade e DNA do HPV (IC ** - 95%)
Paridade	Nulípara	15,4	1,0	1,0
	1	20,8	1,38 (0,77 - 2,47)	1,48 (0,82 - 2,67)
	2	14,9	0,92 (0,50 - 1,68)	1,00 (0,54 - 1,84)
	3 ou +	22,1	1,52 (0,85 - 2,70)	1,66 (0,92 - 2,98)
	Aborto	27,5	2,02 (0,88 - 4,65)	2,21 (0,95 - 5,12)
Contraceção nos últimos 6 meses	Nenhuma	19,1	1,0	1,0
	Anticoncepção oral	16,7	0,72 (0,45 - 1,17)	0,71 (0,44 - 1,15)
	Ligadura tubária	20,0	0,94 (0,59 - 1,52)	0,97 (0,60 - 1,56)
	Outros	23,9	1,15 (0,69 - 1,90)	1,14 (0,69 - 1,90)
Papanicolaou alterado-passado	Não	19,5	1,0	1,0
	Sim	17,8	0,88 (0,58 - 1,34)	0,90 (0,59 - 1,37)
Nº de parceiros ao longo da vida	1	14,0	1,0	1,0
	2	23,9	1,97 (1,32 - 2,95)	1,94 (1,30 - 2,91)
	3	19,3	1,44 (0,85 - 2,45)	1,41 (0,83 - 2,39)
	≥ 4	33,6	3,09 (1,94 - 4,94)	2,99 (1,86 - 4,79)
Nº parceiros nos últimos 6 meses	0 ou 1	19,0	1,0	1,0
	2 ou 3	25,0	1,42 (0,51 - 3,98)	1,40 (0,50 - 3,92)
Idade da primeira relação Sexual	≤ 16	22,6	1,0	1,0
	17-18	23,4	1,02 (0,67 - 1,55)	1,01 (0,67 - 1,54)
	19-21	14,2	0,53 (0,33 - 0,86)	0,53 (0,33 - 0,86)
	≥ 22	15,3	0,58 (0,35 - 0,96)	0,58 (0,35 - 0,96)
Infecção ginecológica nos últimos 6 meses	Não	18,4	1,0	1,0
	HPV	26,7	1,68 (0,52 - 5,41)	1,48 (0,45 - 4,83)
	Outras	28,3	1,71 (0,87 - 3,36)	1,69 (0,86 - 3,33)

*Razão de Chances

** Intervalo de Confiança de 95%

Tabela 15. Razões de Chance para reatividade sorológica segundo variáveis Clínico-Patológicas .
Análise baseada no teste ELISA que utilizou como antígeno o HPV 16.

Variável	Categoria	Frequência relativa (%) Positividade Sorológica	RC* ajustado Por idade (IC** - 95%)
DNA de HPV por Captura Híbrida	Negativo	18,1	1,0
	Positivo	23,3	1,43 (0,91 - 2,23)
DNA de HPV por PCR	Negativo	18,1	1,0
	Positivo	24,5	1,54 (1,00 - 2,37)
DNA de HPV Combinado	Negativo	17,8	1,0
	Positivo	22,9	1,43 (0,98 - 2,08)

*Razão de Chance

** Intervalo de Confiança

Tabela 16. Razões de Chances para reatividade sorológica segundo variáveis sócio-econômicas .
Análise baseada no teste ELISA que utilizou como antígeno o HPV Misto.

Variável	Categoria	Frequência relativa (%) Positividade Sorológica	RC* ajustado por idade (IC** - 95%)	RC *ajustado por Idade e DNA do HPV (IC ** - 95%)
Idade (anos)	≤ 24	15,9	1,0	1,0
	25-34	14,7	0,91 (0,49 - 1,69)	0,92 (0,49 - 1,71)
	35-49	17,6	1,13 (0,64 - 1,97)	1,14 (0,65 - 2,01)
	≥ 50	16,6	1,04 (0,55 - 1,99)	1,06 (0,56 - 2,03)
Raça	Branca	15,4	1,0	1,0
	Não branca	22,4	1,58 (1,01 - 2,49)	1,59 (1,01 - 2,49)
Escolaridade	< Primário	15,2	1,0	1,0
	Primário	17,6	1,20 (0,77 - 1,87)	1,20 (0,77 - 1,87)
	Secundário	19,1	1,35 (0,89 - 2,06)	1,34 (0,87 - 2,05)
	Profissionalizante/ Universitário	14,5	0,97 (0,47 - 1,98)	0,96 (0,47 - 1,96)
Renda	≤ 3 salários mínimos	15,1	1,0	1,0
	> 3 salários mínimos	18,6	1,28 (0,89 - 1,83)	1,28 (0,89 - 1,82)
Tabagismo	Nunca fumou	17,7	1,0	1,0
	Fumante atual	14,8	0,82 (0,55 - 1,22)	0,81 (0,55 - 1,21)
	Ex-fumante	15,0	0,82 (0,49 - 1,37)	0,81 (0,48 - 1,56)
Estado civil	Solteira	21,1	1,0	1,0
	Casada	15,4	0,63 (0,37 - 1,06)	0,63 (0,37 - 1,07)
	Divorciada	20,5	0,85 (0,41 - 1,78)	0,84 (0,40 - 1,78)
	Viúva	15,7	0,61 (0,24 - 1,59)	0,61 (0,24 - 1,59)

*Razão de Chances

** Intervalo de Confiança de 95%

Tabela 17. Razões de Chance (RC) para reatividade sorológica segundo variáveis de saúde reprodutiva. Análise baseada no teste ELISA que utilizou como antígeno o HPV Misto.

Variável	Categoria	Frequência relativa (%) Positividade Sorológica	RC* ajustado por idade (IC** - 95%)	RC *ajustado por Idade e DNA do HPV (IC ** - 95%)
Paridade	Nulípara	12,6	1,0	1,0
	1	18,8	1,58 (0,84 - 2,95)	1,61 (0,86 - 3,03)
	2	13,7	1,07 (0,56 - 2,05)	1,11 (0,58 - 2,12)
	3 ou +	17,8	1,43 (0,77 - 2,68)	1,48 (0,79 - 2,78)
	Aborto	27,5	2,66 (1,13 - 6,28)	2,75 (1,16 - 6,52)
Contracepção nos últimos 6 meses	Nenhuma	17,0	1,0	1,0
	Anticoncepção oral	16,4	1,04 (0,63 - 1,73)	1,04 (0,63 - 1,73)
	Ligadura tubária	15,5	0,88 (0,53 - 1,48)	0,88 (0,53 - 1,48)
	Outros	17,4	1,05 (0,6 - 1,83)	1,04 (0,59 - 1,82)
Papanicolaou alterado-passado	Não	16,7	1,0	1,0
	Sim	16,7	0,99 (0,64 - 1,53)	0,99 (0,64 - 1,54)
Nº de parceiros ao longo da vida	1	10,3	1,0	1,0
	2	24,9	2,95 (1,93 - 4,5)	2,96 (1,94 - 4,52)
	3	16,7	1,82 (1,03 - 3,21)	1,83 (1,03 - 3,24)
	≥ 4	30,0	3,93 (2,39 - 6,48)	3,98 (2,41 - 6,59)
Nº parceiros nos últimos 6 meses	0 ou 1	16,5	1,0	1,0
	2 ou 3	20,0	1,29 (0,43 - 3,93)	1,28 (0,42 - 3,90)
Idade da primeira relação sexual	≤ 16	17,0	1,0	1,0
	17-18	18,6	1,10 (0,69 - 1,75)	1,10 (0,70 - 1,75)
	19-21	14,6	0,80 (0,49 - 1,32)	0,81 (0,49 - 1,33)
	≥ 22	15,8	0,86 (0,50 - 1,45)	0,86 (0,51 - 1,46)
Infecção ginecológica nos últimos 6 meses	Não	16,1	1,0	1,0
	HPV	25,0	1,81 (0,57 - 5,76)	1,74 (0,54 - 5,58)
	Outras	17,4	1,16 (0,53 - 2,58)	1,16 (0,53 - 2,57)

*Razão de Chance

** Intervalo de Confiança de 95%

Tabela 18. Razões de Chance (RC) para reatividade sorológica segundo variáveis Clínico-Patológicas . Análise baseada no teste ELISA que utilizou como antígeno o HPV Misto.

Variável	Categoria	Frequência relativa (%) Positividade Sorológica	RC* ajustado Por idade (IC** - 95%)
DNA de HPV por Captura Híbrida	Negativo	15,8	1,0
	Positivo	19,5	1,34 (0,83 - 2,16)
DNA de HPV por PCR	Negativo	16,5	1,0
	Positivo	17,5	1,11 (0,69 - 1,79)
DNA de HPV Combinado	Negativo	16,0	1,0
	Positivo	18,1	1,19 (0,79 - 1,78)

*Razão de Chance

** Intervalo de Confiança

Nesta tabela 19 foi utilizado o modelo de regressão logística para selecionar as variáveis mais independentemente preditivas do risco de sororeatividade em cada preparação antigênica via algoritmo de retenção de variáveis tipo “stepwise backwards”. Foram mantidos no modelo todos os fatores significativamente associados com sororeatividade ao nível de 10% ($p=0,1$) para entrada e 15% ($p=0,15$) para saída de variáveis.

Para o antígeno HPV 16 a variável paridade foi de risco para sororeatividade, quem teve filhos ou esteve grávida e abortou teve maior risco de soropositividade do que as mulheres que nunca pariram. O maior número de parceiros sexuais ao longo da vida foi considerado fator de risco para sororeatividade quando comparado com o grupo de mulheres que tiveram somente um parceiro ao longo da vida.

Quando analisado o HPV antígeno misto, foi observada a mesma relação entre sororeatividade e maior número de parceiros sexuais. Ainda para o antígeno misto, outra variável mais preditivas da reatividade sorológica anti-HPV foram a raça não branca com um risco de 1,60 sobre a raça branca . Dentro da variável tabagismo , as categorias fumante atual e ex-fumante apresentaram-se como fator de proteção para soropositividade comparadas com a categoria nunca fumou.

Tabela 19. Razões de chance das variáveis mais preditivas* da reatividade sorológica anti-HPV segundo o tipo de antígeno usado na reação ELISA.

Variável	Contraste	Razão de Chances e IC 95%	
		Antígeno HPV 16	Antígeno Misto
Raça	Não branca x branca		1,60 (1,00 - 2,55)
Tabagismo	Fumante atual x nunca fumou		0,63 (0,42 - 0,95)
	Ex-fumante x nunca fumou		0,67 (0,39 - 1,14)
Paridade	1 x nulípara	1,54 (0,86 - 2,77)	
	2 x nulípara	1,20 (0,66 - 2,16)	
	≥ 3 x nulípara	1,85 (1,07 - 3,17)	
	Aborto x nulípara	1,82 (0,77 - 4,25)	
N de parceiros ao longo da vida	2 x 1	1,94 (1,29 - 2,91)	3,01 (1,97 - 4,62)
	3 x 1	1,49 (0,87 - 2,53)	1,86 (1,05 - 3,30)
	≥ 4 x 1	3,07 (1,91 - 4,96)	4,13 (2,49 - 6,85)

* regressão logística multivariada para seleção de variáveis (técnica “stepwise backwards”; vide metodologia).

O nosso objetivo na tabela 20 abaixo foi o de avaliar as correlações epidemiológicas entre as respostas sorológicas para cada tipo de antígeno, definidas como variáveis dicotômicas, e presença de lesões cervicais. Para tal calculou-se as RCs e respectivos IC95% razão de chances (“odds ratios”) para cada combinação de antígeno (HPV 16 ou misto) e critério de definição de lesão (citológico ou histopatológico). Lesões foram definidas como sendo quaisquer diagnósticos de LEIBG e LEIAG. Casos com diagnósticos de CEASI ou de outras anormalidades foram excluídos das análises. O modelo de regressão logística incondicional foi utilizado no cálculo de RCs ajustados por idade e adicionalmente pela presença de DNA de HPV na amostra cervical (PCR).

Tabela 20. Razão de chances (RC) e intervalo de confiança (IC95%) para lesões intraepiteliais cervicais segundo resposta sorológica anti-HPV e tipo de critério para definir lesões.

Critério de definição de lesões *	Tipos de antígeno de HPV	RC ajustado por idade (IC95%)	RC ajustado por Idade e DNA do HPV (IC95%)
Citológico **	HPV 16	1,43 (0,59 - 3,45)	1,20 (0,48 - 2,97)
	HPV misto	0,39 (0,92 - 1,69)	0,36 (0,80 - 1,55)
Histológico ***	HPV 16	0,93 (0,34 - 2,58)	0,92 (0,33 - 2,58)
	HPV misto	1,29 (0,42 - 4,00)	1,27 (0,41 - 3,98)

*Citologia: Comparação entre lesões intraepiteliais de baixo ou alto grau e resultados citológicos normais (CEASI e outras categorias não incluídas). Histologia: Comparação entre lesões intraepiteliais de baixo ou alto grau confirmadas histologicamente e resultados negativos (somente entre as mulheres biopsiadas)

** 894 mulheres incluídas na análise, das quais 27 apresentaram lesões.

*** 133 mulheres incluídas na análise, das quais 30 apresentaram lesões.

Para ambos os tipos de antígenos (HPV 16 e misto) foi observado que a presença de lesões cervicais não foi fator de risco para soropositividade.

Discussão

Na avaliação da distribuição por frequência relativa da nossa população segundo as diversas variáveis estudadas, pudemos observar algumas características de uma população considerada de baixo risco para neoplasia cervical. Neste programa de rastreamento que é frequentado por mulheres assintomáticas na cidade de Porto Alegre, as mulheres que buscam livremente fazer a prevenção do câncer do colo uterino são na sua maioria mulheres não jovens, brancas, casadas, com 2 ou mais filhos. Estas mulheres não iniciaram sua vida sexual tão precocemente (maior parte entre 17 e 21 anos) e a maioria teve somente um parceiro sexual ao longo da vida. Ou seja, buscam programas de rastreamento mulheres de baixo risco para o desenvolvimento de infecção pelo HPV. Aonde estariam as mulheres de risco? Será que não estão no presente estudo ou estas se submetem menos ao rastreamento para este câncer? O Dr. Paulo Naud em sua tese de doutorado (Naud, 1998) estudou 111 mulheres num serviço de referência para DST do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e as características da população que ele estudou não foram muito diferentes desta apresentada. Talvez as características da nossa população as fazem ser uma população de baixo risco para este câncer.

Foi possível neste estudo alcançar todos os nossos objetivos propostos.

Pensamos que após o controle das flutuações do teste ELISA através da fórmula RAN, a definição da positividade sorológica utilizando-se um grupo controle negativo com baixo risco hipotético de infecção pelo HPV poderá contribuir com futuros estudos sorológicos aumentando a sensibilidade do teste. Este tipo de definição de positividade sorológica está sendo utilizado pela primeira vez. Em estudos anteriores, a média das três medidas (optical density) das amostras de soro corrigidas pelo soro controle haviam sido utilizadas na definição da soropositividade também utilizando um grupo controle negativo

com baixo risco para a infecção pelo HPV (Dillner et al, 1995; Wideroff et al, 1995; Nonnenmacher et al, 1996; Wideroff et al, 1996).

Ao analisar os fatores preditivos da resposta sorológica para ambos os tipos de antígenos (HPV 16 e misto) foi possível observar variáveis que indicam associação positiva com a resposta sorológica. O fato de não ser jovem (mais de 24 anos de idade), foi um fator preditivo positivamente associado com a sororeatividade enquanto que a presença do DNA viral não o foi. Mais uma vez podemos com estes resultados mostrar ser a sorologia um marco de infecção passada mais do que atual. A chance de sororeatividade vai aumentando com a idade pois maior é o contato com o HPV ao longo dos anos. A sororeatividade associada positivamente à um maior número de parceiros sexuais durante a vida confirmou o que vários estudos anteriores já haviam nos mostrado (Dillner et al, 1995; Wideroff et al, 1995; Nonnenmacher et al, 1996; Wideroff et al, 1996; Svare et al, 1997) e vêm também confirmar a sorologia positiva como marcador de infecção prévia ao HPV. Conseqüentemente, esperava-se que o início tardio da vida sexual fosse associado à uma redução da resposta sorológica como foi neste estudo.

Ser casada e com sororeatividade negativamente associada, havendo uma redução da resposta sorológica para ambos antígenos de HPV, vêm ainda mais nos confirmar que as mulheres que têm maior chance de serem soropositivas são aquelas com múltiplos parceiros e solteiras. As mulheres casadas na sua maioria apresentam um menor número de parceiros ao longo da vida. Poderia a sorologia ser então não somente um marcador de infecção passada pelo HPV como também um marco de atividade sexual de uma população? Parece que sim como já foi mostrado por Nonnenmacher et al, 1996, quando foi estudada uma população da Groenlândia de alto risco para câncer cervical, com alta prevalência de múltiplos parceiros sexuais e ausência de correlação com positividade ao DNA.

Quando foi observada a associação da sororeatividade com presença de DNA para o HPV na nossa população de baixo risco para o câncer cervical, a soropositividade esteve

positivamente associada com as variáveis estudadas de DNA para o HPV quando o antígeno foi o HPV 16; já para o antígeno HPV misto somente a variável DNA de HPV por PCR esteve positivamente associada com resposta sorológica positiva.

Os fatores mais associados com a soropositividade tanto ao HPV16 como na sorologia mista observados nesse estudo foram a presença de múltiplos parceiros sexuais durante a vida, possuir escolaridade de nível secundário em relação ao primário e nunca ter tido filhos. O número de parceiros sexuais é reconhecido como sendo o fator de risco mais importante para a aquisição da infecção pelo HPV e vem sendo demonstrado em outros estudos, como no estudo de Olsen *et al* , 1997, onde a sorologia teve uma forte associação com o número de parceiros sexuais; este mesmo autor fala da sorologia como sendo um melhor marcador da atividade sexual do que da presença do HPV DNA.

Na população do estudo a escolaridade (nível médio) foi fator associado à soropositividade ao HPV podendo ter sido um achado ocasional. Na literatura (Schairer et al, 1991; Bauer et al,1993) observan-se mulheres menos instruídas em risco maior para a infecção pelo HPV (supostamente não usuárias de condom pela falta de conhecimento de sua importância). O outro fator associado à soropositividade ao HPV no presente estudo foi a ausência de paridade. Geralmente as mulheres que ainda não tiveram filhos são as mais jovens, e as mulheres mais jovens são as de maior risco para a infecção pelo HPV. A paridade foi considerada associada a sorologia positiva independentemente da variável idade, também contradizendo a literatura (Hildesheim et al, 1993; Franco, 1995) o que nos sugere que o estado de imunodepressão da gestação aumentaria o risco da infecção pelo HPV provavelmente por reativação viral, e assim mulheres que pariram mais filhos estariam em maior risco para esta infecção. Uma hipótese que explicaria o fato de que multíparas venham a ter maior risco para o desenvolvimento de câncer cervical seria que seu sistema imunológico se torna mais deficitário e talvez com uma menor resposta humoral ao HPV, propiciando a cronicidade do vírus e das lesões. Em contrapartida as nulíparas teriam um sistema imunológico mais eficiente.

Em uma segunda fase, quando a resposta sorológica já de forma binária foi avaliada por regressão logística múltipla não condicional, novamente, para ambos os antígenos de HPV estudados, ter mais parceiros sexuais durante a vida apresentou um risco cumulativo maior do que as mulheres que tinham somente um parceiro. Para o antígeno HPV 16 iniciar a vida sexual após 19 anos de idade se mostrou como fator protetor para sororeatividade. A raça não branca foi fator de risco para sororeatividade quando foi utilizado o antígeno misto para o HPV no teste ELISA.

Confirmando os resultados já apresentados, quando realizamos a regressão logística multivariada para a identificação das variáveis mais preditivas da reatividade sorológica, novamente o número de parceiros sexuais ao longo da vida apareceu como uma das variáveis mais independentemente preditivas do risco de sororeatividade para ambos antígenos. Na sorologia que utilizou como antígeno o HPV 16, encontramos ainda a paridade como variável preditiva da reatividade sorológica, e na sorologia que utilizou o antígeno misto para o HPV, a raça não branca e as categorias fumante atual e ex-fumante foram preditivas da sororeatividade ao HPV. A raça não branca já foi referida por outros estudos como sendo de risco para a infecção pelo HPV e neoplasia cervical (Schairer et al, 1991). Não encontramos explicação para o fumo ser fator protetor para sororeatividade ao HPV. Se esperaria que o fumo surgisse como fator de risco para a sororeatividade pois o mesmo diminui a imunidade e favorece as infecções (Hildesheim et al, 1993).

Observou-se ainda, alcançando mais um dos objetivos do estudo, que não existe associação entre positividade sorológica e risco de lesões intraepiteliais cervicais.

A sorologia talvez fosse útil no rastreamento de populações de risco para o câncer cervical ou na medida do risco para o câncer de colo entre diferentes populações, pois populações de risco irão necessariamente apresentar uma maior soropositividade ao HPV (Nonnenmacher et al, 1995; Nonnenmacher et al, 1996; Strickler et al, 1999).

Grandes estudos prospectivos que estejam avaliando a sorologia como uma das variáveis, como o que vem sendo realizado no Nordeste do Brasil pela Dra. Luiza Villa do Ludwig Instituto de Pesquisa Contra o Câncer, talvez contribuam na elucidação dessas questões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Trans Dis*; 20:274-278, 1993.

Bosch FX, Manos MM, Munoz, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide prospective. *J Natl Cancer Inst*; 87:796-802, 1995.

Coutlé F, Mayrand MH, Provencher D, Franco E. The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. *Clinical and Diagnostic Virology* 8: 123-141, 1997.

Dillner L, Bekassy Z, Jonsson N *et al.* Detection of IgA antibodies against human papillomavirus in cervical secretions from patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Cancer*, v. 43, p. 36-40, 1994.

Dillner L, Wiklund F, Lenner P, et al. Antibodies against linear and conformational epitopes of human papillomavirus type 16 that independently associate with incident cervical cancer. *Int J Cancer*, Jan, 60:3, 377-82, 1995.

Franco, E.L. Viral etiology of cervical cancer: a critique of the evidence. *Rev. Infect. Dis.*, v.13, p.1195-1206, 1991.

Franco O, E.L. Human Papillomavirus and The Natural History of Cervical Cancer. *Infections in Medicine*, p. 57-64, 1993.

Franco, EL: Cancer causes revisited – human papillomavirus and the cervical neoplasia. J Natl Cancer Inst; 87:779-780, 1995.

Galloway D.: “Serological assays for the detection of HPV antibodies.” In “The Epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus”. Edited by Munoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A ed IARC Sci. Publ. No. 119, 147-161. Lyon 1992.

Galloway, D. Papillomavirus capsids : a new approach to identify serologic markers of HPV infection. J Natl Cancer Inst., v.86p. 474-475, 1994.

Hagensee M, and Galloway D. Growing human papillomavirus and virus-like particles in the laboratory. Papillomavirus Report., v.5, p.121-124, 1993.

Hagensee M, Yaegashi N, Galloway D. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. J Virol., 67:315-322, 1993.

Hildesheim A, Gravitt P, Schiffmann MH, et al. Determinants of Genital human papillomavirus infection in low-income women in Washington DC. Sex Trans Dis; 20:279:285, 1993.

IARC, International Agency for Research on Cancer Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 64. Lyon, 1995. Human papillomaviruses. United Kingdom, 1995. 409 p.

Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT: Papillomavirus L1 major capsid Protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. Proc Natl Acad Sci USA 89, 12180-12184, 1992.

Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, Lowy DR, Schiller JT: Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 plus L2 into virus-like-particles. *J Virol*; 67:6929-6936,1993.

Kirnbauer R,Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TB, Lowy DR and Schiller JT: A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus tipe 16. *J Natl Cancer Inst* ; 86:494-504, 1994.

Lorincz AT, Hybrid capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens. *Papillomavirus report*; 7:1-5, 1996.

Manos MM, Ting Y, Wright DK, et al. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Molecular Diagnostics of Human Cancer*, p. 209-214, 1989.

Nonnenmacher B, Hubbert NL, Kirnbauer R, et al. Serologic Response to Human Papillomavirus type 16 (HPV-16) Virus-Like Particles in HPV-16 DNA – Positive Invasive Cervical Cancer and Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade III Patients and Controls from Colombia and Spain. *J Infect Dis*;172:19-24, 1995.

Nonnenmacher B, Kjaer SK, Svare EI, et al. Seroreactivity to HPV16 virus-like particles as a marker for cervical cancer risk in high-risk populations. *Int J Cancer*; 68:704-709, 1996.

Olsen AO, Dillner J, Gjien K; Magnus P. Seropositivity against HPV 16 capsids: a better marker of past sexual behavior than presence of HPV DNA. *Genitourin Med*; 73:2,131-5, 1997.

Rose RC, Bonnez W, Reichman RC, Garcea RL. Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of virus-like particles. *J Virol*, 67:1936-19, 1993.

Schairer C, Brinton LA, Devesa SS, et al. Racial differences in the risk of invasive squamous-cell cervical cancer. *Cancer Causes and Control*, v.2, p.283-289, 1991.

Schiffman, M.H. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.84, n.6, p.394-398, 1992.

Schiffmann M, Bauer HM, Hoover RN, ET AL: Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*; 85:958-964, 1993.

Schiffman, M H: Latest HPV findings – some clinical implications. *Contemporary OB/GYN*. 27-37, 1993.

Svare EI, Kjaer SK, Nonnenmacher B, et al. Seroreactivity to human papillomavirus type 16 virus-like particles is lower in high-risk men than in high-risk women. *J Infect Dis*, 176:4, 876-83, 1997.

Strickler HD; Kirk GD; Figueroa JP; et al. HPV 16 antibody prevalence in Jamaica and the United States reflects differences in cervical cancer rates. *Int J Cancer*. Jan 29, 80:3, 339-44, 1999.

Tindle R.W. and Frazer I.H. Immune response to human papillomaviruses and the prospects for human papillomavirus-specific immunisation. In: zur Hausen H. Human Pathogenic Papillomaviruses. Berlin: Springer-Verlag, 217-253, 1994.

Wideroff L, Schiffman MH, Nonnenmacher B, et al. Evaluation of HPV16 virus-like particles seropositivity in a incident case-control study of cervical neoplasia. J Inf Dis 1995.

Wideroff L, Schiffman MH, Nonnenmacher B, et al. Epidemiologic determinants of seroreactivity to human papillomavirus (HPV) type 16 virus like-particles in cervical HPV-16 DNA-positive and negative women. J Infect Dis, 174:5, 937-43, 1996.

Zur Hausen H. Viruses in human cancer. Science, v. 254,p.1167-1173, 1991.

Zur Hausen H: Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. Curr Top Microbiol Immunol; 186:131-156, 1994.