

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**

**FREQÜÊNCIA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANOS
ONCOGÊNICOS TIPOS 16 E 18 E SUA ASSOCIAÇÃO COM
FATORES DE RISCO E LESÕES DO COLO UTERINO EM
UMA POPULAÇÃO DE MULHERES DE PORTO ALEGRE**

Dissertação de Mestrado

Marilda Tereza Mar da Rosa

Porto Alegre, 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**

**FREQÜÊNCIA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANOS ONCOGÊNICOS TIPOS 16 E 18
E SUA ASSOCIAÇÃO COM FATORES DE RISCO E LESÕES DO COLO UTERINO
EM UMA POPULAÇÃO DE MULHERES DE PORTO ALEGRE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre em Epidemiologia.

Orientador: Dra. Mary Clarisse Bozzetti

Porto Alegre
2005

Aos meus pais, pela vida que me proporcionou esta oportunidade.

Ao Carlos pelo apoio, paciência e compreensão nos momentos de minha ausência durante este período.

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma me ajudaram e contribuíram para esta dissertação de mestrado, em especial:

Ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia por esta oportunidade e aos professores deste PPG pelos ensinamentos.

Principalmente à Professora Doutora Mary Clarisse Bozzetti por ter confiado em mim, pelo indispensável apoio e ensinamento nas minhas dúvidas, por ter sido minha professora e me orientado nesta caminhada, pela dedicação, carinho e amizade.

Ao Carlos pelo amor, compreensão durante estes muitos anos que estamos juntos. Pela ajuda e participação nesta minha jornada.

Ao meu filho Ricardo pelo carinho e auxílio nas dificuldades que tive durante este trajeto.

À Cristine, principalmente por ter estado sempre comigo me ajudando e apoiando em todos os momentos, pela sua amizade e importante participação na realização da técnica de PCR.

À Regina pela sua dedicação e apoio e grande participação neste estudo também na realização da técnica de PCR

À equipe do Posto Jardim Leopoldina que participa neste projeto, pela oportunidade de realização do estudo o qual trará grande benefício no conhecimento do perfil da população do Bairro Jardim Leopoldina.

Ao CDCT/FEPPS pela realização das técnicas e apoio do pessoal que faz parte do projeto.

À direção do IPB/LACEN pela compreensão e apoio.

À Elizabeth pela amizade, ajuda nas dificuldades e padronização da técnica de PCR no CDCT.

Às mulheres participantes do estudo, pois sem elas este trabalho não seria possível.

Enfim a todas as pessoas que talvez eu possa ter esquecido de agradecer.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	7
Relação de Figuras	9
Lista de Tabelas do Artigo	10
Resumo	11
Introdução	13
Revisão Literatura	15
1. Formas de Transmissão e Epidemiologia do Papilomavírus Humano	16
2. Câncer Cervical	19
3. O Papilomavírus Humano (HPV)	21
3.1 Biologia Molecular do Vírus	21
3.2 Ciclo Fisiopatológico do Vírus.....	23
3.3 Manifestações Clínicas	26
3.4 Diagnóstico da Infecção pelo Papilomavírus Humano.....	27
3.4.1 Métodos Indiretos	27
3.4.1.1 Exame cito-patológico (Papanicolau)	27
3.4.1.2 Exame Colposcópico	28
3.4.1.3 Sorologia.....	29
3.4.2 Métodos Diretos	30
3.4.2.1 <i>Polimerase Chain Reaction</i> (PCR).....	30
3.4.2.2 Hibridização por <i>Southern Blotting</i>	31
3.4.2.3 Hibridização <i>In Situ</i> (HIS).....	33
3.4.2.4 Captura Híbrida	33
3.5 Os Papilomavírus Humanos tipos 16 e 18.....	35
Referências Bibliográficas	37

Artigo	47
Resumo	49
Abstract	50
Introdução	51
Material e Método	52
Resultados	57
Discussão	59
Referências Bibliográficas	63
Anexos	71
I. Objetivos do Estudo Mãe “Distribuição de Papilomavírus Humano Oncogênicos e sua Associação com lesões do colo uterino”	72
II. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-GHC	73
III. Ficha de Coleta de Dados – Questionário de Entrada no Estudo	74
IV. Termo de Consentimento Informado	79
V. Fluxograma de Seguimento das participantes do Estudo	83
VI. Trabalhos apresentados em congressos e artigo submetido para publicação, decorrentes do presente estudo	84
VII. Projeto de Pesquisa	85

Lista de Abreviaturas

HPV	Papilomavírus Humano
DST	Doença Sexualmente Transmissível
IARC	<i>Internatinal Agency for Research on Cancer</i>
SIL	<i>Squamous Intraepithelial Lesion</i> -lesão intraepitelial escamosa
HGSIL (LIEAG)	<i>High Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
NIC I-II-III	Neoplasia Intraepitelial Cervical (Graus I, II e III)
INCA.	Instituto Nacional do Câncer
pb	Pares de Bases
LCR	<i>Long Control Region</i> -região regulatória longa
ORF	<i>Open Reading Frame</i> -fase aberta de leitura
L1/L2	Proteínas Tardias que Compõem o Capsídeo Viral
E1-E7	Regiões Precoces do Genoma Viral
pRB	Proteína do Retinoblastoma
p53	Gene constitutivo do genoma humano protetor à indução do câncer
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
VLPs	<i>Virus Like Particles</i> - Partículas Virais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ASCUS	Atipia Escamosa de Significado Indeterminado
AGUS	Atipia Glandular de Significado Indeterminado
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
RNA	Ácido Ribonucleico
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
CMV	Citomegalovírus
LGSIL (LIEBG)	<i>Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau)
IPB	Instituto de Pesquisas Biológicas

LACEN	Laboratório Central
CDCT	Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
RC	Razão de Chances
OR	Odds Ratio-Razão de Chances
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
GHC	Grupo Hospitalar Conceição
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
TE	Tris Ácido Etileno Diamino Tetraacético
PBS	Tampão Fosfato Salino
HCL	Ácido Clorídrico
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetraacético
DNTPs	Deóxi Nucleosídeo Tri Fosfato
TBE	Tris Ácido Bórico e Ácido Etileno Diamino Tetraacético
HC	Hospital Conceição
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul
SES	Secretaria Estadual de Saúde
CAPES/PROF	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Relação de Figuras

1) Figuras da Dissertação

- Figura 1.1** – Distribuição mundial dos tipos de HPV em cânceres cervicais invasivos (GROSS & BARRASSO, 1999)..... 18
- Figura 1.2** – Representação esquemática do genoma do HPV. A posição dos genes precoces (E), tardios (L) e da região não traduzida (UTR) estão indicadas (HOWLEY, P.M, 1996)..... 22
- Figura 1.3** – Fase de proliferação de células infectadas por HPV e formação do papiloma (BOSCH, FX *et al.*, 1995)..... 25

2) Figuras do Artigo

- Figura 2.1** – Distribuição dos Achados Citológicos de Acordo com os Tipos de HPV's Observados 70

Lista de Tabelas do Artigo

Tabela 1 – Características da População Estudada.....	67
Tabela 2 – Distribuição das Variáveis Estudadas de Acordo com o Tipo de Papilomavírus Humano (HPV)	68
Tabela 3 – Razões de Chance Ajustadas e IC 95% da Associação Entre as Variáveis Estudadas e a Presença de HPV 16, 18 e Outros HPVs.....	69

RESUMO

O Câncer de colo uterino é um dos tumores mais freqüentes em mulheres brasileiras, assim como o câncer de mama. O desenvolvimento do câncer cervical e sua associação aos tipos oncogênicos de Papilomavírus Humanos (HPV) está bem documentada, sendo esta infecção um fator necessário para o desenvolvimento do câncer cervical.

Os tipos de HPV 16 e 18 são os mais freqüentemente relacionados a tumores invasivos, denominados, portanto de alto risco. Entretanto, outros fatores como atividade sexual precoce, número de parceiros sexuais, números elevados de gestações e partos, uso prolongado de contraceptivos orais, deficiência nutricional, tabagismo, baixo nível sócio econômico, baixa imunidade e outras doenças sexualmente transmissíveis (DST) são fatores contribuintes para o desenvolvimento dessa patologia.

Este estudo tem como objetivo conhecer a freqüência dos HPVs oncogênicos 16 e 18 na população de mulheres de uma área geográfica localizada na zona norte de Porto Alegre, bem como verificar as características associadas à presença deste vírus e sua relação com lesões do colo uterino.

Trata-se de um estudo transversal cujo desfecho é a positividade ao HPV, em especial HPV 16 e 18, em mulheres de uma área geográfica localizada na zona norte de Porto Alegre. Um total de 1004 amostras de material do colo do útero foi coletado para realização do exame citopatológico convencional e para a identificação do HPV-DNA através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Colposcopia e biópsia foram realizadas sempre que a citologia estivesse alterada e/ou a PCR para o HPV-DNA fosse positiva. A freqüência de HPV e sua distribuição por faixa etária são descritas, bem como a sua associação com as variáveis estudadas através das Razões de Chances (RC) estimadas por regressão logística múltipla.

Observou-se uma freqüência de HPV-DNA de 30,8% na população estudada. Destas 17,8% são mulheres positivas para o HPV 16 e 5,5% para o HPV 18. O fato de mulheres não terem um companheiro fixo (Razão de Chance (RC) =1,42; Intervalo de Confiança (IC) de 95%: 1,10-2,00) mostrou-se associado com a positividade para outros HPVs. O HPV 16

mostrou uma associação positiva com mulheres mais jovens (≤ 34 anos) (RC=2,48;IC95%:1,22-5,05). Quanto ao HPV 18, as mulheres fumantes mostraram uma associação positiva com o desfecho (RC=3,57; IC95%:1,26 –10,10).

Os resultados mostramram uma elevada frequência do HPV na população analisada, onde o mais freqüente foi o tipo oncogênico HPV 16, o que pode ser muito útil no planejamento da utilização de vacinas para o HPV. Os achados também sugerem uma associação positiva de infecção pelo HPV em mulheres sem companheiro fixo e mulheres jovens com a infecção pelo HPV 16 e mulheres fumantes com a infecção pelo HPV 18.

INTRODUÇÃO

O Câncer de colo de útero é um dos tumores mais frequentes em mulheres brasileiras, sendo ultrapassado apenas pelo câncer de pele não melanoma e pelo câncer de mama. Dados absolutos sobre a incidência e mortalidade por câncer do Instituto Nacional de Câncer (INCA), apontam que o câncer de colo de útero foi responsável pela morte de 3953 mulheres no Brasil em 2000. Para 2003, as estimativas sobre incidência e mortalidade por câncer prevêm 16.480 novos casos e 4.110 óbitos (1).

O desenvolvimento do câncer cervical e sua associação aos tipos oncogênicos de HPV está bem documentada, sendo esta infecção um fator necessário para o desenvolvimento do câncer cervical. As infecções genitais causadas pelo papilomavírus humano (HPV) são disseminadas e ocorrem em todo o mundo (2). Seu perfil epidemiológico é de uma doença relacionada à atividade sexual sendo a doença sexualmente transmissível (DST) viral mais freqüente na população sexualmente ativa (3).

O tipo mais comum de HPV associado com câncer cervical em todo mundo é o HPV 16, seguido pelo HPV 18 (4). O aumento da infecção pelo papilomavírus humano (HPV), simula aspectos de um curso epidêmico, e parece não estar sendo adequadamente controlado por medidas profiláticas. Alguns fatores como história anterior de verugas genitais, atividade sexual precoce, multiparidade, uso de anticoncepcionais orais e o tabagismo podem influenciar o risco de adquirir infecções por HPV (5).

Os papilomavírus pertencem à família Papillomaviridae e são classificados de acordo com seu potencial oncogênico, como de baixo risco (subtipos 6, 11, 42, 43 e 44) e de alto risco (subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68) (6).

Em geral, HPVs de baixo risco estão relacionados com tumores benignos e lesões cutâneas leves, enquanto que, HPVs de alto risco estão diretamente associados com neoplasias intraepiteliais que podem progredir para câncer de colo de útero e carcinomas anogenitais (7). O câncer de colo uterino é a segunda neoplasia maligna que mais acomete as mulheres sendo superado somente pelo câncer de mama. Atualmente nenhuma evidência

indica que os tratamentos disponíveis no momento erradicam ou afetam a história natural das infecções pelos papilomavírus e nenhum dos tratamentos é superior aos outros, ou seja, cada caso deverá ser avaliado tomando a conduta mais adequada (8).

A prevenção primária de câncer cervical pode ser atingida através da prevenção e do controle da infecção com o HPV genital. Estratégias de promoção da saúde orientam para uma mudança no comportamento sexual que pode ser efetivo na prevenção de infecção pelo HPV genital. De acordo com estudo de Franco *et al* 2001 ficou estabelecido que a infecção por HPV é o fator causal central para neoplasia cervical (5).

O Consenso da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) e da Organização Mundial de Saúde concluíram que existem justificativas suficientes para que testes para HPV fossem um adjunto do teste Papanicolau para o rastreamento do câncer cervical (5).

Cada vez é maior o interesse na detecção e tipificação na infecção pelo HPV associada ao diagnóstico precoce de lesões intraepiteliais do colo uterino, na perspectiva de uma atuação mais ampla ao nível da prevenção primária até ao desenvolvimento de vacinas específicas para evitar a infecção pelo HPV (9).

Na tentativa de conhecer a frequência de HPV's oncogênicos na população de mulheres de uma área geográfica localizada na zona norte de Porto Alegre e de verificar a associação destes vírus com fatores de risco e com lesões observadas no colo uterino planejou-se este estudo, esperando que os achados possam contribuir para um melhor entendimento da elevada morbidade e mortalidade do câncer de colo uterino em nosso meio, já que esta é uma neoplasia com elevado potencial de prevenção e de cura se detectado precocemente (5).

REVISÃO DE LITERATURA

1. Formas de Transmissão e Epidemiologia do HPV

A principal via de transmissão do Papilomavírus Humano (HPV) é a sexual tanto em homens como em mulheres, dependendo do tipo de HPV e das lesões clínicas associadas a ele, embora os HPVs possam ser transmitidos também por contato da pele, ou perinatal (2). No contato por um longo período com um parceiro não necessariamente ocorrerá transmissão, existindo uma alta prevalência de HPV cervical entre indivíduos que tenham tido dois ou três parceiros sexuais em um curto período de tempo (2).

As infecções clínicas mais comuns ocorrem na região genital e são facilmente transmitidas. Estas são representadas pelas verrugas genitais ou condilomas acuminados, popularmente conhecidos como “crista de galo”. Já as lesões subclínicas não apresentam qualquer sintomatologia, podendo progredir para o câncer do colo do útero caso não sejam identificadas e tratadas precocemente (10).

Segundo Franco *et al.*, o poder aquisitivo e o acesso aos serviços de saúde podem ser o determinante pelo qual as taxas de sobreviventes a esta doença diferem substancialmente entre mulheres brancas e negras nos Estados Unidos (5).

O status sócio-econômico e o nível educacional da população tendem a ter um efeito positivo no risco do câncer cervical através de alterações de alguns conhecidos fatores de risco tais como: idade ao se casar, partos e comportamento de busca dos cuidados com a saúde (5). Além da presença do HPV, outros fatores de risco epidemiológicos vêm sendo apontados na gênese desta neoplasia, tais como: história prévia de múltiplos parceiros sexuais, idade precoce de primeira relação sexual e raça (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,18).

Estudos têm comprovado que HPVs oncogênicos são um fator causal no desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais invasivas (19, 20). Infecções com HPV de alto risco estão associadas no desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas (SIL) e progridem para lesões de alto grau (HGSIL) (21). Em um estudo envolvendo uma população

de 7932 mulheres observamos que, 1214 isto é, 15% apresentaram infecção por HPV de alto risco ao primeiro exame (22).

Estudos realizados por Kjaer *et al.*, 2001 em mulheres com vida sexual ativa mostram que a infecção pelo HPV genital é geralmente decorrente da transmissão sexual (23). Outros estudos (24, 25) são consistentes com estes achados, sugerindo que o número de parceiros sexuais seria um dos fatores de risco mais importantes associados com a presença do HPV-DNA. Entretanto, a transmissão não sexual não pode ser totalmente descartada, pois estudos (26, 27), têm relatado transmissão perinatal de HPV da mãe para a criança, tem observado a presença de HPV-DNA no pênis de recém nascidos bem como na mucosa oral de crianças saudáveis em idade pré-escolar. Estudo recente com mulheres virgens (28), mostrou uma baixa ou nenhuma taxa de HPV DNA positivo nestas, sugerindo que a possibilidade de transmissão não sexual é baixa. Um estudo (23), mostrou que todas as mulheres que permaneceram virgens através do estudo continuaram sendo HPV DNA negativos, sustentando fortemente a idéia que o HPV é transmitido sexualmente.

O desenvolvimento do câncer cervical e sua associação aos tipos oncogênicos do HPV está bem documentada, sendo a infecção pelos tipos oncogênicos de HPV um dos maiores fatores (29, 30, 31, 32, 33). Alguns estudos sugerem que o HPV 16 e o HPV 18 estão associados com os tipos de carcinoma mais agressivos e são preferencialmente encontrados em adenocarcinomas (20, 22, 34, 35). Mais de 100 tipos diferentes de HPV já foram reconhecidos, sendo em torno de 35 tipos encontrados no trato genital, sabendo-se que mais ou menos 30 desses são transmitidos através de contato sexual e podem infectar os órgãos genitais, a pele do pênis, vulva, lábios, ânus ou tecidos que recobrem a vagina e o cérvix (20, 35, 37). Os HPVs 16 e 18 são mais frequentemente relacionados a tumores invasivos, denominados, portanto de alto risco. Além disso, estudos (21, 38) também sugerem que a infecção aguda pelos subtipos 16 e 18 de HPV possa levar a um risco adicional de desenvolvimento rápido para neoplasia intraepitelial cervical de alto grau.

Segundo Touzé *et al.* (4), pelo menos 50% de adultos com atividade sexual tiveram infecção genital por HPV. Estudos (39, 40, 41) indicam que infecções com tipos oncogênicos

de HPV são na maioria transitórias e somente uma pequena proporção daqueles infectados se tornam portadores e então desenvolvem Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC).

São aproximadamente 20 os tipos de HPV associados ao câncer cervical em todo mundo, porém o HPV 16 é o mais freqüentemente encontrado em carcinomas cervicais e NICs (2) (Figura 1.1).

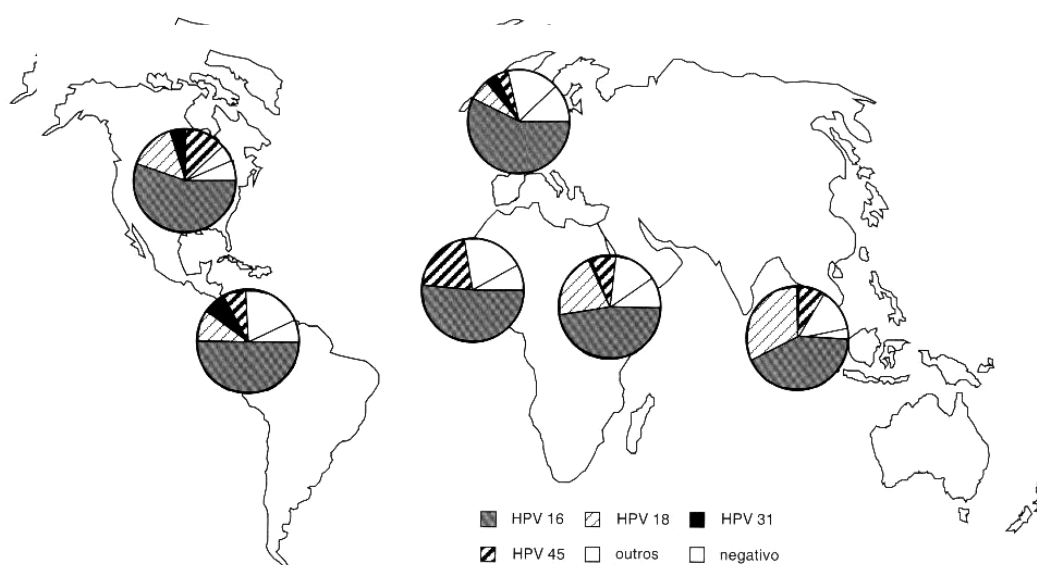


Figura 1-1 Distribuição mundial dos tipos de HPV em cânceres cervicais invasivos (GROSS & BARRASSO, 1999).

2. Câncer Cervical

O câncer é o resultado de um acúmulo de eventos que interferem nas funções essenciais da célula, processo este que pode durar longos períodos de tempo (19). Os HPVs são conhecidos como causadores de tumores, tanto benignos (verrugas cutâneas e mucosas, papilomas), quanto malignos, como os carcinomas cutâneos e os que afetam mucosas, principalmente na região anogenital e no trato aéreo-digestivo superior (42).

Observa-se, porém, que os tipos mais comumente associados aos tumores benignos são diversos daqueles encontrados nas lesões malignas (carcinomas). Dentre os carcinomas, o mais importante, sem dúvida, é o câncer cervical, pois é o que mais atinge mulheres em todo o mundo. Há uma estimativa de que 500.000 novos casos de câncer cervical invasivo são diagnosticados em todo mundo a cada ano, representando aproximadamente 10% de todos os cânceres em mulheres e que 50% das mulheres com diagnóstico da doença eventualmente morrem devido à mesma (2).

O câncer cervical atinge o sétimo lugar em morbidade entre a população total e o segundo entre mulheres, precedido apenas pelo câncer de mama. Em países desenvolvidos o câncer cervical foi a mais freqüente doença neoplásica entre mulheres até o começo dos anos 90, quando o câncer de mama se tornou predominante (5).

Algumas evidências mostram que a prevalência de HPV é mais alta em grupos de mulheres com idades mais jovens quando comparada com grupos de mulheres com idade mais avançada (43).

Estudo recente, publicado pela equipe da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da saúde descreve a distribuição da incidência do câncer de colo de útero por 100.000 mulheres, estimada pelo INCA para 2003 nos diferentes estados brasileiros. Observa-se que o Rio Grande do Sul está entre os estados com maior incidência (19,89/100.000). Os dados são ainda mais preocupantes quando se observa a tendência da mortalidade por este câncer nas diversas regiões do Brasil. Este estudo apresenta também esta tendência de acordo com a faixa etária. Observou-se que existe um nítido aumento do risco de mortalidade na

região Sul do país em todas as faixas etárias, sendo maior o incremento anual na faixa de 50 a 64 anos. A tendência do risco no Sudeste mostrou estabilização, diferindo da tendência na região Sul do país (44).

Vários são os fatores de risco identificados para o câncer do colo de útero. Entre eles observamos aspectos sociais, ambientais e hábitos de vida tais como, baixas condições sócio econômicas, atividade sexual antes dos 18 anos de idade, pluralidade de parceiros sexuais, hábito de fumar (diretamente relacionado à quantidade de cigarros fumados), poucos hábitos de higiene e o uso prolongado de contraceptivos orais são os principais (9, 1).

A progressão tumoral desde a infecção de células normais por HPV também parece estar sujeita a fatores ambientais, como carcinógenos químicos presentes no cigarro e em outros produtos do tabaco; ou restritos ao hospedeiro, tais como hormônios, resposta imune, herança genética, hábitos sexuais do parceiro entre outros. Portanto, papilomavírus humano de determinados tipos, deficiência imunológica e outros co-fatores, provavelmente participam de forma combinada no processo de múltiplas etapas que é a oncogênese do câncer do colo do útero (10).

3. O Papilomavírus Humano (HPV)

3.1. Biologia Molecular do Papilomavírus Humano

Considerando-se que os HPVs de alto risco podem causar instabilidade genética na célula hospedeira devido à integração no genoma celular, os acúmulos de mutações e aneuploidias, freqüentemente observadas em lesões neoplásicas de alto grau, também podem contribuir para que a proteína E6 atue sobre a ativação de telomerasas celulares, impedindo que as mesmas exerçam sua função no controle do envelhecimento e morte celulares, tornando imortais as células infectadas por estes HPVs (45).

A característica mais específica do HPV é que na maioria dos tumores benignos, o genoma viral é preservado como DNA epissomal (não integrado ao genoma hospedeiro).

O vírus tem aproximadamente 5,5nm de diâmetro, e possui um capsídeo de 72 capsômeros. O DNA viral dupla fita e circular, tem 8000 pares de bases (pb), e compreende três regiões, conhecidas como região precoce (*early region*), região tardia (*late region*) e região controladora *Long Control Region* (LCR) (46).

O genoma possui oito regiões conhecidas como ORFs (*Open Reading Frames*), uma série de proteínas precoces funcionais codificadas pelos genes *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*, na região precoce, e que estão envolvidas no controle da replicação e transcrição virais durante o estado epissomal, e duas proteínas tardias que compõem o capsídeo viral (*L1* e *L2*) (45). A *LCR*, que possui a origem de replicação, situa-se entre *L1* e *E6*, em uma região de 500 a 1000 pb, representando cerca de 10% do genoma viral total (47) (Figura 1.2).

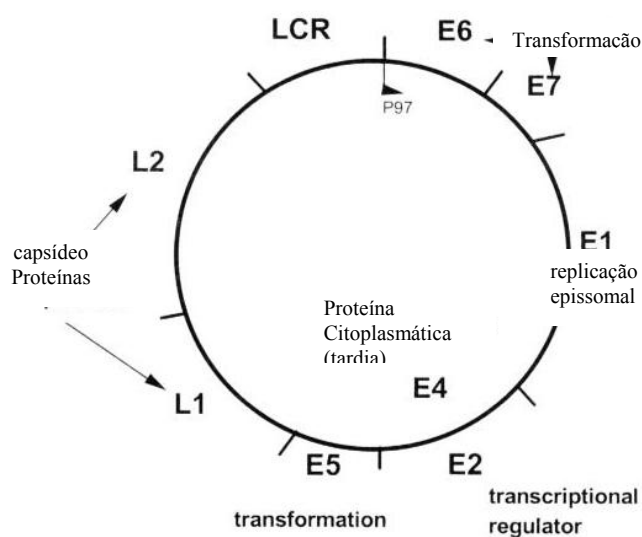


Figura 1-2 Representação esquemática do genoma do HPV. A posição dos genes precoces (E), tardios (L) e da região não traduzida (UTR) está indicada (HOWLEY, P.M, 1996).

As proteínas virais E6 e E7 exercem funções importantes na oncogenicidade, ou seja, na formação de tumores. Temos como exemplo, a oncoproteína E7 interagindo com pRB (proteína retinoblastoma), uma proteína celular, produto do gene do retinoblastoma, que realiza uma importante função na regulação negativa do ciclo celular. Quando o E7 interage com pRB, a célula progride para a próxima etapa do ciclo celular, pois ocorre a liberação do fator de transcrição E2F (da fase G1 do ciclo celular) que estava complexado a pRB, passando a estimular a expressão de uma série de genes envolvidos na proliferação celular (48). Este processo é adicionalmente perturbado pela proteína E6 dos HPVs de alto risco, por sua ligação à p53, que termina com sua degradação (49).

A eliminação deste controle de proliferação e reparo do DNA celular provoca o acúmulo de mutações nas células que expressam tais oncoproteínas, resultando em um fenótipo alterado. Acredita-se, portanto, que o potencial oncogênico destes vírus seja, em parte, devido a essas interações. Isso é comprovado porque as mesmas proteínas E6 e E7 de HPVs de baixo risco, não realizam estas interações (49).

3.2. Ciclo Fisiopatológico do HPV

Uma verruga ou tumoração benigna é a manifestação patológica da infecção por HPV. Essas manifestações às vezes progridem para uma condição maligna, portanto, o HPV é um bom modelo para o estudo da progressão de tumores (50).

A maior parte das evidências de que o HPV é um agente etiológico do câncer humano envolve a sua detecção em tumores. Outras evidências que sustentam a idéia da oncogenicidade do HPV provêm de experimentos moleculares e celulares que mostram as capacidades de transformação do vírus. Estudo sobre a transformação demonstrou que a inserção de um genoma completo de HPV-16 induzia transformação maligna em fibroblastos de roedores. Da mesma forma, a transfecção de DNA de HPV 16 ou 18 em células epiteliais humanas do colo uterino e em queratinócitos de prepúcio neonatal, conferia imortalização às células, mas não sendo assim com o DNA de HPV do tipo 6 de baixo risco. O evento da transformação parece ser específico da célula hospedeira, assim como dependente do tipo de HPV (48). Estudo mostra que as ORFs (*Open Reading Frames*) de E6 e E7 são necessárias para a transformação de células humanas, mas apenas quando provenientes de HPVs dos tipos 16 e 18; já E6 e E7 de HPVs dos tipos 6 e 11 foram pouco ou nada transformadores (45).

A proteína E6 dos HPVs tipos 16 e 18, mas não a dos HPVs tipos 6 ou 11, ligam-se ao produto do gene p53 supressor de tumores e promove a sua degeneração. Acredita-se que a degeneração da proteína p53 resulte no bloqueio das respostas celulares aos danos sofridos pelo DNA, permitindo assim a acumulação de alterações genéticas e a criação de um genótipo maligno (50). Essas características únicas de transformação do genoma de HPV foram definidas em maior profundidade em nível molecular. O genoma viral normalmente está integrado aos cromossomos de células hospedeiras nas linhagens celulares do carcinoma no colo uterino, mas nas lesões benignas esse genoma encontra-se na forma de episomas extracromossômicos. O local da integração viral comumente está na ORF de E2 ou próximo dela, a qual regula a manifestação de E6 e E7. Com perda da regulação, E6 e E7 podem fornecer às células um fenótipo maligno (45).

O HPV é um organismo exclusivamente intracelular que infecta as células mitoticamente ativas para se estabelecer no epitélio. Isto explica porque tanto carcinomas escamosos como glandulares se originam na junção escamocolunar e dentro da zona de transformação, pois nesse local há acesso imediato às células basais e parabasais do epitélio metaplásico.

Quando o vírus infecta uma célula pode ocorrer infecção latente, na qual o DNA exposto reside no núcleo, a replicação viral fica adjunta ao ciclo celular, e as células infectadas têm aparência normal. Essa infecção latente pode converter-se em infecção ativa por mecanismos ainda desconhecidos. Sabe-se, no entanto, que a imunodepressão fisiológica (gravidez) ou patológica (SIDA) pode levar à infecção, ou volta ao estágio inicial com a recuperação da imunidade. A infecção latente só pode ser detectada através de estudos moleculares (3).

No início de um estado replicativo, poucos vírus são encontrados nas células basais e parabasais, mas o número de partículas virais (VLPs) aumenta progressivamente quando o processo de maturação celular ocorre, até que, na superfície epitelial, o núcleo é substituído em grande parte pelas partículas do virion completo (20).

Após a exposição ao HPV, iniciam-se os eventos do ciclo viral, com a atividade específica coordenado por fatores que regulam a resposta imune do hospedeiro.

Existem vários estágios diferentes de interação célula-vírus. O primeiro é a fase de incubação, que dura de duas semanas a oito meses (média de três meses). Esse é o período no qual se estabelece a infecção epissômica, com a interação célula-vírus, sendo regulada por fatores como tabagismo, deficiência do sistema imune ou predisposição genética. O vírus, inicialmente age como um plasmídeo extracromossômico auto-replicante – *episoma*. Estes, a cada divisão mitótica da célula hospedeira, também serão replicados (34).

A infecção epissômica pode ocorrer com a inoculação em locais de microtraumas, permitindo que os virions penetrem a camada basal e descartem o seu capsídeo protéico externo. Já a infecção viral pode permanecer sem manifestação ativa da doença nas células

basais provavelmente na maior parte das pessoas expostas ao HPV. A doença ativamente revelada resultará numa expressão morfológica em células escamosas diferenciadas. Quando isto ocorre, há uma fase de proliferação ativa que dura de três a seis meses. Durante esta fase, a estimulação das células hospedeiras leva à alteração pronunciada no crescimento da camada basal, replicação viral nas camadas médias e efeitos citopáticos virais nas células superficiais (20) (Figura 1.3).

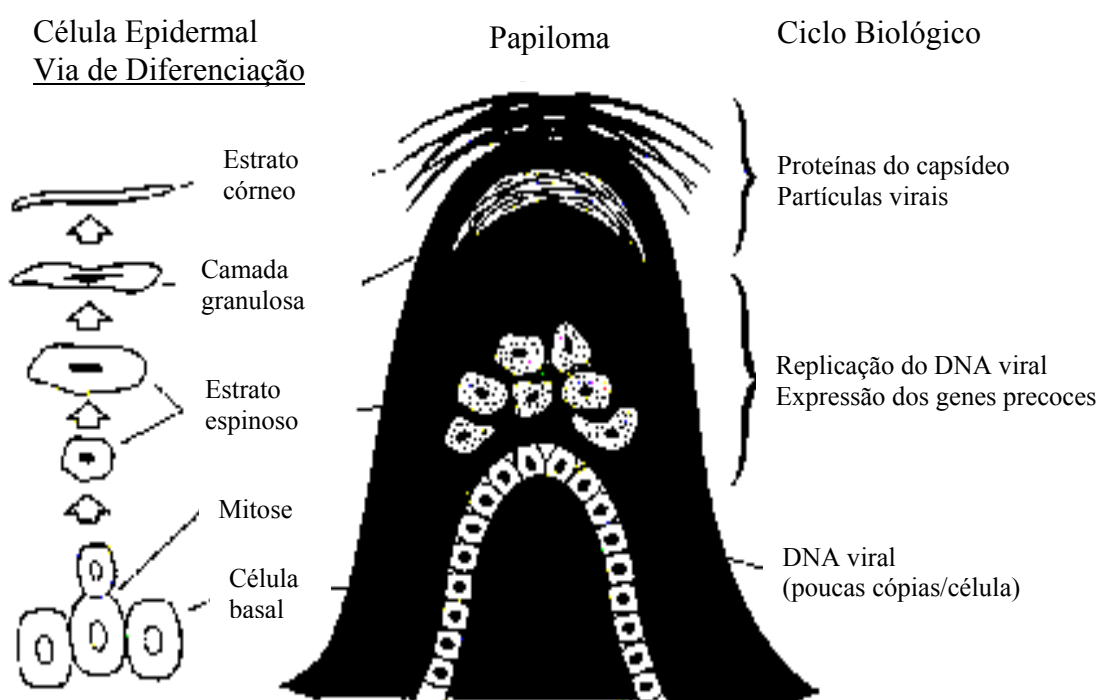


Figura 1-3 Fase de proliferação de células infectadas por HPV e formação do papiloma (BOSCH FX, *et al.*, 1995).

Estas alterações podem se manifestar como doença óbvia ou campos subclínicos de acetobranqueamento que contém graus variados de neoplasia ou formação de papilomas macroscopicamente aparentes. A expressão ativa ao longo prazo da doença (como por exemplo, condilomas ou neoplasia) após a exposição ao HPV é a exceção, e não é tido como regra (51).

Após a resposta imune à infecção por HPV, inicia-se a fase tardia, com duração de três a seis meses; nesta fase, pelo menos 80% das mulheres infectadas permanecerão em estado de remissão clínica, mas poderão apresentar infecção persistente ou latente por HPV. A maioria das lesões tende a regredir espontaneamente pela resposta do sistema imunológico do

hospedeiro, porém, não é possível prever nos casos de infecção por vírus de alto risco, para qual estado a infecção progredirá (48).

]

3.3. Manifestações Clínicas

Em princípio, as infecções por HPV podem ser classificadas como subclínica, clínica e latente. Na forma subclínica, a infecção no colo uterino e nos genitais masculinos é a mais freqüente; esta infecção pode estar associada à neoplasia intraepitelial e é diagnosticada com o uso do colposcópico após aplicação de ácido acético a 5%.

Já na forma clínica, percebe-se espontaneamente as lesões, sendo o condiloma acuminado a manifestação clínica mais comum associada ao HPV. Os condilomas acuminados (papilomas, verrugas) dos órgãos genitais externos em geral são pequenas neofomações sésseis, papilares, múltiplas, cobertas por epitélio queratinoso e raramente atingem o colo uterino, estas lesões podem ser únicas ou múltiplas, localizadas ou difusas e de tamanho variável. No homem, em geral ocorrem lesões na glande, no sulco bálano-prepucial e na região perianal. Na mulher as regiões onde estas lesões podem ser observadas envolvendo a vulva, o períneo, a região perianal, a vagina e o colo uterino.

Na forma latente é feito o diagnóstico através da hibridização do DNA em indivíduos aparentemente sem alterações clínicas e/ou colposcópicas; portanto, esta forma refere-se aos casos onde, na ausência de evidências clínicas, colposcópicas, citológicas e histológicas de lesão, são identificadas seqüências de DNA de HPV com técnicas de hibridização molecular (52, 53).

3.4. Diagnóstico da Infecção pelo HPV

Através da utilização de técnicas moleculares (PCR e captura híbrida II) HPVs de alto risco têm sido encontrados em proporções elevadas em mulheres com câncer invasivo e lesões pré-invasivas de alto grau (54). Por outro lado, a prevalência é baixa em mulheres citologicamente normais, exceto em mulheres jovens, que parecem ter uma alta incidência de infecções transitórias nos anos subseqüentes ao início da atividade sexual. Alguns estudos (55, 56, 57) demonstram o importante papel na presença e persistência de tipos de HPV de alto risco na progressão de lesões pré-invasivas de baixo grau versus lesões de alto grau ao invés de regressão espontânea. Por essas razões, a tipagem do HPV tem sido sugerida como uma possível ferramenta de triagem primária (58).

Existem muitos métodos para detectar a infecção por HPV. Estes podem ser classificados em **indiretos** (citologia e histologia, colposcopia, e sorologia) e **diretos** (microscopia eletrônica, detecção do DNA) (2).

3.4.1. Métodos Indiretos

3.4.1.1. Exame Cito-patológico (Papanicolau)

Considerado um exame trabalhoso e complexo, este depende exclusivamente de um profissional treinado e cuidadoso. O encontro de alterações citológicas, mesmo que pequenas, deve ser atentamente valorizado pelo clínico. Porém, em alguns casos, não há descrição de um quadro citológico definido; estes casos, geralmente, são enquadrados como atipia escamosa de significado indeterminado (ASCUS) ou atipia glandular de significado indeterminado (AGUS). Estatísticas mundiais mostram que em média 10% das pacientes com alterações citológicas indeterminadas irão desenvolver lesões intra-epiteliais de alto grau. Assim, é importante que estas pacientes sejam encaminhadas ao acompanhamento médico (clínico e colposcópico), com biópsia e possível curetagem do canal endocervical (56).

As células infectadas pelo HPV exibem alterações variadas, vistas em esfregaços e biópsias e são denominadas de coilócitos (células com região perinuclear límpida e citoplasma denso que foram descritas primeiramente por Papanicolaou em 1933) (2). Além dessas alterações, as mudanças podem ser observadas na forma, no tamanho celular e na distribuição da cromatina nuclear (2).

Os coilócitos estão presentes nas infecções por HPV onde as partículas virais se encontram em processo de agrupamento, e normalmente são encontradas em lesões clinicamente aparentes. A imunohistoquímica pode detectar o revestimento protéico das partículas virais que se encontram nessas lesões. Ao contrário, as displasias de alto grau e os carcinomas invasivos carecem de coilócitos, o DNA de HPV pode estar presente nessas lesões, mas a atividade de transcriptase talvez não resulte na produção de vírions, que são detectáveis através de microscopia ou de imunohistoquímica (2).

3.4.1.2. Exame Colposcópico

A colposcopia é um método de grande ajuda e de ampla aceitação mundial para o diagnóstico de pacientes com citologia anormal. A sua prática requer um treinamento adequado e uma análise constante de sua qualidade. É uma técnica que utiliza um microscópio de baixo poder, com o qual a cérvix pode ser visualizada com um melhor aumento. A aplicação deste método se desenvolveu de maneira lenta e durante muitos anos, a colposcopia e a citologia esfoliativa se consideraram competitivas no diagnóstico da displasia cervical. Somente em algumas décadas, observou-se a importância do conjunto destas duas técnicas, pois a citologia e a colposcopia são métodos complementares para o estudo das NICs (60).

Uma das muitas vantagens da colposcopia é diminuir o uso das conizações da cérvix. Porém, é importante ressaltar que entre 15% e 20% das citologias anormais, a colposcopia não é suficientemente capaz de estabelecer um diagnóstico preciso e, portanto, necessita ser associada à citologia (60).

3.4.1.3. Sorologia

As dificuldades enfrentadas com a sorologia para HPV no passado associavam-se a reações cruzadas entre HPV e a diversidade de lesões, pois a expressão do HPV na camada superficial do epitélio apresentava poucas células imuno competentes para antígenos virais ocasionando uma fraca resposta sorológica. Distintos esforços feitos em décadas anteriores tentaram desenvolver ensaios sorológicos mais específicos e sensíveis, usando proteínas fusionadas e peptídeos sintéticos, porém não apresentaram resultados eficazes devido a sua escassez de sensibilidade e especificidade. Somente nos últimos anos e, principalmente devido ao advento do *virus-like particles* (VLPs), que ensaios sensíveis e específicos tornaram-se disponíveis (61).

Pode-se dizer que o diagnóstico da infecção pelo HPV através de testes sorológicos tem tido avanços significativos nestes últimos anos, mas ainda encontra-se dificuldade na compreensão da resposta humoral ao HPV (62). Mesmo assim 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 de colo uterino (13, 63, 64).

Estudo (65) mostra que a baixa sensibilidade de VLP-ELISA para HPV-16 pode limitar a utilidade do ELISA como um teste diagnóstico para infecção do HPV-16. Entretanto parece ter especificidade adequada e deveria ser útil como um marcador epidemiológico da infecção por HPV-16 e comportamento sexual. Por isso avaliações da soroprevalência para HPV em populações com diferentes riscos de infecções por HPV e doenças associadas ao HPV, serão importantes para fortalecer a utilidade de ensaios VLPs/ELISA em maiores estudos clínicos e epidemiológicos (65).

A avaliação da resposta imune humoral ao HPV pode ser muito útil na monitorização de soro conversão em programas experimentais envolvendo o desenvolvimento de vacinas contra o HPV, na tentativa de prevenir o câncer do colo uterino e outras neoplasias relacionadas ao HPV (66).

3.4.2. Métodos Diretos

Os avanços na biologia molecular, nos últimos 20 anos, têm ampliado muito o conhecimento sobre a infecção por HIV e a carcinogênese viral. O domínio das técnicas biológicas moleculares usadas na detecção do HPV é necessário para qualquer discussão sobre as malignidades associadas ao HPV, já que cada técnica apresenta características únicas com impacto significativo na sensibilidade e especificidade da mesma. As diferenças de sensibilidade/especificidade, assim como as contaminações entre as várias metodologias de detecção, têm por vezes, dificultado a determinação da associação entre o HPV e os tipos de câncer humano.

O método ideal de detecção do HPV deve estar baseado na presença de DNA-HVP já que o vírus não precisa estar intacto para induzir doença. A utilidade clínica desses métodos ainda precisa ser determinada, mas seu uso em pesquisas básicas é crucial (67).

3.4.2.1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A reação em cadeia da polimerase (PCR), foi desenvolvida em 1985 e desde então vem causando um profundo impacto na biologia molecular, permitindo aos pesquisadores maior facilidade na busca de DNA de HPV. A PCR é uma reação enzimática que resulta na amplificação de material genético “*in vitro*” (68).

A reação consiste de uma etapa de aquecimento em temperaturas elevadas, que provoca a desnaturação do DNA, seguida de resfriamento que leva ao pareamento específico de dois segmentos pequenos de DNA (*primers*) ao gene de interesse permitindo que uma enzima (a DNA polimerase) sintetize novos fragmentos de DNA. Quantidades muito pequenas de DNA podem ser amplificadas de forma altamente sensível e específica através de incubação na presença de uma série de reagentes que serão submetidos a diferentes temperaturas, de forma repetitiva, até se obter o produto final amplificado.

Ao final de 25 a 40 ciclos repetidos, são gerados bilhões de cópias do material genético em estudo. Este é um processo extremamente rápido, eficiente, e atualmente automatizado, podendo fornecer resultados em algumas horas. A visualização do material amplificado é feita por eletroforese em gel de agarose e a comparação com controles adequados e marcadores de tamanho permite sua identificação precisa (69).

Para uma identificação específica do HPV foram necessários diferentes estudos descrevendo uma variedade de *primers* e procedimentos de PCR, cada um desses variando em sensibilidade e especificidade (51). Essa estratégia é também utilizada para a confirmação de resultados de ampliações com *primers consensus* ou genéricos em uma segunda amplificação por PCR. A amplificação com *primers consensus* permite detectar um amplo espectro de genótipos de HPV, bem como identificar novos tipos virais (2). Diferentes conjuntos de *primers consensus* foram desenhados e construídos para este propósito; entre eles: MY09/MY11, OBI/II, CPI/CPII e GP5+/6+ (69). Os *primers* MY09/MY11 e GP5+/6+ amplificam fragmentos de DNA correspondentes à seqüência da ORF de L1 do genoma do HPV, conservada entre os diferentes genótipos (51), sendo que os produtos de amplificação obtidos com os *primers* MY09/MY11, são correspondentes a fragmentos de 450 pb (59, 69, 70, 71, 72).

Atualmente, a detecção molecular do HPV é principalmente utilizada em pesquisa de laboratório e não faz parte do processo de decisão clínico. Entretanto, à medida que os resultados se tornem mais aceitos, as técnicas moleculares serão de grande importância no diagnóstico e tratamento de doenças relacionadas com o HPV.

3.4.2.2. Hibridização por Southern Blotting

A hibridização por Southern Blotting é uma técnica baseada na detecção de pequenos segmentos de DNA ou RNA a partir de "sondas" específicas. (Sondas são seqüências de nucleotídeos complementares desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos do DNA ou RNA à seqüência que se deseja identificar). Com esta técnica é possível identificar DNA de HPV nas células. Para permitir a visualização da reação entre moléculas de DNA ou RNA em

estudo e as sondas, estas podem ser associadas a moléculas radioativas, fluorescentes ou biotiniladas (73).

Várias técnicas baseadas nas propriedades de hibridação dos ácidos nucléicos foram desenvolvidas visando a triagem e isolamento de seqüências específicas do DNA e RNA. A maioria destas técnicas trabalha com uma seqüência de nucleotídeos complementares ao DNA de interesse imobilizado num suporte sólido tal como uma membrana de náilon ou de nitrocelulose. Um destes métodos, desenvolvido na década de 70 por EM.Southern tornou-se conhecida como **Southern blotting** (73, 74).

Nesta técnica, o DNA de HPV após ter sido digerido com uma ou mais enzimas de restrição e os fragmentos resultantes separados por eletroforese em um gel de agarose. Os fragmentos de DNA dupla fita são visualizados por coloração com brometo de etídio, desnaturados *in situ* com hidróxido de sódio e transferidos para uma membrana de nitrocelulose ou de náilon, com o auxílio de uma solução de alta concentração salina (51). Tais condições permitem que o DNA seja retido no suporte sólido, no ponto de contato entre o gel e a membrana, criando, portanto, uma réplica do gel. O DNA é covalentemente ligado à membrana usando-se calor ou luz ultravioleta. Sondas de ácidos nucléicos (DNA ou RNA marcados radioativamente) são para hibridar com o DNA fixado na membrana e a posição na qual a ligação específica ocorre pode ser detectada por auto-radiografia da membrana. O padrão de hibridação pode ser comparado diretamente com a região no gel original que contém a seqüência de DNA de interesse (51).

A detecção molecular inicial de DNA de HPV foi efetuada através do uso de técnicas de hibridização de ácido nucléico. Esse foi o método original de primeira escolha para a detecção do DNA do HPV, sendo considerado o *padrão ouro*, devido o seu elevado grau de especificidade e sensibilidade. Esse método permite uma diferenciação precisa dos diferentes tipos de HPV (2).

3.4.2.3. Hibridização *in situ* (HIS)

A hibridização *in situ* é uma técnica mais sensível que a imuno-histoquímica, porém inferior à reação em cadeia da polimerase (PCR). A HIS é utilizada principalmente para a detecção de vírus (ex. diversos tipos de HPV, vírus de Epstein-Barr, vírus da hepatite B e de outros agentes infecciosos em tecidos suspeitos de infecção, além de cromossomos e produtos da síntese celular). Pode ser realizada em material fixado em formol e incluído em parafina, bem como congelado ou preparados citológicos (75).

3.4.2.4. Captura Híbrida

A Captura Híbrida é um teste sensível capaz de detectar diversos agentes infecciosos, como o papilomavírus humano - HPV, o vírus da hepatite B, Citomegalovírus (CMV), *Herpes simplex* vírus, *Chlamydia trachomatis*, HIV e *Neisseria gonorrhoea* (gonorréia). O teste de captura híbrida II detecta os 18 tipos mais comuns de vírus do HPV que infectam o trato anogenital, determinando com exatidão a presença ou não de DNA de vírus dos grupos de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44) e de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68). A Captura Híbrida é um sofisticado teste de hibridização molecular, com amplificação do sinal dos híbridos formados, que são detectados através de reação enzima-substrato e leitura por quimioluminescência (76).

Estudos demonstram (77, 78) que a sensibilidade do exame de captura híbrida II (1,0 pg/ml DNA-HPV ou 0,1 cópias/célula) é muito superior à apresentada pela hibridização molecular *in situ* (300 cópias/célula) e é similar àquela de outros testes mais demorados, que utilizam radioisótopos ou que manipulam o DNA, como a PCR além de ser superior ao seu antecessor, a captura híbrida I.

Em estudo (79) que avaliou o custo efetividade da utilização da captura híbrida II em mulheres com 30 anos ou mais e observou que este teste combinado com a citologia em screening primário ou a utilização do mesmo em resultados citológicos duvidosos parece diminuir de forma importante o câncer cervical e é mais barato que a utilização de citologia convencional anual como método isolado. Em 2002, o teste de captura Híbrida II passou a ser considerado pelo FDA (*Food and Drug Administration*), nos Estados Unidos, um teste de triagem para o câncer cervical juntamente com a citologia. Em países como Brasil, este ainda é considerado um teste muito caro para ser adicionado aos programas de rastreamento populacional, porém vem sendo cada vez mais utilizado em serviços privados e em populações consideradas de alto risco para este câncer (79).

O exame é realizado a partir de material coletado da área suspeita de infecção utilizando-se *kit* apropriado, fornecido pelo laboratório. O *kit* é composto de um escova e um tubo plástico contendo uma solução ácida que digere qualquer outra estrutura (células, proteínas, gorduras etc.) que não seja DNA ou RNA e fragmenta a molécula de DNA em curtas seqüências de bases nitrogenadas para facilitar a hibridização.

Este teste compreende diversas etapas: a) desnaturação do material para análise, liberando ambas as fitas do DNA; b) reação com sonda de RNA específica para o agente infeccioso pesquisado, formando híbridos RNA/DNA; c) captura desses híbridos por anticorpos monoclonais, com formação de complexos imobilizados na parede do tubo (microplaca) utilizado para o exame; d) adição de anticorpo anticomplexo anticorpo-RNA-DNA conjugado à enzima fosfatase alcalina; e) detecção por quimioluminescência ultrasensível (76).

Esse avanço tecnológico possibilitou desenvolver um teste de fácil realização, podendo o resultado ser conhecido em curto tempo e baixo custo (77).

3.5. Os Papilomavírus Humanos tipos 16 e 18

Aproximadamente 80% de indivíduos sexualmente ativos adquirem o HPV em algum tempo de sua vida. A detecção clínica e laboratorial deste vírus consiste de microscopia, sorologia e técnicas moleculares. Entretanto é difícil determinar onde e quando o vírus foi adquirido. Um recente estudo (80) indica que 90% de mulheres jovens são infectadas com subtipos de HPV não oncogênicos e 70% das que são infectadas com subtipos oncogênicos eliminarão o vírus. Os HPVs 16 e 18 estão associados com neoplasias intraepiteliais cervicais, neoplasias intraepiteliais penianas e têm elevada associação com câncer cervical. O HPV 16 também está associado com neoplasia intraepitelial anal (81).

Os fatores de risco mais associados aos HPVs oncogênicos parecem não diferir daqueles descritos como associados ao HPV em geral. São eles, atividade sexual em idade jovem, múltiplos parceiros sexuais, parceiros sexuais com verrugas genitais, e longo tempo de uso de contraceptivos orais. Outros fatores como predisposição genética, função imune do hospedeiro, e perda de heterozigossidade dos genes do tumor supressor, também tem sido considerado (81).

Com o objetivo de determinar geograficamente a variação intratípica relacionada aos papilomavírus humanos HPV tipo 16 e 18, os quais poderiam estar associados ao desenvolvimento de lesões cervicais, foram analisados dados de em um estudo de coorte, onde o curso da história natural da infecção pelo HPV e neoplasia cervical foi estudado (82). A incidência de câncer cervical é mais alta na África e em países da América Latina do que em países da Europa e da América do Norte. É possível que a presença de uma não efetiva ou de uma não existência de rastreamento, a falta de acesso dos cuidados da saúde, a alta fertilidade e desnutrição possam explicar muitas das diferenças entre as taxas de áreas desenvolvidas e não desenvolvidas. Esta informação se torna relevante na medida em que variantes não Européias do HPV 16 e 18 possam ter um potencial oncogênico aumentado e assim representar um fator adicional contribuindo para a elevada desproporcionalidade das estimativas deste câncer em populações de baixa renda (83).

Outros estudos realizados em populações de mulheres brasileiras (20, 84, 85, 86, 87, 88), mostrou que a prevalência de HPV-DNA em câncer cervical invasivo pode alcançar 55%

quando se utiliza uma técnica de hibridização não-isotópica *in-situ* e aumenta para 91% quando são usadas técnicas baseadas em PCR. Sendo que, os tipos de HPV encontrados em câncer cervical mostram uma variação geográfica no mundo inteiro. No Brasil, estudo (89) sobre a prevalência do HPV em câncer cervical feito em quatro regiões, Norte, Nordeste Sudeste e Sul mostra que o HPV 16 é o tipo predominante apesar da variação regional considerar outros tipos, sendo o HPV 18 o segundo mais prevalente. Já na Região Central do Brasil, o câncer cervical é o segundo câncer mais freqüente e também que é a segunda causa mais comum de morte entre as mulheres, não havendo consideráveis informações na distribuição de prevalência de tipos específicos de HPV-DNA nesta região. Entretanto a identificação de tipos específicos de HPV que são mais associados com câncer cervical em diferentes regiões, tem implicações para prevenções estratégicas de câncer incluindo o efetivo desenvolvimento de vacinas (89).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministério da Saúde Instituto Nacional do Câncer (INCA) 2004. Câncer do Colo do Útero. “<http://www.inca.gov.br/>” 2004.
2. Gross GE, Barrasso R, Infecção pelo papilomavírus humano: Atlas clínico de HPV. Porto Alegre: Artes Médicas; 1999.
3. Carvalho JJM, Oyakawa NI, Consenso Brasileiro de HPV. São Paulo: BG Cultural. 2000.
4. Touzé A., Sanjose S, Coursaget P, Almira MR, Palacio V, Meijer CJLM., Kornegay J, Bosch FX. Prevalence of Anti-Human Papillomavirus Type 16, 18, 31, and 58 Virus-Like Particles in Women in the General Population and in Prostitutes. *J Clin Microbiol* 2001 Dec; 43:44-48.
5. Franco EL, Franco Duarte E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ* 2001 Apr; 3:1017-23.
6. Qureshi MN, Rudelli RD, Tubbs RR, *et al.* Role of HPV DNA testing in predicting cervical intraepithelial lesions: comparison of HC HPV and ISH HPV. *Diagn Cytopathol* 2003 Sep; 29(3):149-55.
7. Alani RM, Münger K. Human Papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol* 1998 Jan; 16(1):330-37.
8. Ministério da Saúde. Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil em 2000. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer/Pró-Onco/INCA, 2000.
9. Serra H, Pista A, Figueiredo P, Urbano A, Avilez F, De Oliveira CF. Cervix uteri lesions and human papilloma virus infection (HPV) detection and characterization of DNA/HPV using PCR (polimerase chain reation). *Acta Med Port* 2000; 13(4):181-92.

10. Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer (*INCA*). HPV, Perguntas e Respostas Mais Frequentes, http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=326 23/11/2004.
11. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, *et al.* Genital human papillomavirus in female university students as determined by PCR-based method. *JAMA* 1991 Jan; 265(4):472-77.
12. Hildesheim A, Gravitt P, Schiffman MH, *et al.* Determinants of genital HPV infection in Low-income women in Washington. DC - *Sex Transm Dis* 1993 Sep-Oct; 20(5):279-85.
13. Nonnenmacher B, Kjaer SK, Svare EI, *et al.* Seroreactivity to HPV 16 virus-like particles as a marker for cervical cancer risk in high-risk populations. *Int J Cancer* 1996; 68(6):704-09.
14. Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, *et al.* Detection of papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Res* 1991; 51:1014-19.
15. Schiffman MH. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84(6):394-98.
16. 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. *Gen Med* 1992; 68:370-73.
17. Von Der Meden AJW, Ruiz Moreno JA, Garcia Leon JF, *et al.* Cytologiccolposcopic-histopathologic correlations in preinvasive cervical lesions and cervical human papillomavirus infections. *Ginecol Obstet Mex* 1995 Sep; 63:365-71.
18. 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] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1996.
19. Zür Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; (186):131-56.

20. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *Natl Cancer Inst* 1995 Jun; 87 (11):796-802.
21. Koutsky LA, Holmes KK, Crichlow CW, *et al.* A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992 Oct; 327(18):1272-78.
22. Clavel C, Masure M, Boryj P, Putaud I, *et al.* Human Papillomavirus is testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer* 2001 Jun; 84(12):1616-23.
23. Kjaer KS, Chackerian B, Van Den Brule AJC, *et al.* High-Risk Human Papillomavirus Is Sexually Transmitted: Evidence from a Follow-Up Study of Virgins Starting Sexual Activity (Intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001 Feb; 10(2):101-06.
24. Ley C, Bauer HM, Reingold, Shiffman MH, Chambers, JC, Tashiro, CJ, And Manos MM. Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83:997-1003.
25. Kjaer SK, Van Der Brule AJC, Bock JE, Poll PA, Engholn G, Sherman ME, Walboorners JM, and MEIJER CJM. Determinants for genital human papillovirus (HPV) infectio in 1000 randomly chosen young Danish women with normal Pap smear: are there different risk profiles for oncogenic and nononcogenic HPV types? *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1997; 6:799-805.
26. Sedlacek TV, Lindhim S, Eder C, Hasty L, Woodland M., Ludomirsky A, and Rando RF. Mechanism for human papillomavirus transmission at birth. *J Gynaecol Obstet* 1989; 161:55-59.

27. Pakarian F, Kaye J, Kell B, Jewwers R, Derias NW, Raju KS and Best JM. Cancer associated human papillomavirus: perinatal transmission and persistense. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101:514-17.
28. Rylander E, Ruusuvara L, Wiksten MA, Evander and Wadell G. The absence of vaginal human papillomavirus 16 DNA in womwn who have not experienced sexual intercourse. *J Gynaecol Obstet* 1994; 83:735-37.
29. Koutsky L. Epidemiology of genital human papilomavirus infection. *Am J Med* 1997 May; 102 (5A):3-8.
30. Handsfield HH. Clinical presentatio and natural course of anogenital warts. *Am J Med* 1997 May; 102(A):16-20.
31. Bosch FX, Munoz N, De Sanjose S, *et al.* Risk factors for cervical cancer in Columbia and Spain. *Int J Cancer* 1992 Nov; 52(5):750-58.
32. Franco EL. Viral etiology of cervical cancer. A critique of the evidence. *Rev Infect Dis* 1991 Nov-Dec; 13(6):1195-1206.
33. Schiffman MH, Bauer HM, Lorincz AT, *et al.* Comparison of Southern Blot Hibridization and Polymerase Chain Reation methods for the detection of human papilomavirus DNA. *J Clin Microbiol* 1991 Mar; 29(3):573-77.
34. Walker J, Bloss JD, Liao SY, *et al.* Human papillomavirus genotype a prognostic Indicator in carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynaecol* 1989 Nov; 74(5):781-85.
35. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, *et al.* Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997 Jun; 89(11):796-802.

36. Severson J, Evans TY, Lee P, *et al.* Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and therapy. *J Cutan Med Surg* 2001; 5:43-60.
37. Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000; 19:1-5.
38. Brisson J, Morin C, Fortier M, *et al.* Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and high-grade lesions. *Am J Epidemiol* 1994 Oct; 140(18):700-10.
39. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JM, Prado C, Rouseau M., Desy and Rohan TE. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from high risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999; 180:1415-23.
40. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, *et al.* Persistence of type specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994; 169:235-40.
41. Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ and Burk RD. Natural history of cervico vaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338: 423-28.
42. Villa LL. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Adv Cancer Res* 1997; 71:321-41.
43. Beay MFD, Tjalma WAA, Pattyn GGO. Prevalence of Human Papillomavirus in Elderly Women with Cervical Cancer. *Gynaecol Obstet Invest* 2001; 52:248-51.
44. Ministério da Saúde Brasil 2004. Editado pelo Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação de Saúde, Núcleo de Comunicação. (Brasília, DF, Brasil, 2004).
45. Graham DA, & Herrington S. The induction of chromosome abnormalities by human papillomaviruses. *Papillomavirus Report* 1998; 9(1):1-5.

46. Howley PM. Papillomaviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN; Knipe DM; Howley PM, Fields ed. Philadelphia: Virol Lippincot-Raven 1996; 3:2045-76.
47. Chan SY, Delius H, Halpern AL and Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: Uniting typing, phylogeny, and taxonomy. J Virol 1995; 69:3074-83.
48. Zür Hausen H. Intracellular surveillance of persisting viral infections: Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. Lancet 1986 Aug; 2(8505):489-91.
49. Rapp L, & Chen JJ. The papillomavirus E6 proteins. Biochim Biophys Acta 1998 Aug; 1378(1):1-19.
50. Ferenczy A, Mitao J and Nagai N. Latent papillomavirus and recurring genital warts. N Engl J Med 1985; 313:784.
51. Kiviat Nancy B. Human Papillomavirus In: Murray PR, Baron E, Falles MA, Tenover FC and Yolken RH, Editores. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Am Soc Microbiol; 1999.
52. Dores GB, Taromaru EK, Gallo C. Aspectos atuais do rastreamento das lesões HPV-induzidas e do câncer do colo uterino com métodos morfológicos e biomoleculares. Newslab 1999; 35:196-205.
53. De Palo G, Stefanan B, Pilotti S. Infecção pelo Papilomavírus. In: De Palo G, Editores. Colposcopia e patologia do trato genital inferior. 2nd ed. Rio de Janeiro: Medsi; 1996.
54. Bauer HM, Greer CE, Manos MM. Determination of genital HPV infection using consensus PCR. 131-153. In: Herrington CS, and Meg JD, (editores). Diagnostic molecular pathology: a practical approach. Oxford England: Oxford University Press; 1992.
55. Smith EM, Johnson SR, Ritchie JM, *et al.* Persistent HPV infection in postmenopausal age women. J Gynaecol Obstet 2004 Nov; 87(2):131-37.

56. Vang SS, Schiffman M, Herrero R, *et al.* Determinants of human papillomavirus 16 serological conversion and persistence in a population-based cohort of 10 000 women in Costa Rica. *Br J Cancer* 2004 Oct; 91(7):1269-74.
57. Cuschier KS, Whitley MJ, Cubie HA. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol* 2004 May; 73(1):65-70.
58. Ronco G. Use of molecular tests of human papillomavirus (HPV) as screening test for cervix cancer: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999 Oct-Dec; 23(4):372-77.
59. Liaw KAI-LI, Glas AG, Manos MM, *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(11):954-60.
60. Creastsas G, Caglar H, Heresshchyshyn M, Gallego M. Cytologic, colposcopic and histologic correlation in young female. *J Adolesc Health Care* 1981 sep; 2(1):35-40
61. Coursaget Pierre. Serology for human papillomavirus. *Salud Pub Mex* 2003; 45(3):361-66.
62. Galloway DA. Serological assays for the detection of HPV antibodies. *IARC Sci Publ* 1992; (149):147-61.
63. 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 patientes and controls from Colombia and Spain. *J Infect Dis* 1995; 172(1):19-24.
64. Nonnenmacher B, Pintos J, Bozzetti MC, Mielzinska-Lohnas I, Lorincz AF, Ikuta N, Schwartzmann G, Villa LL, Schiller JT, Franco EL. Epidemiologic correlates of antibody

response to human papillomavirus among women at low risk of cervical cancer. *Int J STD AIDS* 2003 Apr; 14(4):258-65.

65. Viscidi RP, Kotloff KL, Clayman B, Russ K, Shapiro S and Shah K. Prevalence of Antibodies to Human Papillomavirus (HPV) Type 16 Virus-Like Particles in Relation to Cervical HPV Infection among College Women. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997 Mar; 122-26.

66. Schiller TJ, Lowy D. Papillomavirus-like particles and HPV vaccine development. *Cancer Biology* 1996; 7:1-11.

67. Coutlée F, Maurand MH, Provenchier D, *et al.* The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. *Clin Diagn Virol* 1997 Aug; 8(2):123-41.

68. Mullis KB and Faloona F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalized chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-50.

69. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, *et al.* Use of PGM1 Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples. *J Clin Microbiol* 2002 Mar; 902-07.

70. Deluca GD, Lucero RH, Civetta MTM, *et al.* Human papillomavirus genotypes in women with cervical cytological abnormalities from an area with high incidence of cervical cancer. *Rev Inst Med S Paulo* 2004; 46(1):9-12.

71. Ferency A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol* 2002; 3:11-16.

72. Chan PKS, Chang AR, Cheung JOLK, *et al.* Determinants of Cervical Human Papillomavirus Infection: Differences between High- and Low- Oncogenic Risk Types. *J Infect Dis* 2002; 185:28-35.

73. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1975; 98:503-17.
74. Wiedorn KH, Goldmann T, Henne C, *et al.* EnVision+, a new dextran polymer-based signal enhancement technique for in situ hybridization (ISH). *J Histo* 2001; 49:1067-71.
75. Komminoth P and Werner M. Target and signal amplification: approaches to increase the sensitivity of in situ hybridization. *Histo Chem Cell Biol* 1997; 108:325-33.
76. http://www.digene.com.br/menu/captura_hibrida/texto_captura_hpv.asp 2003.
77. Clavel C; Masure M; Putaud I; Thomas K; Bory JP; Gabriel R; Quereux C; Birembaut P, Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection- comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. *J Clin Pathol* 1998 Oct; 51(10):737-40.
78. Zür Hausen H, Meinhof W, Schreiber W, *et al.* Attempts to detect virus-specific sequences in human tumors. I. Nucleic acid hybridization with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 1974 May; 13 (5): 650-56.
79. Goldie SJ, Kim JJ, Wright TC. Cost-effectiveness of human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening in women aged 30 years or more. *Obstet Gynaecol* 2004 Apr; 103(4):617-18.
80. Carr J, Gyorfí T. Human papillomavirus. Epidemiology, transmission, and pathogenesis. *Clin Lab Med* 2000; 20(2):235-55.
81. Peres L. Genital HPV: Links to cancer, Treatment, and Prevention. *Clin Lab Scien* 2001; 14(3):183-86.
82. Franco EL, Villa LL, Rohan T, Ferenczy A, Petzl-Erler M, & Matlasheewski G. Design and methods of the Ludwig-McGILL longitudinal study of the natural history of human

papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil Ludwig-McGILL Study Group. Rev Panam Salud Pub 1999; 6:223-33.

83. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T and Franco EL. Molecular variants of human papilomavirus humano tipos 16 e 18 preferentially associated with cervical neoplasia. J Med Virol 2000; 58(81):2959-68.

84. Cavalcanti SM, Frugulhetti IC, Fonseca MF, Oliveira LH. Prevalence of human papillomavirus DNA in female cervical lesions from Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89:575-80.

85. Cavalcanti SM, Zardo LG, Oliveira LH. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. J Infect 2000; 40:80-87.

86. Eluf-Neto J, Booth M, Munõs N, Bosch FX, Meijer CJLM, Walboomers JM. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. Br J Cancer 1994; 69:114-19.

87. Gonçalves MA, Massad E, Burattini MN, Villa LL. Relationship between human papillomavirus (HPV) genotypin and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City. São Paulo Brazil Int J STD AIDS 1999; 10:803-07.

88. Lorenzato F, Ho L, Terry G, Singers A, *et al.* The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). Int J Gynaecol Cancer 2000; 10:143-50.

89. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cercal Cancer from Goiânia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro 2003 Mar; 98(2):181-84.

ARTIGO

Freqüência de Papilomavírus Humanos Oncogênicos tipos 16 e 18 e sua Associação com Fatores de Risco e Lesões do Colo Uterino em Uma População de Mulheres de Porto Alegre

Marilda Tereza Mar da Rosa e Colaboradores.

Porto Alegre – Rio Grande do Sul, Brasil.

Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Faculdade de Medicina, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS – Brasil; Departamento de Medicina Social, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS – Brasil.

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde IPB/LACEN e Centro de Desenvolvimento Científico Tecnológico CDCT/FEPPS.

Correspondência para autor: Marilda Tereza Mar da Rosa, Rua Victor Matheus Teixeira 3686, cidade Porto Alegre-RS CEP 91790-540 – Brasil – Fone: +55 51 32502389;

e-mail: marildatereza@yahoo.com.br

mcb@famed.ufrgs.br

Resumo

Objetivo: O presente estudo teve como objetivo conhecer a frequência de HPV's oncogênicos tipos 16 e 18 em uma população de mulheres de uma área geográfica localizada na zona norte de Porto Alegre bem como verificar as características associadas à presença deste vírus e sua relação com lesões do colo uterino.

Método: Trata-se de um estudo transversal cujo desfecho é a positividade do HPV, em especial HPV 16 e 18 em uma população de mulheres de uma área geográfica localizada na zona norte de Porto Alegre. Um total de 1004 amostras de material do colo do útero foi coletado para realização do exame citopatológico convencional e para a identificação do HPV-DNA através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Colposcopia e biópsia foram realizadas sempre que a citologia estivesse alterada e/ou a PCR para o HPV-DNA fosse positiva. A frequência de HPV e sua distribuição por faixa etária são descritas, bem como a sua associação com as variáveis estudadas através da Razão de Chance (RC) estimada por regressão logística múltipla.

Resultados: Observou-se uma frequência de HPV-DNA de 30,8% na população estudada. Destas 17,8% são mulheres positivas para o HPV 16 e 5,5% para o HPV 18. O fato de mulheres não terem um companheiro fixo (Razão de Chance (RC) =1,42; Intervalo de Confiança (IC) de 95%: 1,10-2,00) mostrou-se associado com a positividade para outros HPV's. O HPV 16 mostrou uma associação positiva com mulheres mais jovens (≤ 34 anos) (RC=2,48; IC95%:1,22-5,05). Quanto ao HPV 18, as mulheres fumantes mostraram uma associação positiva com o desfecho (RC=3,57; IC95%:1,26 –10,10).

Conclusão: Os resultados mostraram uma elevada frequência de HPV na população analisada, onde o mais frequente foi o tipo oncogênico HPV 16, o que pode ser muito útil no planejamento da utilização de vacinas para o HPV. Os achados também sugerem uma associação positiva de infecção pelo HPV em mulheres sem companheiro fixo e mulheres jovens com a infecção pelo HPV 16 e mulheres fumantes com a infecção pelo HPV 18.

Palavras-chave: Papilomavírus Humano, Reação em Cadeia da Polimerase, estudo transversal, câncer de colo de útero.

Abstract

Objective: The present study has the aim of describing the frequency of oncogenic HPV Types 16 and 18 among women in our setting and of verifying the factors associated to this virus and its relationship with cervical lesions.

Methods: A cross-sectional study was developed with HPV-DNA positivity as the outcome, specially subtypes 16 and 18. Cervical smears for cytology were collected from all women. Polymerase Chain Reaction (PCR) was the method used to identify the presence of HPV-DNA. Colposcopy and biopsy were performed whenever cytology was abnormal and/or PCR was positive to HPV-DNA. HPV-DNA frequencies are described and the Odds Ratios for all study variables and HPV-DNA were estimated through multiple logistic regression.

Results: The observed HPV-DNA frequency was 30.8%. From those, 17.8% of the women were positives to HPV 16 and 5.5% to HPV 18. Being single (*Odds Ratio* (OR)=1.42; Confidence Interval (CI) of 95%: 1.10-2.00) was associated to other types of HPV. The HPV 16 was associated with younger age (≤ 34 years) (OR=2.48; CI95%: 1.22- 5.05). Smoking was positively associated to HPV 18 (OR=3.57; CI95%: 1.26-10.10).

Conclusion: An elevated HPV frequency was observed in Porto Alegre, southern Brazil where the oncogenic type HPV 16 is the most common. This information could be useful in planning the HPV vaccine. The results also suggest a positive association between women that are single with HPV infection (not types 16 or 18), younger age (≤ 34 years) with HPV 18 and smoking with HPV 18.

Key Words: Human Papillomavirus, Polymerase Chain Reaction, cross-sectional study, cervical cancer.

Introdução

As infecções genitais causadas pelo Papilomavírus Humano (HPV) são disseminadas e ocorrem em todo o mundo (1,2,3). Seu perfil epidemiológico é o de uma doença relacionada à atividade sexual sendo a doença sexualmente transmissível (DST) viral mais freqüente na população sexualmente ativa (1,2,3).

Os HPVs infectam a pele e a membrana das mucosas e podem induzir a formação de tumores malignos e benignos; estudos (1,2,3) epidemiológicos revelam que as infecções por certos tipos de HPVs são importantes fatores de risco para o câncer cervical que é o segundo tumor maligno mais freqüente em mulheres.

O tipo mais comum de HPV associado ao câncer cervical em todo mundo é o HPV 16, seguido pelo HPV 18 (4,5,6). Durante a década de 80, estudos (7, 8) sugeriram que infecções subclínicas cervicais estariam associadas com pacientes jovens, múltiplos parceiros, gravidez e história anterior de verrugas genitais. Além da atividade sexual, no entanto, outras variáveis podem influenciar o risco de adquirir infecção por HPV, como multiparidade, uso de anticoncepcionais orais e tabagismo (7). Os papilomavírus pertencem à família Papillomaviridae e são classificados de acordo com seu potencial oncogênico, como de baixo risco subtipos (6, 11, 42, 43, e 44) e de alto risco subtipos (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68) (5,9). Em geral, os HPVs de baixo risco estão relacionados com tumores benignos e lesões cutâneas leves, enquanto que, os HPVs de alto risco estão diretamente associados com neoplasias intraepiteliais que podem progredir para câncer de colo de útero e carcinomas anogenitais (10,11).

O câncer de colo uterino é a segunda neoplasia maligna que mais acomete as mulheres sendo superado somente pelo câncer de mama (12). Atualmente nenhuma evidência indica que os tratamentos disponíveis no momento erradicam ou afetam a história natural das infecções pelos papilomavírus e nenhum dos tratamentos é superior aos outros, ou seja, cada caso deverá ser avaliado tomando a conduta mais adequada (13,14,15). Estudos têm sido universalmente consistentes e o HPV têm sido proposto como a primeira causa necessária para o desenvolvimento de câncer cervical identificável (2, 4, 6, 16). Infecções com HPVs de

alto risco estão associados ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas e progridem para lesões intraepiteliais de alto grau (17).

A prevenção primária de câncer cervical pode ser realizada através da prevenção e do controle da infecção genital pelo HPV. Estratégias de promoção da saúde orientam para uma mudança no comportamento sexual que pode ser efetivo na prevenção de infecção pelo HPV genital (8). Na tentativa de conhecer a frequência de HPVs oncogênicos, em especial dos tipos 16 e 18, em uma população de mulheres de uma área geográfica localizada na zona norte de Porto Alegre e de verificar a associação desta infecção com fatores de risco e com lesões observadas no colo uterino planejou-se este estudo, esperando que os achados possam contribuir para um melhor entendimento da elevada morbidade e mortalidade do câncer de colo uterino em nosso meio, já que esta é uma neoplasia com elevado potencial de prevenção e de cura se detectada precocemente (8). Além disso, a identificação de tipos específicos de HPV mais associados com câncer cervical em diferentes regiões poderá ter implicações para prevenções estratégicas deste câncer incluindo o efetivo desenvolvimento de vacinas (18, 19, 20).

Material e Métodos

Desenho do Estudo:

Este é um estudo transversal envolvendo mulheres de uma área populacional atendida por uma unidade de atenção primária do Serviço de Saúde Comunitária do Grupo Hospitalar Conceição (GHC), localizada na Zona Norte de Porto Alegre, as quais foram alocadas para participar de um estudo de coorte com seguimento mínimo de cinco anos.

População e Amostra:

A população do estudo é originária da população de mulheres pertencentes à área de abrangência da Unidade de Atenção Primária Jardim Leopoldina, na zona norte de Porto Alegre, onde existem aproximadamente 7000 mulheres adultas residindo nesta área (21).

Para participar do estudo, as mulheres necessitavam buscar atendimento na Unidade Jardim Leopoldina, preencher os critérios de elegibilidade e concordar em participar do estudo assinando um Termo de Consentimento Informado. Para ser elegível a mulher teria que pertencer à área geográfica da unidade acima descrita, possuir prontuário na Unidade referida ter iniciado vida sexual, não ter história de câncer cervical, e não ter sido hysterectomizada.

A amostra deste estudo compreendeu um total de 1004 mulheres arroladas no período de fevereiro de 2003 até setembro de 2004.

Variáveis do Estudo:

O desfecho foi o diagnóstico molecular por PCR de HPV-DNA, em especial os tipos oncogênicos 16 e 18. Após terem sido arroladas, as participantes responderam a um questionário epidemiológico padronizado onde foram coletadas as informações sobre características demográficas, morbidades pregressas, história de vida reprodutiva e de comportamento sexual. Todas as mulheres do estudo foram submetidas a um exame ginecológico onde foi coletado material para citologia convencional e teste do HPV-DNA através do método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Detecção HPV-DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

A técnica de PCR foi anteriormente descrita por BAUER H M, 1993 e por COUILLÉE F, 2002 e padronizada com testes pilotos no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CDCT/LACEN-FEPPS, tendo uma especificidade maior que 95% e uma sensibilidade superior a 90%. Em nosso estudo, encontramos uma sensibilidade de 65% (limiar de detecção da técnica) e uma especificidade de 72% (porcentagem de testes normais com testes negativos). Foram encontrados também valor preditivo positivo de 18,8% e valor preditivo negativo de 95,3%.

As amostras para a pesquisa de DNA de papilomavírus humano foram coletadas na Unidade de Saúde de Atenção Primária do Posto Jardim Leopoldina, utilizando-se escova do tipo “*cytobrush*” e estocadas à temperatura de -20°C em 2 ml de tampão TE (10mM Tris-HCl

pH 8,5; 1mM EDTA) ou PBS (*phosphate-buffered saline* pH 7,4) até a extração do DNA. O transporte das amostras foi realizado em condições de baixas temperaturas.

Após descongelamento, as amostras foram centrifugadas a 5.200 rpm, sob refrigeração, e o sedimento ressuspendido em tampão TE num volume final de 500µL. O DNA das amostras foi extraído por Solução Proteinase K/TE-50 (200 µg/ml de proteinase K ‘DNase/RNa free’ Gibco, 2% Tween 20, 1mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,5). Após inativação a 94°C durante 10 min, as amostras desproteinizadas foram submetidas a uma amplificação por PCR, utilizando-se como *primers consensus* MY09/MY11 com os seguintes oligonucleotídeos degenerados, complementares à região L1 do genoma viral do papilomavírus humano (3, 5, 16, 22, 23).

- My 09 5' .. CGT CC^A/_C AA^A/_G GGA ^A/_TAC TGA TC .. 3'
- My 11 5' .. GC^A/_C CAG GG^A/_T CAT AA^C/_T AAT GG .. 3'

As reações foram realizadas em volume final de 50 µL, contendo 2,5U da enzima *Taq* DNA polimerase, *primers* na concentração de 150 pMol/µL cada; 5µL de tampão de reação 10X contendo 100 mM de Tris-HCl pH 8,3, 500 mM de KCl, 0,2% de gelatina e 30 mM de MgCl₂, 4 µL de dNTPs com 0,2 mM de cada nucleotídeo, DNA e H₂O q.s.p 50 µL.

A amplificação foi feita em aparelho termociclador MJ Research PTC 96: 95°C por 13 min, para desnaturação; 40 ciclos subseqüentes de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min, para amplificação; 72°C por 5 min, para extensão final; 4°C para estoque dos produtos amplificados. Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose 2,0%, em tampão TBE (Tris Ácido Bórico mais Ácido Etileno Diamino Tetraacético), contendo 0,5µg/ml de brometo de etídio, sob luz ultravioleta e comparados a um controle positivo de reação da PCR. As amostras que apresentaram um fragmento à mesma altura do controle positivo, foram consideradas amostras positivas e as amostras que comparadas ao mesmo controle positivo da reação de PCR, e não apresentaram nenhum fragmento, foram consideradas como amostras negativas para o DNA de HPV. Nesta técnica foi utilizado um controle de reação negativo, que ao ser visualizado em gel de agarose, observou-se que as reações não estavam contaminadas, apresentando confiabilidade nos resultados. Um controle interno de reação, *primers β-globina*, foi utilizado para verificarmos a integridade do DNA extraído. Para a

tipagem de HPV tipos 16 e 18 foram utilizados *primers* específicos para estes subtipos (3, 5, 16 22, 23).

As lâminas com esfregaço para citologia e as biopsias foram processadas e analisadas junto ao laboratório de patologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição. As participantes do estudo que apresentaram alterações no exame citológico e/ou foram HPV-DNA positivas realizaram colposcopia e biopsia de colo uterino se indicado. As mulheres diagnosticadas com alterações que necessitaram tratamento imediato (NIC II, III, câncer *in situ*, câncer invasor) foram encaminhadas ao Serviço de Referência para tratamento.

As informações coletadas foram armazenadas sistematicamente em um banco de dados desenvolvido no programa EPINFO 2002. O controle de qualidade de entrada dos dados foi feito através de conferência sistemática dos dados até então digitados com o questionário original de uma amostra aleatória de 20% dos registros já armazenados.

Análise dos dados:

Neste estudo, para fins de análise estatística, todas as mulheres HPV-DNA positivas foram estratificadas em três grupos: uma amostra de mulheres positivas para HPV-DNA 16, uma de mulheres positivas para o HPV-DNA 18 e uma com as demais mulheres HPV-DNA positivas (exceto tipos 16 e 18). Além disso, todas as mulheres HPV negativas foram comparadas aos grupos de mulheres HPV-DNA positivas acima descritas.

Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS (versão 10.0). Foi descrita a frequência global de HPV-DNA, bem como de HPV-DNA 16, 18 e outros tipos de HPVs. As frequências foram descritas para toda a população estudada e por faixa etária. O teste do qui-quadrado (ou exato de Fisher se indicado) foi utilizado para comparar as variáveis categóricas com a presença ou ausência do desfecho e o teste t de student (ou não paramétrico correspondente) para comparar as variáveis contínuas com a presença ou não do desfecho. A Razão de Chances (RC) foi calculada para as análises uni/bivariadas e multivariadas, através do método de Regressão Logística, com seu correspondente Intervalo de Confiança de 95%. Os critérios de seleção das variáveis para o modelo de regressão logística não condicional

envolveram a significância estatística na análise uni/bivariada e/ou a relevância clínico-epidemiológica da variável mediante o conhecimento vigente. Todas as variáveis com $p \leq 0,25$ foram incluídas no modelo, utilizando-se o método ENTER, o qual mantém todas as variáveis selecionadas no modelo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição em 15 de janeiro de 2003, protocolo número 112/2002.

Resultados

Foram analisadas 1004 mulheres para este estudo. Na tabela 1 estão descritas as características desta população, independente do *status* do HPV. Em relação à idade observa-se que 32,0% das mulheres tinham 34 anos ou menos, sendo a maioria 79,5% de cor branca e em torno de 60,0% estudaram até o primeiro grau. A maioria 65,8% eram mulheres com companheiro fixo e 78,2% referiam uso de anticoncepcional oral. Cerca de 67 % das mulheres iniciaram a vida sexual antes dos 20 anos e aproximadamente 30% tiveram mais de 3 parceiros sexuais ao longo da vida. A paridade foi superior a 2 filhos em 36,5% das mulheres. Um total de 26% de mulheres relatou ser fumante e (11%) referiram história prévia de condiloma genital.

A positividade de HPV-DNA, pela técnica de PCR, em toda a população estudada, foi de 30,8% (n=309), sendo que destas, 17,8% (n=55) foram positivas para o HPV 16 e 5,5% (n=17) para o HPV 18. Tendo um total 695 mulheres negativas para HPV-DNA.

Na tabela 2 observa-se a distribuição das variáveis estudadas de acordo com os tipos de HPVs identificados (16,18 e outros HPVs). A distribuição por grupo etário entre as mulheres positivas para o HPV 16 é semelhante. Já para o HPV 18 há uma predominância de mulheres mais velhas 64,7%, ocorrendo o mesmo nas mulheres com outros tipos HPVs e mulheres HPV negativas. A cor branca predomina em todos os grupos, observando-se percentuais mais elevados para não brancas em mulheres positivas para o HPV 16 e 18. Quanto à escolaridade, houve predomínio de mulheres que estudaram até o 1º grau nos grupos de participantes com HPV 16, outros HPVs e HPV negativas. O oposto foi observado entre as mulheres positivas ao HPV 18. A maioria das participantes informaram ter companheiro fixo e o número de mulheres sem companheiro em torno de 40% nos grupos de mulheres HPV positivas e 30% para as HPV negativas. Observa-se que em torno de metade da população de mulheres positivas ao HPV 18 relatam ser fumante, o que não ocorre nos outros grupos (HPV 16, outros HPVs e HPV negativas) onde as não fumantes são minoria. Em todos os grupo houve uma maior proporção de mulheres que iniciou a vida sexual antes dos 20 anos de idade. Chama atenção que entre as mulheres positivas para HPV 16, em torno de 40% referiram mais de 3 parceiros ao longo da vida, sendo este percentual menor nos outros grupos. A

maioria referiu ser usuária de anticoncepcional oral, sendo o maior percentual observado 88,2% nas positivas para HPV 18. Também foi maior em todos os grupos o percentual de mulheres que informaram paridade de até 2 filhos. Um número relativamente pequeno de mulheres referiu história prévia de condiloma genital, sendo a maior proporção observada entre as positivas ao HPV 16.

Na figura 1 estão descritos os achados do exame citopatológico de acordo com o tipo de HPV identificado. A citologia normal é predominante em todos os grupos, sendo o maior percentual observado entre as mulheres HPV negativas. No entanto, as lesões de baixo grau foram detectadas, em sua maioria, nas mulheres HPV positivas, em especial nas positivas ao HPV 16 e 18, embora um pequeno percentual também tenha sido observado entre as HPV negativas. Lesões de alto grau só foram identificadas nas positivas para o HPV 16 3,8%.

Do total de mulheres estudadas, 33,5% (n=336) foram encaminhadas a colposcopia e, destas 24,3% (n=82), apresentaram anormalidades a este exame e realizaram biópsia. Da totalidade de biópsias realizadas, 56,0% (n=46) apresentaram alterações. Destas, 20,0% (n=9) mulheres apresentaram lesão de alto grau e 74,0 % (n=34) de baixo grau. Entre as mulheres com lesões de alto grau, 56,0% (n=5) foram positivas para o HPV 16.

Na tabela 3 são descritas as Razões de Chance ajustadas estimadas, com correspondentes intervalos de confiança de 95%, para a associação entre as variáveis estudadas e os desfechos. Observa-se uma associação positiva e significativa entre mulheres sem companheiro fixo e a positividade para outros HPV's. Já em relação ao HPV 16 houve uma associação positiva e significativa com mulheres mais jovens (≤ 34 anos) (RC=2,48; IC95%:1,22-5,05). Quanto ao HPV 18, observou-se uma associação estatisticamente significativa com mulheres fumantes (RC=3,57; IC95%:1,26-10,10).

Discussão

Os resultados deste estudo mostram uma elevada frequência de positividade para HPV 30,8%, sendo o tipo oncogênico HPV 16 o mais freqüente entre as positivas 17,9%. As frequências observadas neste estudo estão dentro do amplo intervalo relatado na literatura, onde a prevalência e a incidência da infecção cervical pelo HPV mostram grande variação, de acordo com o método diagnóstico utilizado, mas também por refletir as variações quanto ao comportamento sexual entre as populações (1, 3). Dentro do Brasil, também é observada esta variação, onde em outro estudo realizado em cidade do interior do Rio grande do Sul, em população considerada de baixo risco foi encontrada uma frequência de HPV-DNA de 13,0% (24). Outro estudo brasileiro (25) realizado em São Paulo, entre mulheres de baixa renda, também referiu uma frequência de mulheres HPV positivas de 26,2%, sendo 39,5% positivas para os HPVs 16 ou 18. A frequência de HPV observada em nosso estudo foi elevada, também com predominância dos HPVs 16 e 18 23,4%. Especula-se que esta frequência esteja relacionada com o tipo de população estudada, que inclui baixa renda e baixa cobertura para o rastreamento de câncer de colo uterino. Quanto a frequência mais elevada de HPV 16, os estudos têm sido unânimes em indicar este tipo de HPV oncogênico como o mais freqüentemente observado (2, 3, 25, 26, 27, 28). Este achado também é corroborado em nosso estudo. Cabe salientar, no entanto que frequências elevadas também tem sido observadas em mulheres com citologia normal e subsequente desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas da cérvix, sendo estes achados consistentes com a hipótese de a infecção pelo HPV ser causa necessária para o desenvolvimento de neoplasia cervical (27).

Apesar do presente estudo ter arrolado mulheres de uma área geográfica de Porto Alegre, acredita-se que os achados possam ser extrapolados para as mulheres desta cidade, onde a distribuição das características demográficas é semelhante à relatada na amostra estudada. No entanto, as mulheres estudadas relataram, em sua maioria, mais de 3 parceiros sexuais ao longo da vida, sexarca, anterior aos 20 anos e em torno de 30,0% referiram nenhuma escolaridade ou primeiro grau incompleto. Este padrão de comportamento de “risco” na população estudada deve ser considerado ao discutir-se os achados deste estudo.

Embora estudos realizados na Costa Rica (29), Colombia e México (30), mostrem uma distribuição bimodal da infecção pelo HPV quanto à faixa etária, sendo o primeiro pico abaixo dos 25 anos e o segundo pico acima dos 59 anos, outros estudos (3, 5) não observaram a mesma tendência. Em nosso estudo, a faixa etária foi analisada considerando mulheres com até 34 anos e com mais de 34 anos, pela distribuição relativamente pequena observada de mulheres com mais de 54 anos 17,4% (n=174). Nosso estudo relata uma frequência maior de mulheres jovens entre as positivas ao HPV 16, fato também descrito em outros estudos (25, 28) entanto, abaixo de 25 anos, no entanto o segundo pico ocorre em um período etário um pouco mais.

Em relação à citologia, as lesões de baixo grau observadas foram, em sua maioria, nas mulheres HPV positivas, em especial nas positivas ao HPV 16 e 18, embora um pequeno percentual também tenha sido observado entre as HPV negativas. Este pequeno percentual de lesões de baixo grau encontradas em amostras negativas para HPV na PCR, está provavelmente relacionado a algum fator inibitório na reação, como por exemplo, resíduos da extração, uma vez que foi utilizado controle interno o qual não estava presente na reação com relação às outras amostras, ou mesmo lesões do tipo ASCUS e AGUS que em nossa classificação, juntamente com NIC I, foram considerados de baixo grau. As lesões de alto grau só foram identificadas nas positivas para o HPV 16. Estes achados refletem a expectativa de que lesões de alto grau, consideradas pré-malignas estejam associadas a presença de HPV oncogênico.

Sabe-se que a presença da infecção pelo HPV é um fator necessário, porém não suficiente para o desenvolvimento do câncer de colo uterino (3, 6). Assim, outros fatores parecem contribuir para o desenvolvimento desta neoplasia. Entre eles, fatores hormonais como elevada paridade associada a um longo período de exposição a anticoncepcionais orais, outras infecções genitais como a *Chlamidia trachomatis* podem ser considerados co-fatores do HPV (7, 8).

Além disso, outros fatores também têm sido sugeridos como possíveis cofatores, como déficit nutricional, fatores inerentes ao hospedeiro que aumentariam a suscetibilidade à

infecção pelo HPV, como marcadores genéticos e moduladores da resposta imune e mesmo variantes genéticos de vários tipos de HPV (3, 8, 31).

Em nossos achados, variáveis como idade inferior a 35 anos, e de comportamento sexual, como, não ter companheiro fixo além de ser fumante, se mostraram associadas à infecção pelo HPV. Estes achados são corroborados por resultados relatados em outros estudos (2,7,8,14, 25, 31). Cabe salientar o achado referente à exposição ao fumo, para o HPV oncogênico 18, mostrando uma associação positiva e significativa, embora este achado deva ser interpretado com cautela, pois o número de mulheres neste grupo é relativamente pequeno.

Também tem sido observado que no Estado do Rio Grande do Sul há um aumento da mortalidade ao longo dos últimos 20 anos, em relação a outros estados da Região Sul do Brasil, em todas as faixas etárias, sendo maior o incremento anual na faixa de 50 a 64 anos (12, 32). Sendo o Rio Grande do Sul, o estado brasileiro onde é observada a prevalência de fumo mais elevada, seria possível especular que o fumo possa estar atuando como cofator junto ao HPV e contribuindo assim para o aumento da morbidade e mortalidade por esta neoplasia em nosso meio. Se esta especulação estiver correta, é essencial que se combine junto às medidas de prevenção para a infecção genital pelo HPV, medidas para redução da exposição das mulheres ao fumo.

É possível que a existência de programas de educação e rastreamento sistemático de todas as mulheres após a primeira relação sexual possam modificar o quadro atual. Além disso, falhas na educação básica da população, a falta de conhecimento e os temores pelo próprio tabu ainda relacionado ao câncer fazem com que estes programas não sejam exigidos pela comunidade, apontando, desta forma, para uma conscientização ainda maior por parte dos governos quanto ao processo de educação e informação para a saúde dos cidadãos.

Concluindo, este estudo aponta uma elevada frequência da HPV em mulheres de Porto Alegre, onde o mais freqüente é o tipo oncogênico HPV 16. Esta informação pode ser muito útil no planejamento da utilização de vacinas para o HPV. Além disso, os achados sugerem uma associação positiva desta infecção com mulheres jovens, sem companheiros fixo e fumantes, sugerindo assim uma população de “risco” em nosso meio onde podem ser

aplicadas medidas de prevenção em nível de atenção primária, as quais não exigem sofisticação tecnológica, podendo contribuir para uma redução deste importante “fardo” em saúde pública.

Referências Bibliográficas.

1. Dillner J, Meijer CJ, Von Krogh G, Horenblas S. Epidemiology of human papillomavirus infection. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2000;205:194-200.
2. Bosch FX, De Sanjose S. Human papillomavirus in cervical cancer. *Curr Oncol Rep.* 2002;4(2):175-83.
3. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 2000;19(1-2):1-5.
4. Touzé A, De Sanjose S, Coursaget P, Almira MR, Palacio V, Meijer CJLM, Kornegay J, Bosch FX. Prevalence of Anti-Human Papillomavirus Type 16, 18, 31, and 58 Virus-Like Particles in Women in the General Population and in Prostitutes. *J Clin Microbiol.* 2001; 4344-4348.
5. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *Natl Cancer Inst.* 1995;87(11):796-802.
6. Zür Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;(186):131-156.
7. Castellsague X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 2002;89(2):191-2.
8. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ.* 2001;3:1017-1023.

9. Qureshi MN, Rudelli RD, Tubbs RR, *et al.* Role of HPV DNA testing in predicting cervical intraepithelial lesions: comparison of HC HPV and ISH HPV. *Diagn Cytopathol.* 2003;29(3):149-55.
10. Alani RM, Münger K. Human Papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol.* 1998;16(1):330-337.
11. Marshall K. Cervical dysplasia: early intervention. *Altern Med Rev.* 2003;8(2):156-70.
12. Kalakun L and Bozzetti MC. Evolution of uterine cervical cancer mortality from 1979 to 1998 in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Cad. Saúde Pub.* No Prelo 2005.
13. Schiffman M, Kjaer SK. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;(31):14-19.
14. Bekkers RL, Massuger LF, Bulten J, Melchers WJ. Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Rev Med Virol.* 2004; 14(2):95-105.
15. Ball C and Madden JE. Update on cervical cancer screening. Current diagnostic and evidence-based management protocols. *Postgrad Med.* 2003;113(2):59-64,70.
16. Ferenczy A and Franco EL. Persistent human papillomavirus infection and cervical cancer. *Lancet Oncol.* 2002;3(1):11-6.
17. Koutsky LA, Holmes KK, Crichlow CW, *et al.* A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *J Engl Med.* 1992; 327(18):1272-1278.
18. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human Papillomavirus Prevalence Among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III

and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*. 2003;98(2):181-184.

19. Mandic A, Vujkov T. Human papillomavirus vaccine as a new way of preventing cervical cancer: a dream or the future? *Ann Oncol*. 2004;15(2):197-200.

20. Williamson AL, Marais D, Passmore JA, Rybicki E. Human papillomavirus (HPV) infection in Southern Africa: prevalence, immunity, and vaccine prospects. *IUBMB Life*. 2002;53(4-5):253-8.

21. Instituto Brasileiro De Geografia Estatística (IBGE) Censo 2000 <http://www.ibge.gov.br>

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

23. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, *et al*. Use of PGM1 Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):902-907.

24. Nonnenmacher B, Pintos J, Bozzetti MC, Mielzinska-Lohnas I, Lorincz AF, Ikuta N, Schwartzmann G, Villa LL, Schiller JT, Franco EL. Epidemiologic correlates of antibody response to human papillomavirus among women at low risk of cervical cancer. *Int J STD AIDS*. 2003;14(4):258-65.

25. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T and Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus human types 16 e 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Med Virol*. 2000;(58)81:2959-2968.

26. Cornelison TL. Human Papillomavirus genotype 16 vaccines for cervical cancer prophylaxis and treatment. *Curr Opin Oncol*. 2000;12(5):466-73.

27. Liaw KAI-LI, Glas AG, Manos MM, *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(11):954-960.
28. Chan PKS, Chang AR, Cheung JOLK, *et al.* Determinants of Cervical Human Papillomavirus Infection: Differences between High- and Low- Oncogenic Risk Types. *J Infec Dis.* 2002;185:28-35.
29. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, *et al.* Population – based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:464-74.
30. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjose S, *et al.* The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer.* 1992;52(5):743-749.
31. Peres L. Genital HPV: Links to cancer, Treatment, and Prevention. *Clin Lab Scien.* 2001;14(3):183-186.
32. Ministério da Saúde Brasil 2004. Editado pelo Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação de Saúde, Núcleo de Comunicação. (Brasília, DF, Brasil, 2004).

Tabela 1: Características da População Estudada (N=1004)

Variável	n (%)
<i>Grupos Etários (em anos)</i>	
≤ 34	323 (32,0%)
≥ 35	681 (68,0%)
<i>Cor da Pele</i>	
Branca	798 (79,5%)
Não Branca	206 (20,5%)
<i>Escolaridade</i>	
Até 1º Grau Completo	604 (60,2%)
≥ 2º Grau	400 (39,8%)
<i>Estado Marital</i>	
Com companheiro fixo	661 (65,8%)
Sem companheiro fixo	343 (34,2%)
<i>Fumantes</i>	
Sim	256 (25,5%)
Não	748 (74,5%)
<i>Sexarca (em anos)</i>	
< 20	674 (67,1%)
≥ 20	330 (32,9%)
<i>Parceiros Sexuais na Vida</i>	
≤ 3	707 (70,4%)
> 3	297 (29,6%)
<i>Paridade</i>	
≤ 2	637 (63,5%)
> 2	367 (36,5%)
<i>Uso de Anticoncepcional Oral</i>	
Sim	785 (78,2%)
Não	219 (21,8%)
<i>História de Condiloma Genital</i>	
Sim	109 (10,9%)
Não	895 (89,1%)

Tabela 2: Distribuição das Variáveis Estudadas de acordo com o Tipo de Papilomavírus Humano (HPV).

Variáveis	HPV (+) (N=309)			HPV (-) (N=695)
	HPV 16 (N=55)	HPV 18 (N=17)	Outros HPVs (N=237)	
Grupos Etários (em anos)				
≤ 34	26 (47,3%)	6 (35,3%)	77 (32,4%)	212 (30,5%)
≥ 35	29 (52,7%)	11 (64,7%)	160 (67,6%)	483 (69,5%)
Cor				
Branca	40 (72,7%)	12 (70,5%)	188 (79,4%)	556 (80,0%)
Não Branca	15 (27,3%)	5 (29,5%)	49 (20,6%)	139 (20,0%)
Escolaridade				
Até 1º Grau Completo	33 (60,0%)	7 (41,2%)	136 (57,4%)	427 (61,4%)
≥ 2º Grau	22 (40,0%)	10 (58,8%)	101 (42,6%)	268 (38,6%)
Estado Marital				
Com Companheiro Fixo	33 (60,0%)	10 (58,8%)	138 (58,2%)	481 (69,3%)
Sem Companheiro Fixo	22 (40,0%)	7 (41,2%)	99 (41,8%)	214 (30,7%)
Fumo				
Sim	19 (34,5%)	8 (47,1%)	57 (24,1%)	176 (25,4%)
Não	36 (65,5%)	9 (52,9%)	180 (75,9%)	519 (74,6%)
Sexarca				
< 20	38 (69,0%)	10 (58,8%)	154 (64,9%)	469 (67,5%)
≥ 20	17 (31,0%)	7 (41,2%)	83 (35,1%)	226 (32,5%)
Parceiros Sexuais na Vida				
≤ 3	33 (60,0%)	12 (70,5%)	152 (64,2%)	509 (73,2%)
> 3	22 (40,0%)	5 (29,5%)	85 (35,8%)	186 (26,8%)
Uso de Anticoncepcional Oral				
Sim	44 (80,0%)	15 (88,3%)	184 (77,6%)	544 (78,3%)
Não	11 (20,0%)	2 (11,7%)	53 (22,4%)	151 (21,7%)
Paridade				
≤ 2	37 (67,3%)	10 (58,8%)	155 (65,4%)	433 (62,3%)
> 2	18 (32,7%)	7 (41,2%)	82 (34,6%)	262 (37,7%)
História de Condiloma Genital				
Sim	8 (14,5%)	2 (11,8%)	30 (12,6%)	68 (9,8%)
Não	47 (85,5%)	15 (88,2%)	207 (87,4%)	627 (90,2%)

Tabela 3: Razões de Chance Ajustadas* e IC 95% da Associação Entre as Variáveis Estudadas e a Presença de HPV 16, 18 e Outros HPVs.

Variáveis	HPV 16	HPV 18	Outros HPVs
	RC(IC95%)*	RC (IC95%)*	RC (IC95%)*
Grupo Etário (em anos)			
≤ 34	2,48 (1,22-5,05)	1,68 (0,49-5,81)	1,17 (0,80-1,70)
≥ 35 (Ref.)	1,0	1,0	1,0
Cor			
Branca (Ref.)	1,0	1,0	1,0
Não Branca	1,55 (0,79-2,99)	2,04 (0,68-6,13)	1,17 (0,80-1,70)
Escolaridade			
Até 1º Grau Completo	1,17 (0,63-2,15)	2,26 (0,76-6,60)	1,10 (0,77-1,50)
≥ 2º Grau (Ref.)	1,0	1,0	1,0
Estado Marital			
Com Companheiro Fixo (Ref.)	1,0	1,0	1,0
Sem Companheiro Fixo	1,32 (0,71-2,46)	1,82 (0,59-5,46)	1,42 (1,10-2,00)
Fumo			
Sim	1,46 (0,79-2,72)	3,57 (1,26-10,10)	1,14 (0,61-1,25)
Não (Ref.)	1,0	1,0	1,0
Sexarca			
< 20	1,71 (0,83-3,50)	1,93 (0,60-6,60)	1,25 (0,87-1,78)
≥ 20 (Ref.)	1,0	1,0	1,0
Parceiros Sexuais na Vida			
≤ 3 (Ref.)	1,0	1,0	1,0
> 3	1,5 (0,79-2,83)	1,15 (0,35-3,82)	1,37 (0,97-1,95)
Uso de Anticoncepcional Oral			
Sim	1,34 (0,63-2,85)	1,89 (0,41-8,70)	1,05 (0,72-1,52)
Não (Ref.)	1,0	1,0	1,0
Paridade			
≤ 2 (Ref.)	1,0	1,0	1,0
> 2	1,10 (0,53-2,13)	1,65 (0,51-2,90)	1,04 (0,68-1,36)

Razão de Chance (RC); Intervalo de Confiança para a RC de 95% (IC95%);

* RC ajustadas para todas as variáveis da tabela.

Figuras do Artigo

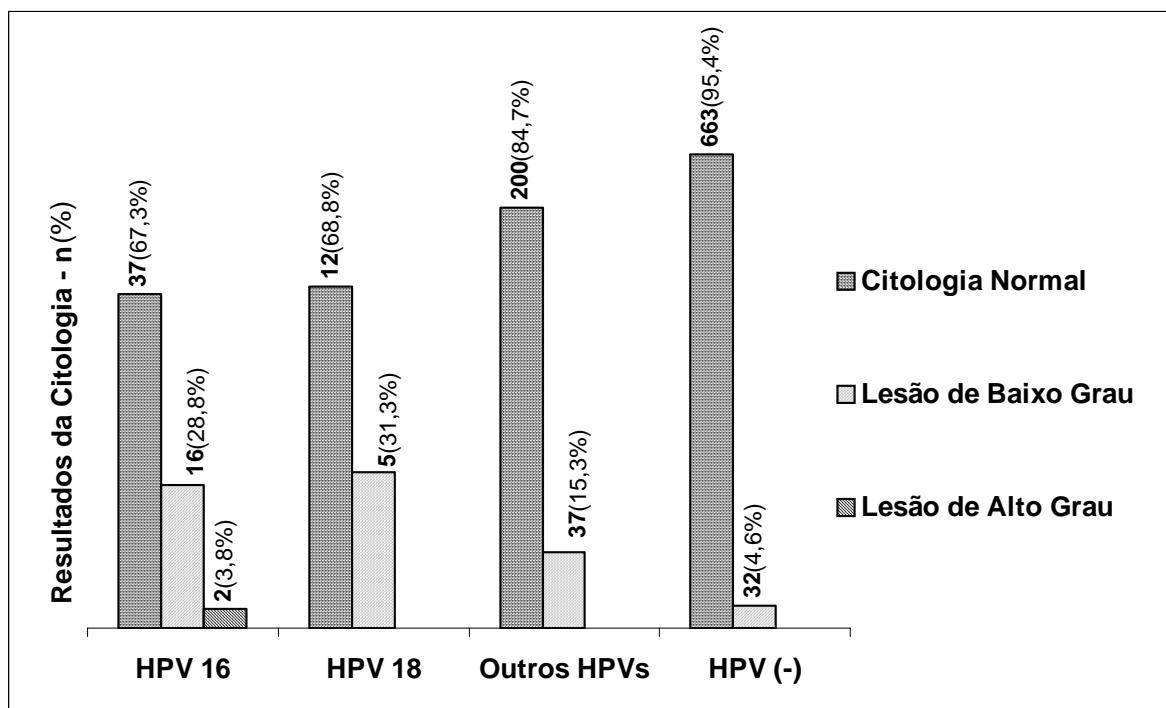


Figura – 2.1 Distribuição dos achados citológicos de acordo com os tipos de HPVs observados

ANEXOS

ANEXO I

OBJETIVOS DO ESTUDO MÃE "DISTRIBUIÇÃO DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO ONCOGÊNICOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM LESÕES DO COLO UTERINO"

1. Verificar a distribuição da infecção por HPV oncogênicos (em especial 16 e 18) em mulheres no nosso meio de acordo com a faixa etária.
2. Descrever a soroprevalência dos HPVs 16 e 18 nesta população de acordo com a faixa etária.
3. Verificar a associação desta infecção com alterações citológicas diagnosticadas por colposcopia e biópsia nestas mulheres.
4. Verificar a presença de variações dos HPVs de sub-tipo 16 e 18 na população estudada e sua relação com o desenvolvimento de lesão cervical.

Os objetivos acima descritos pretendem auxiliar na resposta às seguintes questões:

- 1) Qual a frequência de infecção genital por HPVs oncogênicos em mulheres do nosso meio e como esta frequência se distribui por faixa etária?
- 2) Quais os fatores associados a esta distribuição (culturais, imunológicos, ou outros)?
- 3) Que fatores estão associados ao estado de portador de HPV? Quais fatores de risco para desenvolver a doença são mais observados em nosso meio e qual a importância destes fatores na infecção pelo vírus e na transformação maligna destas lesões?

Nossa expectativa é contribuir para a compreensão do valor desta associação para se distinguir as mulheres que evoluirão para lesões de alto grau ou neoplasia francamente invasiva.

ANEXO II



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO
CEP - GHC
RESOLUÇÃO

Porto Alegre, 15 de janeiro de 2003.

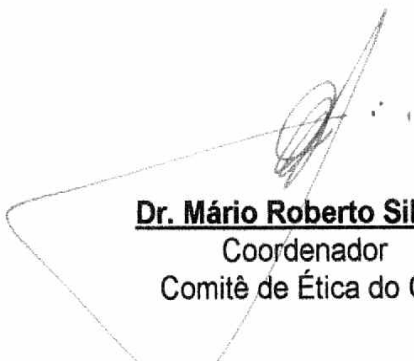
O Comitê de Ética em Pesquisa-CEP-GHC, em reunião ordinária em 15/01/2003 analisou o projeto de pesquisa:

Nº 112/2002

Título: A distribuição de papilomavirus humanos oncogênicos e sua associação com lesões do colo cervical.

Pesquisador (es): Mary Clarisse Bozzetti

Este trabalho, bem como o Termo de Consentimento livre e Esclarecido, no aspecto ético e metodológico, por estarem de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96) obtiveram o parecer **APROVADO**. O autor deverá encaminhar relatórios semestrais sobre o andamento do projeto. Projetos de áreas temáticas especiais não podem ser iniciados sem a aprovação da CONEP. Após conclusão do trabalho, o pesquisador deverá encaminhar relatório final ao Centro de resultados onde foi desenvolvida a pesquisa e ao Comitê de Ética em Pesquisa.


Dr. Mário Roberto Silveira
Coordenador
Comitê de Ética do GHC

ANEXO III

FICHA DE COLETA DE DADOS – QUESTIONÁRIO DE ENTRADA NO ESTUDO

PREVENÇÃO E DETECÇÃO PRECOCE DE CÂNCER DE COLO UTERINO

I. QUESTIONÁRIO DE ENTRADA NO ESTUDO

NOTA: Toda informação será mantida sob estrita confidencialidade. Este questionário será armazenado em arquivos fechados. Seu número de identificação será a única conexão à informação coletada.

QUEST _ _ _ _ _

1. Nome: _____

2. Endereço: _____

3. Telefone de contato: _____

4. Data de nascimento? ___ / ___ / _____ (dd/mm/aaaa)

DNASC: ___ / ___ / _____

5. Data da entrevista? ___ / ___ / _____ (dd/mm/aaaa)

DENT: ___ / ___ / _____

6. Idade: __ (em anos)

IDADE: __

7. Estado marital:

ESTMARIT: _

(1) Casada ou com companheiro fixo há pelo menos 1 ano

(2) Com companheiro há menos de 1 ano (3) Solteira

(4) Divorciada/desquitada (5) Separada

(6) Viúva

8. Ocupação: _____ OCUP: _ _

9. Cor da pele:

(1) branca (2) negra (3) mulata (4) amarela

COR: _

10. Escolaridade:

ESCOLAR: _

(1) analfabeta (2) primeiro grau incompleto

(3) primeiro grau completo (4) segundo grau incompleto

(5) segundo grau completo (6) terceiro grau incompleto

(7) terceiro grau completo (9) ignorado

11. Número de pessoas que residem na casa: _ _

PCASA: _ _

12. Renda da família (anotar a renda em reais) _____

RENDA: _ _

13. Você fuma? (1) Sim (2) Não

FUMO: _

SE A RESPOSTA À QUESTÃO 13 FOR “NÃO” PULE PARA A

QUESTÃO 16

- | | |
|---|-------------|
| 14. Se sim, há quanto tempo? __ (em anos) | TFUMO: __ |
| 15. Se sim, quantos cigarros fuma por dia? __ | CIGDIA: __ |
| 16. Idade da primeira menstruação: __ | MENARCA: __ |
| 17. Seus ciclos menstruais são regulares? _____ (intervalo) | CMENST: _ |
| 18. Você ainda menstrua? (1) Sim (2) Não | MENOP1: _ |

SE A RESPOSTA À QUESTÃO 18 FOR “NÃO” PULE PARA A

QUESTÃO 22

- | | |
|---|-------------|
| 19. Se não, há quanto tempo? __ (em anos) | MENOP2: __ |
| 20. Você faz ou já fez terapia de reposição hormonal?
(1) Sim (2) Não | MENOP3: _ |
| 21. Se sim, por quanto tempo? __ (em anos) | MENOP4: __ |
| 22. Qual a idade da primeira relação sexual: __ | SEXARCA: __ |
| 23. Qual o número de parceiros sexuais no último mês: __ | PARSEX1: __ |
| 24. Qual o número de parceiros sexuais ao longo da vida: __ | PARSEX2: __ |
| 25. Você utiliza ou utilizou algum método anticoncepcional?
(1) Sim (2) Não | ACO1: _ |
| 26. Qual o método anticoncepcional que utiliza ou utilizou?
(1) Anticoncepcional oral; (2) Anticoncepcional injetável;
(3) Condon (camisinha); (4) Diagrama;
(5) “Camisinha” feminina; (6) DIU/Mirena;
(7) Cirúrgico (LT); (8) Tabela; (9) Não sabe;
(10) Não se aplica; (11) Outro: _____ | ACO2: __ |
| 27. Já esteve grávida alguma vez? (1) Sim (2) Não | GESTA1: _ |

SE A RESPOSTA À QUESTÃO 27 FOR “NÃO” PULE PARA A

QUESTÃO 33

- | | |
|--|------------|
| 28. Se sim, quantas vezes? __ | GESTA2: __ |
| 29. Que idade tinha na primeira gestação? | GESTA3: __ |
| 30. Quantos filhos nasceram vivos? | FVIVOS: __ |
| 31. Já teve algum aborto? (1) Sim (2) Não | ABO1: _ |
| 32. Se sim, quantos? __ | ABO2: __ |
| 33. Você já teve/tem alguma das seguintes doenças?
(1) Sim; (2) Não; (9) Não sabe | |
| Condiloma acuminado/Papilomavírus (verrugas genitais): _ | COND: _ |
| AIDS/ HIV positiva: _ | HIV: _ |
| Sífilis: _ | SIFILIS: _ |
| Gonorréia: _ | GONO: _ |
| Candidíase genital: _ | CANDIDA: _ |

- Clamídia genital: _
- Herpes genital: _
- Outra, qual?: _____
34. Se sim, você fez algum tipo de tratamento?
35. Se sim, qual? _____
36. Seu marido ou companheiro já teve alguma das seguintes doenças? Sim; (2) Não; (9) Não sabe
- Condiloma acuminado/Papilomavírus (verrugas genitais): _
- AIDS/ HIV positivo: _
- Sífilis: _
- Gonorréia: _
- Candidíase genital: _
- Clamídia genital: _
- Herpes genital: _
- Outra, qual?: _____
37. Se sim, você fez algum tipo de tratamento?
38. Se sim, qual? _____
39. Você alguma vez já realizou o exame preventivo de colo uterino? (1) Sim; (2) Não; (9) Não sabe
40. Se sim, qual a data do último exame? ___ / ___ (mm/aaaa) DATCP: ___ / ___
41. Você costuma realizar auto-exame de mamas?
- (1) Sim (2) Não
42. Se sim, com que frequência?
- (1) diária; (2) semanal; (3) mensal; (4) Outra: _____
43. Você já teve ou tem alguns dos seguintes problemas de saúde? (1) Sim (2) Não (9) Não sabe
- Doença cardiovascular (HAS, DIC): _
- Lesões pré-invasivas de colo de útero: _
- Doença endócrino-metabólica (diabetes): _
- Doença Respiratória (asma, dpoc): _
- Doença psiquiátrica (depressão): _
- Câncer ginecológico: _
- Outro tipo de câncer: _
44. Se sim, você faz algum tipo de tratamento para o seu problema de saúde? (1) Sim (2) Não
45. Se sim, qual o tratamento? _____
46. Alguém na sua família (lado materno ou paterno) tem ou teve algum dos seguintes problemas de saúde?
- (1) Sim (2) Não (9) Não sabe
- Doença cardiovascular (HAS, DIC): _
- Lesões pré-invasivas de colo de útero: _
- Doença endócrino-metabólica (diabetes): _
- Doença Respiratória (asma, dpoc): _
- Doença psiquiátrica (depressão): _
- Câncer ginecológico: _
- CLAMIDIA: _
- HERPES: _
- OUTDST: _
- TRAT1: _
- TRAT2: _
- CONDM: _
- HIVM: _
- SIFILISM: _
- GONOM: _
- CANDIDAM: _
- CLAMIDIAM: _
- HERPESM: _
- OUTDSTM: _
- TRATM1: _
- TRATM2: _
- CP1: _
- MAMA1: _
- MAMA2: _
- HDCV: _
- HLPCU: _
- HDEM: _
- HDR: _
- HDP: _
- HCAG: _
- HC: _
- TRATPS1: _
- TRATPS2: _
- HFDCV: _
- HFLPCU: _
- HFDEM: _
- HFDR: _
- HFDP: _
- HFCAG: _

- Outro tipo de câncer: _____
- AIDS(HIV positivo): _____
47. Se sim, faz algum tipo de tratamento para o este problema de saúde? (1) Sim (2) Não
48. Se sim, qual o tratamento? _____
49. História de óbito na família nos últimos cinco anos?
(1) Sim (2) Não (3) Não sabe
50. Se sim, qual a idade da pessoa que foi ao óbito: __ (anos)
51. Se sim, qual a causa da morte? _____
- HFC: _____
HFAIDS: _____
TRATPSF1: _____
TRATPSF2: _____
ÓBITOF: _____
OBFIDAD: _____
CAUSAOFB: _____

OBSERVAÇÕES DO ENTREVISTADOR:

PREVENÇÃO E DETECÇÃO PRECOCE DE CÂNCER DE COLO UTERINO

II. QUESTIONÁRIO DE DADOS DO EXAME E COLETA DE MATERIAL

NOTA: Toda informação será mantida sob estrita confidencialidade. Este questionário será armazenado em arquivos fechados. Seu número de identificação será a única conexão à informação coletada.

QUEST _____

1. Nome: _____
2. Foram realizados os seguintes exames na participante do estudo:
Coleta para exame cito-patológico da cérvix uterina (CP):
(1) Sim (2) Não, porque? _____
Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? _____

Resultado do CP? _____ CP: ____

(1) Normal; (2) AGUS; (3) ASCUS
(4) NIC 1; (5) NIC 2; (6) NIC 3;
(7) Ca in situ; (8) Ca invasivo; (9) Outro: _____

Coleta de material para PCR (PCR):
(1) Sim (2) Não, porque? _____
Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? _____

Resultado da PCR (HPV-DNA)? _____ HPV DNA: ____

(1) Positiva (2) Negativa
Se positiva, qual o tipo de HPV identificado? _____ **THPV:** ____

Coleta de sangue para a sorologia p/HPV(SORO):
(1) Sim (2) Não, porque? _____
Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? _____

Resultado da sorologia para o HPV? _____ SOROHPV: ____

(1) Positiva (2) Negativa

Foi indicado colposcopia?

(1) Sim (data: _____) (2) Não

Foi realizada colposcopia?

(1) Sim (data: _____) (2) Não, porque?

Resultados da colposcopia?

COLPO: _

(1) Anormal com realização de biópsia;

(2) Anormal sem realização de biópsia (porque? _____)

(3) Normal

ANEXO IV

TERMO DE CONSETIMENTO INFORMADO

Título do Projeto: A Distribuição de Papilomavírus Oncogênicos e Sua Associação Com Lesões do Colo Uterino

Protocolo nº: _____

Financiamento: CAPES-PROF (UFRGS); FIPE/HCPA; FAPERGS; LACEN/RS

Apoio: GSC/GHC

Investigador Principal: Dra. Mary Clarisse Bozzetti

A infecção genital pelo Papilomavírus Humano é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns. É causada pelo vírus conhecido como Papilomavírus Humano ou HPV. Este vírus é o principal agente causador do câncer de colo de útero. Pelo fato deste ser um câncer bastante comum entre as mulheres em nosso meio e, embora possa ser diagnosticado precocemente e as mulheres curadas, ele ainda é responsável por um grande número de mortes entre as mulheres em nosso meio. Por isso, a busca de métodos para um diagnóstico mais precoce e mais acessível à toda população têm sido tema de muitas pesquisas.

Nós planejamos um estudo que tem como principal enfoque a identificação e o acompanhamento de mulheres portadoras do HPV bem como de outras lesões associadas presentes no colo uterino. Por isso estamos convidando-a a fazer parte deste estudo, cujos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios estão descritos a seguir.

Objetivos do estudo:

O presente estudo tem como objetivos verificar a presença e distribuição de acordo com a idade dos tipos de HPV que estão mais associados ao câncer de colo de útero. A presença deste vírus será estudada em material coletado no colo uterino e no sangue. A identificação da presença deste vírus, a detecção de uma proteína chamada P16, presente em células com HPV ativo e o acompanhamento das mulheres que participarão do estudo permitirá entender melhor porque algumas mulheres evoluem para lesões de colo de útero de alto grau ou mesmo câncer.

Procedimentos:

As mulheres que concordarem em participar do estudo serão inicialmente entrevistadas para responder algumas questões relacionadas à sua saúde, após será realizado um exame ginecológico no qual será coletado, através do uso de uma escova especial para este exame, material da parte externa e do canal do colo uterino. Deste material será realizado exame

citológico, (preventivo do câncer de colo de útero) e material para investigar a presença do HPV.

As mulheres que tiverem o exame citológico alterado e/ou que tiverem a presença do HPV ao exame serão encaminhadas para a realização de uma colposcopia, que um exame semelhante ao exame ginecológico, onde se observa o colo do útero com lente de aumento. Se neste exame for constatada a presença de alguma lesão no colo do útero, será realizada uma biópsia desta lesão, que significa retirar um pequeno fragmento da lesão e encaminhar para um exame mais minucioso, chamado exame histopatológico e também, neste mesmo fragmento será estudado se existe alguma alteração na proteína P16.

Também será coletado nas mulheres que concordarem em participar do estudo, 20 ml de sangue. Deste sangue será isolado o soro, que será congelado e posteriormente será feita a verificação da presença do HPV.

As mulheres participantes do estudo serão acompanhadas de acordo com os resultados dos exames mencionados acima. A frequência de visitas médicas poderá ser no mínimo semestral e no máximo anual. Sendo que os procedimentos em cada consulta serão os mesmos descritos acima.

Riscos e Desconfortos:

Os riscos e desconfortos às participantes deste estudo são aqueles associados aos procedimentos descritos acima, ou seja, a coleta de material para o exame citológico e para o HPV poderá, de modo pouco freqüente, causar um pequeno sangramento local, que cessará espontaneamente. Para as mulheres que necessitarem a realização de biópsia, poderá também ocorrer um pequeno sangramento com melhora espontânea e eventualmente poderá haver um pouco de dor local, também passageira. A coleta de sangue é de uma quantidade pequena (20 ml) e por isso dificilmente causará algum mal-estar geral (1 em cada 1000 pessoas), no entanto poderá haver dor no local da coleta e eventualmente um pequeno hematoma. Os demais procedimentos serão feitos em material já coletado e congelado para posterior exame e por isso não causarão desconfortos às participantes do estudo.

Benefícios:

Os benefícios diretos do estudo às participantes serão: estas terão a oportunidade de serem identificadas com lesões pré-cancerosas do colo de útero e tratadas antes da evolução destas lesões; aquelas que forem positivas a algum tipo de HPV de alto risco para o câncer de colo uterino e que não tiverem lesões aparentes serão acompanhadas com uma frequência maior visando acompanhar e tratar as possíveis lesões que se desenvolverem.

Como benefício indireto estas mulheres estarão contribuindo com informações fundamentais para ampliar o conhecimento desta doença e de sua evolução (prognóstico) para o conhecimento científico, já que está é uma doença altamente prevenível e curável se detectada precocemente e que, no entanto ainda está entre as causas de morte por câncer mais comum entre as mulheres, especialmente em nosso meio.

Compensação financeira:

Não haverá nenhum pagamento às mulheres que concordarem em participar do estudo, bem como as participantes do estudo não terão nenhum custo adicional relacionado aos procedimentos e às visitas médicas.

Confidencialidade:

Toda a informação que será fornecida pelas participantes do estudo e os resultados advindos dos procedimentos realizados será considerada confidencial e será somente conhecida da equipe envolvida no estudo. Todos os questionários e materiais coletados serão identificados através de um código criado na entrada do estudo, este código será a única identificação utilizada no banco de dados do estudo que será utilizado para análise dos dados e divulgação dos mesmos no meio científico.

Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo:

Este termo de consentimento explica de forma clara o estudo que estamos propondo e convidando as mulheres a participar, no entanto se houver alguma dúvida estas serão esclarecidas pela equipe do estudo, através da Dra. Mary Clarisse Bozzetti em qualquer momento do estudo pelo telefone 3333 8779.

Em caso de danos:

Se a participante do estudo acha que teve algum problema de saúde relacionado com a sua participação no estudo ou se tem alguma pergunta sobre os cuidados médicos que necessita esta deverá contatar a coordenadora do estudo Dra. Mary Clarisse Bozzetti pelo seguinte telefone: 33338779.

Se houver algum dano à sua saúde resultante de sua participação, receberá os cuidados médicos necessários sem custos adicionais. Não haverá, no entanto, compensação financeira, apenas atendimento médico e hospitalar quando indicado.

Participação voluntária:

A participação de cada mulher no estudo é voluntária, ou seja, que não quiser participar do estudo estará livre para fazê-lo sem que haja qualquer perda no atendimento de seus problemas de saúde a que tem direito.

Se concordar em participar do estudo e mudar de idéia durante o decorrer do mesmo, estará livre para fazê-lo, e da mesma forma não sofrerá perdas relacionadas ao atendimento a que tem direito para seus problemas de saúde.

O Significado de Sua Assinatura:

A sua assinatura abaixo significa que você entendeu a informação que lhe foi fornecida sobre o estudo e sobre este termo de consentimento. Se você assinar este documento significa que você concorda em participar do estudo.

VOCÊ RECEBERÁ UMA CÓPIA DESTE TERMO DE CONSENTIMENTO

carimbo do estudo



Assinatura da paciente e/ou responsável (se menores de 18 anos) Data:

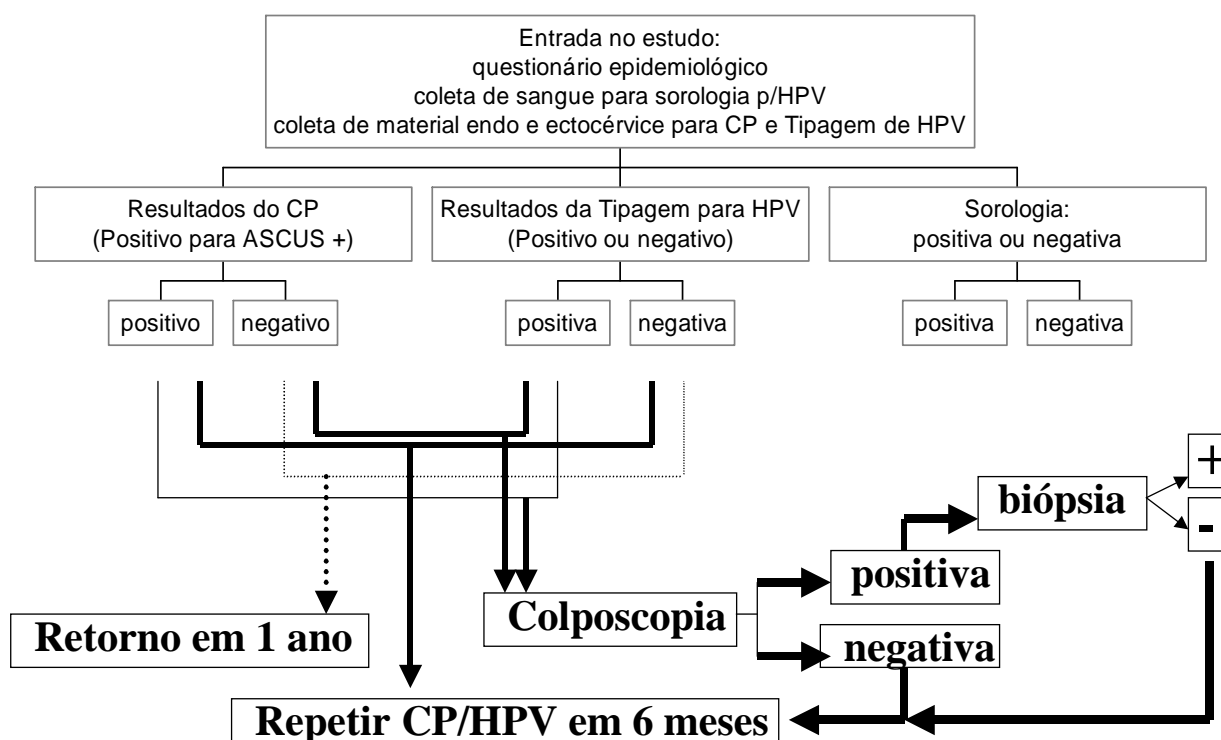
Assinatura da pessoa que obteve o consentimento Data:

Assinatura do coordenador do estudo Data:

Coordenadora
Dr^a Mary Clarisse Bozzetti
Rua Ramiro Barcelos 2600, 4º andar Sala 417 D
Bairro Santana, Porto Alegre CEP 90035-003
Fone: 51-33301380

Responsável pelo Projeto
Marilda Tereza Mar da Rosa
Rua Victor Matheus Teixeira 3685
Nova Restinga Porto Alegre CEP 91790-540
Fone: 51-32502389

ANEXO V

Fluxograma de seguimento das participantes do estudo

ANEXO VI

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS E ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO, DECORRENTES DO PRESENTE ESTUDO.

1 - 6º Congresso Brasileiro de Medicina de Família & Comunidade e 6º Congresso de Medicina Familiar, Região Conesul CIMF/WONCA, Rio de Janeiro de 3 a 6 de abril 2004, *Co-infecção Cérvico Vaginais de Chlamidia trachomatis e Papilomavirus Humano: Resultado de um estudo de coorte.*

2 - VI Congresso Brasileiro de Epidemiologia Recife PE de 19 a 23 de junho de 2004, *Co-infecção Cérvico Vaginais de Chlamidia trachomatis e Papilomavirus Humano: Resultado de um estudo de coorte.*

3 - 38º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial Exposição Técnico-Científica, Florianópolis – SC, 22 a 25 de setembro de 2004, *Co-infecção Cérvico Vaginais de Chlamidia trachomatis e Papilomavirus Humano: Resultado de um estudo de coorte.*

4 - V Salão de Iniciação Científica, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do sul Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Porto Alegre – RS de 27 a 29 de outubro de 2004, *Comparação da Detecção de DNA do Papilomavírus Humano (HPV) por PCR, através de Primes Consenso e Específicos para HPV-16 em amostras cervicais.*

5 – 2º Congresso de Infectologia do Conesul. De 02 a 04 de dezembro de 2004. Centro de Convenções Rebouças São Paulo – Brasil. *Incidência da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres do Serviço de Atenção Primária do Grupo Hospitalar Conceição (GHC), Porto Alegre – Brasil: Resultados preliminares de um estudo de coorte.*(Revista Panamericana de Infectologia)

ANEXO VII**PROJETO DE PESQUISA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**

Curso de Mestrado

**FREQÜÊNCIA DE HPVS ONCOGÊNICOS TIPOS 16 E 18 E
SUA ASSOCIAÇÃO COM FATORES DE RISCO E LESÕES
DO COLO UTERINO EM UMA POPULAÇÃO DE MULHERES
DE PORTO ALEGRE**

Marilda Tereza Mar da Rosa

Prof^ª. Dr^ª. Mary Clarisse Bozzetti

Porto Alegre, 2005

INTRODUÇÃO

As infecções genitais causadas pelo Papilomavírus Humano (HPV) são disseminadas e ocorrem em todo o mundo (1). Seu perfil epidemiológico é de uma doença relacionada à atividade sexual sendo a doença sexualmente transmissível (DST) viral mais freqüente na população sexualmente ativa (2).

Ultimamente tem se observado uma grande elevação na incidência de lesões condilomatosas virais anogenitais em homens e mulheres. Os HPVs infectam a pele e a membrana das mucosas e podem induzir a formação de tumores malignos e benignos; grandes estudos epidemiológicos revelam que as infecções por certos tipos de HPVs são importantes fatores de risco para o câncer cervical (1). O aumento da infecção pelo papilomavírus humano (HPV), simula aspectos de um curso epidêmico, e parece não estar sendo adequadamente controlado por medidas profiláticas.

Durante a década de 80, estudos (1, 2) sugeriram que infecções subclínicas cervicais estariam associadas com pacientes jovens, múltiplos parceiros, gravidez e história anterior de verrugas genitais. Além da atividade sexual, no entanto, outras variáveis podem influenciar o risco de adquirir infecção por HPV, como multiparidade, uso de anticoncepcionais orais e tabagismo (1, 2). Os papilomavírus pertencem à família Papillomaviridae e são classificados de acordo com seu potencial oncogênico, como de baixo risco (subtipos 6, 11, 42, 43 e 44), e de alto risco (subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) (3).

Em geral, HPVs de baixo risco estão relacionados com tumores benignos e lesões cutâneas leves, enquanto que, HPVs de alto risco estão diretamente associados com neoplasias intraepiteliais que podem progredir para câncer de colo de útero e carcinomas anogenitais (4). O câncer de colo uterino é a segunda neoplasia maligna que mais acomete as mulheres sendo superado somente pelo câncer de mama. Atualmente nenhuma evidência indica que os tratamentos disponíveis no momento erradicam ou afetam a história natural das infecções pelos papilomavírus e nenhum dos tratamentos é superior aos outros, ou seja, cada caso deverá ser avaliado tomando a conduta mais adequada (5).

Na tentativa de conhecer a frequência de HPVs oncogênicos na população de mulheres de uma área geográfica da zona norte de Porto Alegre e de verificar a associação destes vírus com fatores de risco e com lesões observadas no colo uterino planejou-se este estudo, esperando que os achados possam contribuir para um melhor entendimento da elevada morbidade e mortalidade do câncer de colo uterino em nosso meio, já que esta é uma neoplasia com elevado potencial de prevenção e de cura se detectado precocemente(6).

1. Formas de Transmissão e Epidemiologia do HPV

A principal via de transmissão do Papiloma Vírus Humano (HPV) é a sexual tanto em homens como mulheres, dependendo do tipo de HPV e das lesões clínicas associadas a ele, os HPVs são transmitidos também por contato da pele, ou perinatal (1). O contato por um longo período com um parceiro não necessariamente ocorrerá transmissão, existindo uma alta prevalência de HPV cervical entre indivíduos que tenham tido dois ou três parceiros sexuais em um curto período de tempo (1).

As infecções clínicas mais comuns ocorrem nas regiões genitais e são facilmente transmitidas. São as verrugas genitais ou condilomas acuminados, popularmente conhecidas como “crista de galo”. Já as lesões subclínicas não apresentam qualquer sintomatologia, podendo progredir para o câncer do colo do útero caso não sejam tratadas precocemente (7).

Segundo Franco *et al.*, o poder aquisitivo e o acesso aos serviços de saúde podem ser o determinante pelo qual as taxas de sobreviventes esta doença diferem substancialmente entre mulheres brancas e negras nos Estados Unidos (6).

O status sócio-econômico e o nível educacional da população tendem a ter um efeito positivo no risco do câncer cervical através de alterações de alguns conhecidos fatores de risco tais como: idade ao se casar, partos e comportamento de busca dos cuidados com a saúde (6). Além da presença do HPV, outros fatores de risco epidemiológicos vêm sendo apontados na gênese desta neoplasia, tais como: história prévia de múltiplos parceiros sexuais, idade precoce de primeira relação sexual e raça (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15).

Estudos têm comprovado que HPVs oncogênicos são um fator causal no desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais invasivas (16, 17). Infecções com HPV de alto risco estão associadas no desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas (SIL) e progridem para lesões intraepiteliais de alto grau (HGSIL) (18). Neste estudo em uma população de 7932 mulheres observamos que 1214 mulheres, isto é 15% apresentaram infecção por HPV de alto risco no primeiro exame (19).

Estudo realizado por Kjaer *et al.* (17) em mulheres com atividade sexual ativa mostram que a infecção pelo HPV genital é geralmente decorrente da transmissão sexual (20). Estudos (21, 22) agora são consistentes com estes achados, assim o número de parceiros sexuais seria um dos mais importantes fatores de riscos associados com a presença do HPV-DNA.

Entretanto a transmissão não sexual não pode ser totalmente descartada, pois estudos (23, 24) têm relatado transmissão perinatal de HPV de mãe para a criança, a presença de HPV DNA no pênis de recém nascidos como também na mucosa oral de crianças saudáveis em idade pré-escolar. Em recente estudo (25) com virgens mostrou uma baixa ou nenhuma taxa de DNA HPV positivo nestas, assim a possibilidade de transmissão não sexual permanece baixa. Este estudo (20) mostrou que todas as mulheres que permaneceram virgens através do estudo continuaram sendo DNA HPV negativo, isto sustenta fortemente a idéia que o HPV é transmitido sexualmente.

O desenvolvimento do câncer cervical e sua associação aos tipos oncogênicos do HPV está bem documentada, sendo a infecção pelos tipos oncogênicos de HPV um dos maiores fatores de risco para o câncer cervical (26, 27, 28, 29, 30).

Estudos sugere que o HPV 16 e o HPV 18 estão associados com os tipos de carcinoma mais agressivos e são preferencialmente encontrados em adenocarcinomas (31). Mais de 100 tipos diferentes de HPV já foram reconhecidos, sendo mais ou menos 35 tipos encontrados no trato genital, sabendo-se que mais ou menos 30 desses são transmitidos através de contato sexual e podem infectar os órgãos genitais, a pele do pênis, vulva, lábios, ânus ou tecidos que recobrem a vagina e o cérvix (17, 32, 33). Os HPVs 16 e 18 são mais frequentemente relacionados a tumores invasivos, denominados, portanto de alto risco. Estudos sugerem que a infecção aguda pelos subtipos 16 e 18 de HPV possa levar a um risco adicional de desenvolvimento rápido para neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (18, 34).

Segundo Touzé *et al.* (2001), pelo menos 50% de adultos com atividade sexual tiveram infecção genital por HPV. Estudos (35, 36, 37) indicam que infecções com tipos oncogênicos de HPV são na maioria transitórias e somente uma pequena proporção daqueles

infectados se tornam portadores e então desenvolvem Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). Os tipos de HPV mais comuns associados com câncer cervical em todo mundo são HPV 16, seguido pelo HPV 18 (36).

Aproximadamente 20 tipos de HPV estão associados ao câncer cervical, porém o HPV 16 é o mais freqüentemente encontrado em carcinomas cervicais e neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) no mundo todo (1) (Figura 1).

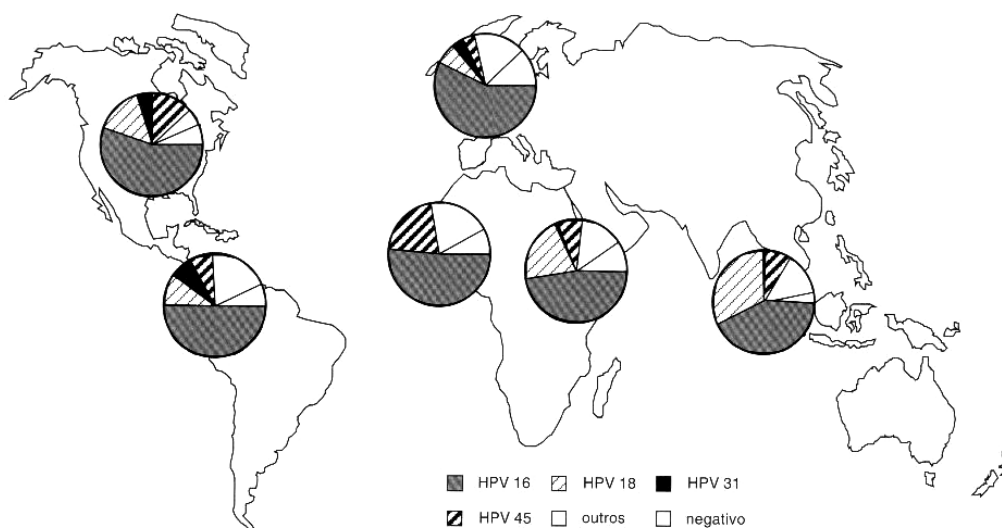


Figura 1. Distribuição mundial dos tipos de HPV em cânceres cervicais invasivos (GROSS & BARRASSO, 1999).

2. Câncer Cervical

O câncer é o resultado de um acúmulo de eventos que interferem nas funções essenciais da célula, processo este que pode durar longos períodos de tempo (16). Os HPVs são conhecidos como causadores de tumores, tanto benignos (verrugas cutâneas e mucosas, papilomas), quanto malignos, como os carcinomas cutâneos e os que afetam mucosas, principalmente nas regiões anogenitais e no trato aéreo-digestivo superior (39).

Observa-se, porém, que os tipos mais comumente associados aos tumores benignos são diferentes daqueles encontrados nas lesões malignas (carcinomas). Dentre os carcinomas malignos, o mais importante, sem dúvida, é o câncer cervical, pois é o que mais atinge mulheres em todo o mundo. Há uma estimativa de que 500.000 novos casos de câncer

cervical invasivo são diagnosticados em todo mundo a cada ano, representando aproximadamente 10% de todos os cânceres em mulheres e que 50% das mulheres com diagnóstico da doença eventualmente morrem devido à mesma (1).

O câncer cervical atinge o sétimo lugar em morbidade entre a população total e o segundo entre mulheres, precedido apenas pelo câncer de mama. Em países desenvolvidos o câncer cervical foi a mais freqüente doença neoplásica entre mulheres até o começo dos anos 90, quando o câncer de mama se tornou predominante (6).

Algumas evidências mostram que a prevalência de HPV é alta em grupos de mulheres com idades mais jovens comparada com grupos de mulheres com mais idade (40).

A progressão tumoral desde a infecção de células normais por HPV também parece estar sujeita a fatores ambientais, como carcinógenos químicos presentes no cigarro e em outros produtos do tabaco; ou restritos ao hospedeiro, tais como hormônios, resposta imune, herança genética, hábitos sexuais do parceiro entre outros. Portanto papilomavírus de determinados tipos, deficiência imunológica e outros co-fatores, provavelmente, participam de forma combinada no processo de múltiplas etapas que é a oncogênese do câncer do colo do útero (7).

De acordo com dados absolutos sobre a incidência e mortalidade por câncer do Instituto sobre a incidência e mortalidade por câncer do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de colo de útero foi responsável pela morte de 3,953 mulheres no Brasil em 2000. Para 2003, as Estimativas sobre Incidência e mortalidade por Câncer prevêem 16.480 novos casos e 4.110 óbitos (41).

3. O HPV

3.1. Biologia Molecular do Vírus HPV

A característica mais específica do HPV é que na maioria dos tumores benignos, o genoma viral é preservado como DNA episossomal (não integrado ao genoma hospedeiro).

O vírus tem aproximadamente 5.5 nm de diâmetros, e possui um capsídeo de 72 capsômeros. O DNA viral dupla fita e circular, tem 8.000 pares de bases (pb), e compreende três regiões, conhecidas como região precoce (*early region*), região tardia (*late region*) e região controladora *Long Control Region* (LCR) (42).

O genoma possui oito regiões conhecidas como ORFs (*Open Reading Frames*), uma série de proteínas precoces funcionais codificadas pelos genes *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*, na região precoce, e que estão envolvidas no controle da replicação e transcrição virais durante o estado episossomal, e duas proteínas tardias que compõem o capsídeo viral (*L1* e *L2*) (42). A *LCR*, que possui a origem de replicação, situa-se entre *L1* e *E6*, em uma região de 500 a 1000 pb, representando cerca de 10% do genoma viral total (43). (Figura 2).

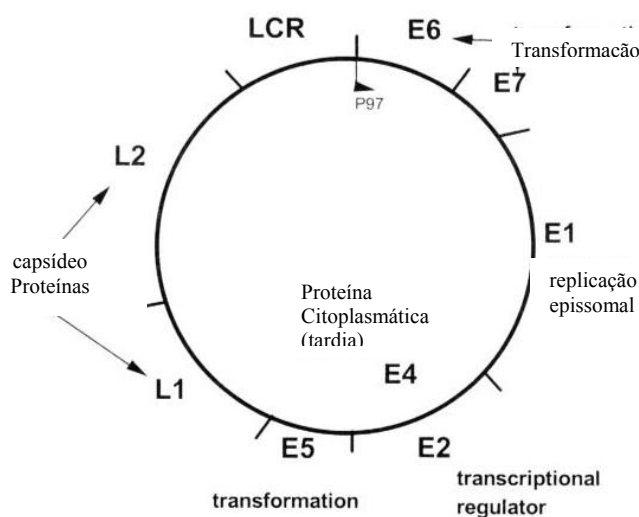


Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV. A posição dos genes precoces (E), tardios (L) e da região não traduzida (UTR) está indicada (HOWLEY, P.M, 1996).

Estudos recentes mostraram que as proteínas virais E6 e E7 exercem funções importantes na oncogenicidade, ou seja, na formação de tumores. Temos como exemplo, a

oncoproteína E7 interagindo com pRB (proteína retinoblastoma), uma proteína celular, produto do gene do retinoblastoma, que realiza uma importante função na regulação negativa do ciclo celular. Quando o E7 interage com pRB, a célula progride para a próxima etapa do ciclo celular, pois ocorre a liberação do fator de transcrição E2F (da fase G1 do ciclo celular) que estava complexado a pRB, passando a estimular a expressão de uma série de genes envolvidos na proliferação celular (44). Este processo é adicionalmente perturbado pela proteína E6 dos HPVs de alto risco, por sua ligação à p53, que termina com sua degradação (45).

A eliminação deste controle de proliferação e reparo do DNA celular provoca o acúmulo de mutações nas células que expressam tais oncoproteínas, resultando em um fenótipo alterado. Acredita-se, portanto, que o potencial oncogênico destes vírus seja, em parte, devido a essas interações. Isso é comprovado porque as mesmas proteínas E6 e E7 de HPVs de baixo risco, não realizam estas interações (45).

Considerando-se que os HPVs de alto risco podem causar instabilidade genética na célula hospedeira devido à integração no genoma celular, os acúmulos de mutações e aneuploidias, freqüentemente observadas em lesões neoplásicas de alto grau, também podem contribuir para que a proteína E6 atue sobre a ativação de telomerasas celulares, impedindo que as mesmas exerçam sua função no controle do envelhecimento e morte celulares, tornando imortais as células infectadas por estes HPVs (46).

3.2. Ciclo Fisiopatológico do HPV

Uma verruga ou tumoração benigna é a manifestação patológica da infecção por HPV. Essas manifestações às vezes progridem para uma condição maligna, portanto, o HPV é um bom modelo para o estudo da progressão de tumores (47).

A maior parte das evidências de que o HPV é um agente etiológico do câncer humano envolve a sua detecção em tumores. Outras evidências que sustentam a idéia da oncogenicidade do HPV provêm de experimentos moleculares e celulares que mostram as capacidades de transformação do vírus. Os estudos iniciais sobre transformação

demonstraram que a inserção de um genoma completo de HPV-16 induzia transformação maligna em fibroblastos de roedores. Da mesma forma, a transfecção de DNA de HPV 16 ou 18 em células epiteliais humanas do colo uterino e em queratinócitos de prepúcio neonatal, conferia imortalização às células, mas não sendo assim com o DNA de HPV do tipo 6 de baixo risco. O evento da transformação parece ser específico da célula hospedeira, assim como dependente do tipo de HPV (44). Diversos estudos têm mostrado que as ORFs (“Open Reading Frames”) de E6 e E7 são necessárias para a transformação de células humanas, mas apenas quando provenientes de HPVs dos tipos 16 e 18; já E6 e E7 de HPVs dos tipos 6 e 11 foram pouco ou nada transformadores (46).

A proteína E6 dos HPVs tipos 16 e 18, mas não a dos HPVs tipos 6 ou 11, ligam-se ao produto do gene p53 supressor de tumores e promove a sua degeneração. Acredita-se que a degeneração da proteína p53 resulte no bloqueio das respostas celulares aos danos sofridos pelo DNA, permitindo assim a acumulação de alterações genéticas e a criação de um genótipo maligno (47). Essas características únicas de transformação do genoma de HPV foram definidas em maior profundidade em nível molecular. O genoma viral normalmente está integrado aos cromossomos de células hospedeiras nas linhagens celulares do carcinoma no colo uterino, mas nas lesões benignas esse genoma encontra-se na forma de episomas extracromossômicos. O local da integração viral comumente está na ORF de E2 ou próximo dela, a qual regula a manifestação de E6 e E7. Com perda da regulação, E6 e E7 podem fornecer às células um fenótipo maligno (46).

O HPV é um organismo exclusivamente intracelular que infecta as células mitoticamente ativas para se estabelecer no epitélio. Isto explica porque tanto carcinomas escamosos como glandulares se originam na junção escamocolunares e dentro da zona de transformação, pois nesse local há acesso imediato às células basais e parabasais do epitélio metaplásico.

Quando o vírus infecta uma célula pode ocorrer infecção latente, na qual o DNA exposto reside no núcleo, a replicação viral fica adjunta ao ciclo celular, e as células infectadas têm aparência normal. Essa infecção latente pode converter-se em infecção ativa por mecanismos ainda desconhecidos. Sabe-se, no entanto, que a imunodepressão fisiológica

(gravidez) ou patológica (AIDS) pode levar à infecção, ou volta ao estágio inicial com a recuperação da imunidade. A infecção latente só pode ser detectada através de estudos moleculares (2).

Quando se inicia um estado replicativo, poucos vírus são encontrados nas células basais e parabasais, mas o número de partículas virais (VLPs) aumenta progressivamente quando o processo de maturação celular ocorre, até que, na superfície epitelial, o núcleo é substituído em grande parte pelas partículas do virion completo (17).

Após a exposição ao HPV, iniciam-se os eventos do ciclo viral, com a atividade específica coordenado por fatores que regulam a resposta imune do hospedeiro.

Existem vários estágios diferentes de interação célula-vírus. O primeiro é a fase de incubação, que dura de duas semanas a oito meses (média de três meses). Esse é o período no qual se estabelece a infecção epissômica, com a interação célula-vírus, sendo regulada por fatores como tabagismo, deficiência do sistema imune ou predisposição genética. O vírus, inicialmente age como um plasmídeo extracromossômico auto-replicante – *episoma*. Estes, a cada divisão mitótica da célula hospedeira, também serão replicados (48).

A infecção epissômica pode ocorrer com a inoculação em locais de microtraumas, permitindo que os virions penetrem a camada basal e descartem o seu capsídeo protéico externo. Já a infecção viral pode permanecer sem manifestação ativa da doença nas células basais provavelmente na maior parte das pessoas expostas ao HPV. A doença ativamente revelada resultará numa expressão morfológica em células escamosas diferenciadas. Quando isto ocorre, há uma fase de proliferação ativa que dura de três a seis meses. Durante esta fase, a estimulação das células hospedeiras leva à alteração pronunciada no crescimento da camada basal, replicação viral nas camadas médias e efeitos citopáticos virais nas células superficiais (17) (Figura 3).

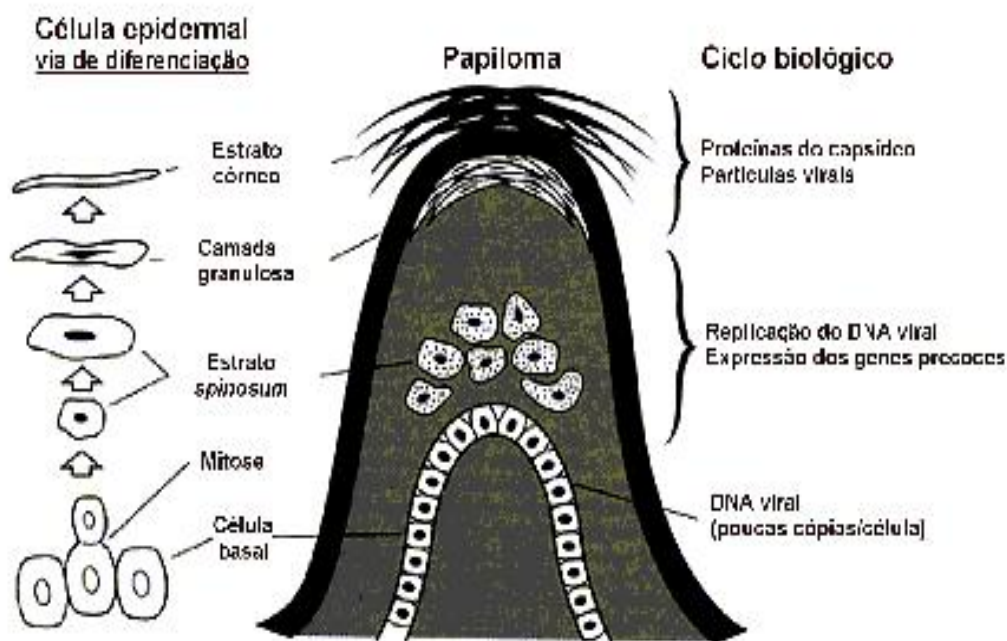


Figura 3. Fase de proliferação de células infectadas por HPV e formação do papiloma (BOSCH, FX *et al.*, 1995).

Estas alterações podem se manifestar como doença óbvia ou campos subclínicos de acetobranqueamento que contém graus variados de neoplasia ou formação de papilomas macroscopicamente aparentes. A expressão ativa ao longo prazo da doença (como por exemplo, condilomas ou neoplasia) após a exposição ao HPV é a exceção, e não é tido como regra (49).

Após a resposta imune à infecção por HPV, inicia-se a fase tardia, com duração de três a seis meses; nesta fase, pelo menos 80% das mulheres infectadas permanecerão em estado de remissão clínica, mas poderão apresentar infecção persistente ou latente por HPV. A maioria das lesões tende a regredir espontaneamente pela resposta do sistema imunológico do hospedeiro, porém, não é possível prever nos casos de infecção por vírus de alto risco, para qual estado a infecção progredirá (44).

3.3. Manifestações Clínicas

A mais comum manifestação clínica associada ao HPV é o condiloma acuminado (excrescência papilar única ou múltipla). Em princípio, a infecção por HPV pode ser classificada como clínica subclínica e latente. Em uma manifestação clínica, percebe-se espontaneamente as lesões, sem maiores dificuldades. Os condilomas acuminados (papilomas, verrugas) dos órgãos genitais externos em geral são pequenas neofomações sésseis, papilares, múltiplas, cobertas por epitélio queratinoso e raramente atingem o colo uterino. nesta forma as lesões podem ser únicas ou múltiplas, localizadas ou difusas e de tamanho variável. No homem, em geral ocorrem lesões na glande, sulco bálano-prepucial e região perianal e, na mulher, vulva, períneo, região perianal, vagina e colo.

Na forma subclínica, a infecção no colo uterino e nos genitais masculinos é a mais freqüente; esta infecção pode estar associada à neoplasia intra-epitelial e é diagnosticada com o uso do colposcópico após aplicação de ácido acético a 5%.

E na forma latente é feito o diagnóstico através da hibridização do DNA em indivíduos com tecidos clínicos e colposcopicamente normais; portanto, esta forma refere-se aos casos em que, na ausência de evidências clínicas, colposcópica, citológica e histológica de lesão, sejam identificadas seqüências de DNA de HPV com técnicas de hibridização molecular (50, 51).

3.4. Diagnóstico da Infecção pelo HPV

A infecção por alguns tipos de papilomavírus humano tem sido reconhecida como carcinogênica para o colo uterino. Através da utilização de técnicas moleculares (PCR e captura híbrida II) HPVs de alto risco têm sido encontrados em proporções bem elevadas em mulheres com câncer invasivo e lesões pré-invasivas de alto grau (52). Por outro lado, a prevalência é baixa em mulheres citologicamente normais, exceto em mulheres jovens, que parecem ter uma alta incidência de infecções transitórias nos anos subsequentes ao início da atividade sexual. Alguns estudos demonstram o importante papel na presença e persistência

de tipos de HPV de alto risco na progressão de lesões pré-invasivas de baixo grau versus lesões de alto grau ao invés de regressão espontânea. Por essas razões, a tipagem do HPV tem sido sugerida como uma possível ferramenta de triagem primária (53).

Existem muitos métodos para detectar a infecção por HPV. Estes podem ser classificados em *indiretos* (citologia e histologia, colposcopia, e sorologia) e *diretos* (microscopia eletrônica, detecção do DNA por hibridização) (1).

3.4.1. Métodos Indiretos

3.4.2. Exame Cito-patológico (Papanicolaou)

Considerado um exame trabalhoso e complexo, este depende exclusivamente de um profissional treinado e cuidadoso. O encontro de alterações citológicas, mesmo que pequenas, deve ser atentamente valorizado pelo clínico. Porém, em alguns casos, não há descrição de um quadro citológico definido; estes casos, geralmente, são enquadrados como ASCUS (atipia escamosa de significado indeterminado) ou AGUS (atipia glandular de significado indeterminado). Estatísticas mundiais mostram que em média 10% das pacientes com alterações citológicas indeterminadas irão desenvolver lesões intra-epiteliais de alto grau. Portanto, é importante que estas pacientes sejam encaminhadas ao acompanhamento médico (clínico e colposcópico), com biópsia e possível curetagem do canal endocervical (54).

As células infectadas pelo HPV exibem alterações variadas, vistas em esfregaços e biópsias e são denominadas de coilócitos (células com região perinuclear límpida e citoplasma denso que foram descritas primeiramente por Papanicolaou em 1933) (1). Além dessas alterações, as mudanças podem ser observadas na forma e no tamanho celular e na distribuição da cromatina nuclear (1).

Os coilócitos estão presentes nas infecções por HPV onde as partículas virais se encontram em processo de agrupamento, e normalmente são encontrados em lesões clinicamente aparentes. A imunohistoquímica pode detectar o revestimento protéico das

partículas virais que se encontram nessas lesões. Ao contrário, as displasias de alto grau e os carcinomas invasivos carecem de coilócitos, o DNA de HPV pode estar presente nessas lesões, mas a atividade de transcriptase talvez não resulte na produção de vírions, que são detectáveis através de microscopia de luz ou imunohistoquímica (1).

3.4.3. Exame Colposcópico

A colposcopia é um método de grande ajuda e de ampla aceitação mundial para o diagnóstico de pacientes com citologia anormal. A sua prática requer um treinamento adequado e uma análise constante de sua qualidade.

A colposcopia surgiu no ano de 1925, quando Hans Hinselmaan, um ginecologista alemão desenvolveu uma nova técnica para o diagnóstico do câncer do colo de útero. Com um microscópio de baixo poder, pode visualizar a cérvix com um melhor aumento. A aplicação deste método se desenvolveu de maneira lenta e durante muitos anos, a colposcopia e a citologia esfoliativa se consideraram competitivas no diagnóstico da displasia cervical. Somente em algumas décadas, observou-se a importância do conjunto destas duas técnicas, pois a citologia e a colposcopia são métodos complementares para o estudo das NICs (55)

Uma das muitas vantagens da colposcopia é diminuir o uso das conizações das cérvix. Porém, é importante ressaltar que entre 15% e 20% das citologias anormais, a colposcopia não é suficientemente capaz de estabelecer um diagnóstico preciso e, portanto, necessita da citologia (55).

3.4.4. Sorologia

As dificuldades enfrentadas com sorologia para HPV no passado associavam-se a reações cruzadas entre HPV e diversidade de lesões, pois a expressão do HPV na camada superficial do epitélio apresentava poucas células imunocompetentes de antígenos virais ocasionando uma fraca resposta sorológica. Distintos esforços feitos em décadas anteriores

tentaram desenvolver ensaios sorológicos mais específicos e sensíveis, usando proteínas fusionadas e peptídeos sintéticos, porém não apresentaram resultados eficazes devido a sua escassez de sensibilidade e especificidade. Somente nos últimos anos e, principalmente devido ao advento dos virus-like particles (VLP), que ensaios sensitivos e específicos tornaram-se disponíveis (56).

Pode-se dizer que o diagnóstico da infecção pelo HPV através de testes sorológicos tem tido avanços significativos nestes últimos anos, mas ainda encontra-se dificuldade na compreensão da resposta humoral do HPV (57).

Mesmo assim 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 de colo uterino (10, 58, 59).

Estudo (60) mostra que a baixa sensibilidade de VLP-ELISA para HPV-16 pode limitar a utilidade do ELISA como um teste diagnóstico para infecção do HPV-16. Entretanto parece ter especificidade adequada e deveria ser útil como um marcador epidemiológico da infecção por HPV-16 e comportamento sexual. Por isso a avaliações de soroprevalência para HPV em populações com diferentes riscos de infecções por HPV e doenças associadas, serão importantes para fortalecer a utilidade de ensaios VLPs/ELISA em maiores estudos clínicos e epidemiológicos (60).

A avaliação da resposta imune humoral ao HPV pode ser muito útil na monitorização de soro conversão em programas experimentais envolvendo o desenvolvimento de vacinas contra o HPV, na tentativa de prevenir o câncer do colo uterino e outras neoplasias relacionadas ao HPV (61).

3.4.5. Métodos Diretos

Os avanços na biologia molecular, nos últimos 20 anos, têm ampliado muito o conhecimento sobre a infecção por HIV e a carcinogênese viral. O domínio das técnicas

biológicas moleculares usadas na detecção do HPV é necessário para qualquer discussão sobre as malignidades associadas ao HPV, já que cada técnica apresenta características únicas com impacto significativo na sensibilidade e especificidade da mesma. As diferenças de sensibilidade/especificidade, assim como as contaminações entre as várias metodologias de detecção, têm por vezes, dificultado a determinação da associação entre o HPV e os tipos de câncer humano.

O método ideal de detecção do HPV deve se basear na presença de DNA de HPV, já que o vírus não precisa estar intacto para induzir doença. A utilidade clínica desses métodos ainda precisa ser determinada, mas seu uso em pesquisas básicas é crucial (62).

3.4.6. Hibridização por Southern Blotting

Várias técnicas baseadas nas propriedades de hibridação dos ácidos nucleicos foram desenvolvidas visando a triagem e isolamento de seqüências específicas do DNA e RNA. A maioria destas técnicas trabalha com uma réplica do DNA de interesse imobilizado num suporte sólido tal como uma membrana de náilon ou de nitrocelulose. Um destes métodos, desenvolvido na década de 70 por EM.Southern tornou-se conhecida como Southern blotting (63)

Nesta técnica, o DNA é digerido com uma ou mais enzimas de restrição e os fragmentos resultantes separados por eletroforese em um gel de agarose. Os fragmentos de DNA dupla fita são visualizados por coloração com brometo de etídio, desnaturados *in situ* com hidróxido de sódio e transferidos para uma membrana de nitrocelulose ou de náilon, com o auxílio de uma solução de alta concentração salina (49). Tais condições permitem que o DNA seja retido no suporte sólido, no ponto de contato entre o gel e a membrana, criando, portanto, uma réplica do gel. O DNA é covalentemente ligado à membrana usando-se calor ou luz ultravioleta. Sondas de ácidos nucleicos (DNA ou RNA marcados radioativamente) podem ser utilizadas para hibridar com o DNA fixado na membrana e a posição na qual a ligação específica ocorre pode ser detectada por auto-radiografia da membrana. O padrão de

hibridação pode ser comparado diretamente com a região no gel original que contém a seqüência de DNA de interesse.

A detecção molecular inicial de DNA de HPV foi efetuada através do uso de técnicas de hibridização de ácido nucléico. Esse foi o método original de primeira escolha para a detecção de DNA de HPV, sendo considerado o *padrão ouro*, devido o seu elevado grau de especificidade e sensibilidade. Esse método permite uma diferenciação precisa dos diferentes tipos de HPV (1).

Porém, o seu elevado custo e laboriosidade fazem que este método não seja utilizado na rotina.

3.4.7. Hibridização *in situ* (HIS)

A hibridização *in situ* é uma técnica baseada na detecção de pequenos segmentos de DNA ou RNA a partir de "sondas" específicas. Sondas são seqüências de nucleotídeos complementares desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos do DNA ou RNA à seqüência que se deseja identificar. Com esta técnica, é possível identificar DNA de HPV nas células. Entretanto, a sensibilidade do exame é menor com essa técnica porque o DNA do espécime está presente apenas em pequenas quantidades em cada célula (63, 64).

Para permitir a visualização da reação entre as moléculas de DNA ou RNA em estudo e as sondas, estas podem ser associadas a moléculas radioativas, fluorescentes ou biotiniladas.

A hibridização *in situ* é uma técnica mais sensível que a imuno-histoquímica, porém inferior à reação em cadeia da polimerase (PCR). A HIS é utilizada principalmente para a detecção de vírus (ex. diversos tipos de HPV, vírus de Epstein-Barr, vírus da hepatite B e de outros agentes infecciosos em tecidos suspeitos de infecção, além de cromossomos e produtos da síntese celular). Pode ser realizada em material fixado em formol e incluído em parafina, bem como congelado ou preparados citológicos (65).

3.4.8. Captura Híbrida

A Captura Híbrida é um teste sensível capaz de detectar diversos agentes infecciosos, como o papilomavírus humano - HPV, o vírus da hepatite B, Citomegalovírus (CMV), *Herpes simplex* vírus, *Chlamydia trachomatis*, HIV e *Neisseria gonorrhoea* (gonorréia). O teste de captura híbrida II (Digene Brasil) detecta os 18 tipos mais comuns de vírus do papiloma humano (HPV) que infectam o trato anogenital, determinando com exatidão a presença ou não de DNA de vírus dos grupos de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44), e de alto risco (16, 18, 31, 32, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68). A Captura Híbrida é um sofisticado teste de hibridização molecular, com amplificação do sinal dos híbridos formados, que são detectados através de reação enzima-substrato e leitura por quimioluminescência (66).

Estudos demonstram que a sensibilidade do exame de captura híbrida II (1.0 pg/ml DNA-HPV ou 0,1 cópias/célula) é muito superior à apresentada pela hibridização molecular *in situ* (300 cópias/célula) e é similar àquela de outros testes mais demorados, que utilizam radioisótopos ou que manipulam o DNA, como a PCR além de ser superior ao seu antecessor, a captura híbrida I (67, 68).

A utilização clínica do teste de captura híbrida II é controversa. Alguns autores defendem seu emprego como teste de triagem em mulheres com diagnóstico cito-patológico de *ASCUS* células escamosas atípicas de significado indeterminado ou lesões intra-epiteliais de baixo grau do colo uterino (69).

Por outro lado, outros cientistas reconhecem a precisão do método, mas sugerem que ainda é cedo para uma definição de estratégia de triagem e recomendam a detecção do HPV como método de pesquisa.

O exame é realizado a partir de material coletado da área suspeita de infecção utilizando-se *kit* apropriado, fornecido pelo laboratório. O *kit* é composto de um escova e um tubo plástico contendo uma solução ácida que digere qualquer outra estrutura (células, proteínas, gorduras, etc.) que não seja DNA ou RNA e fragmenta a molécula de DNA em curtas seqüências de bases nitrogenadas para facilitar a hibridização.

Este teste compreende diversas etapas: a) desnaturação do material para análise, liberando ambas as fitas do DNA; b) reação com sonda de RNA específica para o agente infeccioso pesquisado, formando híbridos RNA/DNA; c) captura desses híbridos por anticorpos monoclonais, com formação de complexos imobilizados na parede do tubo (microplaca) utilizado para o exame; d) adição de anticorpo anticomplexo anticorpo-RNA-DNA conjugado à enzima fosfatase alcalina; e) detecção por quimioluminescência ultrasensível. Esse avanço tecnológico possibilitou desenvolver um teste de fácil realização, podendo o resultado ser conhecido em curto tempo e baixo custo (67).

3.4.9. PCR (Polymerase Chain Reaction)

A reação em cadeia da polimerase (PCR), foi desenvolvida em 1985 e desde então vem causando um profundo impacto na biologia molecular, permitindo aos pesquisadores maior facilidade na busca de DNA de HPV. A PCR é uma reação enzimática que resulta na amplificação de material genético “in vitro”.

A reação consiste de uma etapa de aquecimento em temperaturas elevadas, que provoca a desnaturação do DNA, seguida de resfriamento que leva ao pareamento específico de dois segmentos pequenos de DNA (*primers*) ao gene de interesse permitindo que uma enzima (a DNA polimerase) sintetize novos fragmentos de DNA. Quantidades muito pequenas de DNA podem ser amplificadas de forma altamente sensível e específica através de incubação na presença de uma série de reagentes que serão submetidos a diferentes temperaturas, de forma repetitiva, até se obter o produto final amplificado.

Ao final de 25 a 40 ciclos repetidos, são gerados bilhões de cópias do material genético em estudo. Este é um processo extremamente rápido, eficiente, e atualmente automatizado, podendo fornecer resultados em algumas horas. A visualização do material amplificado é feita por eletroforese em gel de agarose e a comparação com controles adequados e marcadores de tamanho permite sua identificação precisa.

Para uma identificação precisa do HPV foram necessários diferentes estudos descrevendo uma variedade de *primers* e procedimentos de PCR, cada um desses variando em sensibilidade e especificidade (49). Para a detecção de um ou poucos tipos de HPV, os métodos se tornam mais sensíveis quando a amplificação é realizada com *primers* específicos. Essa estratégia é também utilizada para a confirmação de resultados de amplificações com *primers consensus* ou genéricos em uma segunda amplificação por PCR. A amplificação com *primers consensus* permite detectar um amplo espectro de genótipos de HPV, bem como identificar novos tipos virais (1). Diferentes conjuntos de *primers consensus* foram desenhados e construídos para este propósito; entre eles: MY09/MY11, OBI/II, CPI/CPII e GP5+/6+ (70). Os *primers* MY09/MY11 e GP5+/6+ amplificam fragmentos de DNA correspondentes à seqüência da ORF de L1 do genoma do HPV, conservada entre os diferentes genótipos (49), sendo que os produtos de amplificação obtidos com os *primers* MY09/MY11, são correspondentes a fragmentos de 450 pb (70).

Atualmente, a detecção molecular do HPV é principalmente utilizada em pesquisa de laboratório e não faz parte do processo de decisão clínico. Entretanto, à medida que os resultados se tornem mais aceitos, as técnicas moleculares serão de grande importância no diagnóstico e tratamento de doenças relacionadas com o HPV.

RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Por ser o HPV um agente infeccioso causador de lesões passíveis de evolução maligna no colo do útero, o conhecimento da presença dos subtipos oncogênicos mais frequentes e suas variações, bem como essa frequência se distribui por faixa etária e os fatores associados a essa distribuição (culturais, imunológicos e outros), serão de grande importância para futuros programas de vacinação e prevenção do HPV.

Estudos relatam a importância de se conhecer a relação entre HPVs oncogênicos principalmente 16 e 18 e o risco de lesões neoplásicas cervicais na tentativa identificar grupos que se beneficiariam com um rastreamento mais frequente. A identificação dos grupos de HPV dos quais são mais comumente associados com câncer cervical em diferentes regiões

tem implicações para estratégias de prevenção do câncer, incluindo o efetivo desenvolvimento de vacinas (71).

A prevenção primária do câncer cervical pode ser atingida através de detecção e controle da infecção pelo HPV genital. Estratégias de prevenção em saúde orientam para uma mudança no comportamento sexual que pode ser efetivo como forma de evitar a infecção pelo HPV genital (6).

OBJETIVOS

Geral

Conhecer a frequência de HPVs oncogênicos, verificar as características associadas à presença deste vírus e sua relação com lesões do colo uterino em mulheres residentes na área geográfica de atendimento da Unidade de Atenção Primária em Saúde Jardim Leopoldina localizada na Zona Norte de Porto Alegre/RS.

Específicos

Descrever a frequência de HPV na população estudada, em especial dos tipos oncogênicos 16 e 18.

Relacionar as características demográficas, reprodutivas e de comportamento sexual com a presença de HPV na população do estudo, em especial os tipos 16 e 18.

Verificar a associação entre diagnóstico molecular de HPVs 16 e 18 com outros achados clínicos (citologia e colposcopia).

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento

Este é um estudo transversal envolvendo mulheres de uma área populacional atendida por uma unidade de atenção primária do Serviço de Saúde Comunitária do Grupo Hospitalar Conceição (SSCGHC), localizada na Zona Norte de Porto Alegre.

A população do estudo será originária da Unidade de Atenção Primária Jardim Leopoldina. Esta unidade foi instalada nessa comunidade durante os anos 90 e se localiza no bairro Jardim Leopoldina. Existem aproximadamente 7000 mulheres adultas residindo nesta área (informações do banco de dados do IBGE censo de 2000).

Amostra e Amostragem

Serão convidadas a participarem do estudo, mulheres que buscarem atendimento na Unidade Jardim Leopoldina, que preencherem os critérios de elegibilidade e concordarem em participar do estudo. Para ser elegível a mulher deve pertencer à área geográfica da unidade acima descrita, possuir prontuário na Unidade referida, ter iniciado vida sexual, não ter história prévia de câncer cervical e não ter sido hysterectomizada. Embora o estudo de coorte preveja uma amostra de 1004 mulheres, para este estudo que envolve a caracterização dos sub-tipos 16, 18 e outros HPVs.

VARIÁVEIS DO ESTUDO

Desfecho principal:

- diagnóstico molecular HPV 16 e 18.
- diagnóstico molecular de outros tipos oncogênicos de HPV.

Variáveis independentes:

- características demográficas;
- morbidades pregressas;
- história da vida reprodutiva;
- comportamento sexual;
- diagnóstico citológico e histológico da cérvix uterina;
- diagnóstico colposcópico da cérvix uterina;

PROCEDIMENTOS

Após serem arroladas, as participantes respondem a um questionário epidemiológico padronizado e são encaminhadas para o exame ginecológico onde será coletado material para citologia convencional e teste do HPV-DNA através do método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Extração de DNA das amostras clínicas e Pesquisa de DNA de HPV por PCR:

As amostras para a pesquisa de DNA de papilomavírus humano serão coletadas utilizando escova do tipo “cytobrush”, estocadas à temperatura de -20°C em 2ml de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 8,5; 1mM EDTA) ou PBS (phosphate-buffered saline pH 7,4) até a extração do DNA. O transporte das amostras será realizado em condições de baixas temperaturas.

Após descongelamento, as amostras serão centrifugadas a 5.200 rpm, sob refrigeração, e o sedimento ressuspensionado em tampão TE num volume final de 500µL. Após esse tratamento, uma alíquota correspondente a 100µL da amostra será tratada com 100µL de Proteinase K/TE-50 (200 µg/mL de proteinase K 'DNase/RNA free' Gibco, 2% Tween 20, 1mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,5) e incubados por 18 h a 37°C. Após inativação a 94°C durante 10 minutos, as amostras desproteinizadas serão submetidas a uma amplificação por PCR, utilizando-se *primers consensus* MY09/MY11 com os seguintes oligonucleotídeos degenerados, complementares à região L1 do genoma viral do papilomavírus humano (70, 72).

- My 09 5' .. CGT CC^A/_C AA^A/_G GGA ^A/_TAC TGA TC .. 3'
- My 11 5' .. GC^A/_C CAG GG^A/_T CAT AA^C/_T AAT GG .. 3'

As reações serão realizadas em volume final de 50µL, contendo 2,5U da enzima Taq DNA polimerase, primers na concentração de 150 pMol/µL cada; 5µL de tampão de reação 10X contendo 100 mM de Tris-HCl pH 8,3, 500 mM de KCl, 0,2% de gelatina e 30 mM de MgCl₂, 4µL de dNTPs com 0,2 mM de cada nucleotídeo, DNA e H₂O q.s.p 50µL.

As condições para amplificação em aparelho termociclador MJ Research PTC 96:

- 95°C durante 13 minutos para desnaturação.
- 40 ciclos subsequentes de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min, para amplificação.
- 72°C por 5 min, para extensão final.
- 4°C para estoque dos produtos amplificados.

Os produtos de PCR serão analisados em géis de agarose 2,0%, em tampão TBE, contendo 0,5µ/ml de brometo de etídio e sob luz ultravioleta. Para tipagem de HPV 16 e 18 serão utilizados primers específicos para estes subtipos. Em todas as amostras testadas será utilizado um par de primers complementares ao gene da beta globina humana como controle interno da reação.

O diagnóstico molecular do HPV e identificação dos subtipos específicos 16 e 18 da amostra de mulheres positivas para o HPV será realizado através do método da PCR no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT)IPB/LACEN-FEPPS/RS.

As mulheres com resultados positivos ao DNA do HPV, (estimativa de 500 mulheres), serão acompanhadas com frequência semestral para verificar as presenças de alterações citológicas do colo uterino e sua evolução na tentativa de relaciona-las com os HPV's oncogênicos, em especial os tipos 16 e 18.

Todas as amostras de mulheres HPV-DNA positivas serão estratificadas em dois grupos: uma amostra de mulheres com HPV/DNA tipos 16 e 18, uma com os demais tipos de HPV. Uma amostra de mulheres HPV negativas (de igual tamanho ou maior – até 3:1 se necessário) será utilizada para comparar os achados.

As participantes do estudo que apresentarem alterações no exame clínico e ou citológico realizarão colposcopia e biopsia de colo uterino quando indicado.

As lâminas com esfregaço para citologia e as biopsias serão processadas e analisadas junto ao laboratório de patologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição. Serão indicadas para colposcopia as participantes do estudo que apresentarem achados citológicos (ASCUS ou +) e/ou forem HPV-DNA positivas (Anexo V).

As mulheres que forem diagnosticadas com alterações citológicas que necessitem tratamento imediato (NIC II, III, câncer in situ, câncer invasor) serão encaminhadas para o Serviço de Ginecologia do Hospital Conceição (HC) ou Hospital Fêmeina (ambos do Grupo Hospitalar Conceição) para realizar os procedimentos indicados e retornarão para a rotina de acompanhamento ambulatorial após liberação hospitalar. As alterações citológicas do tipo “atípias de células escamosas de significância indeterminada” (ASCUS) ou neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau (NIC I) terão vigilância semestral para acompanhamento da lesão.

As pacientes que apresentarem sinais de lesão cervical na colposcopia serão submetidas à biopsia. As amostras biopsiadas serão também avaliadas e comparadas.

A coleta de dados epidemiológicos (variáveis demográficas, de vida reprodutiva, de comportamento sexual e morbidades progressas) será realizada através de um questionário

padronizado e por entrevistadores treinados quando da entrada das participantes no estudo (Anexo III).

Toda a coleta estará sob a responsabilidade e supervisão da pesquisadora principal e coordenadora do projeto e alunos do programa de pós-graduação envolvidos no estudo. A coleta de dados ocorrerá junto à Unidade Jardim Leopoldina e será realizada em um dia da semana (sexta-feira: manhã e tarde) em um consultório especificamente designado pela chefia da unidade para este fim.

O período de coleta para atingir a totalidade da amostra proposta é de 18 meses, com início na segunda quinzena de fevereiro de 2003. Caso o número previsto para o estudo não seja atingido neste período existe a possibilidade de prorrogar o período da coleta em até 3 meses, de acordo com a disponibilidade da unidade de saúde.

O banco de dados será elaborado no programa EPI INFO versão 2002. Os bolsistas envolvidos no projeto serão responsáveis pela elaboração do mesmo e supervisionados pelos alunos de pós-graduação envolvidos no estudo. Para o controle de qualidade de entrada dos dados será feita conferência sistemática dos dados até então digitados com o questionário original de uma amostra aleatória de 20% dos registros.

Para o controle de qualidade de entrada dos dados será feita conferência sistemática dos dados até então digitados com o questionário original de uma amostra aleatória de 20% dos registros.

As variáveis para análise serão as inclusas no instrumento de coleta e outras que poderão ser criadas a partir do banco de dados. Todas as análises serão realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS (versão 10.0).

ANÁLISE DOS DADOS:

Descrição da frequência de HPV, em especial dos HPV's 16 e 18 (global e por faixa-etária)

Análise uni/bivariada:

Teste do qui-quadrado (ou exato de Fisher se indicado) para comparar as variáveis categóricas com a presença ou ausência do desfecho.

Teste t de student (ou não paramétrico correspondente) para comparar as variáveis contínuas com a presença ou não do desfecho.

Odds Ratios:

A Odds Ratio será calculada para as análises uni/bivariadas e multivariadas (regressão logística) com seu correspondente intervalo de confiança de 95%.

Os critérios de seleção das variáveis para o modelo de regressão logística não condicional envolverão a significância estatística na análise uni/bivariada e/ou a relevância clínico-epidemiológica da variável mediante o conhecimento vigente.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição em 15 de janeiro de 2003, protocolo número 112/2002.

RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS

Estima-se que 15% das amostras de HPV positivo sejam do tipo 16 e 5% do tipo 18 e que 10 a 20% da amostra tenha alteração citológica ao exame convencional. Logo, estima-se que a amostra será significativa para análise de associação entre tipos de HPV e tipos de lesão cervical.

Além disso, o conhecimento da distribuição dos subtipos oncogênicos mais frequentes e suas variações poderá ter um impacto importante sobre a implementação de futuros programas de vacinação para este vírus.

RISCOS E DIFICULDADES

Cuidado especial deverá ser tomado para que a quantidade de material para análise molecular, em especial para os do subtipo de HPV 16 e 18 seja suficiente para o processamento das técnicas. Como o estudo será realizado em mulheres de uma população geograficamente definida, com registro na unidade de atenção primária e de fácil acesso acredita-se que este risco bem como uma possível perda de seguimento seja bastante minimizada.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo apresenta um benefício direto para as participantes que é a identificação de uma infecção genital viral que as discrimina em alto e baixo risco para a possibilidade de desenvolvimento de câncer cervical, permitindo que entre em um programa de rastreamento mais freqüente e com maior possibilidade de identificar alterações pré-malignas as quais podem ser eliminadas pela detecção e tratamento precoces. O benefício indireto é a contribuição do estudo para o conhecimento científico nesta área, envolvendo um importante problema de saúde pública em nosso meio.

Os riscos envolvidos no estudo envolvem os riscos inerentes ao procedimento de coleta de material cervical (dor discreta, ocasional, pequeno sangramento pós-exame em especial se for realizada biópsia, e ardência no momento do exame de inspeção do colo a olho nu e pela colposcopia). Outro risco que poderia estar presente seria criar ansiedade naquele grupo de mulheres que apresentarem anormalidades que coloquem-nas em grupo de alto risco para a neoplasia em questão, porém como o objetivo do rastreamento é, não só prevenção,

como também detecção precoce de lesões pré-malignas a possibilidade de eliminar a provável causa da ansiedade é bastante elevada, evitando sofrimento futuro.

A todas as mulheres elegíveis para o estudo serão dadas informações detalhadas sobre o estudo, incluindo risco e benefício, e as que concordarem em participar assinaram um termo de consentimento pós-informação (anexo IV).

EQUIPE DE PESQUISA

Coordenador: Prof^a Dr^a Mary Clarisse Bozzetti

Pesquisadores colaboradores: Dr^a Elizabeth Herrera, Dr. Alexandre da Silva Aguiar, Dr^a Daniela Montano Wilhelms, Dr^a Adriana Rosa, Dr. Eduardo Lahude Lima, Dr^a Cléia Bertinetti Bandeira.

Alunas de pós-graduação (mestrado/doutorado): Marilda Tereza Mar da Rosa, Luciane Calil Mylius, Cristine Igansi e Lídia Medeiros

Bolsistas de iniciação científica: 5(cinco) já selecionados (2 CNPq; 1 FAPERGS e 2 voluntários).

Serviços Colaboradores:

- Serviço de Patologia do GHC (citologia e histologia).
- Laboratório do Centro de Pesquisas do HCPA.
- Serviço de Patologia do HCP (gene p16).
- Serviço de ginecologia do GHC (colposcopia e tratamento).
- Gerencia de saúde Comunitária do GHC.
- Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CDCT-IPB-LACEN/FEPPS/RS (PCR).
- Unidade Jardim Leopoldina /SSC/GHC (participantes do estudo).
- Coordenação do programa da Mulher /SSC/GHC.

FINANCIAMENTOS

O estudo dispõe:

- Verba parcial para realização de algumas etapas do estudo fornecido pela Fundação de Auxílio à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (valor: R\$ 4.000,00).
- Verba para a realização do método PCR de edital da SSMA/RS (valor: R\$ 6.000,00).
- Verba CAPES/PROF: PPG Clínica Médica (valor: R\$ 3.000,00); PPG Epidemiologia (valor: R\$ 3.000,00).
- Verba FIPE/HCPA: verba para realização de imuno-histoquímica para P16 (R\$4.000,00).
- Verba CNPQ/Edital 2003; valor R\$ 20.000,00
- Dispõem de 2 bolsas PIBIC/CNPq, 1 bolsa BIC/PROPESQ e 1 bolsa Produtividade em Pesquisa/CNPq.

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

<i>Mês</i>	<i>Ano</i>	<i>Atividade</i>
Julho/Dezembro	2002	- Elaboração do projeto. - Contato com profissionais da unidade de saúde.
Janeiro	2003	- Detalhamento junto à unidade sobre a execução do projeto e divulgação junto à comunidade. - Encaminhamento do projeto à comissão de ética em pesquisa do HNSC
Janeiro/Fevereiro	2003	- Adequação dos instrumentos de coleta. - Estudo piloto. - Início da coleta de dados. - Elaboração do banco de dados.
Fevereiro/Dezembro Janeiro/agosto	2003 2004	- Coleta de dados. - Armazenamento sistemático do material coletado para estudo a -20°C (simultâneo à coleta). - Armazenamento sistemático dos dados no banco.
Abril/Junho	2004	- Análise parcial dos dados. - Processamento das amostras (análise sorológica e PCR para HPV-DNA) e acompanhamento das participantes conforme protocolo do estudo. Retorno dos dados à unidade de saúde e à população.
Julho/Novembro	2004	- Análise completa dos dados. - Relatório dos achados do estudo.
Dezembro Janeiro/Fevereiro	2004 2005	- Divulgação dos dados junto à unidade e à população. - Revisão final e defesa de mestrado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia/UFRGS. - Redação de manuscrito para publicação.

ORÇAMENTO TOTAL DO ESTUDO

7.1. Material de Consumo:	US\$ (23/07) (US\$ 1,00 = R\$ 2,48)
<u>7.1.1. Etapa inicial do estudo (primeiros 2 anos)</u>	
1. 2050 lâminas e lamínulas	1779,4 (unid.:0,868)
2. Luvas p/coleta do citológico (4000)	1936,0 (unid.:0,484)
3. 14 caixas para armazen. de lâminas (150 p/caixa)	347,20 (unid.:24,80)
4. 10 pctes. de papel A4 para questionários e Manual de instruções (pctes c/500)	99,20 (pcte.:9,92)
5. 800 tubos plásticos c/tampa para armazenamento sangue (40 ml) (unid. c/25)	5404,16(unid:168,88)
6. 800 seringas (50 ml) para coleta de sangue	1584,00 (unid: 1,98)
7. 23 kits captura híbrida II p/ 2000 testes p/HPV (alto risco)	23875,61(u.:1038,07)
8. 2250 coletores p/captura híbrida	3172,5 (u.:1,41)
9. 430 tubos para coleta material cervical p/PCR	3039,8(unid:168,88)
10. Reagentes p/a citologia	1674,00 (u.:0,670)
11.Containers para armazenamento e envio do material p/captura híbrida	200,00
Total item 7.1.1	42,911,71
<u>7.1.2. Segunda Etapa do estudo (últimos 3 anos)</u>	
1. Material para o teste sorológico (ELISA):	
- a)30 placas <i>microtiter</i> (96 orifícios) cx. c/5	558,00(cx.: 93,00)
- b)Carbonato (tampão)	54,00
- c)VLPs (HPV 16 e 18) (p/reação antg/antic)	4500,00
- d)PBS	28,00
- e)IgG anti-humana (horseradish peroxidase-conjugated goat F(ab') ₂)	225,80
- f)leite em pó a 0,5%	35,00
- g)substrato ABTS	38,50
2. 430 escovas endocervicais	632,10 (unid.:1,47)
3. Material p/PCR	
- DNTPs (oligonucleotídios)	270,00 (100µl:54,0)
- Taq DNA polimerase (10X)	48,00 (unid.: 24,00)
- MgCl ₂	33,40
- proteinase K	150,00(5m- 75,00)
- brometo de etidio	144,00 (5ml-72,00)
- primers p/HPV 16 e 18	1663,00
- Agarose 1%	64,00
- Ponteiras 1-~□I (c/1000)	72,58 (cx.: 18.14)

Total item 7.1.2	8516,38
7.2. Outro material	
Postagem p/remessa material p/laboratório DIGENE em São Paulo	992,00 (10 remes.)
Total item 7.2	992,00
7.3. Recursos Humanos	
1. Bolsistas de iniciação científica (3)	--
2. Leitura Cito/histopatologistas	--
3. Diagnóstico Colposcópico	--
Total geral (exceto item 7.3)	52420,09

Observações:

Verbas de pesquisa já disponíveis p/ itens (total:7196,00)

7.1.1: itens 3, 4, 5

7.1.2.: itens 1a,b,d,f,g; 2

Verbas absorvidas pela instituição (total: 10013,2):

7.1.1: itens 1, 2, 6, 9,10

7.3: itens 2,3

Verbas de pesquisa solicitadas e aguardando resposta (total menos item 7.3.1.: 34418,89):

7.1.1: itens 7, 8, 11

7.1.2: itens 1c,e; 3

7.3: item 1

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1- Gross GE, Barrasso R. Infecção pelo papilomavírus humano: Atlas clínico de HPV. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999.
- 2- Carvalho JJM, Oyakawa NI, Consenso Brasileiro de HPV. São Paulo: BG Cultural, 2000.
- 3- Qureshi MN, Rudelli RD, Tubbs RR, *et al.* Role of HPV DNA testing in predicting cervical intraepithelial lesions: comparison of HC HPV and ISH HPV. *Diagn Cytopathol.* 2003 Sep;29(3):149-55
- 4- Alani RM, Münger K. Human Papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol.* 1998 Jan;16(1):330-337.
- 5- Ministério da Saúde. Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil em 2000. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer/Pró-Onco/INCA, 2000.
- 6- Franco EL Franco ED, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ.* 2001;3:1017-1023.
- 7- Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer (*INCA*). HPV, Perguntas e Respostas Mais Frequentes, http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=326 23/11/2004.
- 8- Bauer HM, Ting Y, Greer CE, *et al.* Genital human papillomavirus in female university students as determined by PCR-based method. *JAMA.* 1991 Jan 23-30;265(4): 472-477.
- 9- Hildesheim A., Gravitt P, Schiffman MH, *et al.* Determinants of genital HPV infection in Low-income women in Washington. *Sex Trans Dis.* 1993 Sep-Oct;20(5):279-285.
- 10- 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.* 1996;68(6):704-9.

- 11- Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, *et al.* Detection of papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Res.* 1991;51:1014-1019.
- 12- Schiffman MH. Recent program in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84(6):394-398.
- 13- 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.* 1992;68:370-373.
- 14- Von Der Meden AJW, Ruiz Moreno JA, Garcia Leon JF, *et al.* Cytologiccolposcopic-histopathologic correlatios in preinvasive cervical lesions and cervical human papillomavirus infections. *Ginecol Obstet Mex.* 1995 Sep;63:365-371.
- 15- 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, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1996; p 158.
- 16- Zür Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;(186):131-145.
- 17- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, *et al.* Prevalence human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) study proup. *Natl Cancer Inst.* 1995 Jun7;87(11):796-802.
- 18- Koutsky LA, Holmes KK, Crichlow CW, *et al.* A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med.* 1992 Oct 29;327(18):1272-1278.
- 19- Clavel C, Masure M, Boryj P, Putaud I, *et al.* Human Papillomavirus is a necessary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer.* 2001;89:1616-1623.

- 20- Kjaer KS, Chackerian B, Van Den Brule AJC, *et al.* High-Risk Human Papillomavirus Is Sexually Transmitted: Evidence from a Follow-Up Study of Virgins Starting Sexual Activity (Intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10:101-106.
- 21- Ley C, Bauer HM, Reingold, Shiffman MH, Chambers JC, Tashiro CJ and Manos MM. Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *J.Natl. Câncer Inst.* 1991;83:997-1003.
- 22- Kjaer SK, Van Der Brule AJC, Bock JE, PolL PA, Engholn G, Sherman ME, Walboorners JM and Meijer CJM. Determinants for genital human papillovirus (HPV) infectio in 1000 randomly chosen young Danish women with normal Pap smear: are there different risk profiles for oncogenic and nononcogenic HPV types? *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 1997;6:799-805.
- 23- Sedlacek TV, Lindhim S, Eder C, Hasty L, Woodland M, Ludomirsky A and Rando RF. Mechanism for human papillomavirus transmission at birth. *J Obstet Gynaecol.* 1989;161:55-59.
- 24- Pakarian F, Kaye J, Kell B, Jewwers R, Derias NW, Raju KS and Best JM. Cancer associated human papillomavirus: perinatal transmission and persistense. *Br J Obstet Gynaecol.* 1994;101:514-517.
- 25- Rylander E, Ruusuvara L, Wiksten MA, Evander and Wadell G. The absence of vaginal human papillomavirus 16 DNA in womwn who have not experienced sexual intercourse. *Obstet Gynaecol.* 1994;83:735-737.
- 26- Koutsky L. Epidemiology of genital human papilomavirus infection. *Am J Med* 1997 May 5;(5A):3-8.
- 27- Handsfield HH. Clinical presentatio and natural course of anogenital warts. *Am J Med* 1997 May 5;102(5A):16-20.

- 28- Bosch FX, Munoz N, De Sanjose S, *et al.* Risk factors for cervical cancer in Columbia and Spain. *Int. J. Cancer.* 1992;52:750-758.
- 29- Franco EL. Viral etiology of cervical cancer. A critique of the evidence. *Rev Infect Dis.* 1991 Nov-Dec;13(6):1195-1206.
- 30- 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. *J Clin Microbiol.* 1991;29:283-289.
- 31- Walker J, Bloss JD, Liao SY, *et al.* Human papillomavirus genotype a prognostic Indicator in carcinoma of the uteri cervix. *Obstet Gynaecol.* 1989 Nov;74(5): 781-785.
- 32- Severson J, Evans TY, Lee P *et al.* Human papillomavirus infectios: epidemiology, patogenesis, and therapy. *J Cutan Med Surg.* 2001;5:43-60.
- 33- Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 2000;19:1-5.
- 34- Brisson J, Morin C, Fortier M, *et al.* Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low-and high-grade lesions. *Am J Epidemiol.* 1994;140: 700-710.
- 35- Franco EL, Villa LL, Sobrinho JM, Prado C, Rouseau M, Desy and Rohan TE. Epidemiology of aquisição and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from high risk area for cervical cancer. *J Infect Dis.* 1999;180:1415-1423.
- 36- Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, *et al.* Persistence of type specific human papillomavirus infection among cytologically normal womwn. *J Infect Dis.* 1994;169:235-240.
- 37- Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ and Burk RD. Natural history of cervico vaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 1998;338: 423-428.

- 38- Touzé A., De Sanjosé S, Coursaget P, AlmiraL MR, Palacio V, Meijer CJLM, Kornegay J, Bosch FX. Prevalence of Anti-Human Papillomavirus Type 16,18,31, and 58 Virus-Like Particles in Women in the General Population and in Prostitutes. *J Clin Microbiol.* 2001 Dec;43:44-4348.
- 39- Villa LL. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Adv Cancer Res.* 1997;71:321-341.
- 40- Beay MFD, Tjalma WAA, Pattyn GGO. Prevalence of Human Papillomavirus in Elderly Women with Cervical Cancer. *Gynaecol Obstet Invest.* 2001;52: 248-251.
- 41- Ministério da Saúde Instituto Nacional do Câncer (INCA) 2004 Câncer do Colo do Útero. <http://www.inca.gov.br/> 2004.
- 42- Howley PM. Papillomaviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN; Knipe DM; Howley PM, ed. *Fields VIROLOGY*. Lippincot-Raven Philadelphia. 1996; 2045-2076.
- 43- Chan SY, Delius H, Halpern AL and Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: Uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol.* 1995;69:3074-3083.
- 44- zur Hausen H. Intracellular surveillance of persisting viral infections: Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. *Lancet* 1986 Aug 30;2(8505):489-491.
- 45- Rapp L & Chen JJ. The papillomavirus E6 proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1378: F1-F19.
- 46- Graham DA, & Herrington S. The induction of chromosome abnormalities by human papillomaviruses. *Papillomavirus Report.* 1998;9(1):1-5.
- 47- Ferenczy A, Mitao J and Nagai N. Latent papillomavirus and recurring genital warts. *N Engl J Med.* 1985;313:784.

- 48- Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, *et al.* Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Nat Cancer Inst* 1997; Jun 4;89(11):796-802.
- 49- Kiviat Nancy B. Human Papillomavirus In: Murray PR, Baron E, Falles MA, Tenover FC and Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Am Soc Microbiol: 1999.
- 50- Dores GB, Taromaru EK, Gallo C. Aspectos atuais do rastreamento das lesões HPV-induzidas e do câncer do colo uterino com métodos morfológicos e biomoleculares. *Newslab*. 1999;35: 196-205.
- 51- De Palo G, Stefanan B, Pilotti S. Infecção pelo Papilomavírus. In: De Palo G (ed.). *Colposcopia e patologia do trato genital inferior*. Rio de Janeiro, Medsi. 1996;125-89.
- 52- Bauer HM, Greer CE, Manos MM. Determination of genital HPV infection using consensus PCR. 131-153. In: CS. Herrington and JD. MeGee (ed.), *Diagnostic molecular pathology: a practical approach*. Oxford University Press. Oxford England 1992.
- 53- Ronco G. Use of molecular tests of human papillomavirus (HPV) as screening test for cervix cancer: a review. *Epidemiol Prev*. 1999 Oct;23(04):372-7.
- 54- Liaw Kai-LI, Glas AG, Manos MM, *et al.* Detection of human papilomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(11):954-960.
- 55- Creastsas G, Caglar H, Heresshchyshyn M, Gallego M. Cytologic, colposcopic and histologic correlation in young female. *J Adolesc Health Care*. 1981 sep;2(1):35-40
- 56- Coursaget Pierre. Serology for human papillomavirus. *Salud Pub Mex*. 2003;45 suppl 3:361-366.

- 57- Galloway D. Serological assays for the detection of HPV antibodies. In: Muñoz N, Bosch FX, Shah KV, *et al.* The Epidemiology of Human Papillomavirus and Cervical Cancer. IARC Scien Publ. 1992;147-161.
- 58- Nonnenmaker 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.* 1995;172:1, 19-24.
- 59- Nonnenmacher B, Pintos J, Bozzetti MC, Mielzinska-Lohnas I, Lorincz Ikuta N, Schwartzmann G, Villa LL, Schiller JT, Franco EL. Epidemiologic correlates of antibody response to human papillomavirus among women at low risk of cervical cancer. *Int J STD AIDS.* 2003 Apr;14(4):258-65.
- 60- Viscidi RP, Kotloff KL, Clayman B, Russ K, Shapiro S and Shah K. Prevalence of Antibodies to Human Papillomavirus (HPV) Type 16 Virus-Like Particles in Relation to Cervical HPV Infection among College Women. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997 Mar;122-126.
- 61- Schiller TJ, Lowy D. Papillomavirus-like particles and HPV vaccine development. *Cancer Biology.* 1996;(7):1-11.
- 62- Coutlée F, Maurand MH, Provenchier D, *et al.* The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. *Clin Diagn Virol.* 1997;(8):123-141.
- 63- Birner P, Bachtary B, Dreier B, *et al.* Signal-amplified colorimetric in situ hybridization for assessment of human papillomavirus infection in cervical lesions. *Med Pathol.* 2001;14:702-709.
- 64- Wiedorn KH, Goldmann T, Henne C, *et al.* EnVision+, a new dextran polymer-based signal enhancement technique for in situ hybridization (ISH). *J Histo.* 2001;(49):1067-1071.

65- Komminoth P and Werner M. Target and signal amplification: approaches to increase the sensitivity of in situ hybridization. *Histo Chem Cell Biol.* 1997;108:325-333

66- http://www.digene.com.br/menu/captura_hibrida/texto-captura_hpv.asp 2003.

67- Clavel C, Masure M, Putaud I, Thomas K, Bory JP, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection - comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. *J Clin Pathol.* 1998 Oct;51:10, 737-40.

68- Zür Hausen H, Meinhof W, Schreiber W, *et al.* Attempts to detect virus-specific sequences in human tumors. I. Nucleic acid hybridization with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer.* 1974;13:650.

69- De Villiers EM. Papillomavirus and HPV typing. In: Jablonska S, Orth G. ED. *Clinics in Dermatology, Papillomaviruses.* New York: Elsevier Scien. 1997;199-206.

70- Coutlée F, *et al.* Use of PGM1 Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples. *J Clin Microb.* 2002 Mar;90:902-907.

71- Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro.* 2003 Mar;98(2):181-184.

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