

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**PREVALÊNCIA DE HPV EM PACIENTES COM ALTERAÇÕES
CITOLÓGICAS E/OU COLPOSCÓPICAS**

EMANUELLA MENESES VENCESLAU

ARACAJU

Abril - 2011

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

PREVALÊNCIA DE HPV EM PACIENTES COM ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS E/OU COLPOSCÓPICAS

Dissertação de Mestrado submetida
à banca examinadora como parte
dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Saúde e
Ambiente, na área de concentração
em Saúde e Ambiente.

EMANUELLA MENESES VENCESLAU

Orientadoras:

Dra. Verônica de Lourdes Sierpe Jeraldo

Dra. Fabiana Botelho de Miranda Onofre

ARACAJU

Abril – 2011

O AUTOR PERMITE A REPRODUÇÃO DE CÓPIAS OU PARTES DESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SOMENTE PARA PROPÓSITOS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS DESDE QUE A FONTE SEJA CITADA.

V451p Venceslau, Emanuella Meneses.

Prevalência de HPV em pacientes com alterações citológicas e/ou colposcópicas. / Emanuella Meneses Venceslau; orientação [de] Fabiana Botelho de Miranda Onofre, Verônica de Lourdes Sierpe Jeraldo. – Aracaju, 2011.

54 f. : il.

Inclui bibliografias

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes (UNIT).

1. HPV – Papilomavírus humano. 2. Carcinoma cervical. 3. Saúde pública. I. Onofre, Fabiana Botelho de Miranda (orient.). II. Jeraldo, Verônica de Lourdes Sierpe (orient). III. Universidade Tiradentes (UNIT). IV. Título.

CDU: 616-006.6

**PREVALÊNCIA DE HPV EM PACIENTES COM ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS E/OU
COLPOSCÓPICAS**

Emanuella Meneses Venceslau

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE

Aprovada por:

Verônica de Lourdes Sierpe Jeraldo, D. Sc.
Orientadora

Fabiana Botelho de Miranda Onofre, D. Sc.
Orientadora

Claudia Moura de Melo, D. Sc.

Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, D. Sc.

ARACAJU

Abril - 2011

Epígrafe:

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Agradecimentos:

A Deus que me inspirou e me deu forças para a a superação dos diversos obstáculos.

A meus avós Egidio Teles de Menezes e Alzira Maria de Menezes, pelo Amor incondicional concedido.

Aos meus pais Everaldo Passos Venceslau e Ilda Meneses, pelo Apoio, Amor, Compreensão e Carinho.

A meu irmão Emanuell Meneses Venceslau pelos momentos de cumplicidade e alegrias.

A meu namorado Jocelino Serafim dos Santos Junior, pelo Amor, Companheirismo, Dedicção e Respeito.

A meus sogros Jocelino Serafim dos Santos e Lucia Maria dos Santos, pelo Carinho e Admiração.

A minha Tia Luciene Venceslau Carvalho, por todo carinho e apoio oferecidos desde a infância.

Aos amigos de curso Daniel Santos Oliveira, Glebson Moura Silva, Hélio Lazarini, Maurício Oliva Nascimento maia, Sueli José Pereira Correa, pelo companheirismo, ensinamentos e experiências de vida compartilhados.

A Elaine de Lima Nunes e Érick Vieira Souza, pelas atividades desenvolvidas juntos.

A Anna Carolina Mota Lopes e Mauro Muniz Bezerra pela ajuda essencial no desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade Tiradentes pela bolsa de estudos concedida, possibilitando a minha formação profissional e pela maravilhosa proposta de ensino.

Aos funcionários institucionais Ana, Eradina, Darcy, Nelly, Roneval e Thayse por terem atendido com presteza e ajudado da melhor forma possível.

Aos professores Doutores Claudia Moura de Melo, Francine Ferreira Padilha, Juliana Cordeiro Cardoso, Lauro Xavier Filho, Sara Cuadros Orellana e Verônica de Lourdes Sierpe Jeraldo, pelo apoio, e ajuda material e intelectual concedida durante o curso.

A Fabiana Botelho de Miranda Onofre pelo acompanhamento contínuo, dedicação, paciência, entusiasmo e por ter cumprido brilhantemente seu papel de orientadora.

A todos os professores que fizeram parte de minha jornada desde a infância, que ao somarem ensinamentos contribuíram para o meu aperfeiçoamento profissional.

Aos amigos e familiares que de forma direta ou indireta contribuíram para a minha formação pessoal.

Meus agradecimentos a todos pela admiração, preocupação constante e pela torcida!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 Incidência e mortalidade do Câncer Cervical.....	3
2.2 História Natural do Câncer de Colo Uterino.....	4
2.3 Associação entre HPV e Câncer Cervical	5
2.4 Diagnóstico Molecular do HPV	12
2.5 Citologia Oncótica e Colposcopia.....	16
2.6 Metodologia Geral.....	20
2.7 Referências.....	23
3. Prevalência de HPV em pacientes com alterações citológicas e colposcópicas.....	38
Resumo	40
Abstract.....	41
3.1 Introdução	42
3.2 Métodos	43
3.3 Resultados	45
3.4 Discussão	49
3.5 Referências.....	51
4. Considerações Finais	54
APÊNDICES.....	56
APÊNDICE A- Termo de Consentimento livre e esclarecido.....	57
APÊNDICE B- Formulário de pesquisa.....	58

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1 - Classificação filogenética e epidemiológica dos HPV's anogenitais.....	7
Tabela 2 - Comparação entre as técnicas de detecção do HPV	14
Tabela 3 - Nomenclatura comparativa dos achados citológicos cervicais	19
Tabela 4 - Oligonucleotídeos iniciadores genéricos utilizados para detecção do DNA do HPV	23

Prevalência de HPV em pacientes com alterações citológicas e colposcópicas

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores genéricos utilizados para detecção do DNA do HPV	45
Tabela 2 - Correlação entre as categorias diagnósticas aos exames citopatológico e colposcópico e a detecção molecular do HPV	47
Tabela 3 - Percentual de detecção de DNA de HPV com os pares de oligonucleotídeos iniciadores	48

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 - Lesões precursoras do carcinoma escamoso do colo do útero.....	4
Figura 2 - Representação esquemática do genoma do HPV e arranjo das proteínas não estruturais precoces (E) e estruturais tardias (L) e a região reguladora (LCR).....	6
Figura 3 - Tipos de Interação com o DNA do HPV	11
Figura 4 - Esquema das Proteínas virais E6 e E7 interferindo com a função das proteínas pRb e p53 da célula hospedeira.....	12
Figura 5 - Sensibilidades relativas das técnicas de análise do ácido nucléico	16
Figura 6 - Coilocitos – células compatíveis com a infecção pelo HPV.....	19
Figura 7 - Seqüência típica de eventos na história natural do câncer cervical	20

Prevalência de HPV em pacientes com alterações citológicas e colposcópicas

Figura 1 - Resultados dos laudos citológicos e colposcópicos de amostras cervicais das pacientes atendidas no município de Penedo, Alagoas (2009-2011)	46
Figura 2 - Perfil eletroforético de gel de Integridade do DNA	46
Figura 3 - Perfil eletroforético da PCR utilizando primers PCO3/PCO4.....	47
Figura 4 - Perfil eletroforético da PCR utilizando primers MY09/MY11.....	48
Figura 5 - Perfil eletroforético da PCR utilizando primers GP5+/GP6+	48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AGUS	- Células Glandulares Atípicas de Significado Indeterminado
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASCCP	- Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical
ASC-US	- Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
CH	- Captura Híbrida
CONEPE	- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	- Desoxirrinonucleotídeo trifosfato
DST	- Doenças Sexualmente Transmissíveis
EAB	- Epitélio Acetobranco
HPV	- Papilomavírus Humano
HSIL	- Lesão Intra-epitelial de Alto Grau
IARC	- Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
LSIL	- Lesão Intra-epitelial de Baixo Grau
MgCl ₂	- Cloreto de Magnésio
NASF	- Ambulatório de Ginecologia do Núcleo de Apoio à Saúde da Família
NIC	- Neoplasia Intra-epitelial Cervical
PBS	- Tampão Fosfato Salino
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	- Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição do DNA
RQ-PCR	- PCR em tempo real quantitativa
pb	- Pares de base
SISCOLO	- Sistema de Informação do câncer do colo do útero
SUS	- Sistema Único de Saúde
VIA	- Inspeção visual por ácido acético

PREVALÊNCIA DE HPV EM PACIENTES COM ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS E/OU COLPOSCÓPICAS

Emanuella Meneses Venceslau

O câncer cervical é uma das doenças mais frequentes entre mulheres e causa considerável morbidade e mortalidade. Excluindo o câncer de pele não melanoma, é o terceiro câncer mais comumente diagnosticado e a terceira causa de morte por câncer em mulheres no mundo. No Brasil, o câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais frequente entre as mulheres. Estudos epidemiológicos e moleculares têm mostrado a íntima relação entre o papilomavírus humano (HPV) e o surgimento de câncer cervical, bem como suas lesões precursoras, inferindo que a presença do vírus seja um agente causal para estas malignidades. A utilização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como metodologia no diagnóstico molecular do HPV tem se mostrado como a mais sensível na identificação do DNA viral existente nos mais diversos materiais clínicos, bem como na resolução de dúvidas originadas durante o diagnóstico citológico e colposcópico, não apenas de lesões pré-neoplásicas, mas inclusive nas infecções latentes ou subclínicas associadas a esse vírus. A detecção do DNA do HPV pela técnica de PCR é importante, mas se torna imperativo discriminar o tipo de HPV presente em materiais clínicos provenientes das mucosas genitais, a fim de verificar se os tipos presentes são de alto ou baixo risco para o desenvolvimento de neoplasias cervicais. Considerando que o câncer cervical é uma neoplasia importante no nordeste brasileiro, e que a prevalência do HPV de alto risco está diretamente associado ao câncer cervical, este trabalho teve como objetivos: analisar as principais alterações citológicas e colposcópicas e investigar a prevalência da infecção pelo HPV nas pacientes diagnosticadas em Penedo/AL, município com alto índice de pobreza, verificar o desempenho dos iniciadores MY09/11 e GP5+/6+ para detecção do HPV, e oferecer subsídios para medidas profiláticas. Foram realizadas reações de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores MY09/11 e GP5+/6+ para detecção do HPV nos casos de anormalidades citológicas e/ou colposcópicas diagnosticados no período de Maio de 2009 a Março de 2011, no Ambulatório de Ginecologia do Núcleo de Apoio à Saúde da Família do município de Penedo/AL. Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o teste do qui-quadrado e/ou o teste de Fisher, através do software SPSS, versão 16.0, considerando-se significativas àquelas variáveis que alcançaram um $p < 0,05$ no teste bicaudal.

Palavras-chave: Citologia, HPV, PCR, MY/GP+, lesões precursoras.

PREVALENCE OF HPV IN PATIENTS WITH CYTOLOGIC AND/OR COLPOSCOPIC ALTERATIONS

Emanuella Meneses Venceslau

The cervical cancer is one of the most frequent disease between women and it causes considerable morbidity and mortality. Excluding not melanoma skin cancer, it is the third more commonly diagnosed cancer and the third cause of cancer death in women in the world. In Brazil, the cervix uteri cancer is the second most frequent type of cancer in women. Epidemiological and molecular studies have been showing the intimate relation between the human papillomavirus (HPV) and the appearance of cervical cancer, as well as his precursor lesions, inferring that the presence of this virus is a causal agent for these malignancies. The use of Polimerase Chain Reaction (PCR) technique as methodology in the molecular diagnosis of HPV has revealed as the most sensitive in the identification of the DNA viral existent in any more several clinical materials, as well as in resolution of doubts given rise during the cytological and colposcopic diagnosis, not only in pre-neoplastic lesions, but even in the latent or subclinics infections associated to this virus. The detection of the HPV DNA using PCR is important, but becomes imperative to distinguish the type of HPV present in clinical materials originating from the genital epithelium, in order to check if the present types are of high or low risk for the development of cervical neoplasias. Whereas the cervical cancer is an important neoplasia in the Brazilian northeast, and that high risk HPV is straightly associate to the cervical cancer, this work had as objectives: to analyse the cytological and colposcopic alterations and investigate the predominance of the HPV infection in patients diagnosed in Penedo/AL, municipality with highest poverty index (60,62%), to check the performance of the initiators MY09/11 and GP5+/6+ for HPV detection, and to offer subsidies for preventive measures. PCR reactions were performed using initiators oligonucleotides MY09/11 and GP5+/6+ for the HPV detection in the cases of cytological and/or colposcopic diagnosed in the period May 2009 to March 2011, in the Gynecologic Outpatient of the Family Health Support Nucleus in Penedo/AL. For a statistical analysis of data, we used the Chi-square test and/or the Fisher test by SPSS software, 16.0 version, significant to those variables reached a $p < 0.05$ in the two-tailed test.

Key-words: Cytology, HPV, PCR, MY/GP+, precursor lesions.

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas cervicais é a terceira causa de morte de câncer em mulheres no mundo, excluindo o câncer de pele não melanoma (FERLAY *et al.*, 2010). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa da incidência de câncer do colo do útero para o Brasil nos anos de 2010 e 2011 foi de 18.430, com um risco estimado de 18,47 casos a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2009).

Baseado em informações do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa da taxa bruta de incidência do câncer do colo do útero por 100 mil mulheres para os anos de 2010 e 2011 no Nordeste Brasileiro foi de 18,42 com previsão de 5050 novos casos e no Estado de Alagoas foi de 16,81 com previsão de 270 novos casos. Sua incidência se evidencia a partir dos 20 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente próximo aos 45 anos. É o câncer que apresenta maior potencial de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente, superado apenas pelo câncer de pele (BRASIL, 2009).

Uma série de casos de câncer cervical invasivo investigado com um protocolo padrão foi reunida pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). Aproximadamente 1000 mulheres oriundas de 22 países ao redor do mundo foram histologicamente verificadas com o câncer cervical invasivo. As biópsias congeladas dos tumores foram analisadas em um laboratório central para detecção do DNA do HPV, usando ensaios baseados em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (BOSCH *et al.*, 1995). Depois da reanálise dos casos inicialmente HPV-negativos, o DNA-HPV foi descoberto em 99.7 % dos tumores, levando à conclusão que o HPV é uma causa necessária do câncer cervical (WALBOOMERS *et al.*, 1999) .

Os tipos de HPV de baixo risco 6 e 11 são mais comumente detectados em verrugas genitais e anais, representando 90% de todos os casos (DIANZANI *et al.*, 2004). Os tipos de HPV oncogênicos 16 e 18 acometem cerca de 70% dos cânceres cervicais relacionados com o HPV. Um aumento na carga viral do HPV tem sido correlacionado com a progressão do câncer cervical (SWAN *et al.*, 1999). Essas associações acima mencionadas enfatizam a importância da detecção, genotipagem e quantificação dos HPV de baixo risco e oncogênico, para monitoramento de lesões em progressão (SEAMAN *et al.*, 2010).

Baseado na sequência do DNA viral, mais de 230 tipos de HPV são conhecidos (DE VILLIERS, 1999), onde 118 genótipos são bem caracterizados de acordo com o nicho biológico, potencial oncogênico e posição filogenética (DE VILLIERS *et al.* 2004). Estes vírus estão associados a diferentes doenças em humanos, incluindo verrugas comuns e

genitais, carcinomas cervical (GARLAND *et al.*, 2002), esofagiano (KREIMER, *et al.*, 2005; MOORE *et al.*, 1999), laríngeo (CLAVEL *et al.*, 2000; VENUTI *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2006), e de cabeça e pescoço (HOFFMANN *et al.*, 1998).

Aproximadamente 40 tipos de HPV infectam a região anogenital e 15 deles - 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 - são considerados oncogênicos ou de alto risco porque estão associados com lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau ou câncer. Os tipos 26, 53 e 66 são possivelmente carcinogênicos, enquanto os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e Cp6108 são considerados de baixo risco (MUÑOZ *et al.*, 2003).

A partir da constatação de que o câncer é um problema de saúde pública, passa a ser importante o conhecimento da sua magnitude no Brasil, no tocante a distribuição geográfica com estratificação por idade e sexo, como base de apoio ao seu controle. A busca pelo conhecimento detalhado do perfil regionalizado da doença é de suma importância. Considerando que o câncer cervical é uma neoplasia importante no nordeste brasileiro, e que o HPV de alto risco está diretamente associado ao câncer cervical, o presente trabalho teve como objetivos: investigar a prevalência da infecção pelo HPV em mulheres com anormalidades citológicas e/ou colposcópicas atendidas no município de Penedo no Estado de Alagoas, verificar o desempenho dos iniciadores MY09/11 e GP5+/6+ para detecção do HPV e correlacionar a presença do HPV com o diagnóstico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Incidência e mortalidade do Câncer Cervical

De acordo com o INCA, o câncer cervical é uma das doenças mais freqüentes entre mulheres e causa considerável morbidade e mortalidade. Sua incidência evidencia-se a partir dos 20 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente próximo aos 45 anos (BRASIL, 2009). É o terceiro câncer mais comumente diagnosticado e a terceira causa de morte de câncer em mulheres no mundo inteiro, excluindo o câncer de pele não melanoma, com aproximadamente 530 mil novos casos de câncer em mulheres em 2008. Mais de 85% desses casos e mortes ocorrem em países em desenvolvimento (AHMEDIN JEMAL *et al.*, 2011), sendo que ocorreram: 188 mil no Sudeste da Ásia, 80 mil nas Américas, 75 mil na África e 61 mil na Europa. Em países desenvolvidos, como os EUA, a incidência foi de 11 mil e em países em desenvolvimento como o Brasil a incidência foi de 24 mil (FERLAY *et al.*, 2010). Tais disparidades em incidência e mortalidade entre países desenvolvidos e em desenvolvimento pode ser atribuída às diferenças regionais, a prevalência e distribuição dos principais fatores de riscos, práticas de detecção, e/ou a disponibilidade e uso de serviços de tratamento (AHMEDIN JEMAL *et al.*, 2011).

De acordo com o GLOBOCAN (2008) a mortalidade causada pelo câncer cervical no mundo é de 275 mil, sendo 242 mil mortes ocorridas em regiões menos desenvolvidas: 102 mil no Sudeste da Ásia, 72 mil na Índia e 50 mil na África. Em regiões mais desenvolvidas a mortalidade chega a 33 mil: 36 mil nas Américas e 28 mil na Europa. No Brasil, em contraste com o observado em países desenvolvidos, a exemplo dos EUA com com 3 mil mortes por câncer cervical, a mortalidade por câncer cervical ainda é alta com 110 mil mortes (FERLAY *et al.*, 2010).

No Brasil, segundo informações do INCA o câncer cervical é o segundo tipo de câncer mais frequente entre as mulheres. Para os anos de 2010 e 2011, a estimativa da taxa bruta de incidência foi de 18.430 novos casos por 100 mil mulheres com um risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres. No Nordeste Brasileiro, a estimativa é de 5050 novos casos com um risco estimado de 18,4 casos a cada 100 mil mulheres e no Estado de Alagoas a taxa bruta é de 16,8 sendo previsto 270 novos casos (BRASIL, 2009).

2.2 História Natural do Câncer de Colo Uterino

O carcinoma escamoso do colo uterino é uma doença que apresenta vários estágios na sua evolução, iniciando pelo aparecimento da lesão precursora que pode progredir no decorrer de anos. As lesões precursoras, chamadas de Neoplasia Intra-epitelial Cervical (NIC) ocorrem, principalmente, em mulheres jovens, com pico de incidência em torno dos 30 anos. Mundialmente, tem-se observado um aumento da freqüência destas alterações em torno dos 20 anos e, ocasionalmente, em faixas etárias mais jovens (HERBST *et al.*, 1992).

Na maioria das vezes, o câncer de colo uterino se desenvolve na zona de transformação da cérvix, região localizada entre os epitélios glandular e estratificado, nas proximidades do orifício externo do colo. Esta área apresenta constante processo regenerativo e alta taxa de mitose, ocasionados por agentes agressores vaginais, como o pH ácido e a microbiota (KOSS, 2006).

NIC I é a alteração celular que acomete as camadas mais basais do epitélio estratificado do colo do útero (displasia leve). NIC II é a existência de desarranjo celular em até três quartos da espessura do epitélio, preservando as camadas mais superficiais (displasia moderada). NIC III é a observação do desarranjo em todas as camadas do epitélio (displasia acentuada e carcinoma *in situ*), sem invasão do tecido conjuntivo subjacente (Figura 1) (KOSS, 2006).

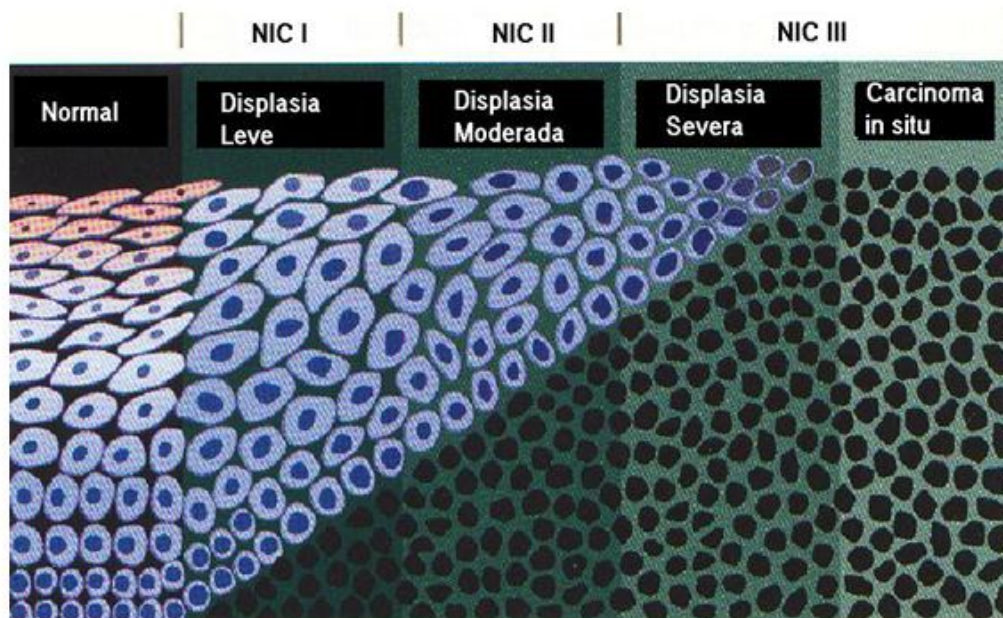


Figura 1 - Lesões precursoras do carcinoma escamoso do colo do útero (modificado de DEMAY, 2010)

A literatura científica aliada à história natural de NIC enfoca desde 1950, especialmente aspectos de regressão, persistência e progressão. Quando estratificado em graus de gravidade, os dados indicam que a probabilidade aproximada da regressão de NIC I é 60%, persistência 30%, progressão a NIC III 10%, e progressão à invasão 1%. As aproximações correspondentes de NIC II são 40%, 40%, 20%, e 5%, respectivamente. A probabilidade de NIC 3 regressar é 33% e progredindo à invasão maior do que 12%. Mesmo os mais altos graus de atipia podem regressar em uma proporção significativa de casos (OSTOR, 1993). As mulheres com NIC III, que inclui o carcinoma *in situ*, apresentam risco substancial para o câncer cervical invasivo (PAGLIUSI; AGUADO, 2004).

2.3 Associação entre HPV e Câncer Cervical

O câncer cervical está intimamente relacionado com a infecção persistente por certos tipos de Papilomavírus Humano (HPV). A infecção por HPV é a doença sexualmente transmissível mais comum, sendo que mais de 80% da população apresenta-se infectada em algum momento da vida. Em raros casos, esta infecção leva ao câncer cervical (TJALMA *et al.*, 2005). Na maioria dos casos, a infecção por HPV é assintomática e o vírus desaparece espontaneamente em 6-18 meses (FERENCZY; FRANCO, 2002).

As primeiras suspeitas de correlação entre o HPV e o câncer cervical surgiram a cerca de 37 anos atrás (ZUR HAUSEN, *et al.*, 1974; ZUR HAUSEN, 1976; ZUR HAUSEN, 1977). Foram encontrados DNA de tipos específicos de HPV na maioria das biópsias de câncer cervical. Além disso, estudos epidemiológicos têm demonstrado que o HPV é o fator etiológico do câncer cervical e que a infecção pelo HPV pode ser detectada em quase todos os casos (ZUR HAUSEN, 2002; DE VILLIERS *et al.*, 2004). Em estudo realizado por WALBOOMERS *et al.* (1999), encontrou-se, através do uso da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), ácido desoxiribonucleico (DNA) de HPV em 99,7% dos casos de câncer cervical, indicando que o HPV é de fato a principal causa deste tipo de câncer.

Os Papilomavírus Humanos são vírus da família *Papillomaviridae* que infectam células epiteliais e têm a capacidade de causar lesões na pele ou mucosas. Causam diversos tipos de lesões como a verruga comum e a verruga genital ou condiloma, popularmente conhecida como “crista de galo”. Elas têm crescimento limitado e com frequência regridem espontaneamente (BROWN; FIFE, 1990). É um vírus icosaédrico, não envelopado e com ácido nucléico constituído de DNA de dupla fita, circular. O diâmetro do capsídeo é de 55 nm e seu DNA possui 7900 pares de bases. Seus genes dividem-se em

três grupos funcionais: a região conhecida como *long control region* (LCR) (região de longo controle), os genes iniciais (E) e os genes tardios (L) (CHANG, 1990).

A região LCR é uma região não codificadora do vírus cuja função é regular a transcrição e replicação viral. A região E é responsável pela síntese de proteínas relacionadas à replicação viral e que podem também interferir no ciclo celular, contribuindo para o desenvolvimento de neoplasias. São sete genes E, os quais têm diferentes funções: Os genes E1 e E2 codificam proteínas que regulam a transcrição de outros genes E; a região E4 codifica um grupo de proteínas que regula a maturação e replicação viral, além de interagir com proteínas da célula hospedeira, alterando a matriz de citoqueratina para produzir o coilocito; as proteínas E6 e E7 interagem com proteínas do hospedeiro, proteína 53 (p53) e proteína do retinoblastoma (pRb), que possibilitam a transformação neoplásica das células infectadas pelo vírus. A região L possui dois genes: L1 e L2, os quais codificam proteínas do capsídeo viral. A proteína codificada pelo gene L1 é altamente conservada entre os diferentes tipos de HPV. A L2 é variável e responsável pelas diferenças de antigenicidade (RICHART *et al.*, 1998) (Figura 2).

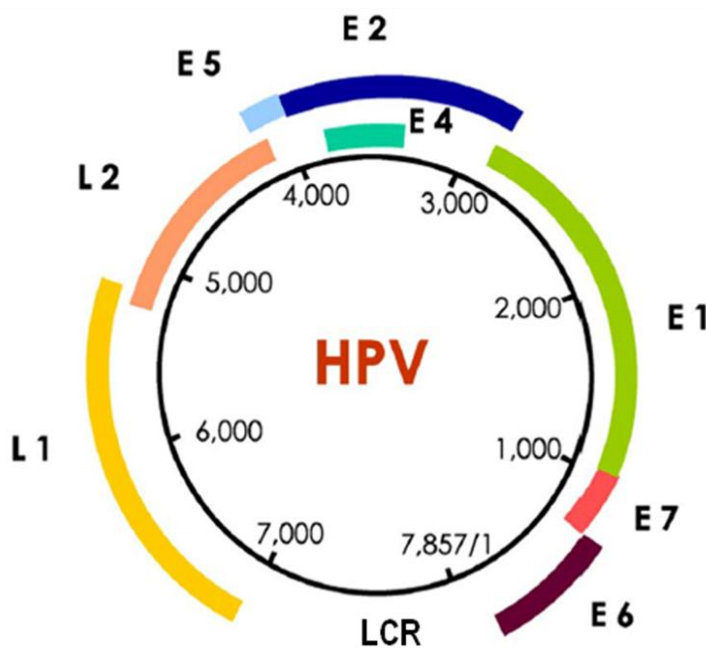


Figura 2 - Representação esquemática do genoma do HPV e arranjo das proteínas não estruturais precoces (E) e estruturais tardias (L) e a região reguladora (LCR) (MUÑOZ *et al.*, 2006).

Atualmente são conhecidos mais de 230 tipos de HPV com base na sequência do DNA viral (HAWES *et al.*, 2004); destes, 118 genótipos estão bem caracterizados, de acordo com o nicho biológico, potencial oncogênico e posição filogenética (DE VILLIERS *et al.*, 2004). Os tipos de HPV diferem entre si em pelo menos 10% na sequência de nucleotídeos do gene L1. Quando essa homologia varia menos do que 2%, fala-se em variante e, entre 2% e 10%, em subtipo (BURK, 1999; DOOBAR; STERLING, 2001). A Tabela 1 resume a classificação epidemiológica e filogenética dos HPVs anogenitais proposta por MUÑOZ *et al.* (2006).

Tabela 1 - Classificação filogenética (1 a 15) e epidemiológica dos HPVs anogenitais (MUÑOZ *et al.*, 2006).

Espécies	Genótipos	Risco	Espécies	Genótipos	Risco	Espécies	Genótipos	Risco
1	{ HPV 32 HPV 42	indeterminado baixo	6	{ HPV 30 HPV 53 HPV 56 HPV 66	indeterminado provável alto alto provável alto	10	{ HPV 6 HPV 11 HPV 13 HPV 74 HPV 44 HPV 55	baixo baixo baixo indeterminado baixo indeterminado
2	{ HPV 28 HPV 3 HPV 10 HPV 29 HPV 77	indeterminado indeterminado indeterminado indeterminado indeterminado	7	{ HPV 59 HPV 18 HPV 45 HPV 70 HPV 39 HPV 68 HPV 85	alto alto alto baixo alto provável alto indeterminado	11	{ HPV 34 HPV 73	indeterminado provável alto
3	{ HPV 61 HPV 72 HPV 62 HPV 81 HPV 83 HPV 89 HPV 84 HPV 86 HPV 87	baixo baixo indeterminado baixo indeterminado baixo indeterminado indeterminado indeterminado	8	{ HPV 91 HPV 7 HPV 40 HPV 43	indeterminado indeterminado baixo baixo	13	{ HPV 54	baixo
4	{ HPV 57 HPV 2a HPV 27	indeterminado indeterminado indeterminado	9	{ HPV 52 HPV 67 HPV 33 HPV 58 HPV 16 HPV 31 HPV 35	alto indeterminado alto alto alto alto alto	15	{ HPV 71 HPV 90	indeterminado indeterminado
5	{ HPV 26 HPV 69 HPV 51 HPV 82	provável alto indeterminado alto provável alto						

Aproximadamente 40 tipos de HPV são comumente encontrados no trato genital (LORINCZ *et al.*, 1992; DE VILLIERS, 2001; LEVI *et al.*, 2002). Em uma análise multicêntrica envolvendo 1918 mulheres em 11 estudos de casos-controle, 15 genótipos de HPV (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82) foram classificados como de alto risco, por estarem associados a lesões pré-cancerosas da cérvix, 3 tipos de

HPV (26, 53 e 66) foram classificados como provavelmente de alto risco, e 12 tipos de HPV foram classificados como de baixo risco (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e Cp6108), não associados com o desenvolvimento do câncer cervical (MUÑOZ *et al.*, 2003).

Aproximadamente todos os casos de câncer cervical são causados por um dos tipos de HPV reconhecidos como oncogênicos pela IARC. Estudos demonstram que mulheres portadoras do HPV tipos 16 e/ou 18 apresentam significativo risco de desenvolverem processo maligno em cérvix uterina quando comparadas a infecção por outros agentes virais (PINTO, 2002; JORDÃO *et al.*, 2003; MOTOYAMA *et al.*, 2004; MAHDAVI; MONK, 2005; SÖDERLUND-STRAND *et al.*, 2005). Em 1995 a IARC e a Organização Mundial de Saúde (OMS) consideraram os genótipos 16 e 18 do HPV como os agentes etiológicos do carcinoma escamoso do colo uterino (IARC, 1995). O risco de uma mulher desenvolver neoplasia de colo uterino aumenta em 19 vezes quando ela é infectada com um dos tipos oncogênicos do HPV, e que associados ao tipo 18, 31 ou 33 aumenta em 50 vezes. Quando é relacionado ao HPV 16 este risco aumenta em 100 vezes. Isto quando comparado a mulheres não infectadas (VAN DER GRAAF, *et al.*, 2002). Isto demonstra que o HPV 16 mantém uma forte relação com a persistência das lesões intra-epiteliais (RAMA *et al.*, 2006).

DE SANJOSÉ *et al.* (2007) em uma meta-análise, avaliaram a distribuição dos diversos tipos de HPV em mulheres com citologia normal em 78 estudos, que incluíam 157.879 mulheres randomicamente selecionadas da população de 15 regiões do mundo. A prevalência geral de HPV foi de 10,4%, variando de 22,1% na África a 8,0% na Ásia. Os cinco tipos de HPV mais comuns em mulheres HPV-positivas foram HPV16, seguido pelos 18, 31, 58 e 52, representando 50% de todas as infecções por HPV. Embora os HPV tipos 16 e 18 tenham sido os mais prevalentes, a distribuição dos outros tipos varia conforme a região geográfica. No Japão, Taiwan e leste da África o HPV52 foi o mais comum. O HPV18 foi o mais freqüente em todas as regiões, exceto no sul da Europa, e o HPV53 estava entre os cinco tipos de HPV mais comuns nas mulheres do leste da África e Américas do Norte e Central.

No Brasil, o HPV 16 é o mais freqüente em todas as regiões do país, entretanto, há variação com relação aos outros tipos. O HPV 18 é o segundo mais prevalente nas regiões Norte, Sul e Sudeste. Os HPVs 31 e 33 correspondem ao segundo tipo de HPV mais prevalente nas regiões Nordeste e Central, respectivamente (ELUF NETO *et al.*, 1994; BOSCH *et al.*, 1995; NORONHA *et al.*, 1999; LORENZATO *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2003).

RAMA *et al.* (2008) realizaram estudo em São Paulo e Campinas e encontraram uma prevalência de 17,8% da infecção genital por HPV de alto risco numa amostra de 2.300 participantes. Ao se estratificar a prevalência nos diferentes grupos etários, observaram: 27,1% nas pacientes abaixo dos 25 anos, 21,3% entre 25-34 anos, 12,1% entre 35-44 anos, 12,0% entre 45-54 anos e de 13,9% entre 55 e 65 anos. A infecção genital por HPV de alto risco ocorreu em 14,3% das citologias normais, em 77,8% das lesões escamosas de alto grau e nos dois (100%) casos de carcinoma.

Em relação ao carcinoma invasor, SMITH *et al.* (2007) em uma meta-análise, analisaram 130 estudos, totalizando 14.595 casos, dos quais 9.494 carcinomas de células escamosas e 1.949 adenocarcinomas eram positivos para HPV. Verificaram que cerca de 70% dos casos estavam associados com infecção por HPV16 (55%) ou HPV18 (12,8%). Os outros tipos mais comuns de HPV em ordem decrescente foram: HPV45, 31, 33, 52, 58, e 35. Nas lesões intra-epiteliais de alto grau (HSIL), o tipo 16 foi o mais prevalente, representando 45,3% dos casos positivos para HPV. O HPV18 apareceu consistentemente em terceiro ou quarto lugar. Já os outros tipos, 31, 33, 35, 45, 52 e 58 variaram muito mais segundo as diferentes regiões. No Brasil, os tipos de HPV mais prevalentes foram o 16 (43,6%), seguido pelo 58 (8,7%), 31 (5,8%) e 33 (5,2%). Os autores concluíram que tipos específicos de HPV podem determinar diferentes riscos para a persistência e a progressão determinada pelo vírus, e que o risco de carcinoma cervical é principalmente associado aos HPV16, 18 e 45, sendo que o HPV16 mostrou maior risco também para NIC II e NIC III.

O HPV16, quando persiste por dois anos, possui maior capacidade de causar NIC e câncer do que qualquer outro tipo potencialmente oncogênico. Infecções não relacionadas ao tipo 16 mostraram um risco coletivo de NIC III de aproximadamente um quinto do determinado pelo tipo 16. Contudo, outros tipos de HPV menos comuns na população geral e em mulheres com NIC e câncer têm limitado a precisão das estimativas de risco (WHEELER *et al.*, 2006). Comparativamente, outros tipos têm um risco absoluto muito menor. O HPV33 possui menor potencial oncogênico em termos de progressão de NIC III para carcinoma, comparado com o HPV18 e o HPV45 (SNIJDERS *et al.*, 2006).

CLIFFORD *et al.* (2005) fizeram um levantamento e incluíram 8.308 mulheres com alterações citológicas compatíveis com lesão intra-epitelial de baixo grau (LSIL) oriundas de 55 estudos, onde a prevalência total de HPV foi de 80% na América do Norte e menor que 70% em outras regiões, diferença essa atribuída aos critérios utilizados para o diagnóstico destas lesões. Entre as 5910 mulheres com lesões de baixo grau HPV-positivas, o HPV16 foi o tipo mais comum (26,3%), seguido pelo 31 (11,5%), 51 (10,6%),

53 (10,2%), HPV56 (9.5%), HPV52 (9.0%), HPV18 (8.6%), HPV66 (8.6%), HPV58 (8.4%), HPV6 (8.0%), HPV39 (7.6%), HPV33 (7.4%), HPV59 (6.1%), HPV35 (5.7%), e HPV45 (4.9%). Nesta meta-análise, o Brasil contribuiu com dois estudos (FRANCO *et al.*, 1999; LORENZATO *et al.*, 2000), sendo que o tipo de HPV mais prevalente foi o 16 (22,7%), seguido pelo 31 (16,8%), 51 (14%) e 53 (14%).

Sabe-se hoje que, para o desenvolvimento da lesão intra-epitelial de alto grau e do câncer invasivo do colo do útero, o Papilomavírus Humano (HPV) é condição necessária; porém, por si só, não é uma causa suficiente, uma vez que, para o desenvolvimento, manutenção e progressão das lesões intra-epiteliais, se faz necessária, além da persistência do HPV, a sua associação com os outros fatores de risco (ZUR HAUSEN, 1996; WALBOOMERS *et al.*, 1999).

O risco de câncer cervical é influenciado pela presença de co-fatores, como o fumo (SZAREWSKI; CUZICK, 1998; MENDONÇA *et al.*, 2004); os esteróides sexuais (MORENO *et al.*, 2002); pelo estado imunológico da mulher (MELO; SOUZA, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2004; RIVA *et al.*, 2007); por características relacionadas à vida reprodutiva e ao comportamento sexual, como idade do primeiro coito (BOSCH *et al.*, 2002); número de parceiros, comportamento sexual do parceiro, número de gestações e partos (KJAER, *et al.*, 1988; SCHIFFMAN *et al.*, 1993; DEACON, *et al.*, 2000; HILDESHEIM, *et al.*, 2001; THOMAS *et al.*, 2001; MUÑOZ, *et al.*, 2002). Alguns destes fatores relacionam-se ao risco de contaminação pelo HPV, enquanto outros influenciam diretamente a carcinogênese (MORENO *et al.*, 1995).

O HPV, ao penetrar na célula do hospedeiro, pode se apresentar de forma não integrada ao genoma celular (forma epissomal) ou integrar-se ao cromossomo da célula hospedeira. A integração geralmente é observada nos HPVs de alto risco, enquanto que os HPVs de baixo risco permanecem de forma epissomal (CRUM, 2000; RIVOIRE *et al.*, 2001; FERENCZY; FRANCO, 2002) (Figura 3).

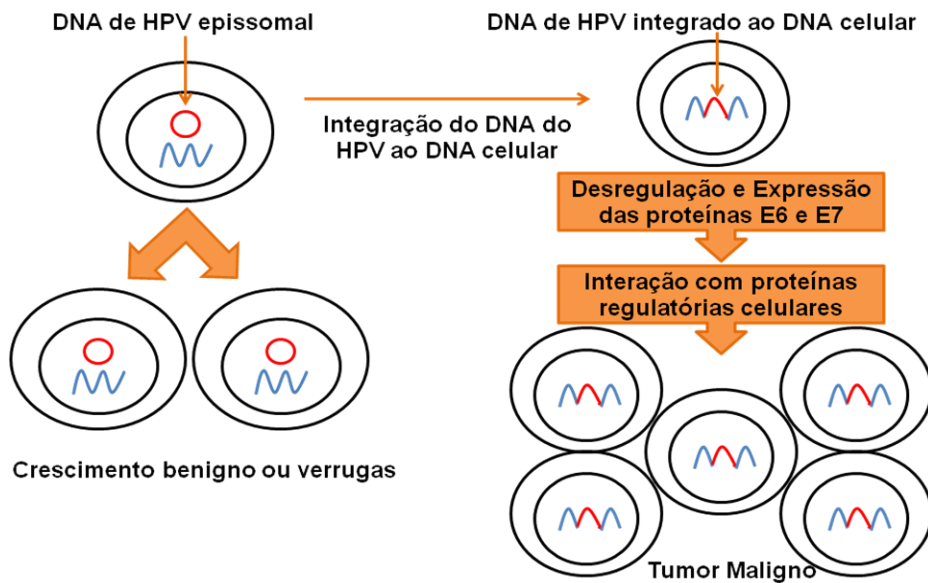


Figura 3 - Tipos de Interação com o DNA do HPV (adaptado de ALBERTS *et al.*, 1994)

A infecção pelo HPV ocorre primeiro nas células da camada basal dos epitélios através de microlesões. Ao se dividirem, algumas células permanecem na camada basal e outras continuam o processo de diferenciação nas camadas superiores. A carcinogênese pelo HPV resulta da expressão de dois genes virais, E6 e E7, que interferem com a função das proteínas pRb e p53 da célula hospedeira (Figura 4). A proteína p53 está relacionada ao controle do ciclo celular, principalmente pela função de manutenção da integridade do genoma, induzindo a apoptose (morte celular) quando ocorre alguma alteração nuclear. A pRb está envolvida no ciclo celular diretamente na transição das fases G1 para S. A ação dos genes E6 e E7 sobre a p53 e pRb leva à inibição da apoptose e à proliferação celular não programada, o que pode aumentar o risco de células infectadas evoluírem para a malignidade (FERENCZY; FRANCO, 2002; LODISH *et al.*, 2004).

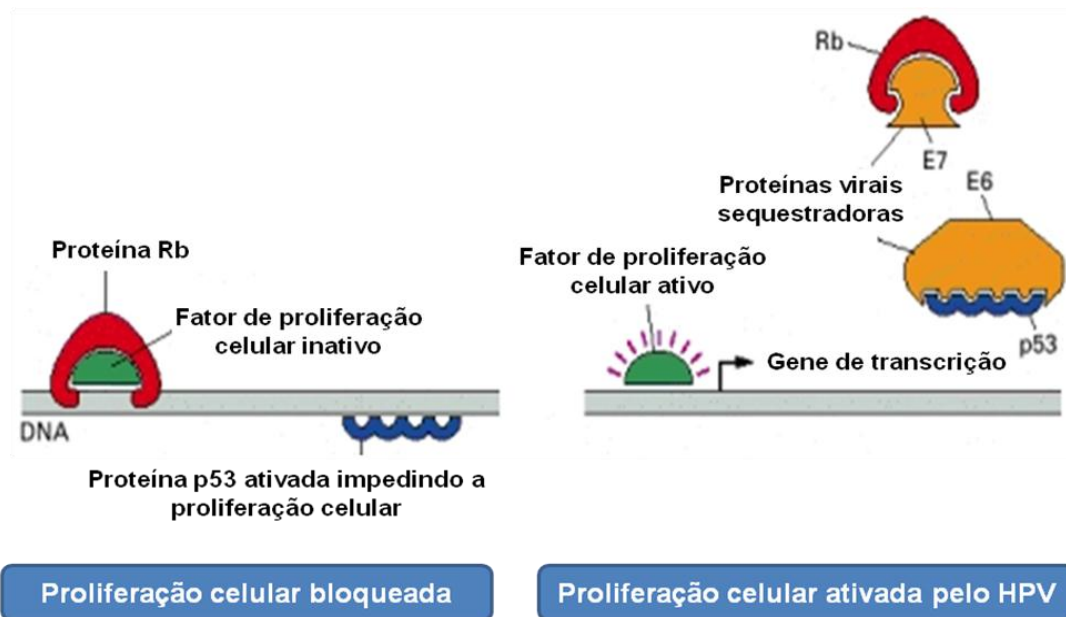


Figura 4 - Esquema das proteínas virais E6 e E7 interferindo com a função das proteínas pRb e p53 da célula hospedeira (adaptado de ALBERTS *et al.*, 1994)

Em condições normais, os produtos dos genes supressores de tumor p53 e pRb são expressos sempre que as células apresentam algum dano no DNA ou quando as células são forçadas a entrar em um estado replicativo. A p53 promove parada do ciclo celular na fase G1, reparo e apoptose no DNA, evitando que células com erro no DNA entrem na fase S (LODISH *et al.*, 2004). Sendo assim, as proteínas p53 e pRb são essenciais para o controle do crescimento normal das células, pois evitam a formação de células anormais e sua entrada no ciclo celular (FERENCZY; FRANCO, 2002).

Outro aspecto a ser considerado é a infecção múltipla, sendo que alguns dados sugerem que estas podem ter um efeito sinérgico na carcinogênese. LIAW *et al.* (2001) e ROUSSEAU *et al.* (2001) estudaram sobre a história natural da infecção e mostraram que mulheres já infectadas possuem um risco aumentado para a aquisição de novos tipos de HPV se comparadas com mulheres negativas para HPV.

A detecção e o tratamento de lesões precursoras causadas pelo HPV podem ser importantes estágios no diagnóstico e tratamento do câncer cervical. O teste de Papanicolaou como o método de rastreamento mais utilizado no mundo, gera um declínio na mortalidade por câncer cervical. Entretanto em países em desenvolvimento, enquanto programas de rastreamento são incomuns, o câncer cervical vem sendo uma das mais importantes causas de morte nas mulheres (FRANCO, *et al.*, 2001; PERRONS, *et al.* 2002; DINC *et al.*, 2010). A detecção do DNA-HPV, especialmente em infecções latentes pode

ser muito útil na detecção do câncer e lesões precursoras (SEVERSON, *et al.*, 2001; DINC *et al.*, 2010).

2.4 Diagnóstico molecular do HPV

Os membros da família do HPV não foram ainda cultivados *in vitro*, logo, a detecção do HPV baseia-se estritamente em análises moleculares das seqüências do DNA-HPV. Vários métodos moleculares foram desenvolvidos para o uso na detecção e quantificação do HPV (HUBBARD, 2003), dentre eles: Captura Híbrida 2 (CH2) (LORINCZ, 1996; GIOVANELLI *et al.*, 2004; SÖDERLUND-STRAND *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2009), hibridização *in situ* (ZUR HAUSEN *et al.*, 1974; BAGARELLI; OLIANI, 2004) e reação em cadeia da polimerase (PCR) (LIAW. *et al.*, 2001; PERRONS *et al.*, 2002; DIANZANI *et al.*, 2004; GIOVANELLI *et al.*, 2004; HAWS *et al.* 2004; SÖDERLUND-STRAND *et al.*, 2005; PAYAN *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2009; DINC *et al.*, 2010; SEAMAN *et al.*, 2010; TSIODRAS *et al.*, 2010) (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação entre as técnicas de detecção do HPV (adaptado de HUBBARD, 2003).

	Captura Híbrida	Imunoistoquímica/ Hibridização <i>in situ</i>	PCR	RQ-PCR
Amostra	Líquida	Líquida ou parafinada	Líquida ou parafinada	Líquida ou parafinada
Morfologia do Tecido	Não preserva	Preserva	Não preserva	Não preserva
Conservação	Líquido	Lâminas	Líquido	Líquido
Carga Viral	Sim	Não	Não	Sim
Sensibilidade	++	+	+++	++++
%Detecção/Tipo	18 sondas investigadas	Sondas investigadas	Todos os tipos	Todos os tipos
Forma de detecção	Grupos de risco	Tipo específico	Tipo específico	Tipo específico
Reações cruzadas	Sim	Sim	Não	Não

PCR: Reação em cadeia da polimerase; RQ-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Devido à baixa sensibilidade da hibridização *in situ*, ela tem sido substituída pela captura híbrida, que permite detectar o tipo de HPV e sua carga viral (BAGARELLI; OLIANI, 2004). Entretanto, o método mais comumente utilizado para detecção de HPV's genitais é a PCR através dos conjuntos de primers MY09/11 e GP5+/6+ (HAWS *et al.*, 2004), uma vez que a PCR possui maior sensibilidade de detecção dos genomas virais, quando comparada com outras metodologias (CHANG *et al.*, 1995).

A sensibilidade e especificidade do método PCR podem sofrer variações dependendo dos primers utilizados, do tamanho de produto da PCR, desempenho da DNA polimerase utilizada na reação e da quantidade de DNA-HPV amplificado e capacidade de detecção de múltiplos tipos. O DNA-HPV pode ser seletivamente amplificado por uma série de reações que levam a um aumento exponencial e reprodutível nas seqüências virais presentes no espécime biológico. A PCR pode produzir teoricamente um milhão de cópias de uma única molécula de DNA fita dupla depois de 30 ciclos da amplificação. Por isso, o cuidado deve ser tomado para evitar resultados falsos positivos originados de espécimes ou reagentes contaminados (IFTNER; VILLA, 2003).

Atualmente, a Captura Híbrida 2 (CH2) é o único teste de HPV aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso diagnóstico *in vitro*. A CH2 é um método não-radioativo, de quimioluminescência que detecta praticamente todos os tipos oncogênicos de HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68), bem como a maior parte dos genótipos não oncogênicos de HPV de baixo risco (6, 11, 42, 43, e 44). Dentro do sistema de teste da CH2, as sondas específicas de genótipos de alto e baixo risco são misturadas em um coquetel. Esta metodologia pode ser executada na maior parte dos laboratórios clínicos capazes de realizar testes de alta complexidade. A CH2 foi aprovada nos Estados Unidos como um suplemento ao teste de Papanicolaou na proteção do câncer cervical, sendo vendido em outros países como um teste diagnóstico de câncer cervical primário em conjunto ou separado com o teste de Papanicolaou (HUBBARD, 2003).

Em um estudo realizado com 975 pacientes oriundas de um programa de rastreamento para o câncer cervical em Porto Alegre, Brasil, foi encontrada uma prevalência de HPV de 15%, quando utilizada a técnica de CH, e de 16% quando utilizada a técnica de PCR. Quando combinadas as duas técnicas, a prevalência de HPV foi mais elevada 27% (NONNENMACHER *et al.*, 2002).

Em outro estudo, realizado com 80 pacientes cujas amostras foram coletadas durante exame ginecológico no Departamento de Ginecologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, a CH apresentou 47,5% de amostras positivas para HPV de alto risco, enquanto a PCR diagnosticou 87,5% de casos positivos, mostrando baixa concordância (40%) entre ambas. Os autores acreditam que a falha na detecção das amostras positivas pela CH seja devida a baixa carga viral nas amostras, tornando-as ocasionalmente falso-negativas (NOMELINI *et al.*, 2007).

A figura 5 ilustra a hierarquia relativa das sensibilidades dos métodos de sonda direta (hibridização *in situ*), amplificação de sinal (CH2) e métodos de amplificação de alvo PCR e RQ-PCR (PCR em tempo real quantitativa). As técnicas de sonda diretas oferecem menor sensibilidade para detecção de uma sequência de DNA específica, ao passo que a sensibilidade mais alta é realizada com amplificação alvo (CAUSSY *et al.*, 1988; HUSNJAK *et al.*, 2000; SCHIFFMAN *et al.*, 1991). A RQ-PCR é o método de amplificação de alvo mais sensível (GIBSON *et al.* 1996; HEID *et al.*, 1996, HUBBARD, 2003).

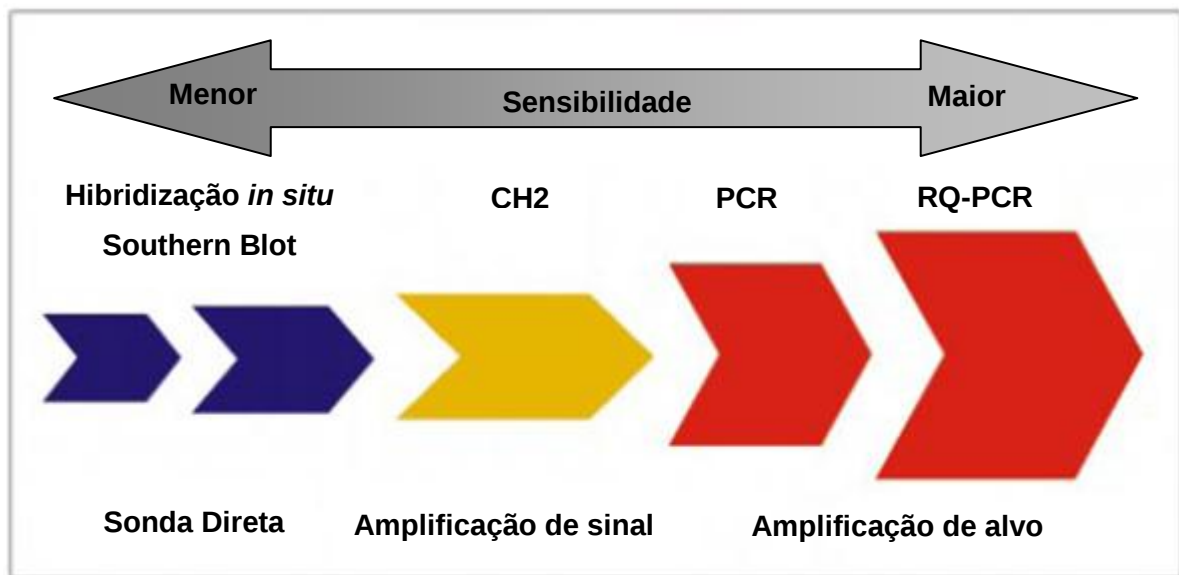


Figura 5 - Sensibilidades relativas das técnicas de análise do ácido nucleico (adaptado de HUBBARD, 2003).

O teste diagnóstico molecular ideal deve ser capaz de diferenciar uma sequência alvo a nível de nucleotídeos únicos, um atributo muito importante ao se desejar analisar mutações gênicas, por exemplo. As técnicas de amplificação alvo, RQ-PCR e PCR direta, são também as mais seletivas, sendo capazes de diferenciar sequências distintas menores em um DNA alvo. Os protocolos dos testes de seletividade mais baixa têm a dificuldade de diferenciação entre sequências de alvo semelhantes que têm um alto grau da homologia de sequência, como é o caso dos membros da família do HPV. Os testes de sonda direta e os testes de amplificação de sinal são, por isso, propensos a reatividade cruzada (HUBBARD, 2003).

A determinação do tipo de HPV do produto amplificado pela PCR pode ser feita através da técnica de polimorfismo dos tamanhos dos fragmentos de restrição (RFLP), seqüenciamento e hibridização do ácido nucleico. Na técnica de *RFLP* a detecção do HPV é feita por digestão do produto de PCR com enzimas de restrição, cujos fragmentos são analisados por eletroforese, com um padrão de banda específico para cada tipo de HPV. É um método manual e trabalhoso, de interpretação direta que não permite a identificação dos tipos presentes na amostra clínica com infecção por diversos tipos de HPV (MOLIJN *et al.*, 2005).

Os produtos de HPV amplificados por PCR podem ser clivados com enzimas de restrição e os fragmentos obtidos comparados para identificação do subtipo viral, o que permite classificar seu grau de risco. As enzimas de restrição utilizadas para a maior parte

das análises são: *BamHI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI*, e *PstI*. Os dados dos papillomavirus humanos por RFLP são às vezes difíceis de interpretar, sobretudo quando as infecções mistas são encontradas (HUBBARD, 2003; JACOBS *et al.*, 1999; KADO *et al.*, 2001; LUNGU *et al.*, 1992; MEYER *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1999).

2.5 Citologia Oncótica e Colposcopia

Os programas de rastreamento embasados na citologia oncótica (CO) têm sua eficácia definitivamente comprovada, tendo sido organizados e implementados com sucesso em muitos países. Com a implantação de programas de rastreamento eficazes entre 1986 e 1995, alguns países nórdicos conseguiram diminuir as taxas de incidência do câncer do colo do útero, como Islândia (redução de 67%), Finlândia (75%), Suécia (55%), Dinamarca (54%) e Noruega (34%) (EUROPEAN COMMISSION EUROPE AGAINST CÂNCER PROGRAMME, 2000).

Em 1988, o Ministério da Saúde do Brasil, por meio do Instituto Nacional de Câncer, criou o Programa Nacional de Controle do Câncer Cervical e de Mama, cujo objetivo era formar uma rede nacional integrada e facilitadora de acesso aos serviços de saúde, disponibilizando uma estrutura para realização de diagnóstico (citopatológico e histopatológico) e tratamento precoces (cirurgia de Alta Frequência - CAF), visando minimizar o impacto desta doença na população (INCA, 2002).

Baseado em informações do INCA, é estimado que uma redução de cerca de 80% da mortalidade por esse tipo de câncer pode ser alcançada mediante o rastreamento de mulheres na faixa etária de 25 a 65 anos com o teste de Papanicolaou e tratamento das lesões precursoras com alto potencial de malignidade ou carcinoma *in situ*. Para tanto, é necessário garantir a organização, a integralidade e a qualidade do programa de rastreamento, bem como o acompanhamento das pacientes (BRASIL, 2007).

Tais programas, embasados fundamentalmente na aplicação sistemática da CO, aumentaram significativamente a detecção das Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC), cujo tratamento é mais simples e menos agressivo que o das lesões invasoras. Sua aplicabilidade nos países em desenvolvimento é, no entanto, dificultada por vários fatores como altos custos para sua implantação, a necessidade de laboratórios e profissionais capacitados, além da logística complexa para um programa de rastreamento. Os laudos do exame citológico são subjetivos, dependem da interpretação morfológica, e são sujeitos a riscos de coleta inadequada ou de controle de qualidade insuficiente, podendo levar a

erros de laboratório ao rastrear e interpretar os exames e a conseqüentes falhas na prevenção do câncer cervical (CRONJÉ, 2004;KOSS, 2006).

O principal problema do programa de rastreamento embasado na CO é sua baixa sensibilidade que, segundo estudos de revisão, varia entre 30% e 87%, ainda que sua especificidade tenha oscilado de 86% a 100% (OGILVIE *et al.*, 2010). Outros fatores que colaboram para a baixa eficácia dos programas de rastreamento baseados na CO em países em desenvolvimento são predominantemente conjunturais, como a pequena cobertura das populações de risco e a precariedade da assistência médica (CRONJÉ *et al.*, 2004). A alta desproporcionalidade do câncer cervical em países em desenvolvimento e em outras populações inobservadas clinicamente é basicamente devido à falta de rastreamento, o que permite a detecção de lesões pré-cancerosas e do câncer cervical em estágio inicial (MATHEW e GEORGE, 2009; PARKIN *et al.*, 2008; VIZCAINO *et al.*, 2000).

No Brasil, de acordo com o INCA, a melhoria da cobertura do exame citológico ainda não foi suficiente para reduzir a mortalidade por câncer do colo do útero em muitas regiões. O diagnóstico tardio ainda é o mais habitual e pode estar relacionado as dificuldades no acesso da população feminina aos serviços e programas de saúde, baixa capacitação dos recursos humanos envolvidos na atenção oncológica, incapacidade do sistema de saúde para absorver a demanda às Unidades de Saúde e dificuldades dos gestores municipais e estaduais em definir e estabelecer um fluxo assistencial com hierarquização dos diversos níveis de atenção (BRASIL, 2006 b).

O estudo citológico do esfregaço cervical permite a identificação de um conjunto de alterações classificadas de acordo com a presença e o grau das atipias celulares (Tabela 3). Pelo Sistema Bethesda, elas se dividem em alterações com critérios citológicos definidos (inflamatórias, lesão intra-epitelial de baixo grau, lesão intra-epitelial de alto grau, carcinoma invasor) e alterações indeterminadas, que são aquelas que não apresentam critérios morfológicos para serem classificadas definitivamente como reativas ou como neoplásicas, denominadas atipias escamosas (ASC) (SOLOMON *et al.*, 2002).

Tabela 3 - Nomenclatura comparativa dos achados citológicos cervicais (adaptado de DEWAR *et al.*, 1992).

Papanicolaou (1942)	OMS (1952-1973)	Richart (1967)	Bethesda (1988)
Classe I (Normal)	Normal	Normal	Dentro dos limites normais
Classe II (Inflamatório)	Atipias	Atipias	ASC-US, AGUS, Alterações epiteliais benignas, Infecção, Alterações reativas/reparativas
Classe III (Sugestivo, mas não conclusivo de malignidade)	Displasia Leve	Infecção pelo HPV (condiloma)	LSIL
		NIC I	
	Displasia Moderada	NIC II	HSIL
Classe IV (Fortemente sugestivo de malignidade)	Displasia Acentuada	NIC III	
	Carcinoma <i>in situ</i>		
Classe V (Conclusivo de malignidade)	Carcinoma escamoso invasor	Carcinoma escamoso invasor	Carcinoma invasor de células escamosas

OMS: Organização Mundial da Saúde; NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical; ASC-US: Atipias escamosas de significado indeterminado; AGUS: Atipias glandulares de significado indeterminado; LSIL: Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau; HSIL: Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau

O exame citopatológico não diagnostica a infecção pelo HPV e nem especifica o seu tipo, mas evidencia alterações celulares que sugerem a presença deste vírus, tais como paraceratose, coilocitose, binucleação (Figura 6) e núcleos hipertróficos com cromatina grosseira (KOSS, 2006). Com isso, novos métodos de rastreamento, como testes de detecção do DNA do HPV e inspeção visual do colo do útero, utilizando ácido acético ou lugol, se tornaram também eficazes na redução das taxas de mortalidade por câncer do colo do útero (INCA, 2009).

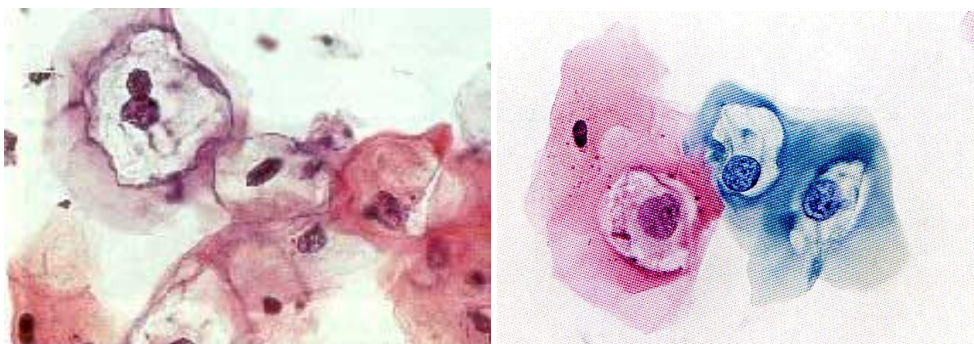


Figura 6 - Coilócitos – células compatíveis com a infecção pelo HPV (PEREYRA e PARELLADA, 2005)

A citologia oncológica, introduzida na década de 40 por PAPANICOLAOU e TRAUT (1943), constituiu grande avanço no controle do carcinoma da cérvix uterina. O método foi gradativamente adquirindo adeptos, assimilado em serviços de ginecologia e, atualmente, representa importante forma de rastreamento deste tipo de neoplasia. A sua grande aceitabilidade, tanto pela população como pelos profissionais de saúde, aliada à facilidade de execução, tem permitido a redução significativa da mortalidade por câncer do colo do útero nos países onde sua implementação foi ampla, principalmente nos centros mais desenvolvidos (MOTTA *et al.*, 2001).

É sugerido pelo Ministério da Saúde do Brasil, que o exame citopatológico seja realizado em mulheres de 25 a 60 anos de idade, uma vez por ano e, após dois exames anuais consecutivos negativos, a cada três anos. Essa recomendação apóia-se na observação da história natural do câncer do colo do útero, que permite a detecção precoce de lesões pré-malignas ou malignas e o seu tratamento oportuno, graças à lenta progressão que apresenta para doença mais grave (Figura 7). Em geral, estima-se que a maior parte das lesões de baixo grau regredirá espontaneamente, enquanto cerca de 40% das lesões de alto grau não tratadas evoluirão para câncer invasor em um período médio de 10 anos (BRASIL, 2006a).

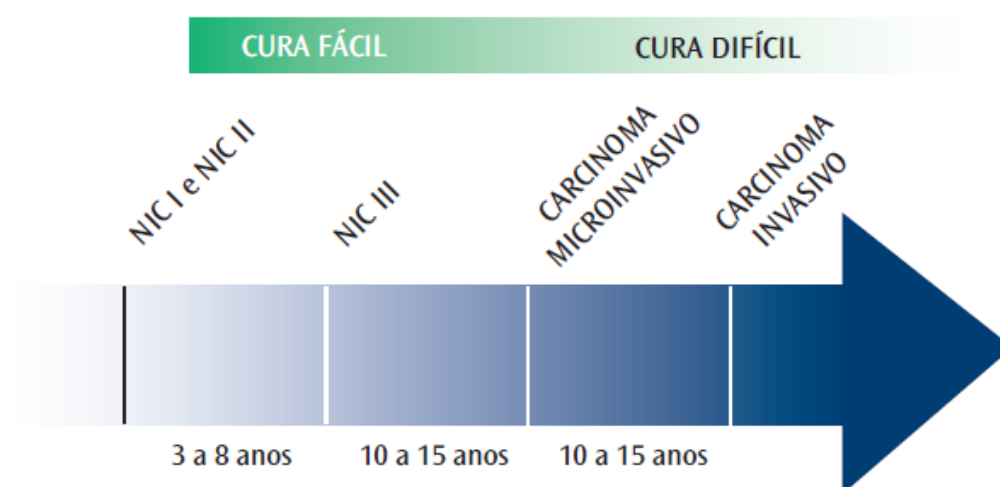


Figura 7 - Seqüência típica de eventos na história natural do câncer cervical (BRASIL, 2006).

A colposcopia é um exame que permite visualizar a vagina e o colo do útero por meio de um aparelho chamado colposcópio. Esse aparelho permite a ampliação do colo do útero de 10 a 40 vezes do tamanho normal, possibilitando verificar pequenas alterações difíceis de serem vistas a olho nu. Este exame é geralmente recomendado para mulheres

que têm resultado anormal do exame de Papanicolaou ou para aquelas que durante o exame ginecológico foi notada alguma alteração. Durante a colposcopia são utilizados ácido acético a 5% e lugol a 2% para realce de áreas a serem examinadas. A colposcopia também é indicada quando é necessária uma biópsia do colo do útero ou quando há uma suspeita de infecção pelo HPV (CHASE *et al.*, 2009).

FERRIS e LITAKER (2005), em um estudo de triagem avaliando a qualidade da colposcopia interobservador em pacientes examinadas em quatro centros clínicos, encontraram sensibilidade de 37% e especificidade de 90%, com valor preditivo positivo de 31% e valor preditivo negativo de 92%. CORDEIRO *et al.* (2005) estimaram a validade da visualização com ácido acético (VIA) no rastreamento das NIC e lesões induzidas por HPV, comparando seu desempenho com o da colposcopia. Foram analisadas 303 mulheres biopsiadas em unidade de Saúde Pública de Recife-PE. O estudo histopatológico foi anormal em 24. Deste total, a VIA foi positiva em 22, conferindo-lhe sensibilidade estimada de 91,7%, especificidade de 68,9%, valor preditivo positivo de 7,5% e valor preditivo negativo de 99,7%. Concluindo que sua baixa especificidade foi responsável por um elevado número de resultados falso-positivos. Em outro estudo realizado por MOUSAVI, *et al.* (2007) no Irã, avaliando a correlação entre colposcopia e a histologia em 344 mulheres, encontraram sensibilidade de 74% e especificidade de 91%, com valor preditivo positivo de 92% e valor preditivo negativo de 70%.

2.6 Metodologia Geral

Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo do tipo transversal, realizado no período de Maio de 2009 à Março de 2011, a partir de levantamento epidemiológico dos casos de anormalidades citológicas e colposcópicas do Ambulatório de Ginecologia do Núcleo de Apoio à Saúde da Família (NASF) de Penedo município com alto índice de pobreza (60,62%) no estado de Alagoas, com abordagem analítica quantitativa e modelo descritivo de apresentação de dados.

Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Tiradentes/Aracaju/SE, sob protocolo de número 060810, conforme regulamentado pela Resolução 196/96 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEPE). O estudo foi

realizado no Laboratório de Biologia Molecular em cooperação com o Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Instituto de Tecnologia e Pesquisa.

Todas as participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). O acompanhamento ou manejo de mulheres com citologias cervicais anormais não fez parte do estudo. Entretanto, o protocolo previa que os resultados da PCR (detecção e tipagem do HPV) estariam disponíveis às pacientes ao término do estudo, e que seria de responsabilidade do pesquisador comunicar esses resultados ao ginecologista responsável pelo Ambulatório de Ginecologia.

Amostras clínicas

Neste estudo foram utilizados raspados cervicais das pacientes portadoras de alterações citológicas e colposcópicas. Foram incluídas no estudo mulheres que possuíam resultado citológico: células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), células glandulares atípicas de significado indeterminado (AGUS), lesão intra-epitelial de baixo grau (LSIL), lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL) e carcinoma invasivo tipo epidermóide. Também foram incluídas neste estudo pacientes com alterações colposcópicas do tipo epitélio acetobranco (EAB), pontilhado, mosaico, epitélio iodo positivo parcial e epitélio iodo negativo, consideradas como colposcopia positiva. Os formulários (Apêndice B) foram preenchidos baseados nos prontuários das pacientes.

Coleta do material

Os raspados cervicais foram coletados com espátulas de Ayre. O raspado coletado foi acondicionado em tubos Falcon, contendo 25 mL de solução tampão PBS (Tampão Fosfato Salino, pH 7,4) e estocado a -20°C até a extração do DNA. A colposcopia foi realizada por um médico colposcopista experiente, sendo utilizado o ácido acético a 5% e solução de Lugol a 2% (CHASE *et al.*, 2009).

Extração do DNA

A extração do DNA oriundo da coleta cervical foi realizada utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 200µL das amostras foram digeridas com 20µL de proteinase K e 200µL de tampão AL a 56°C por 10 minutos. A precipitação do DNA foi realizada pela adição de 200µL de etanol (96%). O DNA foi eluído em 200µL de tampão AE e foi estocado a -20°C até uso posterior.

Amplificação do DNA

Foram utilizados neste estudo, dois diferentes pares de “primers” para detecção do HPV: MY09/MY11, GP5+/GP6+ (Tabela 4). As reações de PCR para cada “primer” foram realizadas separadamente conforme descrito previamente por BERNARD *et al.* (1994) e DE RODA-HUSMAN *et al.* (1995). A tabela 4 revela os pares de “primers” utilizados para a técnica de PCR e as respectivas condições de reação para cada par de “primer”. Para cada reação de PCR, foi utilizado um controle positivo (DNA extraído de amostra de condiloma) e um controle negativo (H₂O). O resultado foi considerado positivo para DNA viral quando um dos testes com os “primers” MY09/MY11 ou GP5+/GP6+ detectou DNA-HPV.

Tabela 4 – “Primers” genéricos utilizados para detecção do DNA-HPV

Iniciadores	Sequência	Tamanho do Fragmento	Protocolo (PCR)	Condições (PCR)
MY09	5'CGTCCMARRGGAWACTGATC 3'	450 pb	15 mM MgCl ₂ (<i>buffer</i> 1x), 800 µM de dNTPs, 50 pmol/µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,25 U da Hot Star Taq DNA polimerase (Invitrogen)	40 ciclos: 94°C/45 seg. 55°C/45 seg. 72°C/45 seg.
MY11	5'GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3'			1 ciclo: 72°C/5 min.
GP5+	5'TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3'	150 pb	15 mM MgCl ₂ (<i>buffer</i> 1x), 800 µM de dNTPs, 50 pmol/µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,25 U da Hot Star Taq DNA polimerase (Invitrogen)	40 ciclos: 94°C/45 seg. 45°C/45 seg. 72°C/45 seg.
GP6+	5'GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC 3'			1 ciclo: 72°C/5 min
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase				

Eletroforese

A corrida eletroforética foi realizada em gel de Agarose (1,5%) corado com Blue Green Loading Dye (LGC/Biotecnologia®), os fragmentos de DNA foram visualizados através de um transiluminador Wilber Lourmat) sob luz Ultra Violeta. Em seguida o gel foi

fotografado com uma câmera digital de 6.0 Megapixel modelo SP-500 UZ (Olympus®, Tokyo, Japão).

Análise dos dados

Os dados foram coletados em formulário que consta os dados pessoais da paciente, como nome, data de nascimento e endereço, bem como os dados clínicos como os resultados da citologia e colposcopia, dados de registro da paciente no ambulatório e datas das coletas.

Foi realizada tabulação dos dados utilizando o *Microsoft Office Excel* 2007. O software SPSS versão 16.0 (Chicago, IL, USA), foi utilizado para a análise dos dados, onde foram analisadas as seguintes variáveis: ano do exame citológico, idade da paciente e diagnóstico clínico das lesões.

Para a análise estatística foi utilizado o teste do qui-quadrado e/ou o teste de Fisher considerando-se significativas aquelas variáveis que alcançaram um $p < 0,05$ no teste bicaudal.

2.7 Referências

- AHMEDIN JEMAL, D. V. M.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*, 61, p. 69–90, 2011.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 3 ed. New York: Garland, 863-910, 1994.
- BAGARELLI, L. B.; OLIANI, A. H. Tipagem e estado físico de papilomavírus humano por hibridização *in situ* em lesões intra-epiteliais do colo uterino. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 26(1), p. 59-64, 2004.
- BERNARD, H. U.; CHAN, S. Y.; MANOS, M. M.; ONG, C. K.; VILLA, L. L.; DELIUS, H.; PEYTON, C. L.; BAUER, H. M.; WHEELER, C. M. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *Journal of Infectious Diseases*, 170(5), p.1077-1085, 1994.
- BOSCH F. X.; MANOS, M. M.; MUNOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A. M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M. H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, K. V. For the International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) study group. Prevalence of human

papillomavirus in cervical câncer: a worldwide perspective. *Journal of the National Cancer Institute*, 87(11), p. 796–802, 1995.

BOSCH, F. X.; LORINCZ, A.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C. J. L. M.; SHAH, K. V. The causal relation between human papillomavirus and cervical câncer. *Journal of Clinical Pathology*, 55(4), p. 244-265, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência á Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Viva Mulher. Câncer do Colo do Útero. Informações técnico-gerenciais e ações desenvolvidas. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

BROWN D. R.; FIFE K. H. Human papillomavirus infections of the genital tract. *Medical Clinics of North America*, 74(6), p. 1455-1485, 1990.

CASTRO, T. P. P. G.; BUSSOLOTI FILHO, I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 72(2), p. 272-282, 2006.

CAUSSY, D.; ORR, W.; DAYA, A. D.; ROTH, P.; REEVES, W.; RAWLS, W. Evaluation of methods for detecting human papillomavirus deoxyribonucleotide sequences in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(2), p. 236–243, 1988.

CHANG, F. Role of papillomaviruses. *Journal of Clinical Pathology*, 43(4), p. 269-276, 1990.

CHANG, D. Y.; HSIEH, C.Y.; CHEN, R. J.; LEE, S. C.; HUANG, S. C. Comparison of detection of human papillomavirus 16 DNA in cervical carcinoma tissues by Southern blot hybridisation and nested polymerase chain reaction. *Journal of Medical Microbiology*, 43(6), p. 430-435, 1995.

CHASE, D. M.; KALOUYAN, M.; DISAIA, P. J. Colposcopy to evaluate abnormal cervical cytology in 2008. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 200(5), p. 472-480, 2009.

CLAVEL, C. E., NAWROCKI, B.; BOSSEAU, B.; POITEVIN, G.; PUTAUD, I. C.; MANGEONJEAN, C. C.; MONTEAU, M.; BIREMBAUT, P. L. Detection of human papillomavirus DNA in bronchopulmonary carcinomas by hybrid capture II: a study of 185 tumors. *Cancer*, 88(6), p. 1347–1352, 2000.

- CLIFFORD, G. M.; RANA, R. K.; FRANCESCHI, S.; SMITH, J. S.; GOUGH, G.; PIMENTA, J. M. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical câncer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14(5), p. 1157-1164, 2005.
- CORDEIRO, M. R. A.; COSTA, H. DE L. F. F.; ANDRADE, R. P. DE; BRANDÃO, V. R. A.; SANTANA, R. Inspeção visual do colo uterino após aplicação de ácido acético no rastreamento das neoplasias intra-epiteliais e lesões induzidas por HPV. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 27(2), p. 51-57, 2005.
- CRONJÉ, H. S. Screening for cervical câncer in developing countries. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 84(2), p. 101-108, 2004.
- CRUM, C. P. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host and the stem cell. *Modern Pathology*, 13(3), p. 243-251, 2000.
- DEACON, J. M. EVANS, C. D.; YULE, R.; DESAI, M.; BINNS, W.; TAYLOR, C.; PETO, J. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN 3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *British Journal of Cancer*, 83(11), p. 1565–1572, 2000.
- DEMAY, R. M. **Practical Principles of Cytopathology Revised Edition**. American Society for Clinical Pathology, 2 ed. 2010.
- DE RODA HUSMAN, A. M.; WALBOOMERS, J. M. M.; VAN DEN BRULE, A. J. C.; MEIJER C. J. L. M.; SNIJDERS, P. J. F. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3`ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*, 76(4), p. 1057-1062, 1995.
- DE SANJOSE, S.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUÉ, X.; CLIFFORD, G.; BRUNI, L.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases*, 7(7), p. 453-459, 2007.
- DEWAR, M. A. HALL, K.; PERCHALSKI, J. Cervical câncer screening. Past success and future challenge. *Primary Care*, 19(3), p. 589-605, 1992.
- DE VILLIERS, E. M. Human papillomavirus: introduction. *Seminars in Cancer Biology*, 9(6), p. 377, 1999.
- DE VILLIERS, E. M. Taxonomic classification of papillomaviruses. *Papillomaviruses Reproductive*, (12), p. 57-63, 2001.

- DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, p. 17-27, 2004.
- DIANZANI, C.; CALVIERI, S.; PIERANGELI, A.; DEGENER, A. M. Identification of human papilloma viruses in male dysplastic genital lesions. *New Microbiol*, 27(1), p. 65-69, 2004.
- DINC, B.; ROTA, S.; ONAN, A.; BOZDAYI, G.; TASKIRAN, C.; BIRI, A.; GÜNER, H. Prevalence of human papillomavirus (HPV) and HPV-16 genotyping by real-time PCR in patients with several cervical pathologies. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14(1), p. 19-23, 2010.
- DOORBAR, J.; STERLING, J. C. The biology of human papillomaviruses In: STERLING, J.C. & TYING, S.K. (eds) **Human papillomaviruses – Clinical and scientific advances** **Londres**, Arnold, p. 10-23, 2001.
- ELUF-NETO, J. BOOTH, M.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; MEIJER, C. J.; WALBOOMERS, J. M. Human papillomavirus and invasive cervical câncer in Brazil. *Brasílian Journal of Cancer*, 69(1), p. 114-119, 1994.
- EUROPEAN COMMISSION EUROPE AGAINST CÂNCER PROGRAMME. Evaluation and monitoring of screening programmes. Brussels, Luxembourg, 2000.
- FERENCZY, A.; FRANCO, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *The Lancet Oncology*, 3(1), p. 11-16, 2002.
- FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase N°. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; Year. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/>. 2010. Acessado em: 11/02/2011.
- FERRIS, D. G.; LITAKER, M. Interobserver agreement for colposcopy quality control using digitized colposcopic images during the ALTS trial. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 9(1), p. 29-35, 2005.
- FRANCO, E.; VILLA, L.; ROHAN, T.; FERENCZY, A.; PETZL-ERLER, M.; MATLASHEWSKI, 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. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 6(4), p. 223-233, 1999.
- FRANCO, E. L.; DUARTE-FRANCO, E.; FERENCZY, A. Cervical câncer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Canadian Medical Association Journal*, 164(7), p. 1017-1025, 2001.

- GARLAND, S. M. Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. *Pathology*, 34(3), p. 213–224, 2002.
- GIBSON, U. E.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RQ-PCR. *Genome Research*, 6, p. 995–1001, 1996.
- GIOVANELLI, L.; LAMA, A.; CAPRA, G.; GIORDANO, V.; ARICÒ, P.; AMMATUNA, P. Detection of human papillomavirus DNA in cervical samples: analysis of the new PGMYP-PCR compared to the hybrid capture II and MY-PCR assays and a two-step nested PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), p. 861-864, 2004.
- HAWS, A. L. F.; HE, Q.; RADY, P. L.; ZHANG, L.; GRADY, J.; HUGHES, T. K.; STISSER, K.; KONIG, R.; TYRING, S. K. Nested PCR with the PGMY09/MY11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *Journal of Virological Methods*, 122(1), p. 87–93, 2004.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), p. 986–994, 1996.
- HERBST, A. L. **Intraepithelial neoplasia of the cervix**. In: Comprehensive Gynecology, St Louis, Mosby Year Book 2 ed (A. L. Herbst, D.R. Mishell, M.A. Stenchever), p. 821-859, 1992.
- HILDESHEIM, A.; HERRERO, R.; CASTLE, P. E.; WACHOLDER, S.; BRATTI, M. C.; SHERMAN, M. E.; LORINCZ, A. T.; BURK, R. D.; MORALES, J.; RODRIGUEZ, A. C.; HELGESEN, K.; ALFARO, M.; HUTCHINSON, M.; BALMACEDA, I.; GREENBERG, M.; SCHIFFMAN, M. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Braslian Journal of Cancer*, 84(9), p. 1219–1226, 2001.
- HOFFMANN, M.; KAHN, T.; MAHNKE, C. G.; GOEROEGH, T.; LIPPERT, B. M.; WERNER, J. A. Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the head and neck determined by polymerase chain reaction and Southern blot hybridization: proposal for optimized diagnostic requirements. *Acta Otolaryngol*, 118(1), p. 138–144, 1998.
- HUBBARD, R. A. Human Papillomavirus testing methods. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 127(8): 940-945, 2003.
- HUSNJAK, K.; GRCE, M.; MAGDIC, L.; PAVELIC, K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *Journal of Virological Methods*, 88(2), p.125–134, 2000.

IFTNER, T.; VILLA, L. L. Human Papillomavirus Technologies. *Journal of National Cancer Institute Monographs*, 31, p. 80-88, 2003.

INSINGA, R. P.; DASBACH, E. J.; ELBASHA, E. H. Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) disease: *a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model*. *BMC Infectious Diseases*, 9(119), p. 1-26, 2009.

IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Monographs in Human Pappilomaviruses. 1ed. Lyon: IARC, p.64, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Periodicidade de realização do exame preventivo do câncer do colo do útero: normas e recomendações do INCA. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 48(1): p. 13-15, 2002.

JACOBS, M. V.; SNIJDERS, P. J. F.; VOORHORST, F. J.; DILLNER, J.; FORSLUND, O.; JOHANSSON, B.; DOEBERITZ, M. VON K.; MEIJER, C. J. L. M.; MEYER, T.; NINDL, I.; PFISTER, H.; STOCKFLETH, E.; STRAND, A.; WADELL, G.; WALBOOMERS, J. M. M. Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison. *Journal of Clinical Pathology*, 52(7), p. 498–503, 1999.

JORDÃO, A. V.; RUGGERI, L. S.; CHIUCHETA, G. I. R.; PIVA, S.; CONSOLARO, M. E. L. Importância da aplicação de critérios morfológicos não clássicos para o diagnóstico citológico de papilomavírus humano. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39(1), p. 81-89, 2003.

KADO, S.; KAWAMATA, Y.; SHINO, Y.; KASAI, T.; KUBOTA, K.; IWASAKI, H.; FUKAZAWA, I.; TAKANO, H.; NUNOYAMA, T.; MITSUHASHI, A.; SEKIYA, S.; SHIRASAWA, H. Detection of human papillomaviruses in cervical neoplasias using multiple sets of generic polymerase chain reaction primers. *Gynecologic Oncology*, 81(1), p. 47–52, 2001.

KJAER, S.K.; DE VILLIERS, E. M.; HAUGAARD, B. J.; CHRISTENSEN, R. B.; TEISEN, C.; MOLLER, K. A.; POLL, P.; JENSEN, H.; VESTERGAARD, B. F.; LYNGE, E.; JENSEN, O. M. Human papillomavirus, herpes simplex virus and cervical câncer incidence in Greenland and Denmark. A population-based cross-sectional study. *International Journal of Cancer*, 41(4), p. 518–524, 1988.

KOSS, L. G. **Squamous carcinoma of the uterine cervix and its precursors**. In: Diagnostic cytology and its histopathologic bases. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 11, p. 282-318, 2006.

KREIMER, A. R.; CLIFFORD, G. M.; SNIJDERS, P. J. F.; CASTELLSAGUE´, X.; MEIJER, C. J. L. M.; PAWLITA, M.; VISCIDI, R.; HERRERO, R.; FRANCESCHI, S. For the International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicenter Oral Cancer study group. HPV16 semiquantitative viral load and serologic biomarkers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *International Journal of Cancer*, 115(2), p. 329-332, 2005.

LEVI, J.E.; KLETER, B.; QUINT, W. G. V.; FINK, M. C. S.; CANTO, C. L. M.; MATSUBARA, R.; LINHARES, I.; SEGURADO, A.; VANDERBORGHT, B.; NETO, J. E.; VAN DOORN, L. J. High Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) Infections and High Frequency of Multiple HPV Genotypes in Human Immunodeficiency Virus- Infected Women in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), p. 3341-3345, 2002.

LIAW, K. L.; HILDESHEIM, A.; BURK, R. D.; GRAVITT, P.; WACHOLDER, S.; MANOS, M. M.; SCOTT, D. R.; SHERMAN, M. E.; KURMAN, R. J.; GLASS, A. G.; ANDERSON, S. M.; SCHIFFMAN, M. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of others HPV types. *Journal of Infectious Diseases*, 183(1), p. 8-15, 2001.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA P. Cancer. In: **Molecular cell biology**. 5 ed. New York: W. H. Freeman, Cap. 23, p. 956-960, 2004.

LORENZATO, F.; HO, L.; TERRY, G.; SINGER, A.; SANTOS, L. C.; BATISTA, R. DE L.; LUBAMBO, T. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). *International Journal of Gynecological Câncer*, Cambridge, 10(2), p. 143-150, 2000.

LORINCZ, A. T.; REID, R.; JENSON, A. B.; GREENBERG, M. D.; LANCASTER, W.; KURMAN, R. J. Human Papillomavirus infection of the cervix: Relative risk association of 15 common anogenital types. *Obstetrics and Gynecology*, 79(3), p. 328-337, 1992.

LORINCZ, A. T. Hybrid capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens. *Papillomavirus report*, 7, p. 1-5, 1996.

LUNGU, O.; WRIGHT, T. C. JR.; SILVERSTEIN, S. Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. *Molecular and Cellular Probes*, 6(2), p.145–152, 1992.

MAHDAVI, A.; MONK, B. J. Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Câncer: Promises and Challenges. *The Oncologist*, 10(7), p. 528-538, 2005.

- MATHEW, A.; GEORGE, P. S. Trends in incidence and mortality rates of squamous cell carcinoma carcinoma and adenocarcinoma of cervix– worldwide. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 10(4), p. 645-650, 2009.
- MELNIKOW, J.; NUOVO, J.; WILLAN, A. R.; CHAN, B. K.; HOWELL, L. P. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology*, 92(4 Pt 2), p. 727-735, 1998.
- MELO, H. R. L.; SOUZA, R. R. Infecções em indivíduos com alterações da imunidade. In: MELO, H. R. L.; BRITO, C. A. A.; MIRANDA FILHO, D. B.; SOUZA, S. G.; HENRIQUES, A. P. C.; SILVA, O. B. **Condutas em doenças infecciosas**. Rio de Janeiro: MEDSI; p.650-70, 2004.
- MENDONÇA, M.; CAMARGO, R. C. DE; FERREIRA, R. C.; SILVA, R. E. Tabagismo e sua inter-relação com doenças ginecológicas. *Jornal Brasileiro de Medicina*, 86(3), p. 60-63, 2004.
- MEYER, T.; ARNDT, R.; STOCKFLETH, E.; FLAMMANN, H. T.; WOLF, H.; REISCHL, U. Strategy for typing human papillomaviruses by RFLP analysis of PCR products and subsequent hybridization with a generic probe. *Biotechniques*, 19(4), p. 632–639, 1995.
- MORENO, V.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C. J. L. M.; SHAH, K.; WALBOOMERS, J. M. M.; HERRERO, R.; FRANCESCHI, S. For the International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer study group. Effect of oral contraceptives on risk of cervical câncer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric casecontrol study. *The Lancet*, 359(9312), p. 1085–1192, 2002.
- MORENO, V.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOS, S.; GONZALEZ, L. C.; TAFUR, L.; GILI, M.; IZARZUGAZA, I.; NAVARRO, C.; VERGARA, A.; VILADIU, P.; ASCUNCE, N.; SHAH, K. V. Risk factors for progression of cervical intraepithelial neoplasm grade III to invasive cervical câncer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 4(5), p. 459–467, 1995.
- MOLIJN, A.; KLETER, B.; QUINT, W.; VAN DOORN, L. J. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*, 32(1), p. 43-51, 2005.
- MOORE, C. E.; WIATRAC, B. J.; MCCLATCHEY, K. D.; KOOPMANN, C. F.; THOMAS, G. R.; BRADFORD, C. R.; CAREY, T. E. High-risk human papillomavirus types and squamous cell carcinoma in patients with respiratory papillomas. *Otolaryngology & Head and Neck Surgery*. 120(5), p. 698–705, 1999.

- MOTOYAMA, S.; LADINES-LLAVE, C. A.; VILLANUEVA, S. L.; MARUO, T. The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. *Kobe Journal of Medical Sciences*, 50(1), p. 9-19, 2004.
- MOTTA, E. V.; FONSECA, A. M. DA; BAGNOLI, V. R.; RAMOS, L. DE O.; PINOTTI, J. A. Colpocitologia em ambulatório de Ginecologia preventiva. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 47(4), p. 302-310, 2001.
- MOUSAVI, A. S.; FAKOUR, F.; GILANI, M. M.; BEHTASH, N.; GHAEMMAGHAMI, F.; ZARCHI M. K. A prospective study to evaluate the correlation between Reid colposcopic index impression and biopsy histology. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 11(3), p.147-150, 2007.
- MUÑOZ, N.; FRANCESCHI, S.; BOSETTI, C.; MORENO, V.; HERRERO, R.; SMITH, J. S.; SHAH, K. V.; MEIJER, C. J. L. M.; BOSCH, F. X. For the International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer study group. Role of parity and human papillomavirus in cervical câncer: the IARC multicentric case-control study. *The Lancet*, 359(9312), p. 1093-1101, 2002.
- MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; SANJOSE, S. DE; HERRERO, R.; CASTELLSAGUE, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. For the International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer study group. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Câncer. *New England Journal of Medicine*, 348(6), p. 518-527, 2003.
- MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; GONZÁLEZ, A. B. DE; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24(3), p. 3- 10, 2006.
- NOMELINI, R. S.; BARCELOS, A. C. M.; MICHELIN, M. A.; ADAD, S. J.; MURTA, E. F. C. Utilization of human papillomavirus testing for cervical cancer prevention in a university hospital. *Caderno de Saúde Pública*, 23(6), p. 1309-1318, 2007.
- NONNENMACHER, B.; BREITENBACHA, V.; VILLAB, L. L.; PROLLACMARY, J. C.; BOZZETTIC, C. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Revista de Saúde Pública*, 36(1), p. 95-100, 2002.
- NORONHA, V.; MELLO, W.; VILLA, L.; BRITO, A.; MACÊDO, R.; BISI, F.; MOTA, R.; SASSAMOTO, K.; MONTEIRO, T.; LINHARES, A. Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(3), p. 235-240, 1999.

OGILVIE, G. S.; VAN NIEKERK, D. J.; KRAJDEN, M.; MARTIN, R. E.; EHLEN, T. G.; CEBALLOS, K.; PEACOCK, S. J.; SMITH, L. W.; KAN, L.; COOK, D. A.; MEI, W.; STUART, G. C. E.; FRANCO, E. L.; COLDMAN, A. J. A randomized controlled trial of Human Papillomavirus (HPV) testing for cervical cancer screening: trial design and preliminary results (HPV FOCAL Trial). *BMC Cancer*, 10(111), p. 1-10, 2010.

OSTOR A. G. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *International Journal of Gynecological Pathology*, 12(2), p. 186–192, 1993.

PAGLIUSI, S. R.; AGUADO, M. T. Efficacy and other milestones for human papillomavirus vaccine introduction. *Vaccine*, 23(5), p. 569-78, 2004.

PAPANICOLAOU, G.; TRAUT, H. E. Diagnosis of uterine cancer by vaginal smears. *The Commonwealth Fund.*, 1943.

PARKIN, D. M.; ALMONTE, M.; BRUNI, L.; CLIFFORD, G.; CURADO, M. P.; PIÑEROS, M. Burden and trends of type-specific human papillomavirus infections and related diseases in the latin america and Caribbean region. *Vaccine*, 26(11): 1-15, 2008.

PAYAN, C.; DUCANCELLE, A.; ABOUBAKER, M. H.; CAER, J.; TAPIA, M.; CHAUVIN, A.; PEYRONNET, D.; HEN, E. L.; ARAB, Z.; LEGRAND, M. C.; TRAN, A.; POSTEC, E.; TOURMEN, F.; AVENEL, M.; MALBOIS, C.; BRUX, M. A. DE; DESCAMPS, P.; LUNEL, V. Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples using a general realtime PCR on Mx4000 and Lightcycler systems. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(3), p. 897-901, 2007.

PERRONS, C.; KLETER, B.; JELLEY, R.; JALAL, H.; QUINT, W.; TEDDER, R. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA by SPF10 and MY09/MY11 primers in cervical cells taken from women attending a colposcopy clinic. *Journal of Medical Virology*, 67(2), p. 246-252, 2002.

PINTO, P. A. Etiopatogenia do Câncer Vulvar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 38(1), p. 55-58, 2002.

QUEIROZ, C. M. P.; TRAVASSOS, A. G.; STUDART, E.; FILHO, J. B. A.; SARNO, C. K.; PINHEIRO, C. C. Prevalence of human papilloma virus in HIV- positive and HIV- negative patients in the State of Bahia. A pilot study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8(5), p. 356-362, 2004.

RAMA, C. H.; ROTELI-MARTINS, C. M.; DERCHAIN, S. F. M.; OLIVEIRA, E. Z. DE; ALDRIGHI, J. M.; NETO, C. M. Detecção Sorológica de Anti-HPV 16 e 18 e sua

Associação com os achados do papanicolaou em adolescentes e mulheres jovens, *Revista da Associação Médica Brasileira*, 52(1), p. 43-46, 2006.

RAMA, C. H.; ROTELI-MARTINS, C. M.; DERCHAIN, S. F. M.; LONGATTO-FILHO, A.; GONTIJO, R. C.; SARIAN, L. O. Z.; SYRJÄNEN, K.; ALDRIGHI, J. M. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. *Revista de Saúde Pública*, 42(1), p.123-130, 2008.

RICHART, R. M.; MASOOD, S.; SYRJNEN, K. J.; VASSILAKOS, P.; KAUFMAN, R. H.; MEISELS, A.; OLSZEWSKI, W. T.; SAKAMOTO, A.; STOLER, M. H.; VOOIJS, G. P.; WILBUR, D. C. Human papillomavirus IAC Task Force Summary. *Acta Cytologica*, 42(1), p. 50-58, 1998.

RIVA, E.; SERRAINO, D.; PIERANGELI, A.; BAMBACIONI, F.; ZANIRATTI, S.; MINOSSE, C.; SELLERI, M.; BUCCI, M.; SCAGNOLARI, C.; DEGENER, A. M.; CAPOBIANCHI, M. R.; ANTONELLI, G.; DIANZANI, F. Roman Papillomavirus Study Group. Markers of human papillomavirus infection and their correlation with cervical dysplasia in human immunodeficiency vírus-positive women. *Clinical Microbiology and Infection*. 13(1), p. 86-108, 2007.

RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CORLETA, H. V. E.; SILVA, I. S. B. DA. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 47(2), p. 179-184, 2001.

RODRIGUES, A. D.; CANTARELLI, V. V.; FRANTZ, M. A.; PILGER, D. A.; PEREIRA, F. DE S. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 45(6), p. 457-462, 2009.

ROUSSEAU, M. C.; PEREIRA, J. S.; PRADO, J. C. M.; VILLA, L. L.; ROHAN, T. E.; FRANCO, E. L. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. *Journal of Infectious Diseases*, 184(12), p. 1508-1517, 2001.

SANTOS, S. H.; ZEFERINO, L.; VILLA, L. L.; SOBRINHO, J. P.; AMARAL, R. G.; MAGALHÃES, A. V. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(2), p. 181-184, 2003.

SCHIFFMAN, M. H.; BAUER, H. M.; LORINCZ, A. T.; MANOS, M. M.; BYRNE, J. C.; GLASS, A. G.; CADELL, D. M.; HOWLEY, P. M. Comparison of Southern blot hybridization and polymerase chain reaction methods for the detection of human papillomavirus DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(3), p. 573-577, 1991.

SCHIFFMAN, M. H.; BAUER, H. M.; HOOVER, R. N.; GLASS, A. G.; CADELL, D. M.; RUSH, B. B.; SCOTT, D. R.; SHERMAN, M. E.; KURMAN, R. J.; WACHOLDER, S.; STANTON, C. K.; MANOS, M. M. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*, 85(12), p. 958–964, 1993.

SEAMAN, W. T.; ANDREWS, E.; COUCH, M.; KOJIC, E. M.; CU-UVIN, S.; PALEFSKY, J.; DEAL, A. M.; WEBSTER-CYRIAQUE, J. Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR. *Virology Journal*, 7(194), p. 1-17, 2010.

SMITH, J. S.; LINDSAY, L.; HOOTS, B.; KEYS, J.; FRANCESCHI, S.; WINER, R.; CLIFFORD, G. M. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *International Journal of Cancer*, 121(3), p. 621-632, 2007.

SNIJDERS, P. J.; STEENBERGEN, R. D.; HEIDEMAN, D. A.; MEIJER, C. J. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *Journal of Pathology*, 208(2), p. 152-164, 2006.

SÖDERLUND-STRAND, A.; RYMARK, P.; ANDERSSON, P.; DILLNER, J.; DILLNER, L. Comparison between the Hybrid Capture II Test and a PCR-Based Human Papillomavirus Detection Method for Diagnosis and Posttreatment Follow-Up of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), p. 3260-3266, 2005.

SOLOMON, D.; DAVEY, D.; KURMAN, R.; MORIARTY, A.; O'CONNOR, D.; PREY, M.; RAAB, S.; SHERMAN, M.; WILBUR, D.; WRIGHT, T. JR.; YOUNG, N. Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *Journal of the American Medical Association*. 287(16), p. 2114-2119, 2002.

SWAN, D. C.; TUCKER, R. A.; TORTOLERO-LUNA, G.; MITCHELL, M. F.; WIDEROFF, L.; UNGER, E. R.; NISENBAUM, R. A.; REEVES, W. C.; ICENOGLE, J. P. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(4), 1030-1034, 1999.

SZAREWSKI, A.; CUZICK, J. Smoking and cervical neoplasia: a review of the evidence. *J Epidemiology and Biostatistics*, 3, p. 229–256, 1998.

THOMAS D. B.; RAY RM, KOETSAWANG A, KIVIAT N, KUYPERS J, QIN Q, ASHLEY RL, KOETSAWANG S. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. I. Risk factors for invasive cervical carcinomas with human papillomavirus types 16 and 18 DNA. *American Journal of Epidemiology*, 153(8), p. 723–731, 2001.

TSIODRAS, S.; GEORGOULAKIS, J.; CHRANIOTI, A.; VOULGARIS, Z.; PSYRRI, A.; TSIVILIKA, A.; PANAYIOTIDES, J.; KARAKITSOS, P. Hybrid capture vs. PCR screening of cervical human papilloma virus infections. Cytological and histological associations in 1270 women. *BMC Cancer*, 10(53), p. 1-8, 2010.

TJALMA, W. A. A.; VAN WAES, T. R.; VAN DEN EEDEN, L. E.; BOGERS, J. J. Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 19(4), p. 469-483, 2005.

VAN DER GRAAF, Y.; MOLIJN, A.; DOORNEWAARD, H.; QUINT, W.; VAN DOORN, L. J.; VAN DEN TWEEL, J. Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. *American Journal of Epidemiology*, 156(2), p. 158-164, 2002.

VENUTI, A.; MANNI, V.; MORELLO, R.; DE MARCO, F.; MARZETTI, F.; MARCANTE, M. L. Physical state and expression of human papillomavirus in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa. *Journal of Medical Virology*, 60(4), p. 396–402, 2000.

VIZCAINO, A. P.; MORENO, V.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N.; BARROS-DIOS, X. M.; BORRAS, J.; PARKIN, D. M. International trends in incidence of cervical câncer: II. Squamous-cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 86(3), p. 429-435, 2000.

WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; PETO, J.; MEIJER, C. J. L. M.; MUNOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical câncer worldwide. *Journal of Pathology*, 189(1), p. 12-19, 1999.

WANG, T. S.; CHOU, H. F.; LIU, W. M.; CHOO, K. B. Semiautomated typing of human papillomaviruses by restriction fragment length polymorphism analysis of fluorescence-labeled PCR fragments. *Journal of Medical Virology*, 59(4), p. 536–540, 1999.

WHEELER, C. M.; HUNT, W. C.; SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P. E. Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study Group. Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-year risk of cervical precancer. *Journal of Infectious Diseases*, 194(9), p. 1291-1299, 2006.

ZUR HAUSEN, H.; MEINHOF, W.; SCHEIBER, W.; BORNKAMM, G. W. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *International Journal of Cancer*, 13(5), p. 650–656, 1974.

ZUR HAUSEN, H. Condylomata acuminata and human genital câncer. *Cancer Research*, 36(794), p. 1-2, 1976.

ZUR HAUSEN, H. Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 78, p. 1–30, 1977.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections: a major cause of human câncers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1288(2), p. 55-78, 1996.

ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses and câncer: from basic studies to clinical application. *Nature Review Cancer*, 2(5), p. 342–350, 2002.

3. PREVALÊNCIA DE HPV EM PACIENTES COM ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS E COLPOSCÓPICAS

Este artigo foi formatado segundo as normas da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (RBGO)

PREVALÊNCIA DE HPV EM PACIENTES COM ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS E/OU COLPOSCÓPICAS

Emanuella Meneses Venceslau¹, Mauro Muniz Bezerra², Anna Carolina Mota Lopes³, Érick Vieira Souza⁴, Alexandre Sherlley Casimiro Onofre⁵, Verônica de Lourdes Sierpe Jeraldo⁶
Fabiana Botelho de Miranda Onofre⁷

Instituto de Tecnologia e Pesquisa - ITP - Aracaju (SE); Laboratório de Citopatologia da Universidade Federal de Sergipe - UFS - São Cristóvão (SE); Universidade Tiradentes - UNIT, Núcleo de Apoio à Saúde da Família de Penedo - NASF; Brasil.

1 Biomédica, Mestranda em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes - UNIT - Aracaju (SE), Brasil.

2 Médico Tocoginecologista do NASF de Penedo (AL), Mestrando em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes– UNIT-Aracaju (SE), Brasil.

3 Professora Assistente da Universidade Tiradentes - UNIT - Aracaju (SE), Brasil.

4 Acadêmico de Biomedicina da Universidade Tiradentes - UNIT - Aracaju (SE), Brasil.

5 Professor Adjunto da Universidade Federal de Sergipe - UFS - São Cristóvão (SE) - Brasil.

6. Professora Permanente da Universidade Tiradentes - UNIT - Aracaju (SE), Brasil.

7 Professora Adjunta da Universidade Federal de Sergipe - UFS - São Cristóvão (SE) - Brasil.

Correspondência: Fabiana Botelho de Miranda Onofre - e-mail: fabiana.onofre@gmail.com

Laboratório de Citopatologia, Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe - UFS

Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, São Cristóvão (SE) - Brasil

CEP: 49100-000 - Fones: (79) 2105-6841

PREVALÊNCIA DE HPV EM PACIENTES COM ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS E/OU COLPOSCÓPICAS

Resumo

Objetivos: Investigar a prevalência da infecção pelo HPV em mulheres com anormalidades citológicas e/ou colposcópicas em um município com alto índice de pobreza do Estado de Alagoas e verificar o desempenho dos iniciadores MY09/MY11 e GP5+/GP6+ para detecção do HPV. **Métodos:** Foram realizadas reações de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores MY e GP+ para detecção do HPV nos casos de anormalidades citológicas e/ou colposcópicas diagnosticados no período de Maio de 2009 a Março de 2011, no Ambulatório de Ginecologia do Núcleo de Apoio à Saúde da Família do município de Penedo/AL. Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o teste do qui-quadrado e/ou o teste de Fisher, através do software SPSS, versão 16.0, considerando-se significativas àquelas variáveis que alcançaram um $p < 0,05$ no teste bicaudal. **Resultados:** A idade média da população estudada foi de 36 anos. Do total de 70 pacientes que apresentaram alterações citológicas e/ou colposcópicas, 32 pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aceitando participar do estudo. Com relação à citologia, 21 (30%) pacientes apresentaram ASC-US, 20 (29%) AGUS, 12 (17%) LSIL, cinco (7%) HSIL e 12 (17%) apresentaram colposcopia positiva. Destas, 27 (84%) apresentaram banda do gene que codifica para β -globina humana. Das 27 pacientes, oito (30%) apresentaram positividade para o HPV, sendo que uma paciente apresentava ASC-US, duas apresentavam AGUS, três LSIL, uma HSIL e uma paciente apresentava colposcopia positiva (EAB denso). Foi observado um maior número de amostras positivas utilizando os oligonucleotídeos GP5+/GP6+, quando comparados com MY09/MY11. Entretanto, não houve diferença estatística entre os dois oligonucleotídeos utilizados ($p=0,3261$), mesmo havendo o dobro de eficácia de detecção utilizando o oligonucleotídeo iniciador GP+. **Conclusão:** Mais de um tipo de oligonucleotídeo iniciador deve ser utilizado em amostras clínicas para aumentar a sensibilidade na detecção do HPV.

Palavras-chave: Citologia; Colposcopia; HPV; PCR; MY/GP+.

PREVALENCE OF HPV IN PATIENTS WITH CYTOLOGIC AND/OR COLPOSCOPIC ALTERATIONS

Abstract

Objectives: To analyze the cytological and/or colposcopic main changes and investigate the prevalence of HPV infection in patients diagnosed in a town in Alagoas State with high level of poverty as well and to verify the performance of initiators MY09/MY11 and GP5+/6+ for HPV detection. **Methods:** PCR reactions were performed using initiators oligonucleotides MY and GP+ for the HPV detection in the cases of cytological and/or colposcopic diagnosed in the period 2009 to March 2011, in the Gynecologic Outpatient of the Family Health Support Nucleus in Penedo/Al. For a statistical analysis of data, we used the Chi-square test and/or the Fisher test by SPSS software, 16.0 version, significant to those variables reached a $p < 0.05$ in the two-tailed test. **Results:** The middle age of the studied population was 36 years. From 70 patients who presented cytological and/or colposcopic alterations, 32 patients signed the free and explained permission term accepting to participate of the study. With respect to cytology, 21 (30%) patients presented ASC-US, 20 (29%) AGUS, 12 (17%) LSIL, and five (7%) HSIL. 12 (17%) presented positive colposcopy. All 32 (100%) samples presented band in the integrity DNA gel. From them, 27 (84%) samples presented band of gene that encodes for human β -globin. From 27 patients, eight (30%) presented positivity for HPV, which one patient presented ASC-US, two AGUS, three LSIL, and one HSIL, cytologically. One patient presented positive colposcopy (dense EAB). It was observed a greater number of positive samples using oligonucleotides GP5+/GP6+, when compared with MY09/MY11. However, there was no statistical difference between the two oligonucleotides used ($p = 0.3261$), even with twice detection efficacy using oligonucleotide initiator GP+. **Conclusion:** More than one type of oligonucleotide initiator should be used in clinical samples to increase sensitivity in the HPV detection.

Key-words: Cytology; colposcopy; HPV; PCR; MY/GP+.

Prevalência de HPV em pacientes com alterações citológicas e/ou colposcópicas

Prevalence of HPV in patients with cytologic and/or colposcopic alterations

3.1 Introdução

O câncer cervical é uma das doenças mais frequentes entre mulheres e causa considerável morbidade e mortalidade. De acordo com o Globocan (2008), ocorrem 188 mil novos casos por ano no Sudeste da Ásia, 80 mil nas Américas, 75 mil na África e 61 mil na Europa. Em países desenvolvidos, como os EUA, a incidência foi de 11 mil e em países em desenvolvimento como o Brasil a incidência foi de 24 mil¹.

A mortalidade causada pelo câncer cervical no mundo é de 275 mil mortes, sendo 242 mil ocorridas em regiões menos desenvolvidas. No Brasil, a mortalidade por câncer cervical ainda é alta, com 110 mil mortes¹. As discrepâncias em incidência e mortalidade existentes entre países desenvolvidos e em desenvolvimento pode ser atribuída às diferenças regionais, a prevalência e distribuição dos principais fatores de riscos, práticas de detecção, e/ou a disponibilidade e uso de serviços de tratamento².

Estudos epidemiológicos e moleculares têm mostrado a íntima relação entre o papilomavírus humano (HPV) e o surgimento de câncer cervical, bem como suas lesões precursoras, inferindo que a presença do vírus seja um agente causal para estas malignidades^{3,4}. WALBOOMERS et al.⁵, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaios sorológicos, mostraram que o HPV está presente em 99.7% das pacientes com câncer cervical invasivo.

O diagnóstico molecular da infecção pelo HPV é importante para a triagem do vírus e baseia-se, principalmente, em métodos como: captura híbrida (CH2)^{6,7}, hibridização *in situ*⁸ e PCR^{9,10,11}. Essas técnicas apresentam sensibilidade e especificidade amplamente variáveis, sendo a PCR a mais empregada atualmente nas diversas áreas de diagnóstico molecular, devido a sua grande capacidade de detectar pequenos fragmentos de DNA^{12,13}.

O sistema que emprega os iniciadores MY09/MY11 e GP5+/GP6+, que amplificam a região L1 do genoma viral, são os mais freqüentemente utilizados para a detecção do HPV em estudos clínicos e epidemiológicos¹⁴. Tais iniciadores são eficazes para amplificação de um amplo espectro de genótipos de HPV em células obtidas por raspado cervical e em tecidos emblocados em parafina^{15,16}. O par de oligonucleotídeos iniciadores MY09/MY11 flanqueia uma sequência de cerca de 450 pb, enquanto o par GP5+/GP6+ uma sequência de cerca de 150 pb, sendo esta interna à sequência flanqueada pelo MY¹⁷. O par MY é sintetizado a partir de vários nucleotídeos degenerados em cada iniciador,

sendo uma mistura de 25 oligonucleotídeos iniciadores capazes de amplificar mais de 25 tipos de HPV genital. Já o par GP5+/GP6+ consiste em uma sequência fixa de nucleotídeos para cada oligonucleotídeo iniciador. Esse par utiliza baixa temperatura de anelamento durante a PCR¹⁸ e pode ser utilizado como oligonucleotídeo iniciador único ou em “nested” PCR após a amplificação com o oligonucleotídeo iniciador MY¹⁹.

Este estudo teve por objetivos investigar a prevalência da infecção pelo HPV em mulheres com anormalidades citológicas e/ou colposcópicas atendidas em um município pobre do interior de Alagoas e verificar o desempenho dos iniciadores MY09/MY11 e GP5+/GP6+ para detecção do HPV.

3.2 Métodos

Trata-se de um estudo do tipo transversal, realizado no período de Maio de 2009 à Março de 2011, a partir de levantamento epidemiológico dos casos de anormalidades citológicas e/ou colposcópicas diagnosticados no Ambulatório de Ginecologia do Núcleo de Apoio à Saúde da Família (NASF) de Penedo, estado de Alagoas, município com uma população de 60.389 habitantes, área territorial de 689 km², contendo 41 estabelecimentos de Saúde (SUS) e com um alto índice de pobreza (60,62%)²⁰.

Participaram do estudo mulheres que possuíam como resultado citológico: células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), células glandulares atípicas de significado indeterminado (AGUS), lesão intra-epitelial de baixo grau (LSIL), lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL) e carcinoma invasivo. Também foram incluídas neste estudo pacientes com alterações colposcópicas do tipo epitélio acetobranco (EAB), pontilhado, mosaico, epitélio iodo positivo parcial e epitélio iodo negativo, classificadas como colposcopia positiva. Os dados das pacientes foram obtidos dos prontuários médicos. A amostra cervical foi colhida somente das pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Tiradentes/Aracaju/SE.

Os raspados cervicais foram coletados com espátulas de Ayre, acondicionados em tubos Falcon, contendo 25 mL de solução tampão PBS (Tampão Fosfato Salino, pH 7,4) e estocados a -20°C até a extração do DNA.

A extração do DNA oriundo do raspado cervical foi realizada utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Ltd, Crawley, UK) de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 200µL das amostras foram digeridas com 20µl de proteinase K e 200µL de tampão AL a 56°C por 10 minutos. A precipitação do DNA foi realizada pela adição de

200µL de etanol (96%). O DNA foi eluído em 200µL de tampão AE e foi estocado a -20°C até uso posterior. Para determinar a qualidade e a quantidade deste, utilizou-se eletroforese em gel de agarose a 1% corado com *Blue Green Loading Dye* (LGC).

Como controle interno da reação, as amostras que apresentaram DNA foram submetidas à PCR para amplificação do gene da β-globina humana, utilizando os oligonucleotídeos PCO3 (5'CTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC3') e PCO4 (5'TCACCACAACCTTCATCCACGTTCAACC3'), que flanqueiam uma sequência de cerca de 110pb. As quantidades e concentrações dos reagentes foram iguais às da reação de PCR para o HPV utilizando o oligonucleotídeo iniciador MY (Tabela 1).

As amostras que apresentaram positividade para o gene da β-globina humana foram submetidas à pesquisa do DNA viral do HPV. Somente foram excluídas da análise as amostras negativas para o gene da β globina após repetição da análise para confirmação.

Amplificação do DNA

Foram utilizados neste estudo, dois diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores para detecção do HPV: MY09/MY11, GP5+/GP6+. As reações de PCR para cada oligonucleotídeo iniciador foram realizadas separadamente conforme descrito previamente por BERNARD *et al.*²¹ e DE RODA-HUSMAN *et al.*²² A tabela 1 demonstra os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR, bem como as respectivas condições de amplificação. Para cada reação de PCR, foi utilizado um controle positivo (DNA extraído de amostra de condiloma) e um controle negativo (H₂O). O resultado foi considerado positivo para DNA-HPV quando um dos testes com os oligonucleotídeos iniciadores MY09/MY11 ou GP5+/GP6+ detectou o DNA viral.

Eletroforese

A corrida eletroforética foi realizada em gel de Agarose (1,5%) corado com Blue Green Loading Dye (LGC/Biotecnologia®), os fragmentos de DNA foram visualizados através de um transiluminador Wilber Lourmat) sob luz Ultra Violeta. Em seguida o gel foi fotografado com uma câmera digital de 6.0 Megapixel modelo SP-500 UZ (Olympus®, Tokyo, Japão).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores genéricos utilizados para detecção do DNA do HPV

Iniciadores	Sequência	Tamanho do Fragmento	Protocolo (PCR)	Condições (PCR)
MY09 MY11	5'CGTCCMARRGGAWACTGATC 3' 5'GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3'	450 pb	15 mM MgCl ₂ (<i>buffer</i> 1x), 800 µM de dNTPs, 50 pmol/µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,25 U da Hot Star Taq DNA polimerase (Invitrogen)	40 ciclos: 94°C/45 seg. 55°C/45 seg. 72°C/45 seg. 1 ciclo: 72°C/5 min.
GP5+ GP6+	5'TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3' 5'GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC 3'	150 pb	15 mM MgCl ₂ (<i>buffer</i> 1x), 800 µM de dNTPs, 50 pmol/µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,25 U da Hot Star Taq DNA polimerase (Invitrogen)	40 ciclos: 94°C/45 seg. 45°C/45 seg. 72°C/45 seg. 1 ciclo: 72°C/5 min
PCR - Reação em cadeia da polimerase				

Análise estatística

Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o teste do qui-quadrado e/ou o teste de Fisher, através do software SPSS (Chicago, IL, USA), versão 16.0, considerando-se significativas àquelas variáveis que alcançaram um $p < 0,05$ no teste bicaudal.

3.3 Resultados

Foi realizado levantamento amostral dos casos de anormalidades citológicas e/ou colposcópicas diagnosticados no período de Maio de 2009 a Março de 2011, no Ambulatório de Ginecologia do Núcleo de Apoio à Saúde da Família do município de Penedo/AL. A idade média da população estudada foi de 36 anos (variação: 18-58 anos). Com relação aos resultados citológicos, 21 pacientes (30%) apresentaram ASC-US, 20 (29%) AGUS, 12 (17%) LSIL e cinco (7%) HSIL. Colposcopia positiva foi observada em 12 pacientes (17%) (Figura 1).

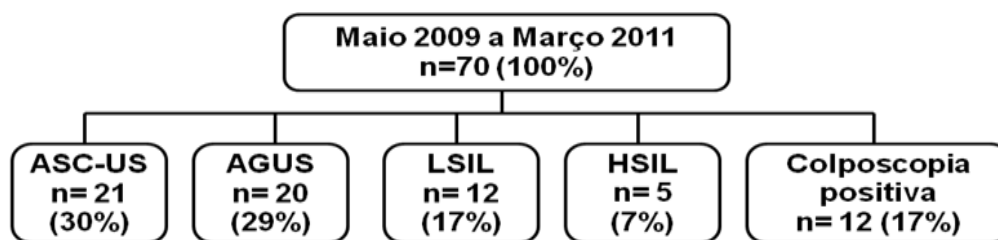


Figura 1 – Resultados dos laudos citológicos e/ou colposcópicos de amostras cervicais das pacientes atendidas no município de Penedo/AL (2009-2011). ASC-US- Células escamosas atípicas de significado indeterminado; AGUS- Células glandulares atípicas de significado indeterminado; LSIL- Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau; HSIL- Lesão escamosa intraepitelial de alto grau

Do total de 70 pacientes que apresentaram alterações citológicas e/ou colposcópicas, 32 pacientes (46%) assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aceitando participar do estudo. Todas as amostras apresentaram banda no gel de integridade (Figura 2). Das 32 amostras analisadas, cinco não amplificaram o gene controle da β -globina humana, mesmo após repetição do PCR, sendo estas pacientes excluídas do estudo (Figura 3).

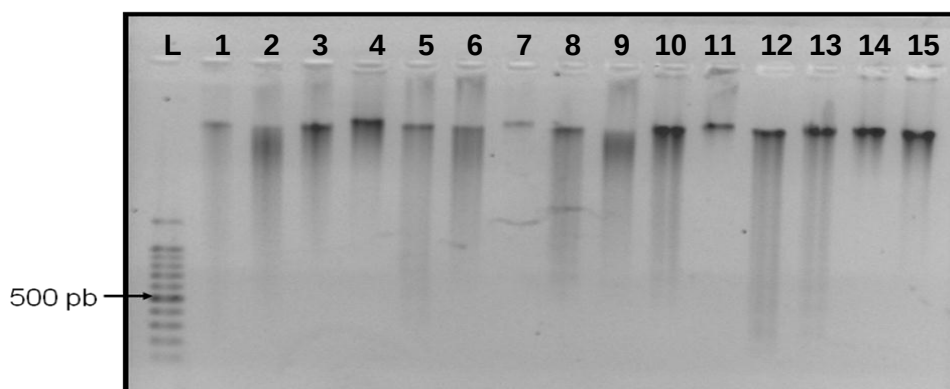


Figura 2 - Perfil eletroforético de gel de Integridade do DNA utilizando gel de Agarose (1%) corado com *Blue Green Loading Dye*. L: *Ladder*. 1-15: Amostras com DNA.

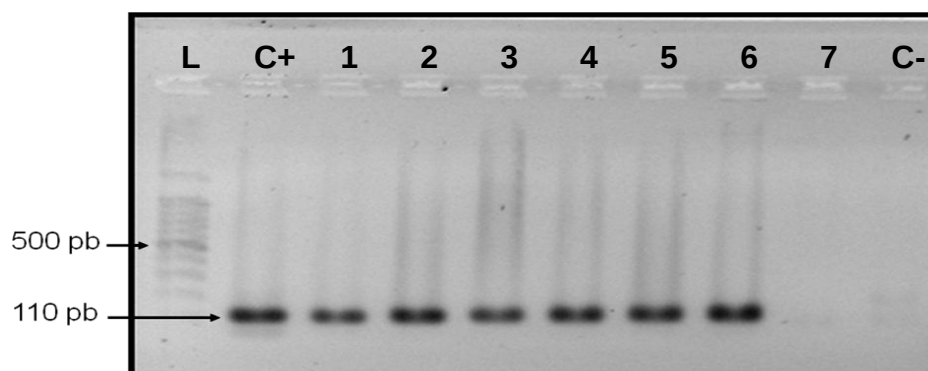


Figura 3 - Perfil eletroforético da PCR utilizando primers PCO3/PCO4 para detecção do gene da beta globina humana correspondente a ~110pb. Gel de Agarose (1,5%) corado com *Blue Green Loading Dye*. L: *Ladder*; C+: Controle positivo; 1-6: Amostras positivas; 7: Amostra negativa; C-: Controle Negativo.

Das 27 pacientes restantes, oito (30%) apresentaram positividade para o HPV, sendo que destas uma teve resultado citológico ASC-US, duas AGUS, três LSIL e uma HSIL; uma delas apresentou colposcopia positiva (EAB denso). Não houve diferença estatística entre as categorias diagnósticas dos exames citopatológico e/ou colposcópico e a detecção molecular do HPV (Tabela 2).

Tabela 2 - Correlação entre as categorias diagnósticas aos exames citopatológico e colposcópico e a detecção molecular do HPV.

Alterações Citológicas e/ou Colposcópicas	HPV		HPV		Total		Valor de p*
	negativo		positivo				
	n	%	n	%	n	%	
ASC-US	5	18,5	1	3,7	6	22,2	0,4183
AGUS	8	29,6	2	7,4	10	37	
LSIL	4	14,8	3	11,1	7	26	
HSIL	0	0	1	3,7	1	3,7	
Alt. colposcópicas	2	7,4	1	3,7	3	11,1	
Total	19	70	8	30	27	100	

ASC-US- Células escamosas atípicas de significado indeterminado; AGUS- Células glandulares atípicas de significado indeterminado; LSIL- Lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau; HSIL- Lesão escamosa intraepitelial de alto grau

* Teste Exato de Fisher

Os resultados mostraram que o DNA-HPV foi detectado em 15% e 30% das amostras ao utilizar-se MY-PCR (Figura 4) e GP+-PCR (Figura 5), respectivamente. Não houve diferença estatística entre os dois oligonucleotídeos utilizados nas PCRs (Tabela 3).

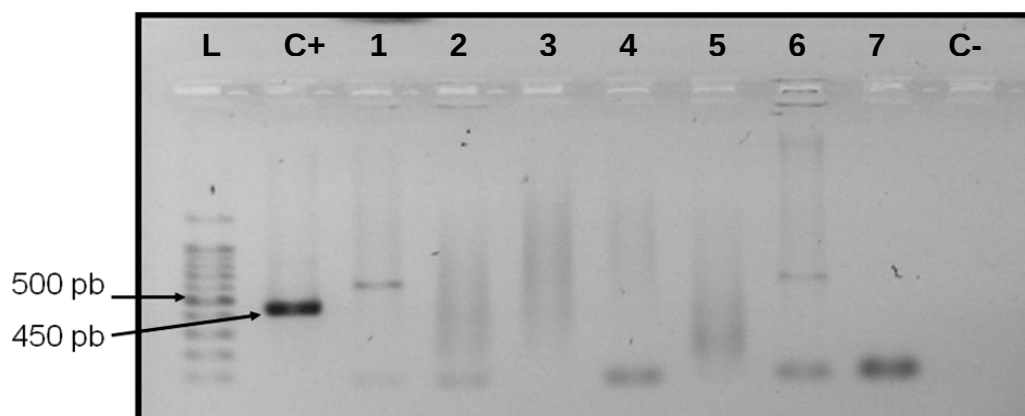


Figura 4 - Perfil eletroforético da PCR utilizando primers MY09/MY11 para detecção do gene L1 do HPV correspondente a ~450pb. Gel de Agarose (1,5%) corado com *Blue Green Loading Dye*. L: *Ladder*; C+: Controle positivo; 1,6: Amostras positivas; 2,3,4,5,7: Amostras negativas; C-: Controle Negativo.

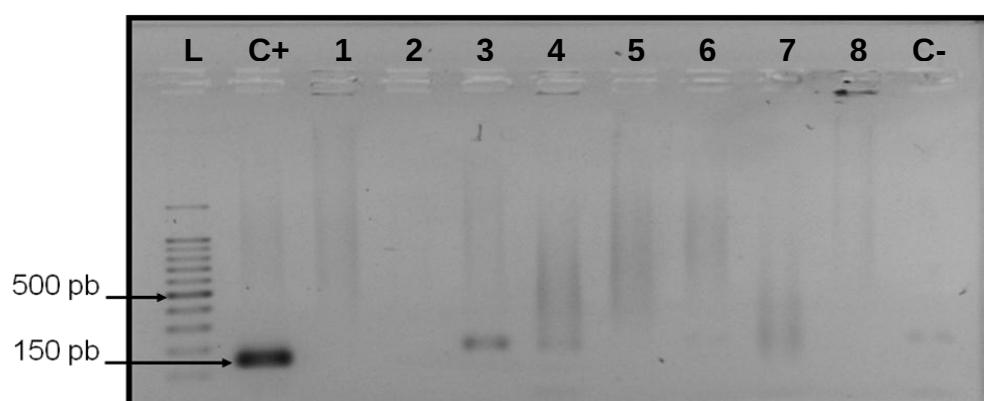


Figura 5 - Perfil eletroforético da PCR utilizando primers GP5+/GP6+ para detecção do gene L1 do HPV correspondente a ~150pb. Gel de Agarose (1,5%) corado com *Blue Green Loading Dye*. L: *Ladder*; C+: Controle positivo; 3: Amostra positiva; 1,2,4,5,6,7,8: Amostras negativas; C-: Controle Negativo.

Tabela 3 - Percentual de detecção de DNA-HPV com os pares de oligonucleotídeos iniciadores

Detecção de DNA-HPV	MY09/MY11 n= 27 (100%)	GP5+/GP6+ n= 27 (100%)	Valor de p*
Negativo	23 (85%)	19 (70%)	0,3261
Positivo	4 (15%)	8 (30%)	

DNA: Ácido desoxirribonucléico; HPV: Papiloma vírus Humano; n: Número de amostras coletadas.

* Teste de Qui-quadrado de Pearson

3.4 Discussão

A reação em cadeia da Polimerase (PCR) está sendo cada vez mais utilizada em laboratórios clínicos para diagnóstico do HPV. Para a região L1, há consenso na indicação de dois sistemas de oligonucleotídeos iniciadores comumente utilizados, MY09/MY11 e GP5+/GP6+ porque ambos detectam uma larga variedade de HPVs. Estudos que utilizam estes diferentes oligonucleotídeos têm mostrado que a frequência da detecção do DNA-HPV depende da população estudada, do método usado para a detecção, do espécime coletado, da técnica de coleta e da capacidade de detectar diferentes tipos na infecção^{18,23,24}. O oligonucleotídeo iniciador degenerado MY09/MY11 utiliza alta temperatura de anelamento (55°C) e pode amplificar infecções múltiplas por HPV. Entretanto, o oligonucleotídeo iniciador GP5+/GP6+ possui temperatura de anelamento mais baixa (42°C), o que possibilita a melhor amplificação de infecções simples de HPV, se comparado a infecções múltiplas¹⁸.

No presente estudo, foi observado um maior número de amostras positivas utilizando os oligonucleotídeos GP5+/GP6+, quando comparados com MY09/MY11. Das 27 amostras, oito (30%) foram positivas para o HPV. Foi encontrado DNA-HPV em 15% e 30% usando os oligonucleotídeos iniciadores MY e GP+, respectivamente. Dessas, quatro (15%) foram detectadas por ambos os métodos e oito (30%) foram detectadas apenas pela PCR do GP+. Entretanto, não houve diferença estatística entre os dois oligonucleotídeos utilizados nas PCRs ($p=0,3261$), mesmo havendo o dobro de eficácia de detecção utilizando o oligonucleotídeo iniciador GP+. Segundo POLJAK et al.²⁵ e VINCE et al.²⁶ não se pode descartar a possibilidade de resultados falso-negativos na PCR, devido à baixa concentração do DNA-HPV na amostra clínica e à presença de inibidores de PCR endógenos ou provenientes do processamento da amostra.

Em estudo realizado por ZEHBE e WILANDER²⁴, foi comparada a sensibilidade desses oligonucleotídeos iniciadores por PCR em biópsias cervicais classificadas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) I a III. Estes autores demonstraram que os dois sistemas de oligonucleotídeos iniciadores foram igualmente sensíveis com uma correlação de 98%. Utilizando GP5+/GP6+, encontraram uma positividade de HPV de 95% e com MY09/MY11 de 94%. QU et al.¹⁸, ao compararem as taxas de detecção dos oligonucleotídeos iniciadores MY09/MY11 e GP5+/GP6+, em amostras cervico-vaginais encontraram DNA-HPV em 45,5% e 42,8%, respectivamente. Das 208 amostras, aproximadamente a metade foi positiva para um ou ambos os testes. Das 102 positivas para HPV, 81 (79,4%) foram detectadas por ambos os métodos e 21 (20,6%) foram detectadas por apenas um dos métodos. Das 21 amostras com resultados discrepantes,

13 (62%) foram detectadas pela PCR do MY e oito (38%) do GP+. O sistema MY foi 5.3 vezes mais eficiente para detecção de infecção com múltiplos tipos de HPV do que o sistema GP+. Esses resultados contrastam com nosso estudo que demonstrou uma eficácia de detecção do par de oligonucleotídeos iniciadores GP5+/GP6+ superior à apresentada pelo par MY09/MY11, o que pode sugerir, portanto, que as pacientes tinham infecção simples do HPV.

REMMERBACH et al.²³, através da análise de esfregaços de mucosa oral de pacientes com suspeitas de lesões de carcinoma, mostraram que o DNA-HPV foi detectado em 2,8% das amostras utilizando a PCR com os oligonucleotídeos MY09/MY11 e 35,8% com os oligonucleotídeos GP5+/GP6+. Estes autores também relataram que a detecção de HPV com os oligonucleotídeos GP5+/GP6+ foi maior que a dos oligonucleotídeos MY09/MY11, corroborando com os resultados encontrados em nosso estudo. Isso pode ser explicado pelo menor tamanho do fragmento de DNA amplificado pelo sistema GP-PCR. Assim, este oligonucleotídeo teria maior eficiência de detecção de HPV em amostras contendo DNA fragmentado. Estes autores também notaram uma maior detecção de HPV em amostras de biópsia quando comparadas com amostras de exsudato cervical, o que pode indicar o diferencial de nosso estudo com o de ZEHBE e WILANDER²⁴.

IFTNER e VILLA²⁷ afirmaram que a sensibilidade e especificidade do método PCR podem sofrer variações dependendo, principalmente, da escolha dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, número de pares de base do produto amplificado pela PCR, desempenho da DNA polimerase utilizada na reação, espectro do tipo DNA-HPV amplificado e capacidade de detectar diferentes tipos na infecção. Os trabalhos encontrados na literatura apontam para taxas de detecção de HPV variáveis. A escolha dos oligonucleotídeos adequados para usos clínicos e epidemiológicos deveria levar em conta a fonte do material clínico, o tamanho do produto da PCR, a amplitude de tipos de DNA-HPV a ser amplificada, a habilidade dos oligonucleotídeos em amplificar múltiplos tipos de HPV e a disponibilidade de sistemas seqüenciadores ou sondas específicas para a identificação dos diferentes genótipos de HPV^{18,23}.

Considerando a grande variabilidade intra e interobservador associada à interpretação citológica das lesões cervicais pré-neoplásicas e neoplásicas, a utilização de métodos de detecção molecular como a técnica de PCR, torna-se um instrumento importante na identificação de pacientes portadoras de HPVs responsáveis pelo desenvolvimento de neoplasia cervical, auxiliando assim a conduta médica. Este estudo

sugere que mais de um tipo de oligonucleotídeo iniciador deve ser utilizado em amostras clínicas para aumentar a sensibilidade na detecção do HPV.

3.5 Referências

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Globocan 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase N°. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; Year. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>. 2010>
2. Ahmedin Jemal DVM.; Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. CA Cancer J Clin. 2011; 61:69–90.
3. Zur Hausen H. Papillomaviruses and câncer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer, 2002; 2(5):342–50.
4. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard H, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology. 2004; 324:17-7.
5. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical câncer worldwide. J Pathol. 1999; 189(1):12-9.
6. Söderlund-Strand A, Rymark P, Andersson P, Dillner J, Dillner L. Comparison between the Hybrid Capture II Test and a PCR-Based Human Papillomavirus Detection Method for Diagnosis and Posttreatment Follow-Up of Cervical Intraepithelial Neoplasia. J Clin Microbiol. 2005; 43(7):3260-6.
7. Rodrigues AD, Cantarelli VV, Frantz MA, Pilger DA, Pereira FdeS. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2009; 45(6):457-62.
8. Bagarelli LB, Olini AH. Tipagem e estado físico de papilomavírus humano por hibridização in situ em lesões intra-epiteliais do colo uterino. Rev Bras Ginecol Obstet. 2004; 26(1):59-64.
9. Dinc B, Rota S, Onan A, Bozdayi G, Taskiran C, Biri A, et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) and HPV-16 genotyping by real-time PCR in patients with several cervical pathologies. Braz J Infect Dis. 2010; 14(1):19-23.
10. Seaman WT, Andrews E, Couch M, Kojic EM, Cu-Uvin S, Palefsky J, et al. Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR. Virol J. 2010; 7(194):1-17.

11. Tsiodras S, Georgoulakis J, Chranioti A, Voulgaris Z, Psyrris A, Tsvilika A, et al. Hybrid capture vs. PCR screening of cervical human papilloma virus infections. Cytological and histological associations in 1270 women. BMC Cancer. 2010; 10(53):1-8.
12. Chang DY, Hsieh CY, Chen RJ, Lee SC, Huang SC. Comparison of detection of human papillomavirus 16 DNA in cervical carcinoma tissues by Southern blot hybridisation and nested polymerase chain reaction. J Med Microbiol. 1995; 43(6):430-5.
13. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutle´E F, Hildesheim A, et al. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. J Clin Microbiol. 2000; 38(1):357–61.
14. Haws ALF, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, et al. Nested PCR with the PGMY09/MY11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. J Virol Methods. 2004; 122(1):87–93.
15. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. Cancer Cell. 1989; 7:209–14.
16. Hubbard RA. Human Papillomavirus testing methods. Arch Pathol Lab Med. 2003; 127(8):940-5.
17. Snijders PJ, Van Den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. J GenVirol. 1990; 71(1):173–81.
18. Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GYF, Klein RS, et al. PCR Detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. J Clin Microbiol. 1997; 35(6):1304-10.
19. Evander M, Edlund K, Bode´N E, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, et al. Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a populationbased study of human papillomavirus infection in young Swedish women. J Clin Microbiol. 1992; 30:987–92.
20. IBGE. Censo Demográfico 2010 – Primeiros Resultados. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>
21. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. J Infect Dis. 1994; 170(5):1077-85.

22. De Roda Husman AM, Walboomers JMM, Den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3`ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*. 1995; 76(4):1057-62.
23. Remmerbach TW, Brinckmannb UG, Hempricha A, Chekolb M, Kühndelc K, Liebertb UG. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/MY11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol*. 2004; 30(4):302-8.
24. Zehbe I, Wilander E. Two consensus primer systems and nested polymerase chain reaction for human papillomavirus detection in cervical biopsies: a study of sensitivity. *Hum Pathol*. 1996; 27(8):812-5.
25. Poljak M, Seme K, Gale N. Rapid extraction of DNA from archival clinical specimens: our experiences. *Pflugers Arch*. 2000; 439(3):42-4.
26. Vince A, Poljak M, Seme K. DNA extraction from archival Giemsa-stained bone-marrow slides: comparison of six rapid methods. *Br J Haematol*. 1998; 101(2):349-51.
27. Iftner T, Villa LL. Human Papillomavirus Technologies. *J Nat Cancer Inst Monogr*. 2003; 31:80-8.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma das principais causas de morte na população feminina é o câncer, que possui o estresse gerado pelo estilo de vida do mundo moderno, como um forte fator de risco aliado à mudança de hábitos, contribuindo diretamente na incidência dessa doença. Em relação ao câncer cervical, o tratamento é mais efetivo quando a doença é diagnosticada em fases iniciais, antes do aparecimento dos sintomas clínicos, justificando a importância das ações para a detecção precoce, uma vez que a Medicina dispõe de procedimentos eficazes para o diagnóstico da neoplasia, em estádios precoces, e de medidas terapêuticas capazes de curar ou melhorar a sobrevida das pacientes. Sendo assim, devem ser disponibilizados à população, os cuidados adequados para reduzir o sofrimento e melhorar qualidade de vida.

O câncer cervical acomete, geralmente, os grupos com maior vulnerabilidade social, onde se concentram as maiores barreiras de acesso à rede de serviços para detecção e tratamento precoce da doença, advinda de dificuldades econômicas e geográficas, insuficiência de serviços e questões culturais, como medo e preconceito dos companheiros, estando fortemente associado a condições de vida precária, baixos índices de desenvolvimento humano, ausência ou fragilidade das estratégias de educação comunitária como a promoção e prevenção em saúde.

Enfim, o câncer cervical possui etiologia, diagnóstico, terapêutica e prevenção bem definidos, o que significa que existe um conhecimento científico aprofundado sobre os fatores causais, formas de detecção e tratamento da doença. A doença possui evolução lenta e seu tratamento é conhecido e eficaz, principalmente nas lesões precursoras, sendo objeto de um programa nacional estruturado para seu controle. As características biológicas do câncer cervical e a existência de um método simples, barato, seguro e aceitável pela população feminina para a sua detecção precoce, o exame citopatológico Papanicolaou, permitem que seu potencial de prevenção e cura seja elevado. Porém, a utilização de métodos de detecção molecular como a técnica de PCR, pode ser importante na identificação de pacientes portadoras de HPVs de alto risco para o desenvolvimento de neoplasia cervical, auxiliando assim a conduta médica.

A utilização da técnica de PCR, para o diagnóstico molecular da infecção pelo HPV, por ser a mais empregada atualmente nas diversas áreas de diagnóstico molecular, devido a sua alta sensibilidade na detecção de pequenos fragmentos de DNA, demonstrou-se uma técnica eficaz para a realização deste trabalho.

As informações apresentadas anteriormente enfatizam a necessidade de que todos os municípios, principalmente aqueles com alto índice de pobreza, como é o caso do município de Penedo investigado neste estudo, implementem programas permanentes e definam estratégias para o aumento de cobertura dos exames citológicos periódicos, principalmente nos grupos de maior vulnerabilidade socioeducacional, onde se concentram os maiores obstáculos acessíveis ao SUS, utilizando ações de educação sexual para efetivar condutas de prevenção de infecção pelo HPV. Informar e conscientizar a população sexualmente ativa sobre o HPV e os riscos associados, contribuirá para reduzir a infecção por esse vírus, possibilitando seu controle e influenciando na diminuição da incidência do câncer cervical a longo prazo.

APÊNDICES

APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, autorizo _____ à Universidade Tiradentes, por intermédio do Dr. Mauro Muniz Bezerra devidamente assistido por sua orientadora Profa. Dra. Fabiana Botelho de Miranda Onofre, a desenvolver a pesquisa abaixo descrita:

1-Título do Experimento: “Prevalência de HPV em pacientes com alterações citológicas e/ou colposcópicas”

2-Objetivo: Investigar a prevalência da infecção pelo HPV em mulheres com anormalidades citológicas e colposcópicas.

3-Descrição de procedimentos: A pesquisa será realizada através de preenchimento de formulário próprio com base nos dados do arquivo do Ambulatório de Ginecologia do Núcleo de Apoio à Saúde da Família de Penedo-AL, que constará de informações clínicas das pacientes que apresentaram anormalidades citológicas e colposcópicas em exames realizados durante o período de Maio de 2009 a Dezembro de 2010. As mesmas serão contactadas através de visita do Agente Comunitário de Saúde de sua residência, a comparecerem ao Ambulatório para realização de uma nova coleta de material cervical.

4-Desconfortos e riscos esperados: O desconforto de ter de se submeter ao exame colpocitológico. Fui devidamente informada dos riscos acima descritos e de qualquer risco não descrito, não previsível, porém que possa ocorrer em decorrência da pesquisa será de inteira responsabilidade dos pesquisadores.

5-Benefícios esperados: Conhecer ao final da pesquisa a prevalência da infecção pelo HPV de alto risco em mulheres com anormalidades citológicas e colposcópicas, bem como os tipos de HPV mais encontrados.

6-Informações: Os participantes têm a garantia que receberão respostas a qualquer pergunta e esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos assuntos relacionados à pesquisa. Também os pesquisadores supracitados assumem o compromisso de proporcionar informações atualizadas obtidas durante a realização do estudo.

7-Retirada do consentimento: O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, não acarretando nenhum dano ao voluntário.

8-Aspecto Legal: Elaborado de acordo com as diretrizes e normas regulamentadas de pesquisa envolvendo seres humanos atende à Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério de Saúde - Brasília – DF.

9-Confabilidade: As voluntárias terão direito à privacidade. A identidade (nomes e sobrenomes) do participante não será divulgada. Porém as voluntárias assinarão o termo de consentimento para que os resultados obtidos possam ser apresentados em congressos e publicações.

11-Quanto à indenização: Não há danos previsíveis decorrentes da pesquisa, mesmo assim fica prevista indenização, caso se faça necessário.

ATENÇÃO: A participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em casos de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Tiradentes. Av. Murilo Dantas, 300 – Farolândia – CEP 49032-490, Aracaju-SE, 79-2182100, ramal 2593.

Aracaju, _____ de _____ de 2010.

ASSINATURA DO VOLUNTÁRIO

APÊNDICE B- FORMULÁRIO DE PESQUISA

Médico

solicitante:

Dados da paciente:

Registro: _____

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____

1ª Citologia

Data: ____/____/____

DUM: ____/____/____

() ASC-US

() LSIL ou NIC I

() HSIL ou NIC II e III

() Carcinoma epidermóide

() Atipias glandulares (AGUS)

() Adenocarcinoma *in situ*

() Adenocarcinoma

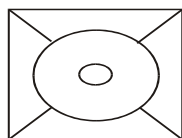
Colposcopia

Data: ____/____/____

DUM: ____/____/____

Exame

macroscópico:



Exame

colposcópico

:

—

—

—

—

—

2ª Citologia**Data:** ____/____/____**DUM:** ____/____/____☐ Negativo☐ ASC-US☐ LSIL☐ HSIL☐ Carcinoma epidermóide☐ Atipias glandulares (AGUS)☐ Adenocarcinoma *in situ*☐ Adenocarcinoma

Data: ____/____/____ Responsável pela coleta dos dados _____