

KARINA SERRAVALLE RAMOS

Estudo do HPV e variáveis sócio-comportamentais em mulheres com lesão intra-epitelial de alto grau

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de concentração:

Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Dr. José Eduardo Levi

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ramos, Karina Serravalle

Estudo do HPV e variáveis sócio-comportamentais em mulheres com lesão intra-epitelial de alto grau / Karina Serravalle Ramos. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: José Eduardo Levi.

Descritores: 1.Papillomaviridae 2.Neoplasia intra-epitelial cervical/diagnóstico 3.Fatores de risco 4.Adolescente 5.Adulto 6.Reação em cadeia da polimerase 7.Carga viral

USP/FM/SBD-440/09

A minha mãe Suzana Maria
Serravalle, por me ensinar que com AMOR
consequimos tudo na vida;
Ao meu marido André Maurício
Costa Ramos pelo amor, apoio e incentivo
em todos os momentos;
Ao meu filho Lucas, razão da
minha vida, por tornar tudo mais
colorido.

Agradecimentos

A Deus, por ter me dado vida, força e energia para realizar meu sonho do doutorado;

As minhas duas “grandes famílias”, em especial a Vanessa, minha irmã e a Sylvio e Carminha, meus queridos sogros, pelo amor, carinho, apoio e sacrifício a mim prestados;

Ao Dr. José Eduardo Levi, meu orientador, pela competência em transmitir com sabedoria os conhecimentos que fundamentaram essa Tese, pela amizade, estímulo e confiança em mim depositados;

A Dra. Conceição Queiroz, minha co-orientadora, pelas oportunidades e incentivo profissional em todos os momentos. Uma pessoa excepcional e rara de se encontrar;

Ao Prof. Dr. Cláudio Pannuti, que me acolheu no laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – IMT-SP tornando viável a realização deste estudo;

Ao Prof. Dr. Aluísio Segurado, Coordenador do Programa de Pós-Graduação de Doenças Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, pelo fundamental apoio prestado;

A Cristina Oliveira, especialmente agradeço pelo suporte técnico nos ensaios de Genotipagem e Carga Viral, que sempre teve total presteza, gentileza e atenção;

Aos professores, colaboradores e toda equipe do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em especial a Adriana Fumie Tateno, Maria Cristina Domingues Fink, Laura Massami Sumita, Cynthia do Canto, Ana Carolina Mamana Fernandes de Souza, Célia Lima Rodrigues, Jaila Borges, Renata Moscolini Romão, Cristina Mendes de Oliveira agradeço pela verdadeira acolhida e pelo suporte sempre dispensado.

Aos Doutores Adhemar Longatto Filho, Jorge Casseb e Enrique Boccardo, pelas valiosas considerações no processo de qualificação, muitas delas incorporadas a esta tese;

A Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Basile, Coordenadora do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) da FMUSP, pelo apoio a mim prestado;

Às Secretarias do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias pelo suporte oferecido, em especial a Roseli Santo.

Ao Estatístico Dr. Eduardo Netto, que sempre com muita presteza e gentileza forneceu valiosas contribuições nas análises estatísticas;

A saudosa Dra. Vera Harfush, diretora da Clínica IDEM, que sempre incentivou minha carreira científica e que tornou possível a realização de mais um dos meus sonhos;

A Sergio Harfush, diretor da Clínica IDEM, pelo apoio nesta caminhada;

À equipe médica da Clínica IDEM, em especial a Dra. Janaina Harfush, Dra. Adriana Bruno e Dra. Ana Gabriela Travassos pelo apoio na busca de pacientes para o estudo;

Aos Drs. Antônio Travessa e Iane Travessa que com muita gentileza contribuíram na colheita das pacientes no CICAN;

As pacientes da Clínica IDEM e do CICAN que se prontificaram voluntariamente a contribuir e participar deste estudo;

A minha amiga Maria Clara Diniz, pelo incentivo nos momentos difíceis;

A minha amiga Camila Beloto, que desde o início desta jornada, me auxiliou na busca ativa das pacientes;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de Internacional Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo: Faculdade de Medicina Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marivalda de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de tabelas

Resumo

Summary

I	INTRODUÇÃO	01
II	REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1	O Papilomavírus Humano (HPV)	02
2.1.1	Histórico	02
2.1.2	Taxonomia	03
2.1.3	Biologia	05
2.1.4	Replicação viral	06
2.2	Oncogenicidade e Mecanismos de Transformação	08
2.3	Epidemiologia do Câncer Cervical	10
2.4	História natural do câncer cervical	14
2.5	Co-Fatores	18
2.6	Lesões em Mulheres Jovens	21
2.7	Vacinas	23
2.8	Diagnóstico Morfológico do HPV	25
2.8.1	Citologia Oncótica	26

2.8.2	Histopatologia	28
2.8.3	Imuno-histoquímica (IHQ)	29
2.9	Diagnóstico Molecular do HPV	31
2.9.1	Hibridização <i>in situ</i>	32
2.9.2	Hibridização do tipo Southern Blotting	32
2.9.3	Captura Híbrida 2	33
2.9.4	Sistemas de Amplificação do DNA alvo: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	34
2.9.4.1	PCR tipo-específico	35
2.9.4.2	PCR genérico	35
2.9.4.3	PCR quantitativo em Tempo Real (<i>Real Time PCR</i>)	36
2.9.5	Sistemas de Genotipagem do HPV	39
2.9.5.1	PCR-RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	39
2.9.5.2	Hibridização em Microplaca [Roche Molecular Systems Amplicor HPV Test (MWP)]	39
2.9.5.3	Hibridização Reversa	40
2.9.5.3.1	Linear Array HPV (Roche)	40
2.9.5.3.2	Line Probe Assay (INNO-LiPA HPV Genotyping v2-Innogenetics)	42
2.9.6	Microarray (Chips de DNA)	42
2.9.7	Métodos de detecção de RNAm E6 E7	44
2.9.7.1	Pre Tect HPV-Proofer (Norchip AS, Noruega) - Biomerieux	44

2.9.7.2	APTIMA HPV Assay (Genprobe)	45
III	JUSTIFICATIVA	48
IV	OBJETIVOS	50
V	MÉTODOS	51
5.1	Modelo do estudo	51
5.2	População de estudo e casuística	51
5.3	Exame Histopatológico	52
5.4	Imuno-histoquímica (IHQ)	53
5.4.1	Detecção da proteína p16 ^{INK4a}	53
5.4.2	Quantificação da expressão da proteína p16 ^{INK4a}	54
5.5	Teste de amplificação de ácidos nucleicos (PCR)	54
5.5.1	Coleta das Amostras	54
5.5.2	Extração Fenol-Clorofórmio	55
5.5.3	Teste Qualitativo da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	56
5.5.4	Identificação dos produtos de PCR	58
5.5.5	Genotipagem das amostras (Linear Array HPV – <i>Genotyping Test</i> - Roche Molecular Diagnostics, Alameda, CA)	59
5.5.5.1	Detecção do produto amplificado	59
5.6	Carga Viral Total do HPV	61
5.7	Carga viral específica do HPV 16	64
5.8	Captura Híbrida 2	65
5.9	Análise e tratamento dos dados	66

5.10	Aspectos Éticos	67
VI	RESULTADOS	68
6.1	Características sócio-demográficas e de comportamento sexual	69
6.2	Expressão da proteína p16 ^{INK4a}	73
6.3	Análise qualitativa do HPV por PCR convencional	76
6.4	Análise dos Genótipos do HPV	77
6.4.1	Grupo sem LIAG	77
6.4.2	Grupo com LIAG	79
6.5	Análise da Carga Viral Total do HPV	89
6.6	Análise da Carga Viral do HPV 16	97
6.7	Desempenho dos Métodos Moleculares no Diagnóstico da LIAG	102
VII	DISCUSSÃO	104
VIII	CONCLUSÕES	128
IX	ANEXOS	129
X	REFERÊNCIAS	134

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

ACO	- Anticoncepcional Oral
ACOG	- <i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
ACS	- <i>American Cancer Society</i>
ADA	- Adenosina Desaminase
AIDS	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	- Agência de Vigilância Sanitária
ASC	- Células Escamosas Atípicas
ASC-H	- Células Escamosas Atípicas não podendo afastar Lesão Intra-epitelial de Alto Grau
ASC-US	- Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
CAF	- Cirurgia de Alta Frequência
CDC	- <i>Centers for Diseases Control and Prevention</i>
CE	- Comunidade Européia
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CH 2	- Captura Híbrida 2
CICAN	- Centro Estadual de Oncologia
Com-HUPES	- Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos
Cp	- Cópias
Ct	- <i>Thereshold Cycle</i>
DAB	- Diaminobenzidina
DNA	- Ácido desoxiribonucléico
dNTPs	- Desoxinucleotídeos trifosfatos
DST	- Doenças Sexualmente transmissíveis
E1	- Glicoproteína 1 do envelope
E2	- Glicoproteína 2 do envelope
E4	- Glicoproteína 4 do envelope
E5	- Glicoproteína 5 do envelope
E6	- Glicoproteína 6 do envelope
E6-AP	- Proteína associada a E6

E7	- Glicoproteína 7 do envelope
EDTA	- Ácido etilenodiamino-tetracético
EGF	- Fator de Crescimento Epidérmico
<i>et al.</i>	- e colaboradores
EUA	- Estados Unidos da América
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
HE	- Hematoxilina-Eosina
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	- Papilomavírus Humano
IC	- Intervalo de Confiança
ICTV	- <i>International Council on the Taxonomy of Viruses</i>
IDEM	- Instituto de Diagnóstico e Exames Médicos
IHQ	- Imuno-Histoquímica
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
L1	- Glicoproteína do capsídeo 1
L2	- Glicoproteína do capsídeo 2
LA	- <i>Linear Array</i>
LBA	- <i>Line Blot Assay</i>
LCR	- Região Longa de Controle
LIAG	- Lesão Intra-epitelial de Alto Grau
LIBG	- Lesão Intra-epitelial de Baixo grau
LIE	- Lesão Intra- Epitelial
LiPA	- <i>Line Probe Assay</i>
LSAB	- <i>Labelled Streptavidin Biotin</i>
mg	- Miligrama
MgCl ₂	- Cloreto de Magnésio
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	- Mililitro
MPL	- 3-deacilatomonofosforil Lipídio A
MS	- Ministério da Saúde
NaOH	- Hidróxido de Sódio
NASBA	- <i>Nucleic Acid Specific Based Amplification</i>
ng	- Nanograma

NIC	- Neoplasia Intra-epitelial Cervical
nm	- Nanômetro
°C	- Graus Celsius
ORFs	- Fases abertas de leitura
p	- p valor
p53	- proteína 53
pb	- Pares de bases
PBS	- <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
pRb	- proteína do Retinoblastoma
Primer	- Oligonucleotídio iniciador
RFLP	- <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RLU	- Unidade de Luz Relativa
RNA	- Ácido ribonucléico
RNAm	- Ácido ribonucléico mensageiro
RT- PCR	- PCR em Tempo Real
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
SPSS	- <i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TAE	- Tris Acetato EDTA
TAq	- <i>termus aquaticus</i>
TBE	- Tris-ácido bórico e EDTA
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMA	- <i>Transcription Mediated Amplification</i>
UCM	- <i>Universal Collection Medium</i>
UFBA	- Universidade Federal da Bahia
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
VIA	- Inspeção Visual com Ácido Acético
VILI	- Inspeção Visual com Lugol
VLP	- <i>Virus-Like Particles</i>
ZTA	- Zona de Transformação Anormal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Árvore Filogenética dos papilomavírus.....	04
Figura 2-	Ciclo celular do HPV adaptado.....	07
Figura 3-	Percentagem estimada de casos de câncer cervical atribuídos aos 15 tipos de HPV mais freqüentes em todo o mundo. (A) análise combinada do IARC com 3.085 casos e (B) Meta-análise incluindo 14.595 casos	13
Figura 4-	História natural do câncer cervical. (A) Esquema demonstrando a progressão de lesões intra-epiteliais para o câncer cervical. (B) Modelo esquemático da carcinogênese cervical. Os principais passos na carcinogênese cervical são: infecção pelo HPV, persistência, progressão para lesões pré-cancerosas e invasão.....	15
Figura 5-	Fluxograma metodológico.....	52
Figura 6-	Caso 10. A. Coloração pela HE de NIC 2. Aumento original: 100X; B. Imuno-Histoquímica p16 ^{INK4a} reatividade fraca (escore 1). Aumento original: 100X.	74
Figura 7-	Caso 29. A. Coloração pela HE de NIC 2. Aumento original: 200X; B. Imuno-Histoquímica p16 ^{INK4a} reatividade forte (escore 3). Aumento original: 400X..	74
Figura 8-	Caso 30. A. Coloração pela HE de NIC 3. Aumento original: 200X; B. Imuno-Histoquímica p16 ^{INK4a} reatividade moderada (escore 2). Aumento original: 200X.....	75
Figura 9-	Caso 18. A. Coloração pela HE de carcinoma. Aumento original: 100X; B. Imuno-Histoquímica p16 ^{INK4a} reatividade forte (escore 3). Aumento original: 400X.....	75

Figura 10-	Eletroforese em gel de agarose 1,5% utilizando os <i>primers</i> PGMY09/11 para amplificação da região do gene L1 do HPV (450 pb) e os <i>primers</i> da β -globina humana correspondente a 268 pb.....	76
Figura 11-	Tiras do teste Linear Array HPV das 47 pacientes sem LIAG com o guia de referência.....	78
Figura 12 -	Tiras do teste Linear Array HPV das 47 pacientes com LIAG com o guia de referência.....	81
Figura 13-	Relação entre número de genótipos do HPV e grupos de idade em mulheres com LIAG.....	83
Figura 14 -	Relação entre número de genótipos do HPV em mulheres com e sem LIAG.....	84
Figura 15 -	Relação entre número de genótipos de HPV oncogênicos e grupos de idade em mulheres com LIAG.....	85
Figura 16 -	Relação entre número de genótipos de HPV oncogênicos em mulheres com e sem LIAG.....	86
Figura 17 -	Imagem da análise da carga viral total do HPV pela técnica PCR em Tempo Real. A) Corrida com as amostras do estudo. B) curva padrão gerada a partir do DNA extraído de células CasKi.....	90
Figura 18-	Mediana e dispersão da carga viral total do HPV em mulheres sem e com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.....	92
Figura 19-	Mediana e dispersão da carga viral total do HPV por grupo de idade em mulheres com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.....	93

Figura 20 -	Relação entre carga viral total do HPV e números de genótipos em mulheres com e sem LIAG.....	94
Figura 21 -	Relação entre carga viral total do HPV e números de genótipos por grupos de idade em mulheres com LIAG. A) mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos B) mulheres com idade igual ou superior a 35 anos.....	96
Figura 22 -	Imagem da análise da carga viral do HPV 16 pela técnica PCR em Tempo Real. A) Corrida com as amostras do estudo. B) curva padrão gerada a partir do DNA extraído de células CasKi.....	98
Figura 23-	Mediana e dispersão da carga viral específica do HPV 16 em mulheres sem e com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.....	100
Figura 24-	Mediana e dispersão da carga viral específica do HPV 16 por grupo de idade em mulheres com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.....	101

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Comparação de Algumas Técnicas Moleculares para Detecção do HPV..... 47
- Quadro 2- Sequências dos *primers* PGMY09/11, GH20 e PC04 utilizados nos ensaios moleculares..... 57
- Quadro 3 - Sequências de *primers* SPF10 modificados homólogos para a região L1 do HPV utilizados na determinação da carga viral total do HPV..... 61
- Quadro 4 - Sequências de *primers* HPV 16-E7.667 e 16-E7.774 específicos para a região E7 do HPV utilizados na determinação da carga viral específica do HPV 16..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Freqüência dos graus histopatológicos segundo grupo de idade na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.....	68
Tabela 2-	Características sócio-demográficas e de comportamento sexual em mulheres com Lesão Intra-epitelial de Alto Grau (LIAG) segundo o grupo de idade em Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.....	72
Tabela 3-	Expressão da proteína p16 ^{INK4a} de acordo com os graus histopatológicos em mulheres com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.....	73
Tabela 4-	Distribuição dos genótipos do HPV em infecção múltipla e única e segundo grupo de idade em mulheres com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.....	80
Tabela 5-	Distribuição dos genótipos do Papilomavírus Humano (HPV) segundo grau histopatológico na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.....	88
Tabela 6-	Análise das médias, desvio padrão, limite inferior, superior, mínimo e máximo da carga viral total do HPV em log ₁₀ cp/10 ⁴ células em mulheres na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.....	91
Tabela 7-	Análise das médias, medianas e desvios padrões da carga viral total do HPV em log ₁₀ cp/10 ⁴ células por grupo de idade em mulheres com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.....	93

Tabela 8-	Análise das médias, desvio padrão, limite inferior, superior, mínimo e máximo da carga viral do HPV 16 em \log_{10} cp/10 ⁴ células em mulheres na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.....	99
Tabela 9-	Análise das médias, medianas e desvios padrões da carga viral do HPV 16 em \log_{10} cp/10 ⁴ células por grupo de idade em mulheres com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.....	101
Tabela10-	Análise do desempenho dos métodos moleculares no diagnóstico de LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.....	103

RESUMO

Ramos, KS. Estudo do HPV e variáveis sócio-comportamentais em mulheres com lesão intra-epitelial de alto grau. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

A infecção pelo HPV em mulheres abaixo de 30 anos é transitória, entretanto, algumas destas mulheres progridem para Lesão Intra-Epitelial de Alto Grau (LIAG). Este estudo investigou características virais, morfológicas e variáveis sócio-comportamentais em mulheres com LIAG, entre estas a determinação dos genótipos oncogênicos do HPV, a carga viral total e específica de HPV 16, a expressão da proteína p16^{INK4a} assim como variáveis epidemiológicas. Foram selecionadas 88 mulheres provenientes de dois serviços de oncologia ginecológica de Salvador, Bahia, a Clínica IDEM e o CICAN, entre julho de 2006 e janeiro de 2009 com diagnóstico citopatológico de LIAG. As pacientes preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderam um questionário contendo informações sócio-demográficas e clínicas. Em seguida, foi realizada a colheita de células esfoliadas do colo uterino para genotipagem através da técnica Linear Array e avaliação da carga viral do HPV por PCR em tempo real, e a biópsia para análise histopatológica. Destas 88 mulheres, apenas 41 (46,6%) tiveram o diagnóstico de LIAG confirmado através do exame histopatológico. Desta forma, as pacientes foram divididas em 3 grupos: sem LIAG (< NIC 2), com LIAG (\geq NIC 2) menores que 30 anos e com LIAG (\geq NIC 2) com idade igual ou superior a 35 anos. Dentre os co-fatores analisados, a escolaridade, o uso de anticoncepcional oral e paridade diferiram nos dois grupos de idade com LIAG. A expressão da proteína p16^{INK4a} foi observada em todos os graus histopatológicos com LIAG, entretanto, sua intensidade não diferiu entre estes. Foi observada uma maior prevalência de LIAG em mulheres mais jovens. Os genótipos mais prevalentes nas mulheres com LIAG foram: HPV 16, HPV 35, HPV 56, HPV 45 e HPV 70; no grupo sem LIAG foram: HPV 16, HPV 31, HPV 56, HPV 61 e HPV CP6108. A carga viral total foi maior em mulheres com LIAG em relação a mulheres sem LIAG. Houve associação entre aumento da carga viral específica para HPV 16 e aumento da severidade das lesões intra-epiteliais. As cargas virais total e específica do HPV 16 não diferiram entre os dois grupos de idade com LIAG, indicando não ser esta o fator que leva ao raro desenvolvimento de LIAGs em mulheres jovens.

Descritores: 1. Papillomaviridae; 2. Neoplasia Intra-epitelial Cervical/diagnóstico; 3. Fatores de risco; 4. Adolescente; 5. Adulto; 6. Reação em Cadeia da Polimerase; 7. Carga viral.

SUMMARY

Ramos, KS. HPV and sociodemographic characteristics in women with high-grade squamous intraepithelial lesion. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

HPV infection in young women, below 30 years old is commonly transitory. However, some women may progress to high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). This study aimed to investigate viral and host factors in young women with a diagnosis of HSIL, such as viral load both total and HPV 16-specific, genotypes, p16^{INK4a} expression and sociodemographic characteristics. Eighty-eight women with a cytological diagnosis of HSIL were recruited from 2 specialized oncogynecologic services from Salvador, Bahia, in between July 2006 and January 2009. After providing written informed consent, cervical scrapes were obtained for DNA extraction for further molecular testing, including HPV genotyping by Linear array and viral load determination by Real-Time PCR. Biopsies were taken for confirmatory histopathologic analysis. Forty-one out of 88 enrolled women (46,6%) had the HSIL diagnosis confirmed. Based on that they were classified into three groups: No SIL, HSIL less than 30 years old and HSIL older than 35 years old. Among co-factors studied, education, oral contraceptive use and parity significantly differed between HSIL age groups. p16^{INK4a} expression was observed with similar intensity among all histological grades of CIN. A higher prevalence of HSIL was detected in younger women. The most prevalent genotypes in HSIL patients were HPV 16, HPV 35, HPV 56, HPV 45 and HPV 70; whereas in the No SIL group were: HPV 16, HPV 31, HPV 56, HPV 61 and HPV CP6108. Total HPV viral load was significantly higher in women bearing CIN than in the normal group. A positive association between HPV 16 viral load and increasing histological grades was observed. Total and HPV 16 viral loads were similar among young and older women with HSIL, suggesting that this is not the main factor leading to the early development of these lesions.

Descriptors: 1. Papillomaviridae; 2. Cervical Intraepithelial Neoplasia/diagnosis; 3. risk Factors; 4. Adolescent; 5. Adult; 6. Polimerase Chain Reaction; 7. Viral load.

I INTRODUÇÃO

Com aproximadamente 500 mil novos casos por ano no mundo, o câncer de colo de útero é a segunda causa de morte por câncer em mulheres, sendo superado apenas pelo câncer de mama (Bosch *et al.*, 1995; Munoz *et al.*, 2003; INCA, 2007; Schiffman *et al.*, 2007). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), aponta que em 2008, o número de novos casos de câncer de colo de útero seja de 18.680, com 51 novos casos por dia e incidência estimada de 19 casos a cada 100.000 mulheres (INCA, 2007).

A relação entre câncer cervical e HPV do grupo oncogênico já está bem estabelecida; através de técnicas de biologia molecular já se consegue detectar o DNA do HPV em 92,9% a 99,7% dos espécimes de câncer cervical invasivo (Bosch *et al.*, 1995; Walboomers *et al.*, 1999; Munoz *et al.*, 2006). Entretanto, apenas a infecção pelo HPV não é suficiente para o desenvolvimento do câncer, sendo necessários outros co-fatores, entre os quais, idade do primeiro intercuro sexual, alta paridade, uso prolongado de anticoncepcionais orais, tabagismo e imunossupressão por drogas ou pelo HIV. É consenso na literatura que a infecção pelo HPV em mulheres abaixo de 30 anos é transitória, com maior taxa de regressão, e persistência e progressão menores em relação às mulheres de faixa etária superior (Moscicki *et al.*, 2004). Entretanto, algumas destas mulheres progridem para Lesão Intra-Epitelial de Alto Grau (LIAG). Neste trabalho, procuramos investigar algumas características virais e morfológicas em mulheres com este tipo de lesão que possam justificar esta manifestação precoce.

II REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Papilomavírus Humano (HPV)

2.1.1 Histórico

Os condilomas clássicos causados pelo Papilomavírus Humano (HPV), são conhecidos desde a mais remota Antiguidade. Registros da Grécia antiga faziam referências a lesões verrucosas ou papilomatosas em algumas regiões como as áreas genitais, palmares e plantares. A doença foi associada a práticas homossexuais e registrada por poetas eróticos e satíricos, assim como em escritos médicos (Bafverstedt, 1967). Durante a Idade Média, as epidemias de gonorréia e sífilis renovaram o interesse pelas Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST), mas não foram feitas distinções entre as causas das diversas lesões genitais. No final do século XIX, as verrugas genitais passaram a ser correlacionadas com as verrugas cutâneas, levando a suposição da origem única das verrugas, a chamada teoria unitária (Oriel, 1971).

Waelsch, em 1917, foi o primeiro a obter sucesso com a inoculação de material de condiloma na pele humana; além disso, foi o primeiro a confirmar a hipótese de que o mesmo agente causava a verruga vulgar e o condiloma acuminado. Usando material não-filtrado de condiloma de pênis, inoculou áreas escarificadas da pele de três voluntários. Dois deles

desenvolveram verrugas planas no antebraço após três e nove meses, respectivamente. Surgiram em uma voluntária, lesões típicas de condiloma na região vulvar após três meses (Goldschmidt e Kligman, 1958).

Zur Hausen *et al.* publicaram o primeiro trabalho sobre hibridização molecular, utilizando sondas de ácido ribonucléico (RNA) derivadas de verruga plantar (zur Hausen *et al.*, 1974). Essa técnica foi aperfeiçoada por Southern utilizando sondas de DNA, que permitiu a distinção de vários tipos de HPV existentes de acordo com o grau de semelhança de suas sequências nucleotídicas (Southern, 1975).

2.1.2 Taxonomia

De acordo com o *International Council on the Taxonomy of Viruses* (ICTV), o HPV pertence à família *Papillomaviridae*, gêneros papilomavírus Alfa, Beta, Gama, Delta, Kappa, entre outros (de Villiers *et al.*, 2004; Bernard, 2005). Clinicamente, o gênero mais importante é o Alfa-papillomavirus, por conter todos os tipos de HPV associados às lesões da mucosa genital (Figura 1). Este gênero inclui as espécies 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. O HPV 16, por exemplo, está classificado no gênero alfa, espécie 9 (Bernard, 2005).

A classificação em tipos de HPV é feita com base na homologia de suas sequências de DNA. Desta forma, variações no genoma dos genes L1, E6 e E7 menores que 2%, são consideradas como variantes dos tipos de HPV. Variações entre 2% e 10%, são consideradas como subtipos e

variações maiores que 10%, como novos tipos de HPV. Os papilomavírus humanos são nomeados pela abreviação HPV seguida de um número que é dado sequencialmente, à medida que diferentes tipos são descobertos (Bernard *et al.*, 1994).

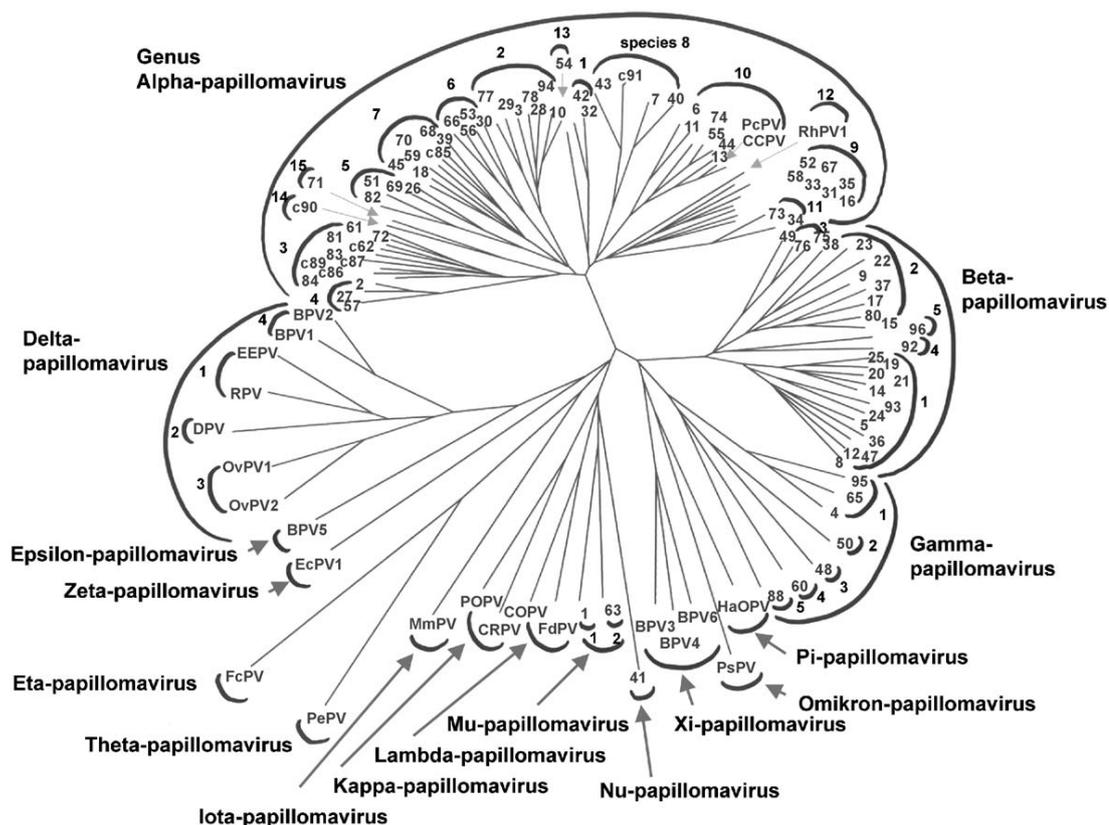


Figura 1 - Árvore filogenética dos papilomavírus (De Villiers *et al.*, 2004).

Mais de 100 tipos de HPV já foram identificados, sendo que cerca de quarenta estão relacionados às infecções ano-genitais (Syrjanen e Puranen, 2000; Munoz *et al.*, 2006; Woodman *et al.*, 2007). Destes, 15 tipos (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82) são de alto risco oncogênico, estando envolvidos em mais de 95% dos carcinomas cervicais

(Walboomers *et al.*, 1999). Os HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81 estão comumente associados ao condiloma acuminado, condilomas planos ou neoplasia cervical intra-epitelial de baixo grau (Bosch *et al.*, 2002). Há ainda, HPVs de provável alto risco, os tipos 26, 53 e 66 (Munoz *et al.*, 2003). O conceito de risco baixo ou alto de desenvolver câncer invasivo, é apoiado por muitos estudos epidemiológicos de caso-controle, que têm mostrado forte associação entre os tipos oncogênicos e lesões de alto grau e carcinoma (Bosch *et al.*, 1995; Munoz, 2000).

O HPV 16 e o HPV 18 são os mais prevalentes, representam cerca de 70% dos tipos virais envolvidos no carcinoma de células escamosas a nível global (Munoz *et al.*, 2006).

2.1.3 Biologia

O HPV é um vírus pequeno, com 55 nanômetros de diâmetro, não envelopado, apresentando simetria icosaédrica. As partículas virais consistem em uma única molécula de DNA circular de fita dupla de aproximadamente 8000 pares de bases (pb) envolvida com as histonas H2a, H2b, H3 e H4, formando um complexo contido no capsídeo, composto por 72 capsômeros. O genoma do HPV pode ser dividido em três regiões principais: precoce ou *Early* (E), que codifica as proteínas não estruturais (E1, E2, E4, E5, E6 e E7); a região tardia ou *Late* (L), responsável pela síntese das proteínas do capsídeo L1 e L2 e a região regulatória *Long*

Control Region (LCR), que contém uma variedade de elementos *cis* que regulam a replicação viral e a expressão gênica (Munger *et al.*, 2004).

As regiões do genoma viral com potencial para codificar proteínas, são denominadas *open reading frames* (ORFs) ou fases abertas de leituras. O genoma do HPV contém aproximadamente 8 ORFs que são expressas através de RNA mensageiros (RNAm) policistrônicos transcritos por uma única fita de DNA (Duensing e Munger, 2004; Longworth e Laimins, 2004).

2.1.4 Replicação viral

A infecção pelo HPV é iniciada quando a partícula viral penetra nas células basais do epitélio através de microlesões. O receptor para entrada do vírus na célula ainda é desconhecido, contudo, estudos sugerem que o sulfato de heparina proporciona esta fixação inicial (Longworth e Laimins, 2004). Nos HPVs oncogênicos, a transcrição viral é iniciada a partir de dois promotores principais: p97 (HPV 16 e HPV 31) e p105 (HPV 18).

Uma vez no núcleo, o genoma viral é mantido na forma episomal em um número baixo, de 20 a 50 cópias por célula (Chow e Broker, 1997); em um segundo momento, parte da progênie viral migra para as células em diferenciação da camada suprabasal, onde ocorre um aumento da replicação do genoma do vírus, expressão dos genes tardios e formação das proteínas estruturais. Nas camadas superiores do epitélio ocorre o empacotamento do vírus em capsídeos e a liberação da progênie do vírus para que o ciclo possa ser reiniciado (Figura 2) (zur Hausen, 2002; Munoz *et*

al., 2006). O período de incubação do HPV varia entre 2 semanas a 8 meses e parece estar relacionado com a competência imunológica individual (Lorincz, 1996b).

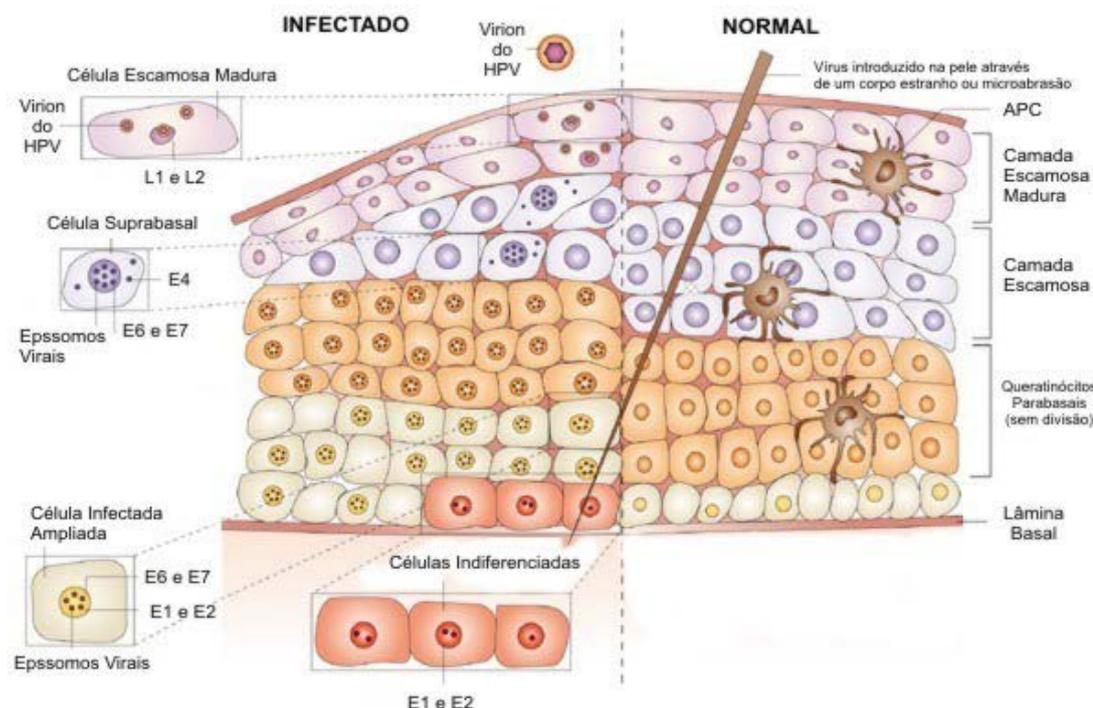


Figura 2 - Ciclo celular do HPV adaptado (Frazer, 2004).

As proteínas E1 e E2 são as primeiras a serem expressas, formando um complexo que atua no recrutamento de polimerases celulares e proteínas acessórias para mediar a replicação. A E1 também desempenha a atividade de helicase, permitindo a separação das fitas do DNA viral. Visto que as proteínas E1 e E2 são expressas por promotores precoces, a habilidade de E2 em ativar e reprimir a expressão contribui para o controle do número de cópias virais em células indiferenciadas (Longworth e Laimins,

2004). A proteína E4 do HPV se associa com filamentos de queratina celular, afetando sua estabilidade mecânica, o que sugere um papel na liberação de partículas virais (Doorbar, 2005). A proteína E5 é expressa nos estágios iniciais da infecção viral. Sua expressão modifica a transdução de sinal para o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) e bloqueia a expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe I na membrana plasmática (Santos, 2002; Leykauf *et al.*, 2004). As proteínas E6 e E7 do HPV são fundamentais no processo de replicação do vírus; elas interagem com as proteínas do ciclo celular p53 e proteína do retinoblastoma (pRb), respectivamente, induzindo a proliferação e eventual imortalização e transformação maligna das células (Munger *et al.*, 2004).

2.2 Oncogenicidade e Mecanismos de Transformação

O desenvolvimento do câncer cervical está ligado a infecções persistentes por HPVs oncogênicos e geralmente é precedido por um período de latência. Entretanto, apenas uma minoria de mulheres infectadas por HPV oncogênicos irão desenvolver o câncer (zur Hausen, 2002).

A atividade transformadora da oncoproteína E6 é dependente da sua ligação com a proteína supressora de tumor p53. A E6 se liga e degrada fisiologicamente a p53 por uma via ubiquitina-dependente (Thomas *et al.*, 1999). A associação de E6 com a p53 é mediada por uma proteína celular adicional, chamada proteína associada a E6 (E6-AP). A formação do

complexo E6-p53 é fundamental para a inativação das funções supressoras da p53. Essa parece ser uma atividade específica dos HPVs de alto risco, pois os HPVs de baixo risco que codificam E6 não inativam a p53 pelo mesmo mecanismo (Werness *et al.*, 1990).

Por outro lado, a proteína E7 se liga à pRb, induzindo a sua degradação, fato observado devido à redução da meia-vida desta proteína em células expressando HPVs de alto risco. A E7 ligada a pRb, preferencialmente na forma ativa, facilita a liberação do fator E2F, promovendo, desta forma, a progressão do ciclo celular, atuando nas fases G1 e S, o que pode eventualmente propiciar o desenvolvimento do câncer (Boyer *et al.*, 1996). A E7 também pode estar associada a outras proteínas envolvidas na proliferação celular, como as histonas diacetilases, componentes do complexo de transcrição AP-1 e inibidores de ciclina dependente de quinase p21^{wap1/cip1}, p27^{kip1} (Zerfass *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1997; Rosenblatt *et al.*, 2005). Em HPV de baixo risco, a proteína E7 liga-se ao pRb com baixa afinidade, enquanto em HPV de alto risco a afinidade é alta (Lee *et al.*, 1998).

Desta forma, os oncogenes E6 e E7 dos HPVs de alto risco quando co-expressados podem facilitar a imortalização de células epiteliais escamosas primárias. A sua expressão prolongada causada pela infecção persistente, pode possibilitar o acúmulo celular de aberrações genômicas que culminam em transformação maligna. A contínua expressão de E6 e E7 é necessária para manutenção do fenótipo transformado em quase todos os carcinomas cervicais (Duensing e Munger, 2004).

2.3 Epidemiologia do Câncer Cervical

Com aproximadamente 500 mil novos casos por ano no mundo, o câncer de colo de útero é a segunda causa de morte por câncer em mulheres, sendo superado apenas pelo câncer de mama (Bosch *et al.*, 1995; Munoz *et al.*, 2003; INCA, 2007; Schiffman *et al.*, 2007). Apesar desta neoplasia ser passível de prevenção e curável, principalmente nos estágios iniciais, mais de 234.000 mulheres irão morrer desta doença anualmente devido a vários fatores, entre os quais a falha na detecção das lesões pré-malignas através de programas de rastreamento citológico cervical (Miller *et al.*, 2000).

Em geral, os índices mais baixos de registro de câncer cervical (menores que 15/100.000) são encontrados na Europa (com exceção de alguns países do leste europeu), América do Norte e Japão. Sua ocorrência é cerca de duas vezes maior em países em desenvolvimento como os situados na África sub-Saara (31/100.000), América Latina (33,5/100.000), Caribe (33,5/100.000) e nas regiões Centro-Sul (26,5/100.000) e Sudeste (18,3/100.000) da Ásia (Parkin e Bray, 2006).

Nos Estados Unidos (EUA), a incidência do câncer de colo de útero era de 44/100.000 antes da introdução de programas coletivos de prevenção, tendo redução de 75% nos 50 anos seguintes. O câncer de colo de útero passou de 1^a para 13^a causa de morte em mulheres neste país (Saslow *et al.*, 2002). Em 2007, A *American Cancer Society* (ACS) estimou que nos EUA aproximadamente 11.000 mulheres tivessem diagnóstico de

câncer cervical e aproximadamente 3.600 morreriam em função desta doença (CDC, 2005). Em países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos varia de 59 a 69%, enquanto que em países em desenvolvimento é de aproximadamente 49% após cinco anos. A média mundial estimada é de 49% (INCA, 2007).

Yang *et al.* demonstraram que o câncer cervical foi o principal tipo de câncer em países em desenvolvimento (Yang *et al.*, 2004). Em geral, nestes países têm se observado uma relativa estabilidade ou um modesto declínio da incidência e mortalidade por câncer cervical (IARC, 2005). A ausência de uma maior queda pode ser devido à falta de programas de rastreamento, ou onde estes programas foram implementados, pode ter havido uma baixa cobertura da população ou pouca qualidade no diagnóstico citológico (Parkin e Bray, 2006). Porém, em geral, a incidência de câncer cervical tem diminuído sensivelmente em áreas onde são realizados programas de rastreamento para detecção de lesões pré-cancerosas (Baseman e Koutsky, 2005).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), aponta que em 2008, o número de novos casos de câncer de colo de útero esperado seja de 18.680, com 51 novos casos por dia e risco estimado de 19 casos a cada 100.000 mulheres. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, na região Norte o câncer cervical é o mais incidente (22/100.000). Nas regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste, este tipo de câncer ocupa a segunda posição (24/100.000; 19/100.000 e 18/100.000, respectivamente) e no Sudeste a quarta posição (18/100.000) (INCA, 2007).

No Estado da Bahia, a taxa padronizada de mortalidade por câncer cervical entre os anos 1980 e 2001 aumentou cerca de 10,5%, passando de 3,8 para 4,2/100.000 mulheres. Em Salvador, capital do Estado, a tendência da incidência do câncer de colo do útero entre os anos de 1997 e 2001, foi de declínio, chegando a 46%, quando a taxa padronizada de incidência passou de 15,0 para 8,1/100.000 mulheres (SESAB, 2004). Provavelmente este fato se deve a maior disseminação de informações relacionadas a esta patologia, estimulando um aumento na procura pela população feminina aos serviços de prevenção e assistência. Reforça-se com isso a importância das ações do Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e Mama (Programa “Viva Mulher”), em funcionamento desde 1998. Por outro lado, o carcinoma *in situ* do colo do útero sofreu aumento expressivo de 118,0% neste mesmo período, aumentando de 5,0 para 10,9/100.000 mulheres. Entre as mulheres que apresentaram esse tipo de câncer, todas estavam com idade superior a 50 anos. Esse fato contribui para reflexões acerca do grau de detecção precoce desse câncer, visto que quanto mais precocemente iniciado o tratamento, maior será a possibilidade de cura, a menor custo e com menos seqüelas (SESAB, 2004).

Evidências epidemiológicas e moleculares mostram claramente que certos genótipos do HPV constituem a principal causa do câncer cervical invasivo. Munõz *et al.* demonstraram que o HPV 16 foi responsável por 57,4% dos casos de câncer cervical e o HPV 18 por 16,6% (Munoz *et al.*, 2004). A figura 3A mostra a distribuição cumulativa de 15 genótipos de HPV entre 3.085 casos de câncer cervical em 25 países. Dentre eles, os sete

genótipos mais prevalentes foram 16, 18, 45, 31, 33, 52 e 58 encontrados em 87,4% dos carcinomas cervicais em todo o mundo (Munoz *et al.*, 2004). Smith *et al.* em um estudo de meta-análise, avaliaram a distribuição dos genótipos de HPV em 14.595 casos de câncer cervical invasivo e 7.094 casos de Lesão Intra-epitelial de Alto Grau e demonstraram que o HPV 16 foi o mais comum no câncer cervical invasivo, seguido dos HPVs 18, 33, 45, 31, 58, 52 e 35 (figura 3B) (Smith *et al.*, 2007).

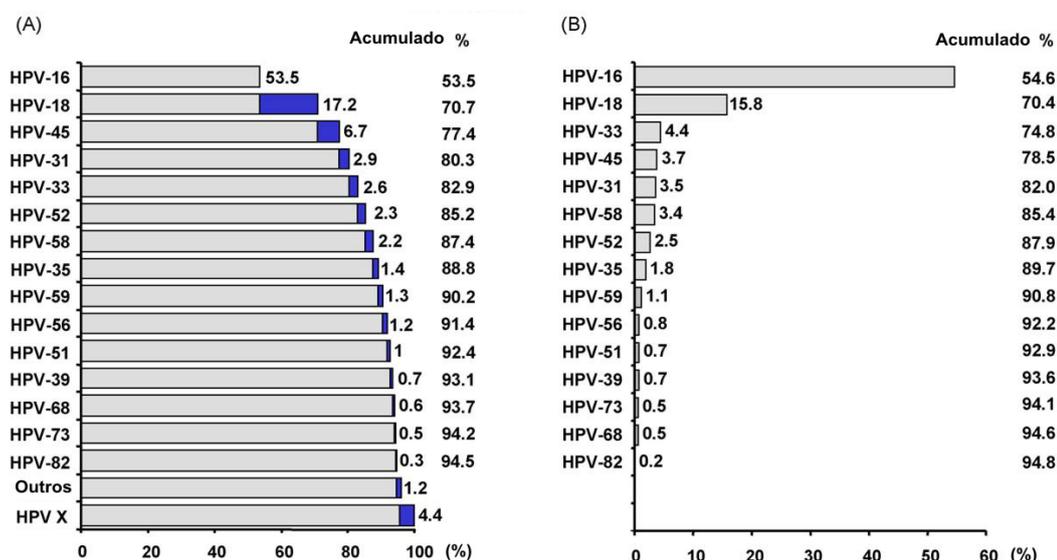


Figura 3 - Percentagem estimada de casos de câncer cervical atribuídos aos 15 tipos de HPV mais freqüentes em todo o mundo. (A) análise combinada do IARC com 3.085 casos (Munoz *et al.*, 2004) e (B) Meta-análise incluindo 14.595 casos (Smith *et al.*, 2007). Revisado por (Castellsague, 2008).

Segundo Walboomers e Meijer, o desenvolvimento do câncer cervical sem a presença do HPV é um evento raro ou impossível (Walboomers e Meijer, 1997). Porém, mesmo o HPV sendo considerado a causa central para o desenvolvimento do câncer cervical, somente 1 a cada 1.000

mulheres com HPV desenvolvem carcinoma do tipo invasivo (Ho *et al.*, 1998).

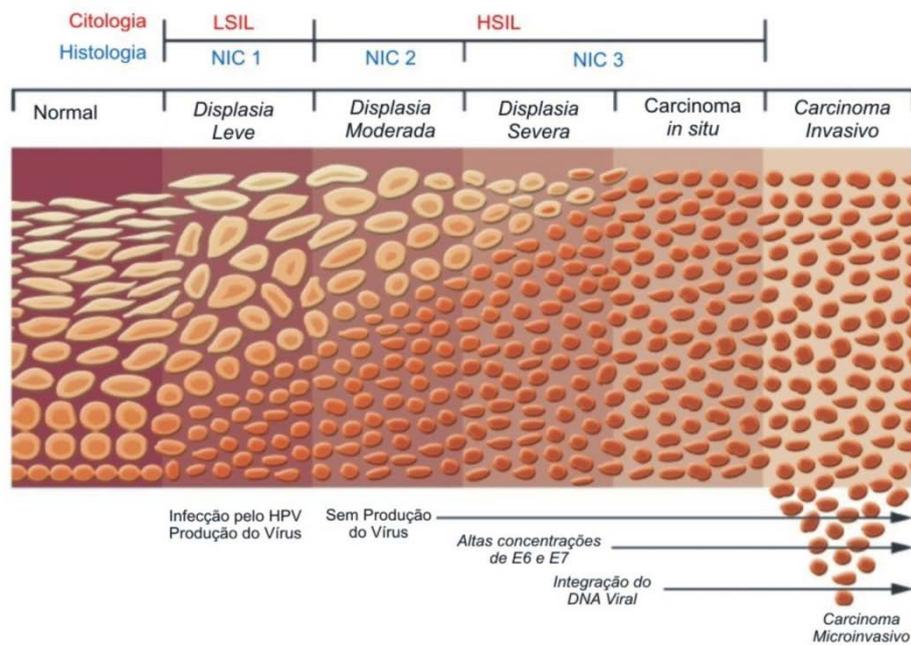
2.4 História natural do câncer cervical

A história natural do câncer cervical envolve mudanças reversíveis no tecido cervical de um estado normal, onde mudanças neoplásicas não são detectadas no epitélio escamoso, a uma variedade de anormalidades que culmina no câncer cervical invasivo (Schlecht *et al.*, 2003a).

A relação entre o câncer cervical e a infecção pelo HPV do tipo oncogênico já está bem estabelecida; através de técnicas de biologia molecular já se consegue detectar o DNA do HPV em 92,9% a 99,7% dos espécimes de câncer cervical invasivo (Bosch *et al.*, 1995; Walboomers *et al.*, 1999; Munoz *et al.*, 2006).

As principais etapas para o desenvolvimento da carcinogênese cervical incluem infecção do epitélio metaplásico na zona de transformação cervical por um ou mais genótipos oncogênicos do HPV, persistência viral, progressão para lesões pré-invasivas (anormalidades epiteliais conhecidas como displasia e carcinoma *in situ* ou diferentes graus de neoplasia intraepitelial cervical [NIC]) e invasão; entretanto, pode ocorrer uma reversão destas etapas, com eliminação da infecção pelo HPV e regressão das lesões pré-cancerosas (figura 4) (Schiffman e Kjaer, 2003; Moscicki *et al.*, 2006).

A)



B)

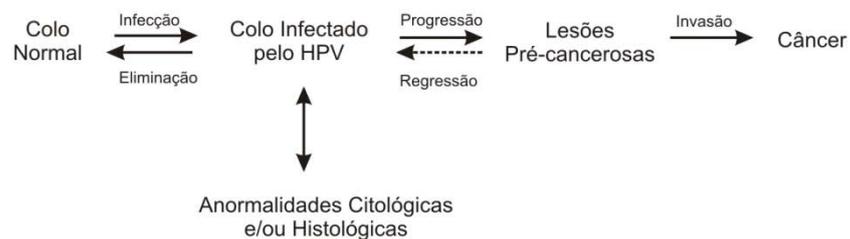


Figura 4 - História natural do câncer cervical. (A) Esquema demonstrando a progressão de lesões intra-epiteliais para o câncer cervical. (B) Modelo esquemático da carcinogênese cervical. Os principais passos na carcinogênese cervical são: infecção pelo HPV, persistência, progressão para lesões pré-cancerosas e invasão (adaptado de Schiffman & Kjaer, 2003).

Embora mais de 90% das infecções pelo HPV regredam espontaneamente, algumas irão causar Lesão Intra-epitelial de Baixo Grau (LIBG ou NIC1), Lesão Intra-epitelial de Alto Grau (LIAG ou NIC 2 e 3) ou progredir para o câncer cervical (Moscicki, 2005). Schlecht, *et al.* observaram que em mulheres infectadas por HPV de alto risco, a LIBG regredia mais lentamente (média de 13,8 meses) e progredia mais rapidamente para LIAG (média de 73,3 meses) em comparação com mulheres infectadas por outros genótipos de HPV (Schlecht *et al.*, 2003a).

Diferentemente da LIBG, o desenvolvimento de LIAG requer uma infecção persistente pelo HPV, onde menos de 40% destas lesões irão regredir (Moscicki, 2005; Woodman *et al.*, 2007). A persistência pode ser definida como a detecção de um mesmo tipo de HPV (ou variantes) duas ou mais vezes durante certo período. Ainda não há um consenso referente à qual intervalo de tempo implica em persistência, mas usualmente varia de alguns meses a um ano, com uma média de 6 meses (Schiffman e Kjaer, 2003).

A LIAG é um importante precursor do câncer cervical e ocorre quando o HPV replicando em células imaturas, impede a maturação do epitélio e sua diferenciação, induzindo a uma contínua replicação de células imaturas e acúmulo de anormalidades genéticas que poderão levar a formação de um clone de células cancerosas (Baseman e Koutsky, 2005).

Existem evidências epidemiológicas de que a infecção persistente, com alta carga viral por tipos oncogênicos do HPV desempenha papel preponderante no desenvolvimento do câncer do colo uterino (Ho *et al.*,

1995), sendo este vírus detectado em quase todas as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas cervicais (Walboomers *et al.*, 1999). A proporção destas lesões persistentes é tempo-dependente, podendo declinar de 60% em 25 meses a 17% após 110 meses de acompanhamento (Syrjanen, 2000). Estudos ainda mostram que o HPV 16 tende a persistir mais tempo do que outros genótipos oncogênicos (Schiffman e Kjaer, 2003; Schiffman *et al.*, 2005).

Na ausência de tratamento, o tempo mediano entre a detecção de LIBG (NIC 1) e o desenvolvimento de carcinoma *in situ* é de 58 meses, enquanto para LIAG (NIC 2) este tempo é de 38 meses e LIAG (NIC 3), de 12 meses (Barron e Richart, 1968). Segundo Ostor, a probabilidade aproximada de regressão da NIC 1 é 60%, persistência 30%, progressão para NIC 3 10% e progressão para invasão 1%. Para NIC 2, as probabilidades correspondentes são de aproximadamente 40%, 40%, 20% e 5%, respectivamente. A probabilidade de NIC 3 regredir é de 33% e progredir para invasão é acima de 12% (Ostor, 1993).

Vários estudos têm demonstrado a importância da persistência no desenvolvimento de lesões pré-cancerosas; o intervalo de tempo médio entre a infecção pelo HPV e desenvolvimento de NIC 3 pode variar de 1 e 10 anos. O significado biológico para este desenvolvimento precoce da NIC 3 é desconhecido; apesar de ser plausível que muitas destas lesões regrediriam, estudos observacionais seriam antiéticos. Estudos de coortes longos cobrindo todo período de idade desde o primeiro intercuro sexual até o

diagnóstico de NIC 3 são necessários para definir o período de tempo da história natural destas lesões (Moscicki *et al.*, 2006).

2.5 Co-Fatores

Apenas a infecção pelo HPV não é suficiente para o desenvolvimento do câncer, sendo necessários outros co-fatores, entre os quais existem evidências de associação com idade do primeiro intercuro sexual (Bosch *et al.*, 2002), alta paridade (Munoz *et al.*, 2002), uso prolongado de anticoncepcionais orais (ACO) (Deacon *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001), tabagismo (Winkelstein, 1977; Deacon *et al.*, 2000; Castellsague *et al.*, 2002) e DSTs tais como, Herpes vírus tipo 2, *Chlamydia trachomatis* (Anttila *et al.*, 2001) e em especial a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Há ainda aspectos relacionados com a resposta imunológica e à genética do hospedeiro e aqueles relacionados ao próprio vírus, tais como genótipo do HPV, co-infecção com outros tipos, variantes, carga viral e integração.

Vários estudos têm demonstrado que o risco de desenvolvimento do câncer cervical está relacionado com a idade do primeiro intercuro sexual, contudo, a evidência definitiva ainda não foi demonstrada. Estudos mostram que o câncer escamoso leva cerca de 15 a 20 anos para se desenvolver; a idade precoce do primeiro intercuro sexual, aumentaria o tempo de exposição ao vírus, fator necessário para o desenvolvimento do câncer. Além disso, tem sido proposto que o desenvolvimento da cérvix (em torno da peri-menarca) ou sua cicatrização (como conseqüência de outras DSTs,

traumas), são situações de alto risco para a infecção pelo HPV que pode alcançar a camada basal e estabelecer uma infecção persistente (Bosch *et al.*, 2002).

A idade também parece ser um fator importante, devido à infecção pelo HPV ser mais comum em mulheres com idade igual ou inferior a 25 anos sexualmente ativas. Embora toda associação com idade deva ser considerada um fator de risco, as adolescentes e mulheres jovens são mais vulneráveis a infecção pelo HPV por razões biológicas. O tipo de epitélio predominante no colo uterino em mulheres adultas é o escamoso, enquanto em adolescentes é o epitélio colunar ou metaplásico que posteriormente, irá se transformar em epitélio escamoso. Durante este processo, denominado de metaplasia escamosa, há formação de grandes áreas escamosas, glandulares e metaplásicas de transição, que são mais permissivas à replicação dos HPVs. Não somente essa rápida proliferação de células dá suporte à replicação do HPV, mas ela é objeto de desenvolvimento de alterações genéticas induzidas por vírus, como também em infecções persistentes, que podem levar a LIAG. A atividade sexual precoce pode acelerar este processo de maturação do epitélio; adolescentes com múltiplos parceiros parecem ter uma cérvix mais madura do que adolescentes que não são sexualmente ativas (Moscicki, 2005).

A alta paridade pode aumentar o risco do câncer cervical, já que um número alto de gestações mantém a zona de transformação na ectocérvice por muitos anos, facilitando a exposição direta ao HPV e outros co-fatores. Além disso, as mudanças hormonais induzidas pela gestação podem

modular a resposta imune ao HPV e influenciar no risco de persistência e progressão (Munoz *et al.*, 2002).

O uso prolongado de ACO também tem sido associado ao câncer cervical em muitos estudos. O uso por mais de 5 anos, é um co-fator que pode aumentar quatro vezes o risco de desenvolvimento do câncer cervical (Moreno *et al.*, 2002). Além disso, os mecanismos hormonais podem influenciar a progressão de lesões cervicais pré-malignas a malignas pela integração do DNA-HPV ao genoma do hospedeiro, resultando na desregulação da expressão de E6 e E7 (Castellsague *et al.*, 2002). Estudos mais recentes que avaliaram positividade do HPV ou análises considerando mulheres HPV positivas e risco para lesões neoplásicas não encontraram nenhuma associação com o uso de ACO (Castle *et al.*, 2005; Syrjanen *et al.*, 2006).

O tabagismo também tem sido relacionado ao câncer cervical desde 1970, baseado em correlações entre o câncer cervical e outros tipos de câncer (Winkelstein, 1977). A nicotina e carcinógenos específicos do tabaco têm sido detectados no muco cervical de fumantes corroborando a hipótese da ação sinérgica entre tabagismo e HPV no desenvolvimento de lesões intra-epiteliais escamosas e câncer cervical (Castellsague *et al.*, 2002). Alguns autores demonstraram que a exposição ao tabaco pode afetar a habilidade do hospedeiro em montar uma resposta imune específica contra infecções virais, mostrando que o tabagismo pode reduzir o número de células de Langerhans e outros marcadores da resposta imune (Poppe *et al.*, 1995).

A primeira publicação relacionando NIC ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi feita por Bradbeer em 1987 (Bradbeer, 1987). Outras publicações se seguiram, e baseado nestes trabalhos, em janeiro de 1993, carcinoma escamoso invasivo foi adicionado à definição de AIDS pelo *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC). Tem sido demonstrado que mulheres infectadas com o HIV apresentam alta prevalência de infecção por HPV e NIC (Maiman, 1994; Sun *et al.*, 1995; Levi *et al.*, 2004).

2.6 Lesões em Mulheres Jovens

A incidência do câncer cervical é rara em mulheres jovens entre os 20 e 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente entre 45 e 49 anos (INCA, 2007). Habitualmente, a infecção pelo HPV acomete jovens no início da atividade sexual, um fenômeno transitório em cerca de 80% dos casos (Rama *et al.*, 2008). A prevalência da infecção por HPV de alto risco em mulheres adolescentes é alta, acima de 49% (Tarkowski *et al.*, 2004). A LIBG é freqüentemente transitória em mulheres jovens e a maioria dos casos regride em 3 anos, somente 3% progride para lesões pré-cancerosas mais avançadas. Wright *et al.* observaram uma incidência de LIAG de 9% nas adolescentes estudadas (Wright *et al.*, 2004). Em um estudo longitudinal com adolescentes e mulheres jovens, somente 25% das mulheres jovens com HPV desenvolveram LIBG com 36 meses a partir da infecção inicial pelo HPV (Moscicki *et al.*, 2004). Entretanto, a persistência viral é considerada o principal fator que leva ao

desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e câncer, ressaltando que nem todas as infecções persistentes progridem para lesões pré-invasivas ou invasivas. Por apresentar maior tempo de persistência, o HPV 16 é o mais prevalente na NIC 3 ou no carcinoma cervical invasivo (Moscicki *et al.*, 2004).

De acordo com o CDC, a incidência de câncer cervical nos EUA entre os anos de 2001 e 2005 em adolescentes com idade entre 15 a 19 anos foi de 0,2/100.000; em mulheres entre 20 e 24 anos (1,5/100.000), entre 25 e 29 anos (5,8/100.000). Na faixa etária de 30 a 34 anos a incidência de câncer cervical dobrou (11,7/100.000), entre 35 e 39 anos foi de 14,1/100.000. O pico foi observado entre as mulheres na faixa etária de 40 a 44 anos (15,5/100.000) (CDC, 2005).

Em adolescentes e mulheres jovens, a LIBG regride em torno de 92% a 94%, e a LIAG também pode regredir em altas proporções, mas os padrões atuais são desconhecidos devido a adolescentes serem geralmente excluídas de estudos de história natural (Moscicki, 2005). Embora LIAG e o câncer cervical em mulheres adolescentes e jovens sejam eventos raros e a taxa de regressão de LIBG seja alta, a incidência mundial do câncer cervical nesta faixa etária mostra a necessidade de controle.

2.7 Vacinas

Atualmente, há uma imensa variedade de estudos sobre vacinas profiláticas e terapêuticas contra o HPV. As vacinas terapêuticas são baseadas na indução da imunidade celular contra células expressando antígenos virais, visando à regressão das lesões associadas ao HPV. As proteínas E6 e E7 são alvos da maioria destas vacinas, uma vez que são expressas constantemente em células de tumores associados ao HPV (Mantovani e Banks, 2001; Munger *et al.*, 2001). As vacinas profiláticas são baseadas na indução de anticorpos neutralizantes capazes de prevenir a infecção pelo HPV. Para isso, os antígenos utilizados baseiam-se na proteína estrutural do capsídeo viral L1, gerando uma estrutura semelhante àquela encontrada nos virions. Esta estrutura, morfologicamente assemelhada aos vírus, porém vazia, foi denominada de *vírus-like particles* (VLP). As VLPs são destituídas de DNA e, assim, são consideradas seguras, pois induzem forte resposta imune sem o risco de infecção ou de produzir uma neoplasia. Outra grande vantagem das VLPs é que podem ser produzidas utilizando células de insetos, bactérias recombinantes ou até mesmo fungos (Lowy e Schiller, 2006). As VLPs de L1 constituem excelentes candidatos a vacinas profiláticas na medida em que previnem infecções e a neoplasia intra-epitelial a elas associadas. As VLPs são capazes de induzir a formação de anticorpos neutralizantes sistêmicos e de mucosa, além de induzir imunidade celular em animais imunizados (Liu *et al.*, 1998).

Em 2006, a agência de regulamentação de medicamentos *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA/MS) do Brasil, aprovaram para comercialização, uma vacina desenvolvida para a prevenção do câncer de colo de útero e de verrugas genitais. A vacina quadrivalente desenvolvida pela Merck&Co. (Gardasil[®]), protege contra quatro tipos de HPV (6, 11, 16 e 18); os HPV 16 e 18, são responsáveis por cerca de 70% dos carcinomas cervicais e os HPV 6 e 11, por 90% das verrugas genitais (Lowy e Schiller, 2006). Esta vacina é indicada para mulheres entre 9 e 26 anos de idade e consiste na mistura de quatro tipos de VLPs derivadas da proteína L1 do capsídeo dos HPV tipo 6, 11, 16 e 18. Estas VLPs tipo-específicas são geradas em cultura da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando tecnologia recombinante. A vacina quadrivalente é administrada via intramuscular; cada injeção contém 20µg de HPV 6 VLP, 40µg de HPV 11 VLP, 40µg de HPV 16 VLP e 20µg de HPV 18 VLP adsorvidas em 225µg do adjuvante hidroxissulfato de alumínio. Esta vacina é administrada em 3 doses durante o período de 6 meses (1^o dia, 2^o mês e 6^o mês) (Villa *et al.*, 2005).

Em 2007, Villa demonstrou nos estudos de fase II/III, 100% de eficácia na administração da vacina quadrivalente em mulheres jovens (16 a 26 anos) contra HPV 16 e HPV 18 relatados em lesões pré-cancerosas, 100% de eficácia contra HPV 16 e HPV 18 relatados em neoplasias vaginais e vulvares de alto grau; 95% de eficácia contra os tipos HPV 6, 11, 16 e 18 de NIC/adenocarcinoma e 99% de eficácia contra os tipos HPV 6, 11, 16 e

18 de lesões genitais (Villa, 2007). Comprovou-se desta forma, que esta vacina é altamente imunogênica, segura e bem tolerada (Villa *et al.*, 2006).

Em 2008, a ANVISA aprovou a comercialização de outra vacina contra o HPV: a vacina bivalente (Cervarix[®], GlaxoSmithKline Biologicals) que protege contra os tipos de HPV 16 e 18, responsáveis por cerca de 70% dos carcinomas cervicais. Esta vacina é indicada para mulheres entre 10 e 25 anos de idade e é composta por VLPs formadas pelas proteínas L1 dos HPVs 16 e 18 obtidas através de sistemas de expressão em células de inseto *Spodoptera frugiperda*. Cada dose de 0,5mL contém 20 μ g de HPV 16 L1 e 20 μ g de HPV 18 L1 em um adjuvante AS04. Este adjuvante é composto por 500 μ g de hidróxido de alumínio e 50 μ g de 3-deacilato monofosforil lipídio A (MPL) (Giannini *et al.*, 2006). Em 2006, Harper *et al.* demonstraram que esta vacina induziu altos níveis de anticorpos dando proteção contra os tipos de HPV 16 e 18 num período de quatro anos e meio, além disso, os autores observaram uma proteção cruzada substancial contra HPV 45 e HPV 31, o terceiro e quarto tipos mais comuns de HPV associados ao câncer cervical (Harper *et al.*, 2006).

2.8 Diagnóstico Morfológico do HPV

O diagnóstico morfológico das infecções por HPV é amplamente utilizado tanto em esfregaços celulares (citologia) quanto em cortes de tecido (histopatologia). A presença de coilócitos indica uma infecção produtiva pelo HPV. Entretanto, com o desenvolvimento de técnicas de detecção do DNA

viral tornou-se evidente a baixa sensibilidade do diagnóstico morfológico, que geralmente resulta em um grande número de casos falso-negativos e falso-positivos (Rosenblatt *et al.*, 2005).

2.8.1 Citologia Oncótica

O exame de Papanicolaou ou citologia oncótica é o método mais utilizado no diagnóstico de lesões pré-invasivas (IARC, 1995). Atualmente, a nomenclatura citológica é normatizada pelo Sistema Bethesda em sua última versão de 2001, onde as atipias em células escamosas (ASC) são agora subdivididas em duas categorias: atipias em células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) e atipias em células escamosas de significado indeterminado em que não é possível descartar lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (ASC-H). As classificações em lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (LIBG), lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (LIAG) e carcinoma escamoso foram conservadas. Entre as atipias glandulares são consideradas aquelas de significado indeterminado e o adenocarcinoma (*in situ* e invasor) (Solomon *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 2003).

Até a década de 90, a citologia convencional constituiu-se na principal estratégia utilizada em programas de rastreamento voltados ao controle do câncer do colo do útero. Novos métodos como testes de detecção do DNA do HPV e inspeção visual do colo do útero utilizando ácido acético (VIA) ou

lugol (VILI), são apontados em vários estudos como eficazes na redução das taxas de mortalidade por câncer cervical (INCA, 2007).

Por ser o exame citológico um método de exame presuntivo, a preocupação com seu controle de qualidade tem sido uma constante. Um dos melhores parâmetros para levar em conta o método é a sua correlação com os achados histopatológicos de biópsias (Cavalcanti *et al.*, 1996; Tuon *et al.*, 2002). Tem sido observado por diversos autores que a sensibilidade da citologia oncológica convencional deve variar de 50 a 95%, com uma correlação histológica entre 70 a 85% (Massad *et al.*, 2001; Massad e Collins, 2003).

A recomendação para o intervalo do rastreamento varia de acordo com cada país, contudo, os protocolos da *American Cancer Society* (ACS) e *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) recomendam realização anual entre os 21 e 30 anos e a cada dois ou três anos para mulheres com 30 anos ou mais, se três testes anuais consecutivos foram negativos (Wright *et al.*, 2003; CDC, 2005). No Brasil, o exame citopatológico é a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde, prioritariamente, para mulheres de 25 a 59 anos (INCA, 2007).

Estima-se que possa ser alcançada a redução de 80% da mortalidade por câncer cervical pelo rastreamento da doença com o teste de Papanicolaou e tratamento das lesões precursoras com alto potencial de malignidade. Para tanto é necessário garantir a organização, integralidade e a qualidade do programa de rastreamento, bem como o seguimento das pacientes. No Brasil, em 1998, o Ministério da Saúde implantou o Programa

“Viva Mulher” com o objetivo de reduzir as taxas de morbi-mortalidade por estas neoplasias (INCA, 2007).

2.8.2 Histopatologia

O exame histopatológico do colo uterino é aceito como procedimento definitivo para o diagnóstico de lesões pré-cancerosas e câncer cervical. A classificação histopatológica vigente é a da Organização Mundial da Saúde em que as lesões intra-epiteliais (LIE) são divididas em três graus: NIC 1, NIC 2 e NIC 3 (Travassoli e Devilee, 2003). Na NIC 1, a maturação está presente em mais de dois terços do epitélio e as células epiteliais contém atipias variáveis que podem incluir o efeito citopático do HPV (coilocitose); anormalidades nucleares estão presentes, mas de forma branda, ocasionais figuras mitóticas estão presentes no terço basal. Na NIC 2, a maturação está presente em mais da metade do epitélio e a atipia nuclear é conspícua em ambas as camadas epiteliais (superior e inferior), figuras mitóticas são geralmente confinadas a dois terços da camada basal do epitélio, formas anormais podem ser vistas. Na NIC 3, a maturação pode estar ausente ou confinada ao terço superficial do epitélio, anormalidades nucleares estão presentes na maioria ou em toda a espessura do epitélio, figuras mitóticas podem ser numerosas e são encontradas em todos os níveis do epitélio, mitoses atípicas são freqüentes. O critério para o diagnóstico do carcinoma escamo-celular microinvasivo é baseado na profundidade da invasão do estroma e atribuí-se um limite superior que, de acordo com a literatura, varia

entre 3 a 5 milímetros. O carcinoma de células escamosas invasor é composto por células escamosas de graus variados de diferenciação (Travassoli e Devilee, 2003).

2.8.3 Imuno-histoquímica (IHQ)

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) é baseada na reação antígeno-anticorpo, onde o antígeno é localizado no tecido por uma reação tintorial. Nos métodos de IHQ se utiliza uma reação enzima-substrato que transforma um cromógeno incolor em um produto final corado. Sua principal aplicação é concentrada em estudos neoplásicos e infecciosos (Dabbs, 2006). A IHQ para detecção das partículas virais (antígenos virais) em biópsias usando anticorpos mono e policlonais tem baixa sensibilidade, com apenas 50% de positividade nos casos morfológicamente compatíveis com infecção por HPV (Kurman *et al.*, 1981).

A infecção por HPVs de alto risco está envolvida na carcinogênese e sua integração no genoma humano resulta na expressão das oncoproteínas virais E6 e E7. A primeira está envolvida na degradação da p53 e a segunda na liberação do fator E2F do complexo E2F-pRb levando a uma contínua ativação do ciclo celular, resultando no acúmulo da p16^{INK4a} nas células (Sano *et al.*, 1998).

A p16^{INK4a} é uma proteína supressora de tumor expressa no locus 9p21 do gene CDKN2A (cromossoma 9); esta proteína é inibidora de quinase dependente de ciclina (CDK 4/6- ciclina D) que desacelera o ciclo

celular por controlar a expressão do fator de transcrição E2F (Sano *et al.*, 1998; Mulvany *et al.*, 2008). A associação entre expressão da p16^{INK4a} em tumores malignos foi relatada pela primeira vez por Sakaguchi e Sano *et al.* (Sakaguchi *et al.*, 1996; Sano *et al.*, 1998). Vários estudos avaliaram o papel da p16^{INK4a} na neoplasia cervical, observando aumento da expressão desta proteína em células HPV-transformadas, câncer cervical e lesões pré-neoplásicas (Sano *et al.*, 1998; Klaes *et al.*, 2001; Guimaraes *et al.*, 2005; Queiroz *et al.*, 2006a). Murphy *et al.* demonstraram o uso potencial da p16^{INK4a} como marcador diagnóstico de células cervicais escamosas e glandulares neoplásicas, além de ser um marcador importante da discariose cervical (Murphy *et al.*, 2003). Em outro estudo, Murphy *et al.* avaliaram o uso de três biomarcadores (p16^{INK4a}, CDC6 e MCM5) em neoplasias intra-epiteliais cervicais e glandulares e observaram que a p16^{INK4a} foi o marcador que demonstrou maior associação com a displasia cervical, ressaltando o uso combinado de marcadores para resolução de casos de difícil diagnóstico (Murphy *et al.*, 2005).

A IHQ para p16^{INK4a} separa os casos HPV negativos ou infectados pelo HPV de baixo risco, daqueles infectados pelo HPV de alto risco oncogênico em que já ocorreu transformação celular. A positividade para a p16^{INK4a} está relacionada à integração do HPV no genoma, mais freqüente à medida que ocorre a progressão da infecção para lesões pré-cancerosas de alto grau e carcinoma, sendo portanto, um importante marcador na carcinogênese cervical (Queiroz *et al.*, 2006b; 2006a).

2.9 Diagnóstico Molecular do HPV

A dificuldade do cultivo do HPV tem impedido o desenvolvimento de ensaios *in vitro* para a detecção deste vírus. Foi então necessário buscar outras técnicas para a detecção do DNA viral em células infectadas e tecidos, usando genomas de HPV clonados como sondas específicas. Sondas moleculares para detecção de HPVs oncogênicos tem sido disponíveis desde 1983, entretanto, foram necessários vários anos para que este conhecimento tivesse aplicabilidade prática (Durst *et al.*, 1983). O avanço das técnicas de biologia molecular permitiu o conhecimento dos genomas de muitos tipos de HPVs e desta forma, a produção de melhores reagentes (*primers* e sondas) para a detecção destes. A introdução de testes mais acurados para detecção do DNA do HPV em investigações epidemiológicas permitiu confirmar a importância deste vírus, principalmente os oncogênicos, como principal fator de risco para o desenvolvimento das neoplasias intra-epiteliais e câncer do colo uterino (Schiffman *et al.*, 1993; Bosch *et al.*, 1995).

Os métodos moleculares utilizados para detecção do HPV podem ser de dois tipos: baseados na hibridização direta do DNA ou RNA viral presente nos espécimes ou baseados na amplificação *in vitro* destes genomas seguida por sua identificação tipo-específica, frequentemente por hibridização ou mapeamento por digestão do DNA viral por enzimas de restrição (Rosenblatt *et al.*, 2005).

2.9.1 Hibridização *in situ*

Esta metodologia permite a localização do DNA ou RNA viral de forma específica em células definidas ou mesmo em cromossomos isolados. Uma vez que pode ser realizada em tecidos parafinados, é muito empregada em estudos retrospectivos. Esta técnica é laboriosa e de relativa baixa sensibilidade, porém, em combinação com a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) esta sensibilidade melhora muito; entretanto, a PCR-*in situ* não é um método amplamente utilizado no diagnóstico do HPV, pois é de difícil execução e baixa reprodutibilidade.

2.9.2 Hibridização do tipo Southern Blotting

No passado, esta técnica foi muito utilizada para a detecção do DNA do HPV. Este método consiste na digestão do DNA viral por enzimas de restrição; os fragmentos são submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, transferidos para uma membrana de nitrocelulose e hibridizados com sondas marcadas com radioisótopos contra todo genoma ou apenas uma região específica. As principais desvantagens deste método são a necessidade de isolamento prévio, de quantidades relativamente grandes e de alta pureza do material genético das amostras biológicas. É um método laborioso e não é indicado para aplicação na rotina (Molijn *et al.*, 2005).

2.9.3 Captura Híbrida 2

O sistema de Captura Híbrida (CH 2, Digene/Quiagen) é um método baseado na hibridização, em solução, de sondas sintéticas de RNA complementares às sequências genômicas de 18 tipos de HPV. É um método de amplificação de sinal não radioativo (Lorincz, 1996a).

Os híbridos DNA-RNA são capturados na superfície da microplaca e são detectados por anticorpo monoclonal específico e um substrato quimioluminescente, determinando uma medida semi-quantitativa da carga viral. O sistema é capaz de detectar a presença de 18 tipos de HPV que mais comumente infectam o trato anogenital e separa estes tipos em dois grupos: o grupo A, que possui 5 sondas para os HPV de baixo risco (6, 11, 42, 43, 44) e o grupo B, que possui 13 sondas para os HPV de intermediário/alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). Esses tipos representam 95% dos vírus que infectam o trato anogenital, sendo que os HPV do grupo intermediário/alto risco estão presentes em 99% dos casos.

O teste de Captura Híbrida é aprovado e reconhecido pelo Ministério da Saúde do Brasil (MS) e pelo FDA dos EUA e é muito utilizado em estudos clínicos no mundo inteiro demonstrando boa reprodutibilidade nos ensaios de rastreamento, porém possui algumas limitações: a) não permite identificar os genótipos específicos do HPV, b) o limite de detecção do teste é de 1pg/mL de DNA-HPV, equivalente a 5.000 cópias do genoma, sendo menos sensível que a PCR (Molijn *et al.*, 2005) c) possui reação cruzada entre os

dois coquetéis de sondas podendo reduzir a relevância clínica do resultado positivo (Castle *et al.*, 2002).

Recentemente, foi desenvolvida pela empresa, uma plataforma robótica automatizada, denominada de sistema de captura rápida, onde se executa incubação, agitação e lavagens, permitindo a realização de 450 amostras em 8 horas (Rosenblatt *et al.*, 2005).

2.9.4 Sistemas de Amplificação do DNA alvo: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O advento da PCR tem feito uma verdadeira revolução na biologia molecular permitindo a geração de um milhão de cópias a partir de uma única molécula de DNA de fita dupla após 30 ciclos de amplificação. A utilização da PCR como metodologia no diagnóstico do HPV tem se mostrado a mais sensível na identificação do DNA viral existente nos mais diversos materiais clínicos, bem como na resolução de dúvidas originadas durante o diagnóstico citohistopatológico e colposcópico não apenas de lesões pré-neoplásicas, mas também nas infecções latentes ou subclínicas associadas a este agente viral (Chow *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2000). A detecção do DNA do HPV pela técnica de PCR é importante, e se torna imprescindível determinar o genótipo de HPV presente em materiais clínicos provenientes das mucosas genitais a fim de verificar se os genótipos presentes são de alto ou baixo risco para o desenvolvimento das neoplasias cervicais. Além disso, a determinação do genótipo do HPV auxilia também

na condução de um tratamento mais apropriado para pacientes infectadas por este vírus e é importante em estudos epidemiológicos e de história natural (Villa *et al.*, 2000).

A análise dos produtos amplificados pode ser feita por diversas técnicas incluindo a eletroforese em gel de agarose, a hibridização tipo-específica, ou ainda por sequenciamento direto do DNA. A sensibilidade e especificidade da PCR podem variar dependendo dos *primers* utilizados, do tamanho do produto, das condições da reação, da eficiência da DNA polimerase empregada e da habilidade para detecção de vários tipos virais (Rosenblatt *et al.*, 2005).

2.9.4.1 PCR tipo-específico

Os *primers* tipo-específicos desenhados para amplificar exclusivamente um único genótipo de HPV podem ser utilizados, entretanto, para detectar a presença de DNA-HPV em uma amostra é preciso fazer várias reações de PCR separadamente. Este método é laborioso, tem alto custo e cada conjunto de *primers* tipo-específicos deve ser validado (Molijn *et al.*, 2005).

2.9.4.2 PCR genérico

Alternativamente, *primers* genéricos podem ser utilizados para amplificar um grande espectro de genótipos de HPV. Os protocolos mais

utilizados empregam *primers* consenso e degenerados complementares a uma região altamente conservada do gene L1, e que são potencialmente capazes de discriminar todos os tipos de HPV que infectam as mucosas. Entre eles estão o par de *primers* consenso GP5/6 e sua versão estendida GP5+/6+ (de Roda Husman *et al.*, 1995), os *primers* degenerados MY09/11 (Manos *et al.*, 1989) e sua versão modificada PGMY09/11 (Gravitt *et al.*, 1998; Gravitt *et al.*, 2000) e os *primers* SPF₁₀ (Kleter *et al.*, 1998). Além da escolha dos *primers*, o tamanho do produto da PCR é importante. Em geral, a eficiência da PCR diminui com o aumento do tamanho do amplicon (Molijn *et al.*, 2005).

2.9.4.3 PCR quantitativo em Tempo Real (*Real Time PCR*)

A PCR em tempo real é uma técnica capaz de monitorar o progresso da PCR enquanto ela acontece. Este método utiliza o momento do ciclo da reação no qual a amplificação de um alvo ultrapassa um limite (*cut-off/ threshold*), ao invés da quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos. Quanto mais alto o número de cópias iniciais do ácido nucléico alvo, mais rápido será observado a quantidade de fluorescência superior ao *cut-off*. Existem vários sistemas de detecção dos produtos de PCR, entre estes os mais empregados são o sistema Taqman[®], também conhecido como ensaio para nuclease 5' fluorescente e o sistema do corante SYBR[®] Green I. No primeiro sistema, uma sonda que consiste de um oligonucleotídeo que contém na extremidade 5' uma molécula fluorescente

(*reporter*) e na extremidade 3' uma molécula bloqueadora (*quencher*) é adicionada aos tubos de PCR. Se não ocorre amplificação do DNA, a sonda está intacta, e a proximidade do *reporter* ao *quencher* bloqueia a fluorescência emitida pelo *reporter*. Por outro lado, durante a fase de extensão da PCR, a sonda irá parear-se com o DNA alvo e é então clivada pela atividade 5' nucleásica da Taq DNA Polimerase, conforme o *primer* vai sendo estendido. A clivagem da sonda leva à separação entre o *reporter* e o *quencher*, resultando na emissão do sinal. A emissão da fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado gerado e, portanto, é considerado um método adequado para estimativa da carga viral. O sistema do corante SYBR Green I utiliza o corante SYBR Green I e vale-se da propriedade de ligação desta molécula de forma altamente específica ao DNA dupla-fita para detectar o produto da PCR conforme ele se acumula durante os ciclos da reação. Neste sistema, não é necessário o uso de sonda, o que reduz a configuração do ensaio e os custos da execução. A diferença mais importante entre os dois sistemas é que o SYBR Green I detectará todo DNA dupla-fita, inclusive produtos da reação não específicos. Uma reação bem otimizada é, portanto, essencial para resultados precisos. Uma desvantagem desta técnica é que exige o uso de equipamentos e reagentes de custo elevado.

O conceito inovador da técnica PCR em Tempo Real, é o *threshold cycle* (C_t *value*), que corresponde ao ciclo aonde um aumento significativo do produto amplificado é primeiramente detectado; é o parâmetro usado para quantificação (Bustin, 2006).

Alguns estudos têm sugerido que o aumento da carga viral de HPV de alto risco pode ser considerado um marcador importante para presença de NIC (Peitsaro *et al.*, 2002; Schlecht *et al.*, 2003a). Flores *et al.* determinaram a associação entre a avaliação da carga viral de HPVs oncogênicos por PCR em tempo real e citologia anormal em mulheres nos EUA e México e demonstraram que existe uma relação dose-resposta entre aumento da carga viral dos HPVs oncogênicos e risco de LIBG e LIAG (Flores *et al.*, 2006). Van Duin *et al.* demonstraram que a carga viral persistente é um fator determinante para progressão de LIAG (van Duin *et al.*, 2002). Lo *et al.* avaliando uma população chinesa quanto à relação entre a carga viral do HPV 16 por PCR em tempo real e severidade das lesões cervicais, observaram que a carga viral pode ser um importante fator no desenvolvimento das lesões cervicais (Lo *et al.*, 2005). Moberg *et al.* em um estudo demonstrando associações tipo-específicas da carga viral do HPV, por PCR em tempo real, com risco de desenvolvimento do carcinoma *in situ*, observaram que a carga viral do HPV pode ser preditiva de um risco futuro de carcinoma cervical *in situ* (Moberg *et al.*, 2004). Entretanto, outros estudos não têm demonstrado associação entre carga viral e aumento da severidade das lesões (Sherman *et al.*, 2003; Castle *et al.*, 2005). Lorincz *et al.* observaram que embora os tipos de HPVs oncogênicos sejam considerados agentes causais necessários para o desenvolvimento do câncer cervical, a relação entre carga viral e o risco de uma subsequente carcinogênese cervical ainda não está bem estabelecida (Lorincz *et al.*, 2002). Payan *et al.* desenvolveram um protocolo de PCR em tempo real

utilizando formato multiplex, incluindo sondas complementares a mais de um genótipo de HPV e demonstraram uma alta sensibilidade sugerindo a possibilidade de rastreamento em pacientes infectadas com o HPV (Payan *et al.*, 2007).

2.9.5 Sistemas de Genotipagem do HPV

2.9.5.1 PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Após a amplificação por PCR, o DNA alvo pode ser detectado através da digestão por enzimas de restrição, gerando um número de fragmentos que podem ser visualizados através da eletroforese em gel de agarose. Este método é laborioso e depende da capacidade das enzimas de restrição em detectar mutações específicas. A PCR-RFLP é um bom método para detecção de infecções únicas pelo HPV, mas não é aplicável na detecção de infecções múltiplas (Milutin Gasperov *et al.*, 2008).

2.9.5.2 Hibridização em Microplaca [Roche Molecular Systems Amplicor HPV Test (MWP)]

Este método é baseado em um conjunto de *primers* não-degenerados que amplificam um pequeno fragmento de 170 pb do gene L1 de 13 genótipos de HPV oncogênicos. O produto amplificado é imobilizado a um conjunto de moléculas de captura adsorvidas a poços de uma placa

contendo 96 poços (*Microtiter Well Plate*) e visualizado por detecção colorimétrica. Além disso, este teste utiliza a enzima TaqGold DNA polimerase que minimiza a quantidade de amplificação inespecífica e aumenta a sensibilidade do teste. Este teste tem como principal vantagem o formato em microplaca com a capacidade de processar até 96 amostras de uma vez (Iftner e Villa, 2003).

2.9.5.3 Hibridização Reversa

A hibridização reversa é utilizada para detecção de infecções tipo-específicas e de infecções múltiplas (Molijn *et al.*, 2005). As mais utilizadas são Line Probe Assay (LiPA), Line Blot Assay (LBA) e Linear Array (LA). O produto da PCR é gerado utilizando *primers* biotinizados. A dupla fita do HPV é desnaturada em condições alcalinas e adicionadas à fita do teste em um tampão de hibridização. Depois da hibridização e lavagem, os híbridos podem ser detectados pela adição do conjugado e substrato, gerando uma coloração na linha da sonda, que pode ser visualizada e interpretada. Este método permite a detecção de múltiplos tipos de HPV em uma única reação e requer apenas uma pequena quantidade de produto da PCR.

2.9.5.3.1 Linear Array HPV (Roche)

O teste de genotipagem Linear Array HPV (LA) é um teste qualitativo *in vitro* capaz de detectar simultaneamente 37 genótipos de DNA anogenital

de HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73(MM9), 81, 82(MM4), 83(MM7), 84(MM8), IS39 e CP6108] em amostras clínicas, tendo a capacidade de monitorar a infecção persistente por HPV (Stevens *et al.*, 2006).

Este teste utiliza *primers* PGMY09/11 biotinizados para amplificar o fragmento de 450 pares de bases correspondente a região L1 do genoma do HPV e baseia-se em quatro etapas: preparação da amostra, amplificação por PCR do DNA alvo, hibridização dos produtos amplificados com sondas específicas fixadas em linhas paralelas em fitas de membrana de nylon e detecção dos produtos amplificados e ligados à sonda, por determinação colorimétrica. Como controle da extração do DNA e eficiência da amplificação, é utilizado um par de *primers* da β -globina humana (Dalstein *et al.*, 2009).

Castle *et al.* comparando os métodos LA e Line Blot, demonstraram que LA é um teste promissor para detecção de genótipos de HPV e pode ser utilizado clinicamente para detecção de lesões pré-cancerosas e câncer (Castle *et al.*, 2008a). Stevens *et al.* compararam os métodos CH 2, AMPLICOR e LA e concluíram que ambos testes baseados na PCR demonstraram maior sensibilidade na detecção de HPV oncogênicos, particularmente entre mulheres com NIC 2 ou neoplasias mais graves, contudo, estes testes apresentaram menor especificidade em relação a CH 2 (Stevens *et al.*, 2007).

2.9.5.3.2 Line Probe Assay (INNO-LiPA HPV Genotyping v2-Innogenetics)

Este teste é baseado no princípio da hibridização reversa. Parte da região L1 (65 pb) do genoma do HPV é amplificada e desnaturada por *primers* SPF₁₀ biotinilados e hibridizados com sondas específicas fixadas em linhas paralelas em fitas de membrana de nylon. Depois da hibridização e lavagem, é adicionado o conjugado (estreptavidina conjugada à fosfatase alcalina) que se liga ao híbrido formado. A incubação com o substrato resulta em um precipitado marrom/violeta e o resultado pode ser interpretado visualmente. O INNO-LiPA pode identificar 26 genótipos do HPV (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 70, 74).

Castle *et al.* comparando dois métodos de genotipagem, LA e LiPA, observaram que ambos os testes são equivalentes na detecção do HPV 16 e HPV 18, os dois genótipos mais prevalentes no câncer cervical e presentes nas vacinas profiláticas (Castle *et al.*, 2008b).

2.9.6 Microarray (Chips de DNA)

O PapilloCheck (Greiner bio-one®) é um ensaio que utiliza a tecnologia de DNA-Arrays para detecção e genotipagem simultânea de 24 genótipos diferentes de HPV. Entre estes, 15 genótipos são classificados como de alto risco (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73

e 82), 2 de risco indeterminado (HPV 53 e 66) enquanto 7 são de baixo risco (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44 e 70) (Dalstein *et al.*, 2009).

O ensaio é baseado na detecção de um fragmento do gene E1 dos 24 genótipos diferentes de HPV. Após a extração do DNA, um fragmento de DNA de aproximadamente 350 pb do gene E1 é amplificado na presença de um conjunto de *primers* específicos durante a PCR. Paralelamente com o objetivo de evitar resultados falso-negativos, um fragmento do gene humano adenosina desaminase (ADA) é amplificado na reação e informa a qualidade da amostra. No segundo passo, os produtos amplificados são hibridizados com sondas específicas do DNA-chip. Cada DNA-Chip contém 12 DNA-Arrays, permitindo a análise simultânea de 12 amostras cervicais. Durante a hibridização o DNA está marcado com fluorescência. Finalmente o DNA não ligado é lavado e o Papillo Check® é escaneado automaticamente, analisado e avaliado.

Em 2009, Dalstein *et al.* avaliando analiticamente o PapilloCheck demonstraram que este teste quando comparado com o LA apresentou resultados similares para detecção do HPV em amostras cervicais. Entretanto, o LA parece ser mais sensível para detectar o HPV 53 e o PapilloCheck na detecção do HPV 56 (Dalstein *et al.*, 2009).

2.9.7 Métodos de detecção de RNAm E6 E7

2.9.7.1 Pre Tect HPV-Proof (Norchip AS, Noruega) - Biomerieux

Este teste utiliza a amplificação baseada na sequência de ácidos nucléicos (NASBA) e tem como alvo o RNAm (E6, E7) (Molden *et al.*, 2005). Este método detecta cinco genótipos de HPV (16, 18, 31, 33 e 45), os mais prevalentes associados aos carcinomas cervicais (Bosh *et al.*, 1995; Munoz *et al.*, 2003), sendo o HPV 16 responsável por mais de 50% dos casos (Kraus *et al.*, 2006).

O potencial oncogênico dos genótipos dos HPVs de alto risco está nos oncogenes E6 e E7, que se ligam e modulam um número de diferentes produtos gênicos, em particular a p53 e pRb. Os oncogenes E6 e E7 são constantemente expressos em tecidos malignos e são independentemente aptos a imortalizar vários tipos de células humanas em cultura de tecidos, contudo, sua eficiência é aumentada quando são co-expressos (zur Hausen, 2002). Kraus *et al.* verificaram a presença do RNAm E6 e E7 em 92% dos carcinomas de células escamosas, demonstrando que o Pre Tect HPV-Proof é uma ferramenta preciosa para detecção do HPV em carcinomas cervicais (Kraus *et al.*, 2006). Molden *et al.* demonstraram que este teste tem uma sensibilidade similar ao PCR genérico e uma especificidade mais alta, indicando ser importante na triagem de mulheres com ASC-US e LIBG na citologia (Molden *et al.*, 2005). Lie *et al.* observaram que este teste parece

ser mais apropriado para avaliação do risco de progressão para o câncer (Lie *et al.*, 2005).

2.9.7.2 APTIMA HPV Assay (Genprobe)

Este teste é baseado na amplificação do RNAm E6/ E7 através da técnica *Transcription Mediated Amplification* (TMA) é o mais recente lançado na Europa em maio de 2008 e aprovado pela Comunidade Européia (CE). Consiste na detecção de 14 genótipos de HPV de alto risco (16/ 18/ 31/ 33/ 35/ 39/ 45/ 51/ 52/ 56/ 58/ 59/ 66/ 68) e ainda está em estudo clínico nos EUA. O ensaio APTIMA HPV envolve três passos principais: captura do alvo, a amplificação do alvo por meio de Amplificação Mediada por Transcrição e a detecção dos produtos de amplificação (amplicon) pelo Ensaio de Proteção de Hibridização.

Em 2007, Castle *et al.* demonstraram que a detecção do RNAm E6/ E7 por este método foi fortemente correlacionada com os exames cito/histológicos. Mais de 90% dos casos de NIC 3 e todos os 5 casos de carcinoma incluídos neste estudo foram positivos por esta técnica, concluindo que o RNAm E6/ E7 é um biomarcador potente para detecção de lesões pré - cancerosas cervicais e câncer (Castle *et al.*, 2007).

Em 2009, Dockter *et al.* avaliaram a performance do ensaio APTIMA HPV comparando com a CH 2 para detecção de HPV de alto risco e LIAG, e observaram que ambos os testes apresentaram uma sensibilidade clínica

similar para detecção da doença, entretanto, o APTIMA HPV obteve uma melhor especificidade clínica do que a CH 2 (Dockter *et al.*, 2009).

III JUSTIFICATIVA

É consenso na literatura que a infecção pelo HPV em mulheres abaixo de 30 anos é transitória, com maior taxa de regressão, e persistência e progressão menores (Moscicki *et al.*, 2004). Entretanto, algumas destas pacientes progridem para Lesão Intra-Epitelial de Alto Grau.

A determinação dos genótipos do HPV, especialmente os do grupo oncogênico, a carga viral, a imuno-histoquímica para p16^{INK4a} aliado a co-fatores epidemiológicos são de extrema importância na condução de estudos para o entendimento da Lesão Intra-epitelial de Alto Grau em mulheres jovens.

Desta forma, este estudo visa investigar as características virais e morfológicas em mulheres com Lesão Intra-Epitelial de Alto Grau (NIC 2 e NIC 3) para um melhor entendimento da patogênese destas lesões, sendo sem dúvida, uma contribuição importante em nosso meio. No Estado da Bahia, não há trabalhos que descrevam especificamente os genótipos em mulheres com Lesão Intra-epitelial de Alto Grau. O único estudo que relatou a prevalência de genótipos circulantes no Estado foi realizado em pacientes HIV positivos e negativos (Queiroz *et al.*, 2004).

Escolhemos o Instituto de Diagnóstico e Exames Médicos (IDEM) e o Centro Estadual de Oncologia (CICAN) para realizar nosso estudo, pois representam centros de referência em patologia cervical na cidade de Salvador, Bahia, onde são realizados rotineiramente exames de citologia, colposcopia e histopatologia.

Para este estudo, estamos implantando na Universidade Federal da Bahia (UFBA) a técnica de PCR para HPV, até então não disponível em nosso meio. O estabelecimento desta técnica é um ponto muito importante na área de Patologia Cervical, e irá ser de grande valia em trabalhos futuros.

IV OBJETIVOS

Geral:

Investigar as características virais e morfológicas em mulheres com Lesão Intra-epitelial de Alto Grau.

Específicos:

1. Padronizar a técnica de PCR em tempo real para determinação da carga viral do HPV;
2. Avaliar o(s) genótipo(s) e a carga viral do HPV em todas as amostras colhidas;
3. Comparar o genótipo de HPV e a carga viral das pacientes com idade inferior a 30 anos que apresentam diagnóstico histopatológico de Lesão Intra-epitelial de Alto Grau, com as de idade igual ou superior a 35 anos;
4. Analisar os co-fatores epidemiológicos (início da vida sexual, número de parceiros, uso de anticoncepcionais orais, paridade e tabagismo) em mulheres com Lesão Intra-Epitelial de Alto Grau;
5. Comparar os resultados dos exames moleculares com os exames morfológicos;
6. Avaliar a expressão da proteína do ciclo celular p16^{INK4a} nas biópsias com Lesão Intra-Epitelial de Alto Grau;
7. Avaliar o desempenho dos métodos moleculares no diagnóstico de Lesão Intra-epitelial de Alto Grau.

V MÉTODOS

5.1 Modelo do estudo

Tratou-se de um estudo transversal.

5.2 População de estudo e casuística

O estudo foi feito com mulheres provenientes do Instituto de Diagnóstico e Exames Médicos (IDEM) e do Centro Estadual de Oncologia (CICAN), centros de referência em patologia cervical na cidade de Salvador, Bahia no período de julho de 2006 a janeiro de 2009. Foram selecionadas 88 mulheres com diagnóstico citopatológico de LIAG: 54 com idade igual ou inferior a 30 anos e 34 com idade igual ou superior a 35 anos. As mulheres com idade entre 31 e 34 anos não foram incluídas no estudo.

Após o diagnóstico citopatológico, as pacientes retornaram ao ambulatório onde preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participar do estudo (anexo A) e responderam um questionário contendo informações sócio-demográficas e clínicas (anexo B). Em seguida, foi realizada a colheita de células esfoliadas do colo uterino para determinação da genotipagem e avaliação da carga viral do HPV e a biópsia para análise histopatológica do fragmento retirado.

Após o resultado do exame histopatológico, as pacientes foram divididas em 3 grupos: sem LIAG (< NIC 2), com LIAG (\geq NIC 2) menores

que 30 anos e com LIAG (\geq NIC 2) com idade igual ou superior a 35 anos (figura 5).

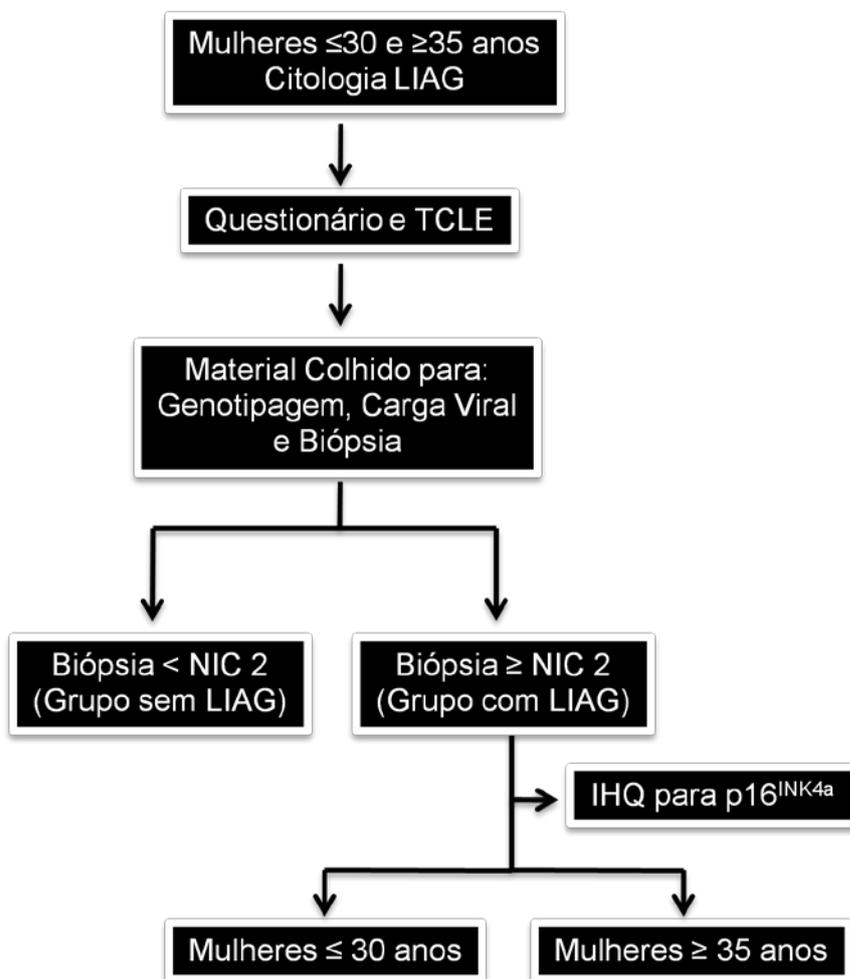


Figura 5 - Fluxograma metodológico.

5.3 Exame Histopatológico

As biópsias foram realizadas sob visão colposcópica, com pinça de Gaylor-Medina ou por cirurgia com alça de alta frequência (CAF), a depender da extensão da Zona de Transformação Anormal (ZTA). Os fragmentos do colo uterino foram fixados em formol a 4% tamponado, por 6

a 12 horas e após emblocagem em parafina, foram feitas secções com 4µm de espessura, coloração por Hematoxilina-Eosina (HE) e secções para imuno- histoquímica.

O diagnóstico histopatológico foi feito por dois patologistas, e quando houve discordância, um terceiro patologista foi consultado. Para o resultado, foi utilizada a Classificação da Organização Mundial da Saúde (Blue Book) considerando-se a infecção pelo HPV como NIC 1 (Travassoli e Devilee, 2003).

5.4 Imuno- histoquímica (IHQ)

5.4.1 Detecção da proteína p16^{INK4a}

Cortes histológicos de tecido incluídos em parafina com 4µm de espessura foram desparafinizados em xilol e rehidratados em álcool (100 a 70%). Em seguida, as amostras foram aquecidas em tampão citrato pH 6.0 e Tween 20 a 0,2% por 30 minutos em banho-maria a 97°C. Após lavagens com água corrente e destilada, as lâminas foram incubadas em metanol contendo peróxido de Hidrogênio a 3% por 10 minutos em temperatura ambiente para inibir a atividade da peroxidase endógena; seguiram-se lavagens com água corrente e *phosphate buffer saline* (PBS) e foi adicionado o bloqueador de ligações inespecíficas por 10 minutos; em seguida, o bloqueador foi escorrido e as lâminas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com anticorpo primário p16^{INK4a} Ab-4 (Neo-

Markers Data Sheet, Labvision, Clone 16PO4) diluído 1:200 em diluente da DAKO (53022). Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas por 10 minutos com o anticorpo secundário LSAB (DAKO, K0690), reveladas com Diaminobenzidina (DAB) e contra coradas com hematoxilina de Harris. Foram utilizados como controle positivo da p16^{INK4a}, amostras de carcinoma escamocelular invasivo do colo uterino.

5.4.2 Quantificação da expressão da proteína p16^{INK4a}

A leitura das lâminas de IHQ para a proteína p16^{INK4a} foi realizada separadamente por dois patologistas e quando havia discordância foi consultado um terceiro especialista. A reação foi considerada positiva para p16^{INK4a} quando foi observada coloração castanha difusa no núcleo e/ou citoplasma. De acordo com a intensidade da imuno-expressão foram atribuídos os seguintes escores: 0 (ausência), 1 (reação fraca), 2 (reação moderada) e 3 (reação forte), sendo este último, igual ao controle positivo de carcinoma escamocelular invasivo do colo uterino (Queiroz *et al.*, 2006a).

5.5 Teste de amplificação de ácidos nucléicos (PCR)

5.5.1 Coleta das Amostras

As amostras foram coletadas com uma escova e transferidas para um tubo contendo 1 mL do meio *Universal Collection Medium* (UCM) (Qiagen,

Biotecnologia do Brasil LTDA.). O material coletado foi mantido sob refrigeração de 2 a 8°C e transportado para o laboratório de Ginecologia do com- HUPES em até 14 dias após a coleta.

5.5.2 Extração Fenol-Clorofórmio

No laboratório, o DNA foi extraído das amostras retirando-se uma alíquota de 400µL do UCM e adicionados 100µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,1, contendo 400µg/mL de proteinase K e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS). Esta suspensão foi então incubada a 37°C durante toda noite e no dia seguinte foi feita a inativação da enzima por incubação a 95°C por 10 minutos. Após centrifugação para remover os restos celulares, o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo (Gravitt *et al.*, 2003).

Aos 500µL da fase aquosa (protK + amostra) foram adicionados 500µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Misturou-se bem ao vórtex, centrifugou-se a 142 x g por 5 minutos a 21°C e transferiu-se o sobrenadante para um tubo limpo (500µL). Adicionou-se 50µL de acetato de sódio pH=5,2 3M, 2µL de glicogênio (20mg/mL) e 1000µL de etanol 100%. Misturou-se bem e deixou-se precipitando durante a noite a - 20°C.

No dia seguinte, centrifugou-se a 21.504 x g por 15 minutos a 4°C, removeu-se o sobrenadante e lavou-se o pellet com etanol 75% gelado a 4°C. Deixou-se o pellet secar por 30 minutos e ressolubilizou-o em 1X tampão de PCR (200µL).

5.5.3 Teste Qualitativo da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Cinco microlitros do DNA extraído foram aplicados diretamente na reação de PCR para HPV de acordo com Gravitt *et al.* (Gravitt *et al.*, 2000), utilizando-se a enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen[®]™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Foram utilizados os conjuntos de *primers* PGMY11 (compreendendo 5 oligonucleotídeos sense) e PGMY09 (compreendendo 13 oligonucleotídeos anti-sense) desenhados a partir da região conservada L1 do genoma do HPV (Gravitt *et al.*, 2000). Como controle interno, foram utilizados os *primers* PC04 e GH20 que amplificam um fragmento de 268 pb do gene da β -globina humana, garantindo a qualidade do DNA extraído. O quadro 2 mostra as sequências dos *primers* PGMY09/11, GH20 e PC04 utilizados neste estudo.

Quadro 2 - Sequências dos *primers* PGMY09/11, GH20 e PC04 utilizados nos ensaios moleculares.

Primer	Seqüência 5' → 3'
PGMY11-A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
PGMY11-B	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
PGMY11-C	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
PGMY11-D	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
PGMY11-E	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09-F	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-G	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-H	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-I	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
PGMY09-J	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
PGMY09-K	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
PGMY09-L	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
PGMY09-M	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
PGMY09-N	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
PGMY09-P	G CCC AAC GGA AAC TGA TC
PGMY09-Q	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
PGMY09-R	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC
HMB01	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT
GH20	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC
PC04	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC

Adaptado de (Gravitt *et al.*, 2000).

A reação foi realizada montando-se um mix com um volume final de 25µL contendo 2,5µL de Tampão de PCR 10x (Invitrogen® - Minus MgCl₂), 2µL de dNTP's (2,5mM) (Invitrogen®), 1,5µL de MgCl₂ (50mM) (Invitrogen®), 0,5µL dos *primers* PGMY09/11 (0,5µM), 1,5µL do *primer* PC04 (0,5µM), 1,5µL do *primer* GH20 (0,5µM), 0,4µL de Platinum Taq DNA Polimerase

(5U/ μ L) (Invitrogen[®]), 2,5 μ L de glicerol (57%) (Invitrogen[®]), 2,5 μ L de Cresol red (2,5 μ g/ μ L), 5,1 μ L de H₂O deionizada e 5 μ L de DNA. Esta mistura foi colocada em um termociclador (Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburgo, Alemanha) e submetida a 95°C por 5 minutos para provocar desnaturação das fitas, seguido de 40 ciclos nas seguintes condições: 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e no final a 72°C por 7 minutos.

5.5.4 Identificação dos produtos de PCR

Os produtos amplificados (268 pb e 450pb da β -globina humana e região L1 do HPV, respectivamente) foram identificados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Agarose Ultrapure[™] – Invitrogen Life Technologies) em TAE 1X [DNA Typing Grade TAE Buffer – GIBCO – Invitrogen Corporation (2mM Tris- Acetato e 50mM de ácido etilenodiaminotetracético - EDTA)] corado com Brometo de Etídio (0,35 μ l/mL). Para tal, foram misturados 10 μ l do produto final com 3 μ L do tampão de Azul de Bromofenol 2X. Além das amostras, foram também submetidos à corrida nos géis, marcadores de peso molecular de 100pb (Invitrogen[®]) como padrão. Os géis foram digitalizados com uma câmera integrante de um sistema para captação e análise de imagens (Alpha Innotec/ AlphaEase FC).

Posteriormente, todas as amostras foram submetidas à genotipagem pelo método Linear Array (Roche Molecular Diagnostics, Alameda, CA).

5.5.5 Genotipagem das amostras (Linear Array HPV – *Genotyping Test* - Roche Molecular Diagnostics, Alameda, CA).

As amostras foram amplificadas utilizando o conjunto de *primers* PGMY09/11 biotinizados (Gravitt *et al.*, 2000) e os *primers* GH20 e PC04, também biotinizados, que amplificam um fragmento de 268 pb do gene da β -globina humana seguindo as especificações do fabricante.

Para cada 100 μ L da reação, foram utilizados 50 μ L da solução contida no HPV MMX (tampão Tris, Cloreto de Potássio, <0,02% de DNA Polimerase Amplitaq® Gold, <0,1% de enzima Amperase, <0,001% de dATP, dCTP, dUTP, dGTP, dTTP, <0,001% de cada um dos *primers* e 0,06% de Azida sódica) acrescida de 125 μ L do Cloreto de Magnésio (<1%), e 50 μ L de cada amostra extraída diluída (1:10) em água destilada e deionizada.

A reação foi submetida a um ciclo inicial por 2 minutos a 50°C, seguido de um segundo ciclo por 9 minutos a 95°C, 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, seguido por um último ciclo de 5 minutos a 72°C, para extensão final. Após o término da reação de PCR, foram acrescentados 100 μ L da solução desnaturante (1,6% de hidróxido de sódio), ainda no termociclador.

5.5.5.1 Detecção do produto amplificado

As tiras de genotipagem são revestidas com bandas das sondas para 37 tipos de HPV e para detecção do gene da β -globina. Estas tiras foram

previamente identificadas e acondicionadas em cada canaleta contidas em bandeja apropriada, onde foram acrescentados 4mL da solução de hibridização (4x SSPE em 0,5% de dodecil sulfato de sódio - SDS) a 53°C. Em seguida, 75µL do produto amplificado e desnaturado foram adicionados em cada canaleta, contendo as tiras, onde cada tira correspondeu a uma amostra. As tiras na bandeja foram incubadas em banho-maria a 53°C sob agitação, a uma velocidade de 0,3 x g por 30 minutos. Após este período, a solução de hibridização foi removida, por aspiração a vácuo. À temperatura ambiente, 4mL da solução de lavagem (1X SSPE em 0,1% de SDS) foram adicionadas sob agitação, e em seguida esta solução foi aspirada á vacuo. Foram adicionados em cada reservatório, 4mL da solução de lavagem aquecida a 53°C e incubada em banho-maria por 15 minutos a 53°C a uma velocidade de 0,3 x g. A solução de lavagem foi removida por aspiração a vácuo e em seguida foram adicionados 4mL do conjugado (estreptavidina-peroxidase) em cada reservatório e deixado à temperatura ambiente sob agitação em um orbitário a 0,6 x g por 30 minutos. O conjugado foi aspirado e lavado com 4mL de solução de lavagem à temperatura ambiente. A solução de lavagem foi removida e acrescentada mais 4mL desta mesma solução, deixando sob agitação em um orbitário a uma velocidade de 0,6 x g por mais 10 minutos à temperatura ambiente. A solução foi aspirada e foram adicionados 4mL do tampão citrato de sódio 1X concentrado e deixado sob agitação em um orbitário a uma velocidade de 0,6 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o citrato foi aspirado e adicionado 4mL do substrato em cada reservatório, e mantido sob agitação em um orbitário

por 5 minutos a uma velocidade de 0,6 x g. Após este tempo, as bandas tornaram-se visíveis. O substrato foi então aspirado e lavado com água destilada para remover seu excesso. A identificação dos diferentes genótipos do HPV foi feita mediante leitura visual das linhas azuis que apareceram nas tiras, as quais foram comparadas com o padrão das linhas de referência fornecidas pelo fabricante.

5.6 Carga Viral Total do HPV

Para padronização da técnica da PCR em tempo real, foram utilizados os *primers* SPF10 modificados que amplificam um fragmento de 65 pb da região L1 do HPV (quadro 3) permitindo a identificação de cerca de 40 genótipos de HPV (Payan *et al.*, 2007).

Quadro 3 - Sequências de *primers* SPF10 modificados homólogos para a região L1 do HPV utilizados na determinação da carga viral total do HPV.

Primer	Seqüência 5' → 3'
Primer Sense	
HP 1E	AACGTGCICAGGGICACAATAATGG
HP 1F	ATAAGGCICAGGGICATAACAATGG
HP 1G	AACGTGCICAGGGICATAATAATGG
HP 1H	AACGTGCICAAGGCICATAATAATGG
Primer Anti-sense	
HP 2C	CGGGTAGTATCTACAACAGTAACAAA
HP 2D	CGAGTGGTATCTACCACAGTAACAAA
HP 2E	CGGGTAGTATCTACTACAGTAACAAA

Adaptado de (Payan *et al.*, 2007).

Foram testadas três concentrações destes *primers*: 100nM, 400nM e 900nM, utilizando uma amostra de DNA humano isolado de tumor com HPV 16; observou-se um melhor resultado, representado por um C_t mais baixo (18,1), nas concentrações de 400nM e 900nM, desta forma, optou-se pela menor concentração (400nM), por utilizar menor quantidade de *primer*.

Em seguida, foi testada qual linhagem celular de carcinoma de colo uterino seria utilizada para construção da curva padrão: CasKi (correspondendo a 600 cópias do HPV 16/célula), ou HeLa (correspondendo a 20 cópias do HPV 18/célula); foram feitas diluições seriadas do DNA obtido de células CasKi com DNA de leucócito humano (50ng/ μ L), de forma a representar 60, 30, 10 e 1 cópia/célula. Para linhagem de células HeLa, foram feitas diluições com DNA de leucócito humano (50ng/ μ L) de forma a representar 10 e 1 cópia/célula. Não foi observada diferença entre as duas linhagens de células, a curva padrão foi adequada para ambas às linhagens (R^2 : 0,98 para CasKi e R^2 : 0,99 para HeLa), optou-se pela linhagem CasKi por esta possuir maior número de cópias/célula (600 cópias), permitindo uma maior amplitude na curva de calibração. Por fim, modificou-se a quantidade de ciclos na reação utilizada por (Payan *et al.*, 2007), diminuiu-se de 45 para 40 ciclos, pois foi observado que após 40 ciclos houve o aparecimento na curva de amplificação, de controles negativos como a água e DNA de leucócito humano; esta amplificação se deve provavelmente, à formação de dímeros de *primers* ou de ligação inespecífica do SYBR Green. A sensibilidade da carga viral total foi de $1 \log_{10} \text{ cp}/10^4$ células.

Uma vez padronizada a PCR em Tempo Real para HPV, o DNA das amostras foi quantificado em um espectrofotômetro (Eppendorf Biophotometer) no comprimento de onda a 260nm. As amostras que apresentaram quantificação superior a 50ng/μL foram diluídas em tampão PCR 1X até atingir esta concentração.

Como controle negativo, foi utilizado DNA humano de leucócito diluído a 50ng/μL. Para construção da curva-padrão, foi utilizado DNA extraído de células Caski, correspondendo a 600 cópias do HPV-16/célula, gentilmente cedido pela Dra. Luisa Villa, do Instituto Ludwig. O DNA destas células foi diluído com água destilada e deionizada a uma concentração de 50ng/μL.

Para a reação, foram adicionados 5μL (250ng) do DNA extraído das amostras ao Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), aos *primers* SPF10 (400nM) e a água DEPC, totalizando um volume final de 25μL. A ciclagem no aparelho foi feita a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos e 60°C por um minuto. A curva de Melting foi feita a 95°C em 15 segundos, seguido de 55°C por 30 segundos e 95°C por 15 segundos. A temperatura de Melting esperada foi de 72°C ± 1°C.

As amostras foram feitas em triplicatas. As células Caski (250ng) foram diluídas em série de 10 vezes até atingir concentrações de 60; 6; 0,6 cópias por células e utilizadas como padrões em cada corrida.

O número de cópias do HPV nas amostras foi avaliado utilizando análise de regressão. Valores correspondentes a C_t foram reportados a uma curva padrão permitindo que os resultados fossem expressos como

indetectáveis ou positivos e posteriormente, quantitativamente em cópias de DNA-HPV/10⁴ células do colo uterino.

5.7 Carga viral específica do HPV 16

Devido ao fato do HPV 16 estar presente em grande parte das amostras, decidiu-se fazer a carga viral específica para este genótipo. A carga viral do HPV 16 foi realizada por PCR em tempo real utilizando o método de SYBR Green e o aparelho 7300 da Applied Biosystems. O protocolo com o SYBR Green foi feito utilizando *primers* específicos que amplificam um fragmento de aproximadamente 100pb da região E7 do HPV 16 (quadro 4) (Walboomers *et al.*, 1999).

Quadro 4 - Sequências de *primers* HPV 16-E7.667 e 16-E7.774 específicos para a região E7 do HPV utilizados na determinação da carga viral específica do HPV 16.

Primer	Seqüência 5' → 3'
Primer Sense	
HPV 16 E7. 667	GATGAAATAGATGGTCCAGC
Primer Anti-sense	
HPV 16 E7.774	GCTTTGTACGCACAACCGAAGC

Adaptado de Walboomers *et al.*, 1999.

Foram adicionados 5µL (250ng) do DNA extraído das amostras ao Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), aos *primers* 16-E7.667 e 16-E7.774 específicos para a região E7 do HPV 16 em uma

concentração de 10 μ M e a água ultra-pura, totalizando um volume final de 25 μ L. A ciclagem no aparelho foi feita a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 55°C por um minuto e 60°C por um minuto. A curva de Melting foi feita a 95°C em 15 segundos, seguido de 60°C por 30 segundos e 95°C por 15 segundos.

As amostras foram feitas em triplicatas. As células Caski (250ng) foram diluídas em série de 10 vezes até atingir concentrações de 60; 6; 0,6 cópias por células e utilizadas como padrões em cada corrida. A sensibilidade deste método foi 1 log₁₀ cp/10⁴ células.

O número de cópias do HPV nas amostras foi avaliado utilizando análise de regressão. Valores correspondentes a C_t foram reportados a uma curva padrão permitindo que os resultados fossem expressos como indetectáveis ou positivos e posteriormente, quantitativamente em cópias de DNA-HPV/10⁴ células do colo uterino.

5.8 Captura Híbrida 2

Para análise das amostras utilizou-se cinco procedimentos básicos: desnaturação, hibridização, captura dos híbridos, reação dos híbridos com o conjugado e a detecção dos híbridos por um substrato quimioluminescente, segundo especificações do fabricante. A desnaturação foi realizada utilizando-se o reagente de Desnaturação contendo hidróxido de sódio (NaOH) adicionado às amostras seguido do aquecimento em banho-maria a 65°C durante 1 hora. A seguir, as amostras que continham DNA-HPV, hibridizaram-se com o coquetel de sonda para HPV de alto risco (RNA-HPV)

em um aquecedor de placas a 65°C por 1 hora. Os híbridos RNA:DNA foram capturados sobre a superfície da microplaca sensibilizada com anticorpos específicos para os híbridos RNA:DNA em um agitador por 1 hora a 1100 x g. Posteriormente, os híbridos imobilizados reagiram por 30 minutos com a fosfatase alcalina conjugada com anticorpos específicos para híbridos DNA-HPV em solução tampão com 0,05% de azida sódica. Finalmente, foi feita a incubação com o substrato CDP Star com Emerald II, por 15 minutos e o resultado foi detectado por quimioluminescência. A luz emitida foi medida pela unidade de luz relativa (RLU) no luminômetro.

Os critérios para interpretação dos resultados do teste DNA-HPV de alto risco (grupo B) foram: espécimes com relação $RLU/Cut-off \geq 1.0$ foram considerados “positivos” para um ou mais genótipos do HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68. Espécimes com relação $RLU/Cut-off < 1.0$ foram considerados “negativos” ou “não detectados” entre os 13 genótipos de HPV testados.

5.9 Análise e tratamento dos dados

Os dados obtidos foram armazenados em um banco de dados do programa SPSS versão 17.0 que também foi utilizado como ferramenta para as análises estatísticas. O nível de significância utilizado nos testes foi de 5%. Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas de frequência. O teste qui-quadrado foi utilizado para comparação de variáveis nominais e ordinais. Quando o número extraído de uma célula foi menor que

1, utilizou-se o teste exato de Fisher. O teste T e ANOVA foram empregados na comparação de 2 ou 3 médias, respectivamente, de variáveis contínuas quando a distribuição foi normal. Quando a distribuição da variável não foi normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. O teste de Spearman foi utilizado para correlacionar 2 variáveis contínuas com distribuições não normais. O teste utilizado para o cálculo do intervalo de confiança foi o decrito por Fleiss *et al.*

5.10 Aspectos Éticos

Este projeto é parte de um projeto mais amplo intitulado “Projeto HPV-Bahia: Estudo Prospectivo de Pacientes com Lesão Intra-epitelial e Câncer Cervical Utilizando Biomarcadores em Mulheres no Estado da Bahia”. Desta forma, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Com-HUPES) em 09 de abril de 2007 com número de protocolo CEP-001/2007 (Anexo C) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 07 de dezembro de 2007 com número de protocolo 1044/07 (Anexo D).

VI RESULTADOS

O estudo foi feito em dois centros de referência em patologia cervical (IDEM e CICAN) na cidade de Salvador, Bahia no período de julho de 2006 a janeiro de 2009. Foram selecionadas 88 mulheres com diagnóstico citopatológico de LIAG: 54 com idade igual ou inferior a 30 anos e 34 com idade igual ou superior a 35 anos. Destas 88 mulheres, apenas 41 (46,6%) tiveram o diagnóstico de LIAG confirmado através do exame histopatológico: 26 (63,4%) com idade igual ou inferior a 30 anos e 15 (36,6%) com idade igual ou superior a 35 anos (tabela 1). Desta forma, as pacientes foram divididas em 3 grupos: sem LIAG (< NIC 2), com LIAG (\geq NIC 2) menores que 30 anos e com LIAG (\geq NIC 2) com idade igual ou superior a 35 anos.

Tabela 1 - Frequência dos graus histopatológicos segundo grupo de idade na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.

<i>Anatomia Patológica</i>	<i>Grupo de Idade</i>		<i>Total</i>
	≤ 30 anos	≥ 35 anos	
< NIC 2	28 (51,9)	19 (55,9)	47 (53,4)
NIC 2	18 (33,3)	4 (11,8)	22 (25,0)
NIC 3	7 (13,0)	8 (23,5)	15 (17,0)
Carcinoma	1 (1,8)	3 (8,8)	4 (4,6)
Total	54 (100,0)	34 (100,0)	88 (100,0)

Valor Absoluto (%)

6.1 Características sócio-demográficas e de comportamento sexual

A análise das características sócio-demográficas e de comportamento sexual foi feita nos dois grupos de mulheres que tiveram o diagnóstico de LIAG confirmado pelo exame histopatológico. Os resultados de cada um dos grupos estão apresentados na **tabela 2**:

Escolaridade

O grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos apresentou um grau de escolaridade mais alto (85% - 17/20) do que o grupo de mulheres com idade igual ou superior a 35 anos (20% - 3/15) ($p < 0,01$).

Tabagismo

A grande maioria das mulheres do estudo (84,2%), não apresentou história de tabagismo. No grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos, apenas 8,7% fumavam e no grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 35 anos, 13,3% fumavam ou tinham parado ($p=0,17$).

Uso de Anticoncepcional Oral (ACO)

No grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos, 54,2% (13/24) das mulheres faziam uso de ACO, enquanto no grupo de mulheres

com idade igual ou superior a 35 anos, apenas 13,3% (2/15), relataram fazer uso de ACO ($p=0,01$).

Idade do Início da Atividade Sexual

Em ambos os grupos observaram-se freqüências semelhantes, 38,9% (7/18) e 42,9% (6/14), respectivamente, de mulheres que iniciaram atividade sexual com até 16 anos ($p=0,82$).

Número Total de Parceiros

O grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos, apresentou uma freqüência de 15% (3/20) com 5 ou mais parceiros durante toda vida. No grupo de mulheres com idade igual ou superior a 35 anos, observou-se uma freqüência semelhante, de 13,3% (2/15) ($p=0,11$).

Paridade

No grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos, nenhuma mulher tinha 3 ou mais filhos, enquanto no grupo de mulheres com idade igual ou superior a 35 anos, esta freqüência foi de 80% (12/15) ($p<0,01$).

Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST)

A grande maioria das mulheres nos dois grupos, 94,7% (36/38), não relatou nenhuma DST prévia, apenas no grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos, duas pacientes (8,7%), relataram ter episódios de herpes tipo 2 ($p=0,51$).

Tabela 2 - Características sócio-demográficas e de comportamento sexual em mulheres com Lesão Intra-epitelial de Alto Grau (LIAG) segundo o grupo de idade em Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.

Características Sócio-demográficas e de Comportamento Sexual	≤ 30 anos	≥ 35 anos	Total	Valor do p
Escolaridade				
Até o Primário	3 (15,0)	12 (80,0)	15 (42,9)	
Médio ou Superior	17 (85,0)	3 (20,0)	20 (57,1)	
Total	20 (100)	15 (100)	35 (100)	<0,01
Tabagismo				
Não	21 (91,3)	11 (73,3)	32 (84,2)	
Sim	2 (8,7)	2 (13,3)	4 (10,5)	
Interrompido	-	2 (13,3)	2 (5,3)	
Total	23 (100)	15 (100)	38 (100)	0,17
Uso de Contraceptivo Oral				
Não	11 (45,8)	13 (86,7)	24 (61,5)	
Sim	13 (54,2)	2 (13,3)	15 (38,5)	
Total	24 (100)	15 (100)	39 (100)	0,01
Idade do Início da Atividade Sexual				
≤ 16 anos	7 (38,9)	6 (42,9)	13 (40,6)	
> 16 anos	11 (61,1)	8 (57,1)	19 (59,4)	
Total	18 (100)	14 (100)	32 (100)	0,82
Número Total de Parceiros				
1	3 (15,0)	7 (46,7)	10 (28,6)	
2 a 4	14 (70,0)	6 (40,0)	20 (57,1)	
≥ 5	3 (15,0)	2 (13,3)	5 (14,3)	
Total	20 (100)	15 (100)	35 (100)	0,11
Paridade				
Sem Filhos	16 (72,7)	1 (6,7)	17 (46,0)	
1 a 2 Filhos	6 (27,3)	2 (13,3)	8 (21,6)	
≥ 3 Filhos	-	12 (80,0)	12 (32,4)	
Total	22 (100)	15 (100)	37 (100)	<0,01
Doenças Sexualmente Transmissíveis				
Não	21 (91,3)	15 (100)	36 (94,7)	
Herpes tipo 2	2 (8,7)	-	2 (5,3)	
Total	23 (100)	15 (100)	38 (100)	0,51
Valor Absoluto (%)				

6.2 Expressão da proteína p16^{INK4a}

A análise da expressão da proteína p16^{INK4a} foi feita apenas nas mulheres que tiveram o diagnóstico de LIAG confirmado pelo exame histopatológico.

Os resultados da expressão da proteína p16^{INK4a} de acordo com o grau histopatológico estão representados na tabela 3. Houve expressão desta proteína em 100% das NIC 2, NIC 3 e carcinomas. Em mulheres com NIC 2, a porcentagem dos escores foram 13,6% (escore 1 - figura 6), 40,9% (escore 2) e 45,5% (escore 3 – figura 7). Para NIC 3, 6,7% (escore 1), 47,6% (escore 2 – figura 8) e 47,6% (escore 3). Para carcinoma, não houve presença do escore 1, 50% correspondeu ao escore 2 e 50% ao escore 3 (figura 9). Não foi observada diferença estatística entre expressão desta proteína e os diferentes graus de LIAG ($p=0,91$).

Tabela 3 - Expressão da proteína p16^{INK4a} de acordo com os graus histopatológicos em mulheres com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.

Anatomia Patológica	Escore da Proteína p16^{INK4a}			Total
	1	2	3	
NIC 2	3 (13,6)	9 (40,9)	10 (45,5)	22 (100,0)
NIC 3	1 (6,7)	7 (47,6)	7 (47,6)	15 (100,0)
Carcinoma	-	2 (50,0)	2 (50,0)	4 (100,0)
Total	4 (9,8)	18 (43,9)	19 (46,3)	41 (100,0)
Valor Absoluto (%)				$p= 0,91$

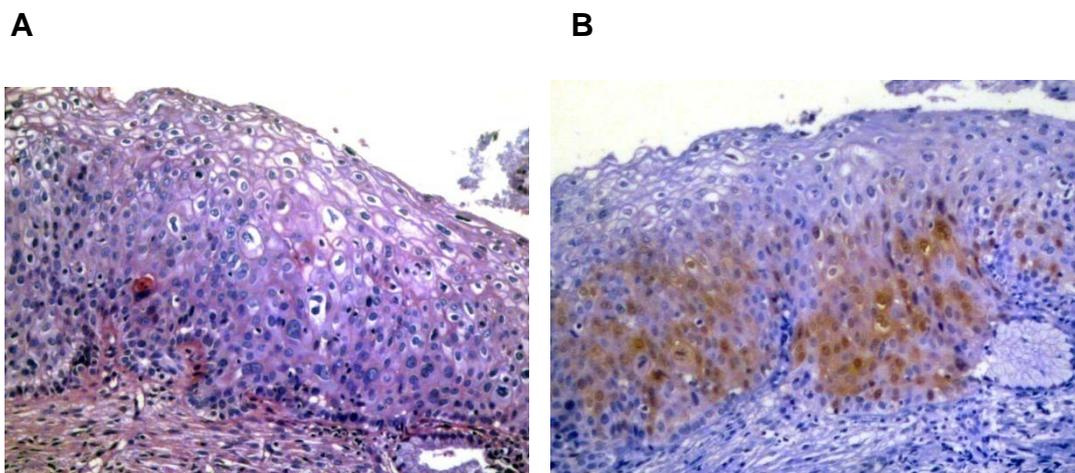


Figura 6 - Caso 10. A. Coloração pela HE de NIC 2. Aumento original: 100X; B. Imuno- Histoquímica p16^{INK4a} reatividade fraca (escore 1). Aumento original: 100X.

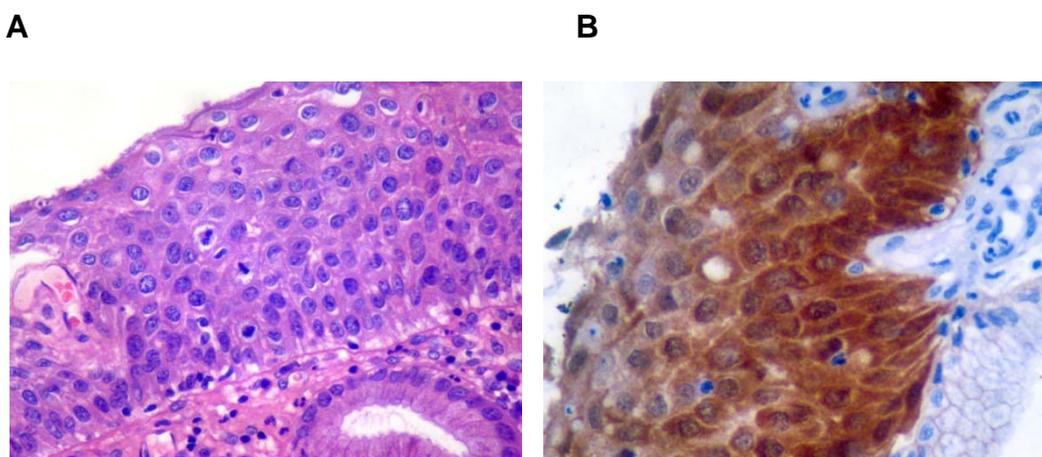


Figura 7 - Caso 29. A. Coloração pela HE de NIC 2. Aumento original: 200X; B. Imuno-Histoquímica p16^{INK4a} reatividade forte (escore 3). Aumento original: 400X.

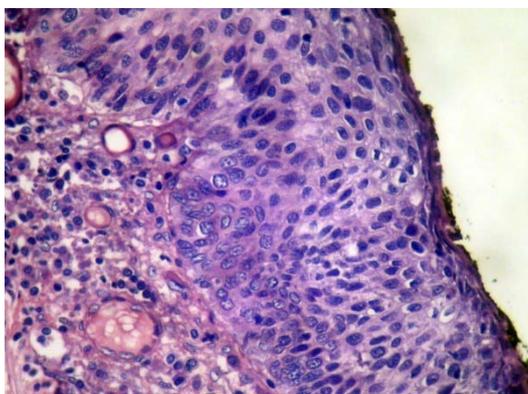
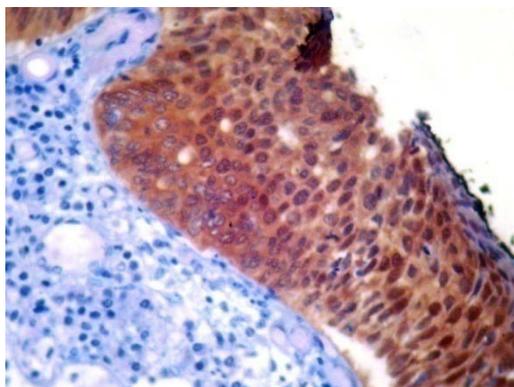
A**B**

Figura 8 - Caso 30. A. Coloração pela HE de NIC 3. Aumento original: 200X; B. Imuno-Histoquímica p16^{INK4a} reatividade moderada (escore 2). Aumento original: 200X.

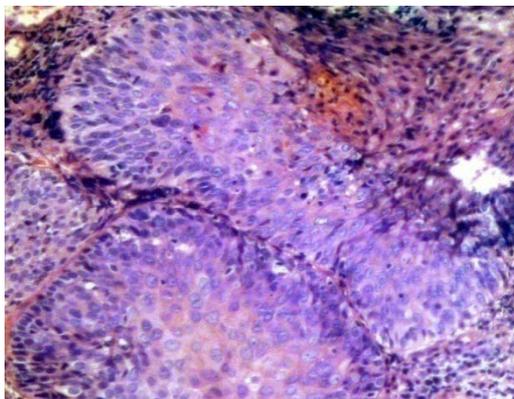
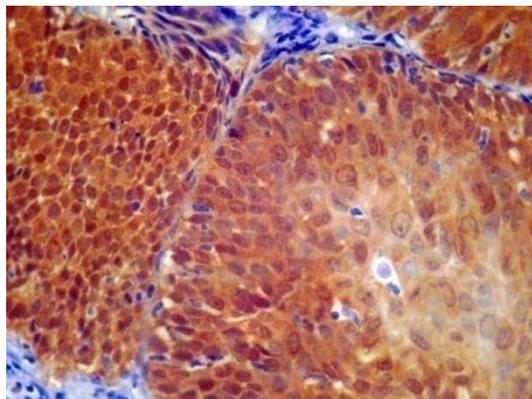
A**B**

Figura 9 - Caso 18. A. Coloração pela HE de Carcinoma. Aumento original: 100X; B. Imuno-Histoquímica p16^{INK4a} reatividade forte (escore 3). Aumento original: 400X.

6.3 Análise qualitativa do HPV por PCR convencional

Como controle de qualidade da extração, os DNAs isolados foram submetidos a PCR convencional visando verificar a presença de bandas da beta-globina.

Os resultados obtidos na PCR convencional foram visualizados em gel de agarose a 1,5% (figura 10). Observa-se a presença do fragmento com 268 pb correspondente à amplificação da região do gene da β -globina humana e do fragmento com 450 pb correspondente à região L1 do HPV.

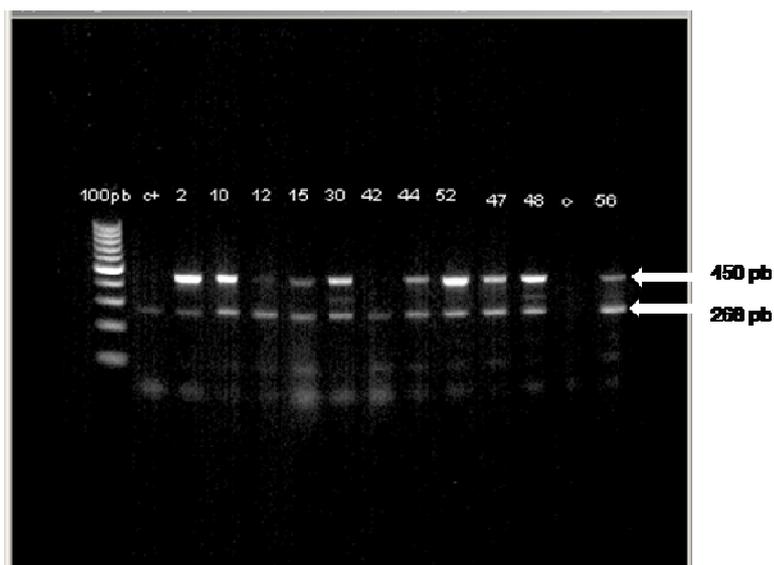


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% utilizando os *primers* PGMY09/11 para amplificação da região do gene L1 do HPV (450 pb) e os *primers* da β -globina humana correspondente a 268 pb.

6.4 Análise dos Genótipos do HPV

6.4.1 Grupo sem LIAG

Das 47 amostras analisadas neste grupo pela técnica Linear Array, o HPV foi detectado em 33 amostras (70,2%); 4 amostras (8,5%) foram consideradas inválidas devido à ausência da amplificação do gene da β -globina humana e em 10 amostras (21,3%) o HPV não foi detectado.

Destas 33 mulheres positivas para HPV, 66,7% (22/33) apresentaram infecção múltipla e somente 33,3% (11/33) apresentaram infecção única. O HPV 16 foi o mais prevalente, sendo encontrado em 46,5% (20/33) das amostras, seguido pelo HPV 31 (20,9%), HPV 56 (20,9%), HPV 61 (16,3%) e HPV CP6108 (16,3%). Observou-se neste grupo, a presença de 02 genótipos não encontrados no grupo com LIAG: HPV 73 (2,3%) e HPV 61 (16,3%). A composição dos genótipos do HPV está demonstrada na figura 11.

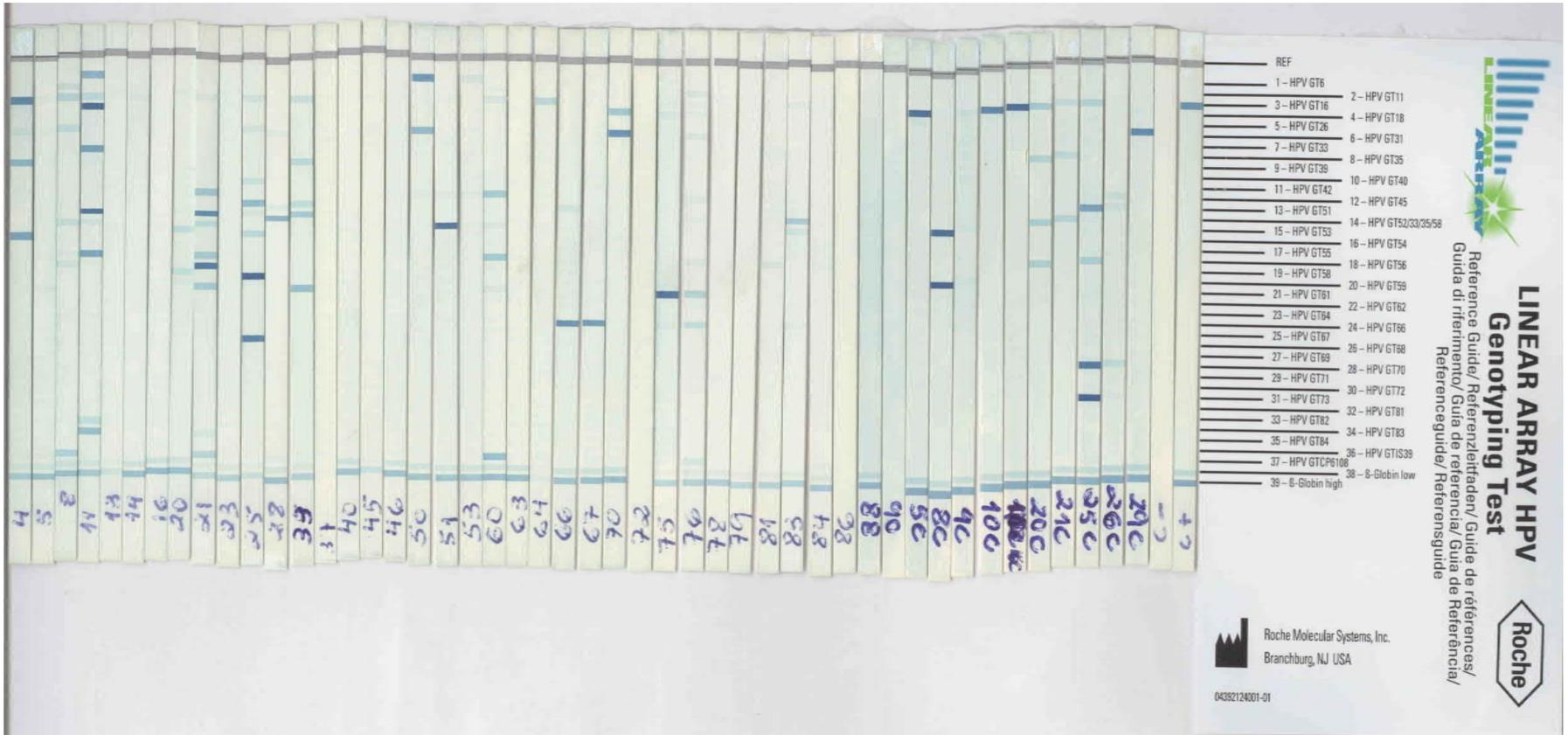


Figura 11 - Tiras do teste Linear Array HPV das 47 pacientes sem LIAG com o guia de referência.

6.4.2 Grupo com LIAG

Dos 37 genótipos do HPV incluídos no teste Linear Array, 28 (75,7%) foram encontrados nas mulheres deste grupo e entre os 16 genótipos oncogênicos, 12 (75%) foram detectados. A distribuição dos genótipos de HPV como infecção múltipla e única e segundo grupo de idade, está descrita na tabela 4. Das 41 amostras analisadas neste grupo, o HPV foi detectado em 38 amostras (92,7%), apenas uma amostra (2,4%) foi considerada inválida devido à ausência da amplificação do gene β -globina humana e em duas (4,9%) o HPV não foi detectado. Destas 38 mulheres positivas para HPV, 76,3% (29/38) apresentaram infecção múltipla e somente 23,7% (9/38) apresentaram infecção única. O HPV 16 foi o mais prevalente, sendo encontrado em 82,5% (33/40) das amostras; nas infecções múltiplas, o HPV 16 esteve presente em 93,1% (27/29) das amostras e nas infecções únicas em 66,7%. Devido a esta elevada prevalência, foi feita a análise da carga viral deste tipo específico. Os outros 4 genótipos mais prevalentes foram o HPV 35 (25,0%), HPV 56 (25,0%), HPV 45 (17,5%) e o HPV 70 (17,5%). O HPV 18 apareceu apenas em 3 amostras (7,5%). Nas mulheres com infecção única, 6 apresentaram infecção pelo HPV 16 (66,7%), 2 pelo HPV 18 (22,2%) e 1 mulher pelo HPV 35 (11,1%). A composição dos genótipos do HPV está demonstrada na figura 12.

Tabela 4 - Distribuição dos genótipos do HPV em infecção múltipla e única e segundo grupo de idade em mulheres com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.

Genótipo do HPV	Prevalência Total	Infecção Única	≤ 30 anos	≥ 35 anos
Alto Risco				
16	33 (82,5)	6 (66,7)	21 (84,0)	12 (80,0)
18	3 (7,5)	2 (22,2)	2 (8,0)	1 (6,7)
31	4 (10,0)	-	4 (16,0)	-
33	1 (2,5)	-	-	1 (6,7)
35	10 (25,0)	1 (11,1)	8 (32,0)	2 (13,3)
39	-	-	-	-
45	7 (17,5)	-	6 (24,0)	1 (6,7)
51	5 (12,5)	-	2 (8,0)	3 (20,0)
52	5 (12,5)	-	4 (16,0)	1 (6,7)
56	10 (25,0)	-	8 (32,0)	2 (13,3)
58	3 (7,5)	-	2 (8,0)	1 (6,7)
59	2 (5,0%)	-	2 (8,0)	-
68	-	-	-	-
73	-	-	-	-
82	-	-	-	-
Risco Intermediário				
26	-	-	-	-
53	5 (12,5)	-	5 (20,0)	-
66	3 (7,5)	-	2 (8,0)	1 (6,7)
Baixo Risco				
6	2 (5,0)	-	2 (8,0)	-
11	1 (2,5)	-	1 (4,0)	-
40	1 (2,5)	-	1 (4,0)	-
42	2 (5,0)	-	1 (4,0)	1 (6,7)
54	3 (7,5)	-	3 (12,0)	-
61	-	-	-	-
67	1 (2,5)	-	-	1 (6,7)
70	7 (17,5)	-	4 (16,0)	3 (20,0)
72	1 (2,5)	-	-	1 (6,7)
81	4 (10,0)	-	4 (16,0)	-
CP6108	3 (7,5)	-	3 (12,0)	-
Risco Indeterminado				
55	-	-	-	-
62	1 (2,5)	-	1 (4,0)	-
64	-	-	-	-
69	-	-	-	-
71	2 (5,0)	-	2 (8,0)	-
83	1 (2,5)	-	1 (4,0)	-
84	5 (12,5)	-	4 (16,0)	1 (6,7)
IS39	2 (5,0)	-	2 (8,0)	-

Valor Absoluto (%)

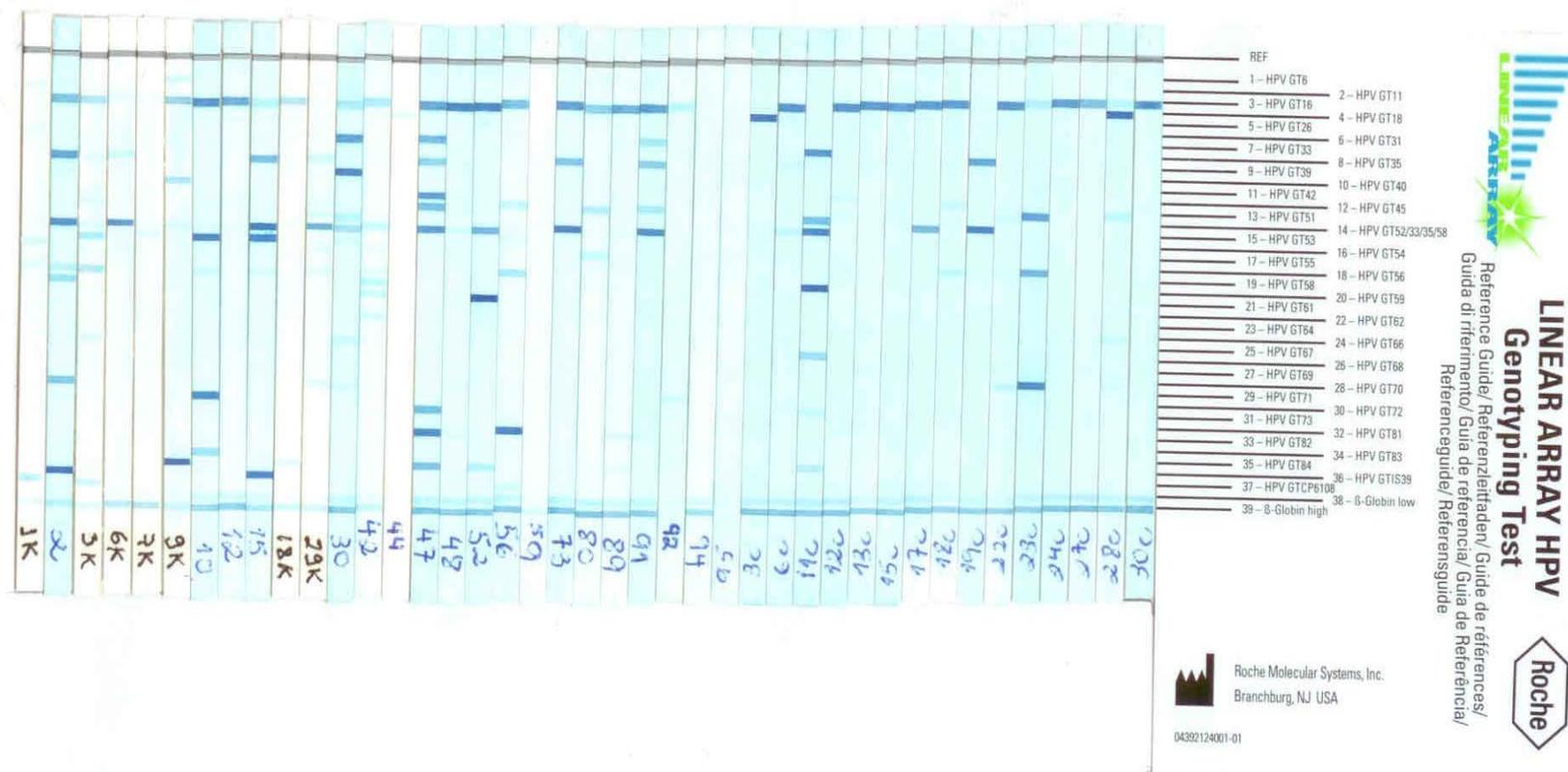


Figura 12 - Tiras do teste Linear Array HPV das 41 pacientes com LIAG com o guia de referência.

A distribuição dos genótipos do HPV por grupo de idade em mulheres com LIAG está descrita na tabela 4. A frequência do HPV 16 não variou entre estes dois grupos. No grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos, este genótipo foi encontrado em 84% (21/25) dos casos e no grupo com idade igual ou superior a 35 anos em 80% (12/15).

A figura 13 mostra a relação entre número de genótipos do HPV e grupo de idade nas mulheres com LIAG. O grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos, apresentou 12,5% (3/24) de infecção única, 41,7% (10/24) com 2 a 4 genótipos e 45,8% (11/24) com 5 ou mais genótipos de HPV; apenas em uma amostra, o HPV não foi detectado. No grupo de mulheres com idade igual ou superior a 35 anos, a porcentagem de infecção única foi de 42,9% (6/14), de infecção por 2 a 4 genótipos foi de 42,9% (6/14), enquanto para 5 ou mais genótipos foi de 14,3% (2/14); em apenas uma amostra, o HPV não foi detectado. A prevalência de infecção múltipla foi maior no grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos (87,5%) que no grupo de mulheres com idade igual ou superior a 35 anos (52,2%). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,05$).

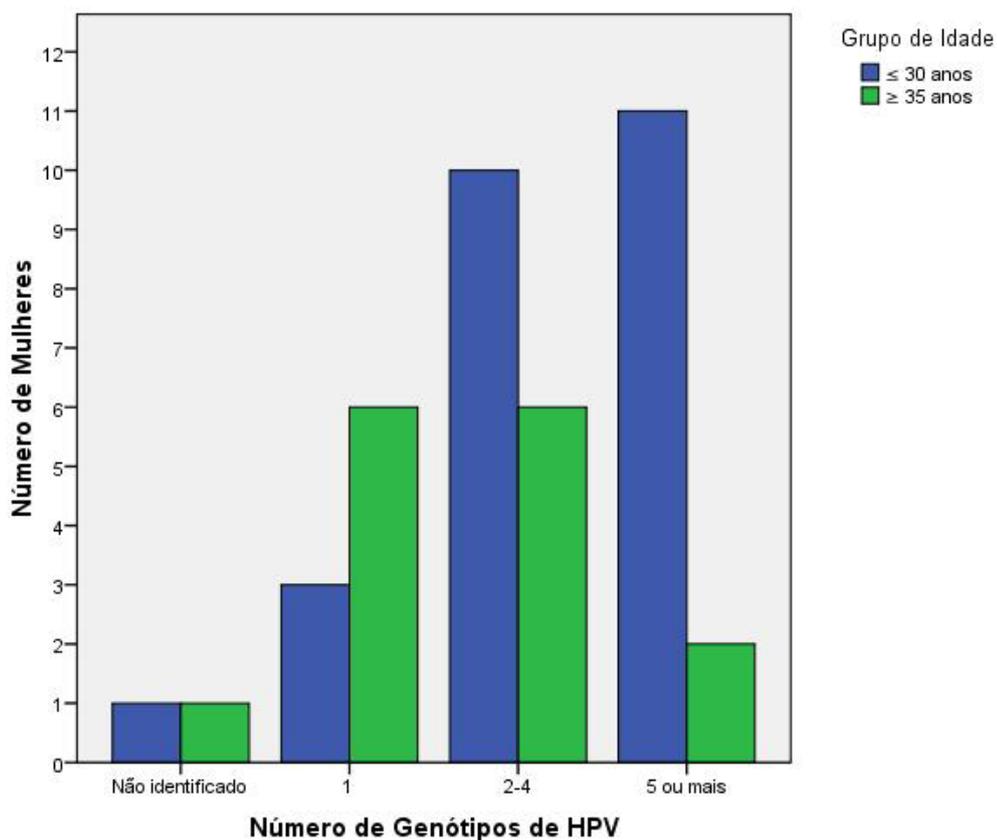


Figura 13 - Relação entre número de genótipos do HPV e grupos de idade em mulheres com LIAG.

A figura 14 mostra a relação entre o número de genótipos do HPV em mulheres com e sem LIAG. No grupo com LIAG, observou-se uma maior prevalência de infecção múltipla quando comparado ao grupo sem LIAG. Quanto maior foi o número de genótipos, maior foi a presença de LIAG ($p=0,02$).

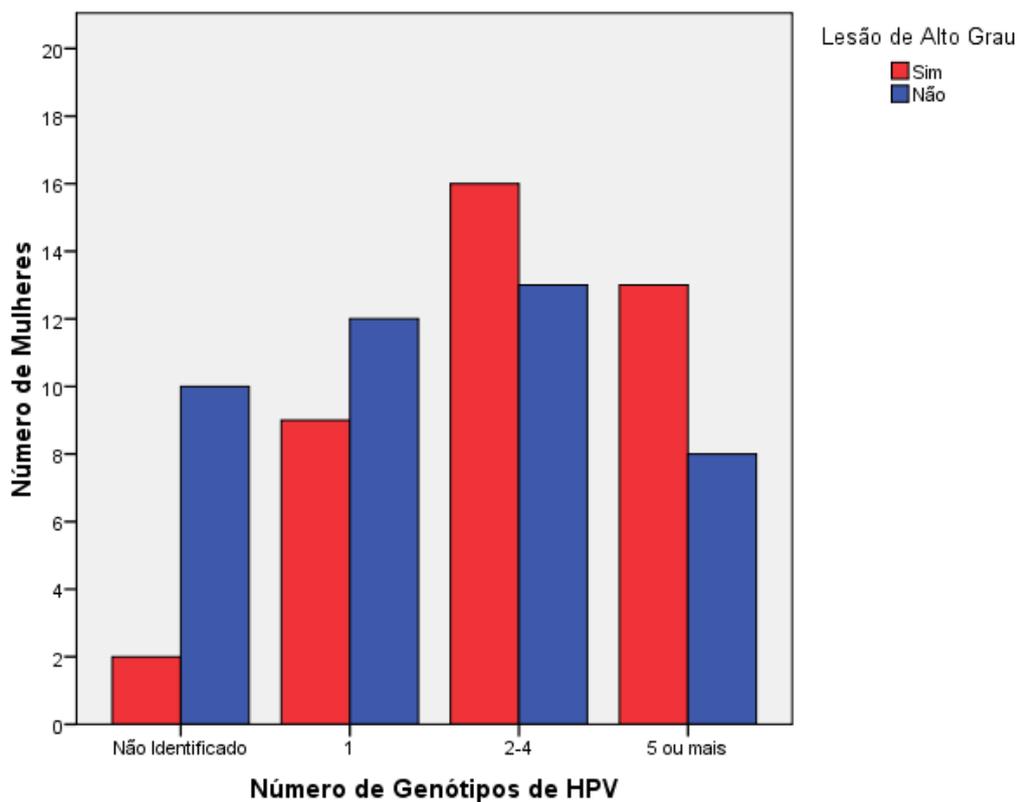


Figura 14 - Relação entre número de genótipos do HPV em mulheres com e sem LIAG.

A figura 15 mostra a análise dos genótipos de HPV oncogênicos em relação aos grupos de idade em mulheres com LIAG. O grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos, apresentou 29,2% (7/24) de infecção por um genótipo, 58,3% (14/24) de infecção por 2 a 4 genótipos e 12,5% (3/24) com 5 ou mais genótipos de HPV. O grupo de mulheres com idade igual ou superior a 35 anos, apresentou 57,1% (8/14) com apenas infecção única, 42,9% (6/14) de infecção por 2 a 4 genótipos e nenhuma infecção por 5 ou mais genótipos de HPV. Todas as mulheres dos dois grupos de idade tinham pelo menos um genótipo oncogênico.

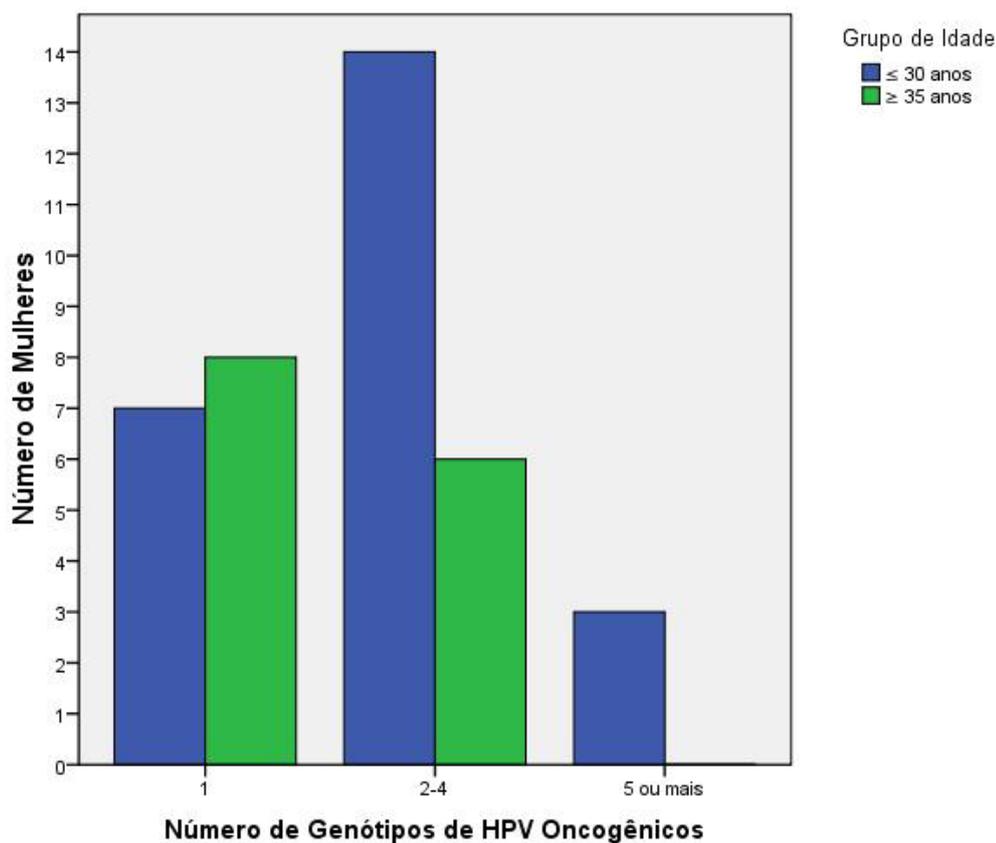


Figura 15 - Relação entre número de genótipos de HPV oncogênicos e grupos de idade em mulheres com LIAG.

A figura 16 mostra a relação entre o número de genótipos oncogênicos do HPV em mulheres com e sem LIAG. Embora o grupo de mulheres com LIAG apresentasse um maior número de genótipos oncogênicos quando comparado com o grupo sem LIAG, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p= 0,59$). Retirando da análise o HPV 16, observou-se que sua ausência continuou não tendo impacto na relação entre genótipos oncogênicos e LIAG ($p=0,49$). Da mesma forma, analisando separadamente os outros cinco genótipos mais prevalentes: HPV 35, HPV 45, HPV 51, HPV 52 e HPV 56, foi observado resultados similares.

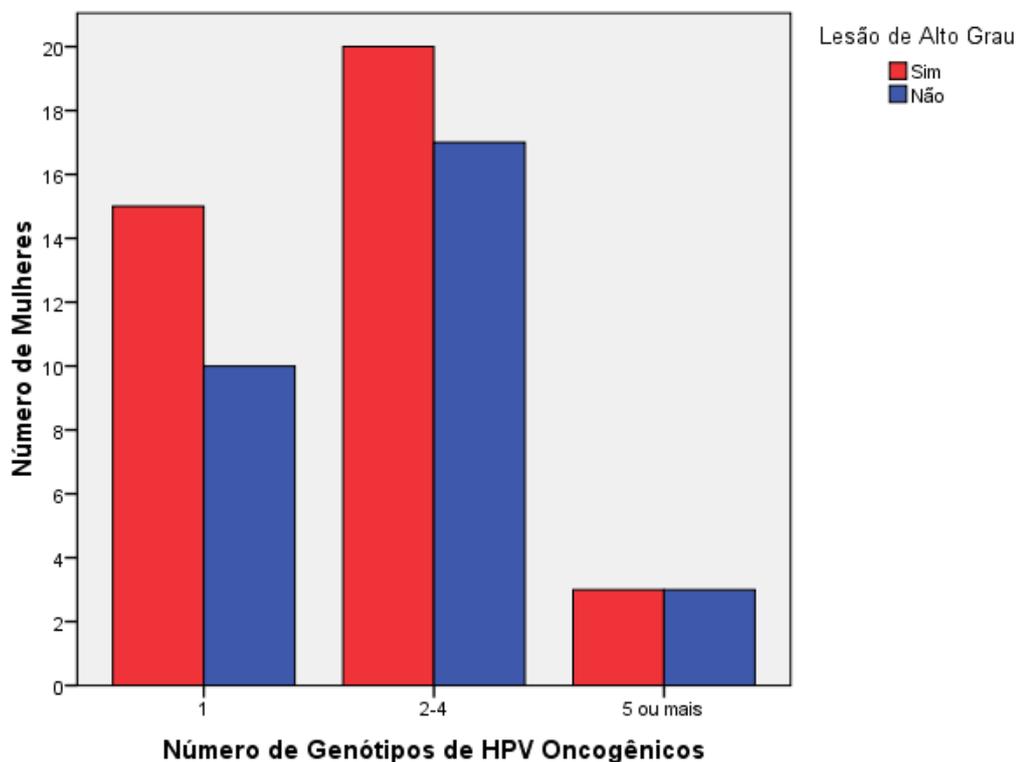


Figura 16 - Relação entre número de genótipos de HPV oncogênicos em mulheres com e sem LIAG.

A distribuição dos genótipos de HPV por classificação histopatológica está descrita na tabela 5. Observou-se a prevalência do HPV 16 nos quatro graus histopatológicos. No grupo de mulheres sem LIAG (< NIC 2) os 5 genótipos mais prevalentes foram HPV 16 (46,5%), HPV 31 (20,9%), HPV 56 (20,9%), HPV 61 (16,3%) e CP6108 (16,3%). Nas mulheres com NIC 2, os genótipos mais prevalentes foram: HPV 16 (77,3%), HPV 56 (36,4%), HPV 35 (31,8%), HPV 45 (22,7%) e HPV 70. (22,7%). Na NIC 3, foram o HPV 16 (85,7%), HPV 35 (21,4%), HPV 18 (14,3%), HPV 66 (14,3%) e HPV 53 (14,3%). Foi observada a presença de quatro carcinomas: um

pertencente ao grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos e três pertencentes ao grupo com idade igual ou superior a 35 anos. Todos os carcinomas (100,0%) continham HPV 16 associado a algum outro tipo de HPV: HPV 45 (25,0%), HPV 56 (25,0%), HPV 70 (25,0%) ou HPV 84 (25,0%).

Tabela 5 - Distribuição dos genótipos do Papilomavírus Humano (HPV) segundo grau histopatológico na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.

Genótipo do HPV	< NIC 2	NIC 2	NIC 3	Carcinoma
Alto Risco				
16	20 (46,5)	17 (77,3)	12 (85,7)	4 (100,0)
18	4 (9,3)	1 (4,5)	2 (14,3)	-
31	9 (20,9)	4 (18,2)	-	-
33	-	1 (4,5)	-	-
35	3 (7,0)	7 (31,8)	3 (21,4)	-
39	-	-	-	-
45	4 (9,3)	5 (22,7)	1 (7,1)	1 (25,0)
51	6 (14,0)	4 (18,2)	1 (7,1)	-
52	5 (11,6)	4 (18,2)	1 (7,1)	-
56	9 (20,9)	8 (36,4)	1 (7,1)	1 (25,0)
58	3 (7,0)	3 (13,6)	-	-
59	2 (4,7)	2 (9,1)	-	-
68	-	-	-	-
73	1 (2,3)	-	-	-
82	-	-	-	-
Risco Intermediário				
26	-	-	-	-
53	6 (14,0)	3 (13,6)	2 (14,3)	-
66	4 (9,3)	1 (4,5)	2 (14,3)	-
Baixo Risco				
6	3 (7,0)	2 (9,1)	-	-
11	3 (7,0)	1 (4,5)	-	-
40	-	1 (4,5)	-	-
42	1 (2,3)	1 (4,5)	1 (7,1)	-
54	3 (7,0)	3 (13,6)	-	-
61	7 (16,3)	-	-	-
67	-	1 (4,5)	-	-
70	2 (4,7)	5 (22,7)	1 (7,1)	1 (25,0)
72	-	1 (4,5)	-	-
81	-	4 (18,2)	-	-
CP6108	7 (16,3)	2 (9,1)	1 (7,1)	-
Risco Indeterminado				
55	-	-	-	-
62	-	1 (4,5)	-	-
64	-	-	-	-
69	-	-	-	-
71	-	1 (4,5)	1 (7,1)	-
83	1 (2,3)	1 (4,5)	-	-
84	2 (4,7)	4 (18,2)	-	1 (25,0)
IS39	2 (4,7)	2 (9,1)	-	-

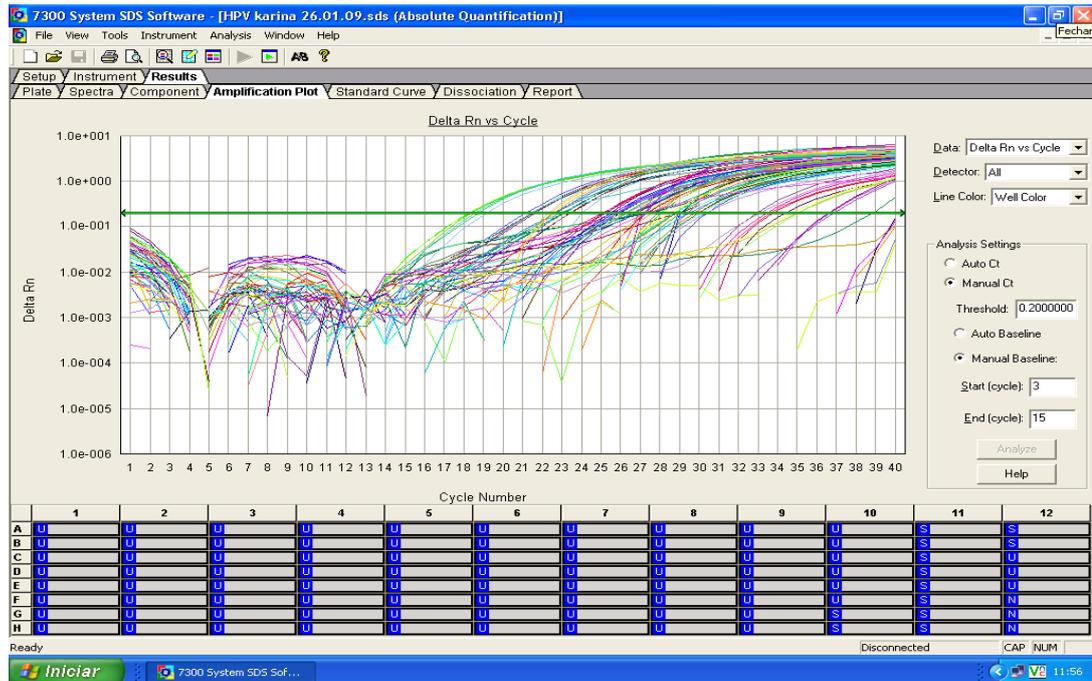
Valor Absoluto (%)

6.5 Análise da carga viral total do HPV

A figura 17, na página seguinte, demonstra a imagem da análise da carga viral total do HPV pela técnica PCR em Tempo Real e a curva padrão gerada a partir do DNA extraído de células CasKi (600 cópias do HPV 16).

A distribuição da carga viral total do HPV por classificação histopatológica está descrita na tabela 6. No grupo sem LIAG (< NIC 2), a carga viral total foi indetectável em 21 amostras (44,7% -21/47). A média da carga viral total foi $1,99 \pm 2,18$ (DP) \log_{10} cp/10⁴ células. No grupo com LIAG, a carga viral total foi indetectável em quatro amostras (9,8% - 4/41). A média para NIC 2 foi $4,03 \pm 1,54$ \log_{10} cp/10⁴ células e para NIC 3 ou carcinoma a média foi $3,70 \pm 1,65$ \log_{10} cp/10⁴ células. Foi observada diferença estatística entre carga viral total entre os grupos com e sem LIAG (p=0,01). A distribuição das medianas e dispersão da carga viral total do HPV em mulheres com e sem LIAG está representada na figura 18.

A)



B)

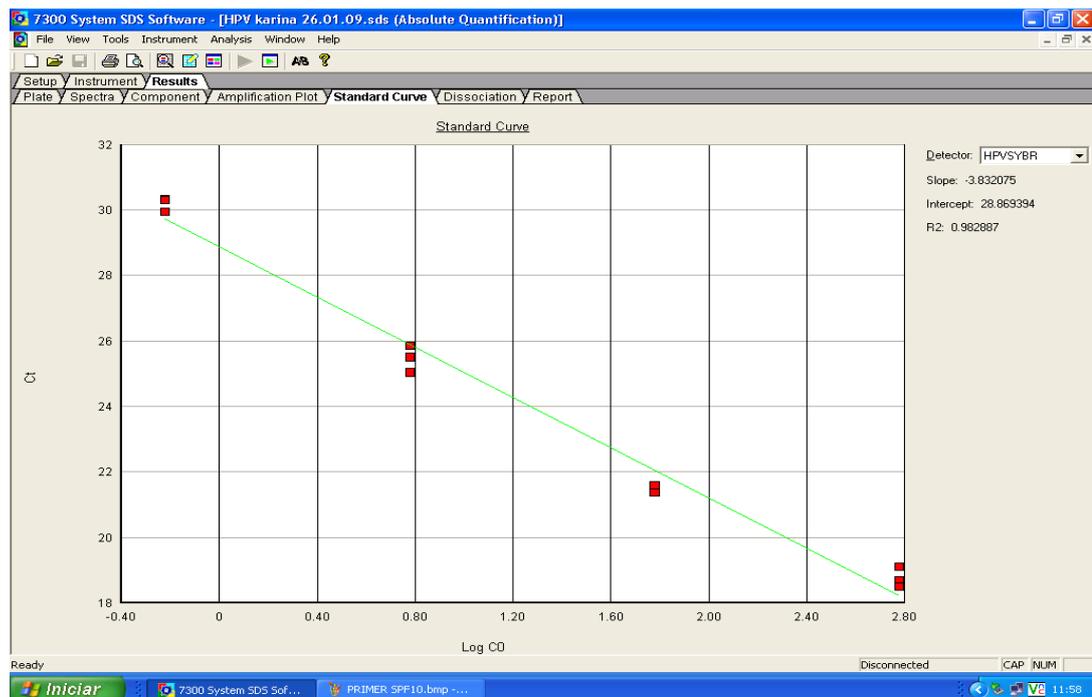


Figura 17 - Imagem da análise da carga viral total do HPV pela técnica PCR em Tempo Real. A) Corrida com as amostras do estudo. B) curva padrão gerada a partir do DNA extraído de células CasKi.

Tabela 6 - Análise das médias, desvio padrão, limite inferior, superior, mínimo e máximo da carga viral total do HPV em \log_{10} cp/ 10^4 células em mulheres na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.

Anatomia Patológica	Valor Absoluto (n)	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior do IC 95%	Limite Superior do IC 95%	Mínimo	Máximo
< NIC 2	47	1,99	2,18	1,35	2,63	0,00	6,79
NIC 2	22	4,03	1,54	3,34	4,71	0,00	6,77
≥ NIC 3	19	3,70	1,65	2,90	4,49	0,00	6,20
Total	88	2,87	2,13	2,42	3,32	0,00	6,79

$p= 0,01$

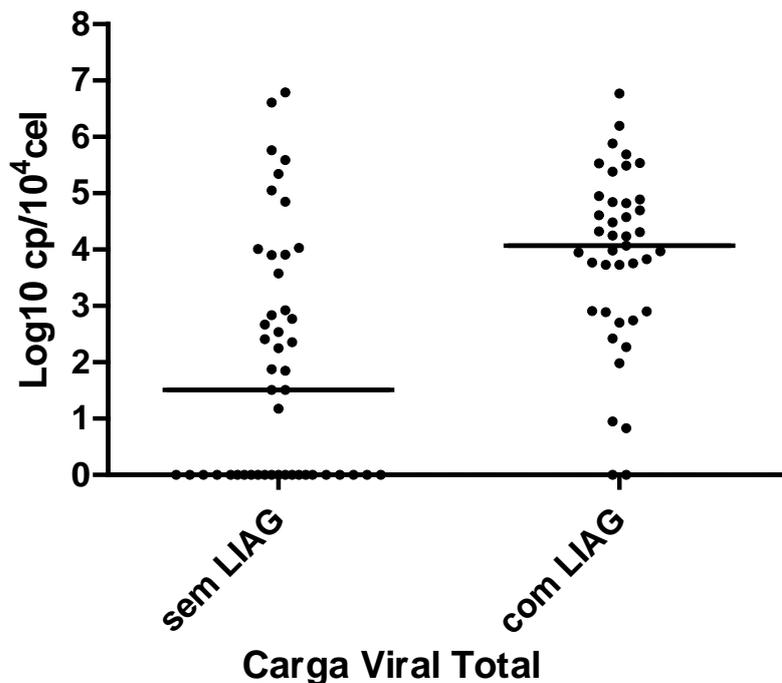


Figura 18 - Mediana e dispersão da carga viral total do HPV em mulheres sem e com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de Julho de 2006 a Janeiro de 2009.

A tabela 7 mostra a análise das médias, medianas e desvios padrões da carga viral total do HPV por grupo de idade em mulheres com LIAG. A média da carga viral em mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos foi $2,82 \pm 2,09 \log_{10} \text{ cp}/10^4$ células, a mediana foi $2,76 \log_{10} \text{ cp}/10^4$ células. No grupo de mulheres com idade igual ou superior a 35 anos, a média da carga viral total foi de $2,95 \pm 2,22 \log_{10} \text{ cp}/10^4$ células, a mediana foi $3,87 \log_{10} \text{ cp}/10^4$ células. Não foi observada diferença estatística em relação à análise da carga viral total entre os dois grupos de idade. A distribuição das medianas e dispersão da carga viral total do HPV por grupo de idade está representada na figura 19.

Tabela 7 - Análise das médias, medianas e desvios padrões da carga viral total do HPV em \log_{10} cp/ 10^4 células por grupo de idade em mulheres com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.

Grupo de Idade	Valor Absoluto (n)	Média	Desvio Padrão	Mediana
≤ 30 anos	26	2,82	2,09	2,76
≥ 35 anos	15	2,95	2,22	3,87

$p=0,89$

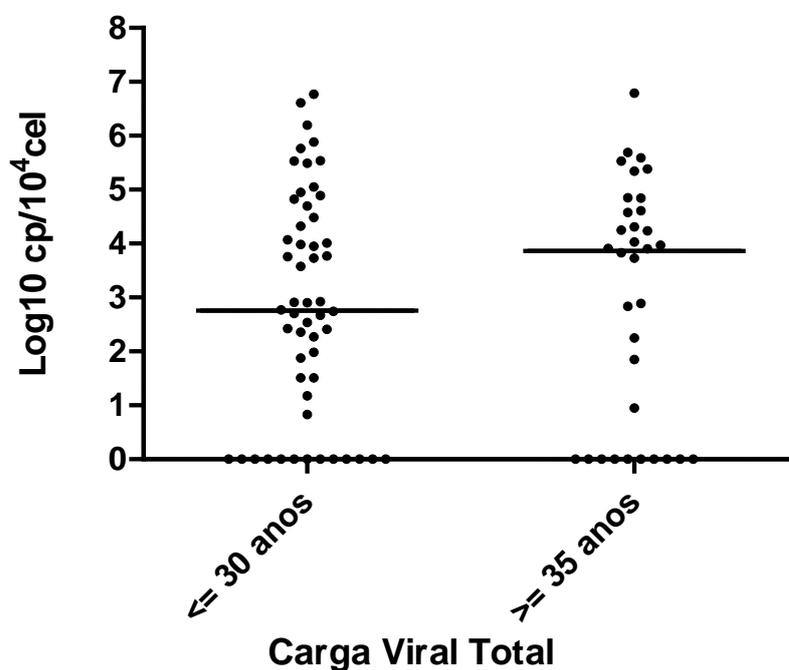


Figura 19 - Mediana e dispersão da carga viral total do HPV por grupo de idade em mulheres com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de Julho de 2006 a Janeiro de 2009.

A relação entre carga viral total e número de genótipos do HPV em mulheres com e sem LIAG estão representadas na figura 20. Foi observada associação entre número de genótipos e carga viral total no grupo de mulheres sem LIAG ($p < 0,01$). No grupo de mulheres com LIAG não foi observada associação entre carga viral total e número de genótipos ($p = 0,31$). O índice de determinação foi muito baixo ($R^2 = 0,03$), indicando que houve dispersão.

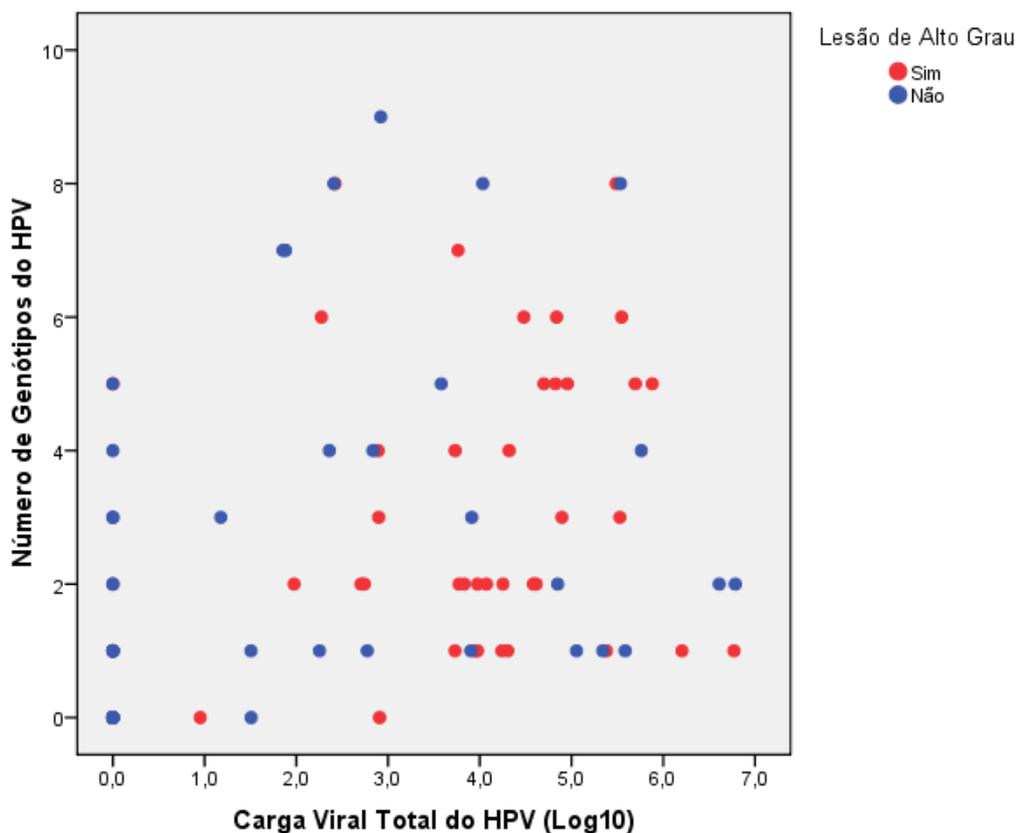


Figura 20 - Relação entre carga viral total do HPV e números de genótipos em mulheres com e sem LIAG.

A distribuição do número de genótipos do HPV e a carga viral total por grupo de idade em mulheres com LIAG estão representadas na figura 21. Não foi observada uma associação entre número de genótipos e carga viral total no grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos ($p= 0,39$). No grupo de mulheres com idade igual ou superior a 35 anos, houve uma tendência à associação ($p=0,06$). O índice de determinação (R^2) para o grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos foi muito baixo ($R^2=-0,04$) indicando uma difusão maior do que no grupo das mulheres com idade igual ou superior a 35 anos ($R^2= 0,12$).

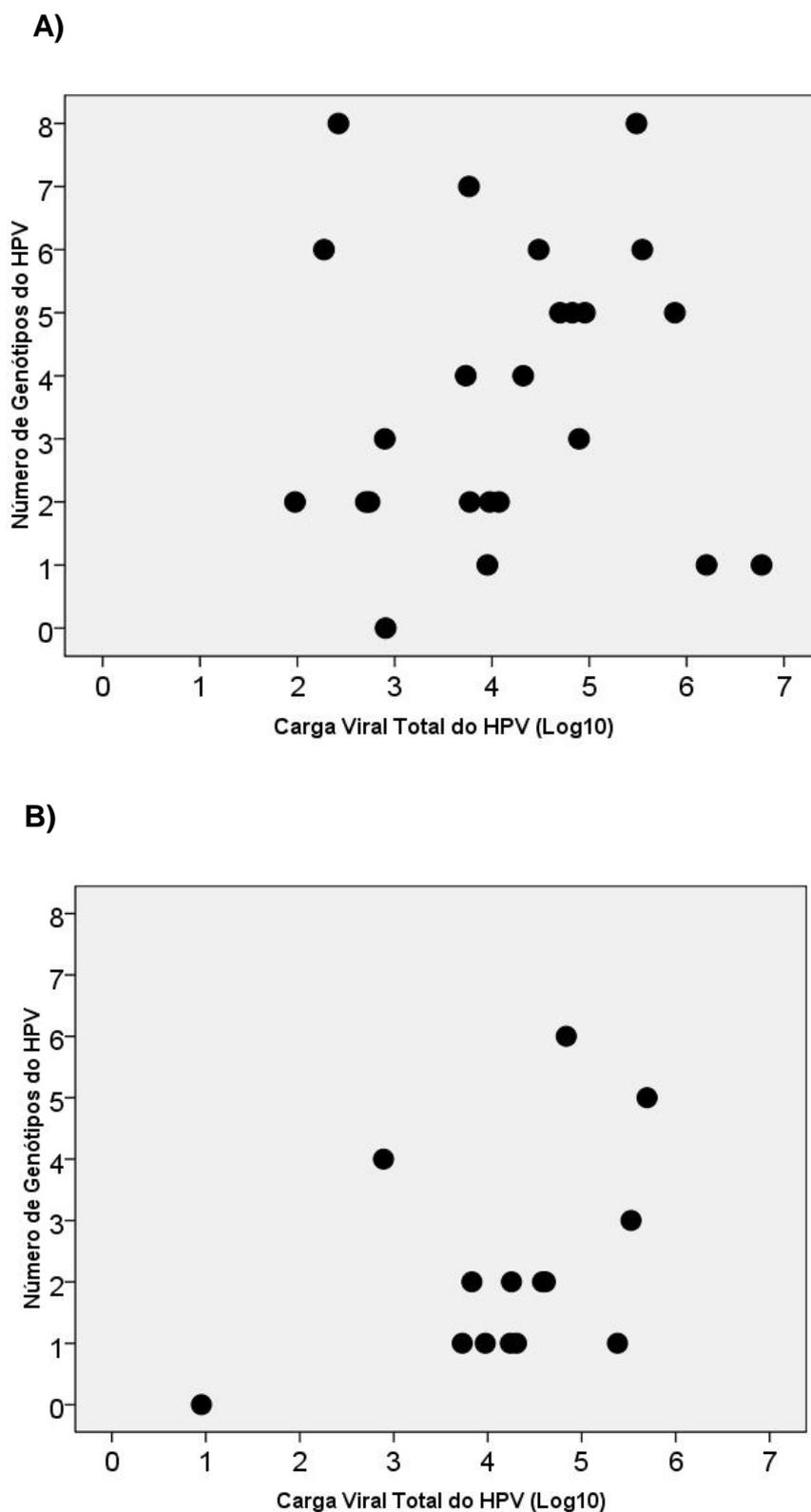


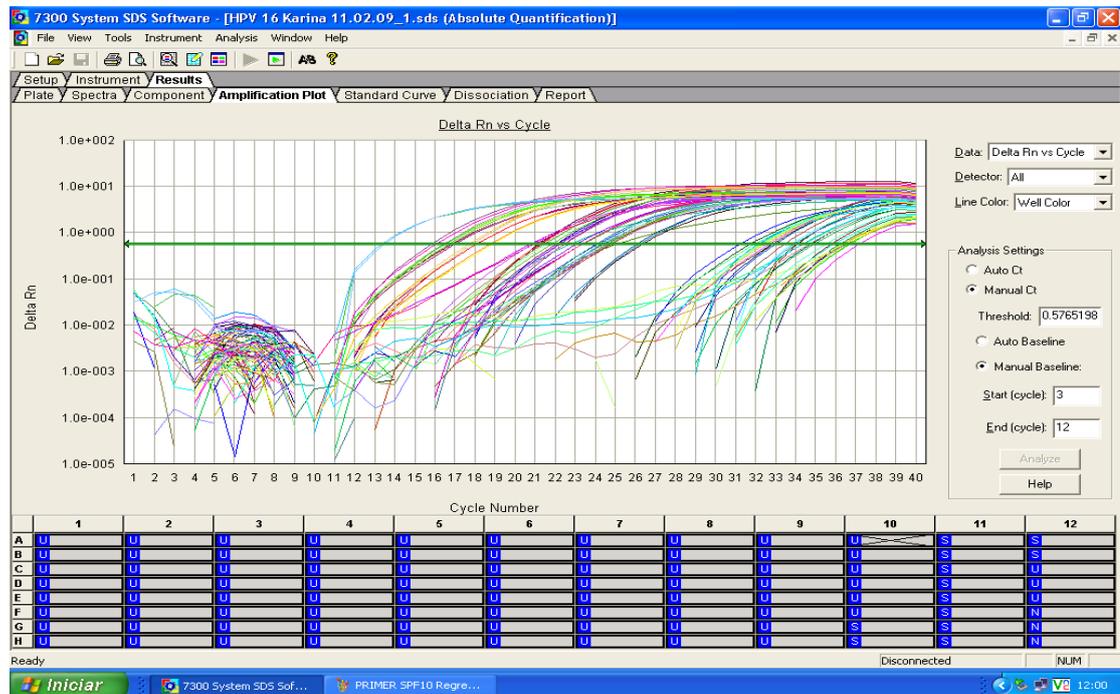
Figura 21 - Relação entre carga viral total do HPV e números de genótipos por grupos de idade em mulheres com LIAG. A) mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos B) mulheres com idade igual ou superior a 35 anos.

6.6 Análise da carga viral do HPV 16

A figura 22, na próxima página, demonstra a imagem da análise da carga viral do HPV 16 pela técnica PCR em Tempo Real e a curva padrão gerada a partir do DNA extraído de células CasKi (600 cópias do HPV 16).

A distribuição da carga viral do HPV 16 por classificação histopatológica está descrita na tabela 8. No grupo sem LIAG, a carga viral para HPV 16 foi indetectável em 83,0% (39/47) das amostras. A média da carga viral do HPV 16 foi $0,53 \pm 1,18 \log_{10}$ cp/10⁴ células. No grupo com LIAG, cinco amostras (12,2% - 5/41) tiveram carga viral indetectável para HPV 16. A média de carga viral em mulheres com NIC 2 foi $2,75 \pm 1,92 \log_{10}$ cp/10⁴ células, em mulheres com NIC 3 ou carcinoma, foi $3,47 \pm 1,40 \log_{10}$ cp/10⁴ células. Houve diferença estatística entre carga viral e os graus histopatológicos. Foi observado que quanto maior o grau da lesão, maior foi a carga viral para HPV 16 ($p < 0,01$). A distribuição das medianas e dispersão da carga viral específica do HPV 16 em mulheres com e sem LIAG está representada na figura 23.

A)



B)

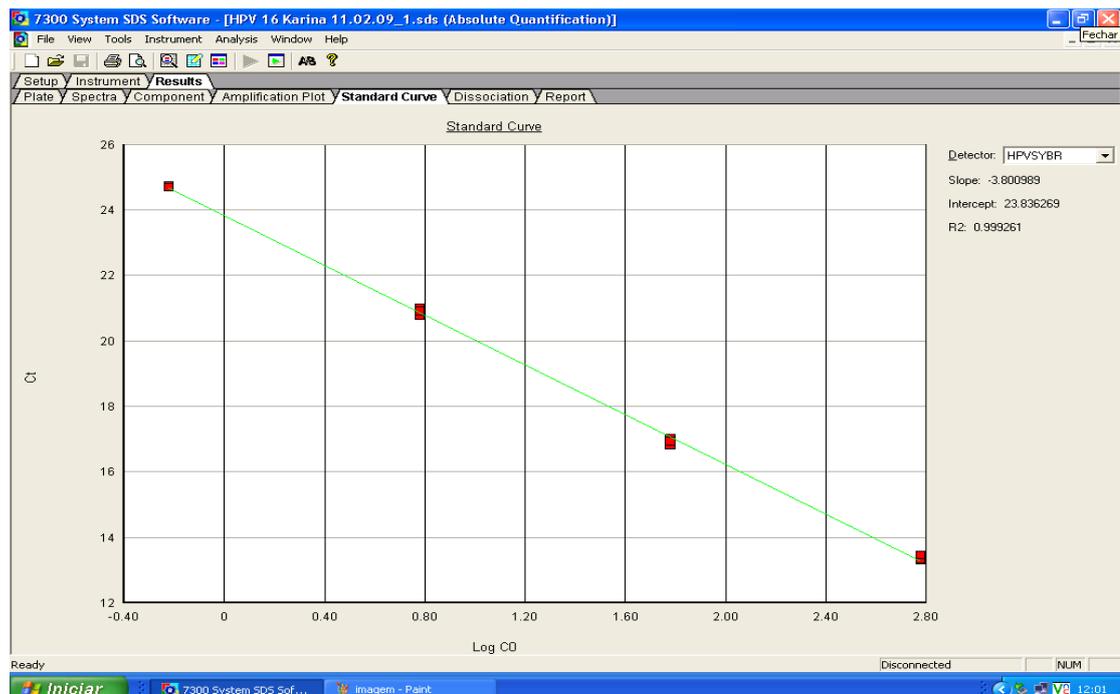


Figura 22 - Imagem da análise da carga viral do HPV 16 pela técnica PCR em Tempo Real. A) Corrida com as amostras do estudo. B) curva padrão gerada a partir do DNA extraído de células Caski.

Tabela 8 - Análise das médias, desvio padrão, limite inferior, superior, mínimo e máximo da carga viral do HPV 16 em \log_{10} cp/ 10^4 células em mulheres na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.

Anatomia Patológica	Valor Absoluto (n)	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior do IC 95%	Limite Superior do IC 95%	Mínimo	Máximo
< NIC 2	47	0,53	1,18	0,19	0,88	0,00	5,43
NIC 2	22	2,75	1,92	1,89	3,60	0,00	6,04
≥ NIC 3	19	3,47	1,40	2,80	4,15	0,09	4,74
Total	88	1,72	1,93	1,31	2,13	0,0	6,04

p < 0,01

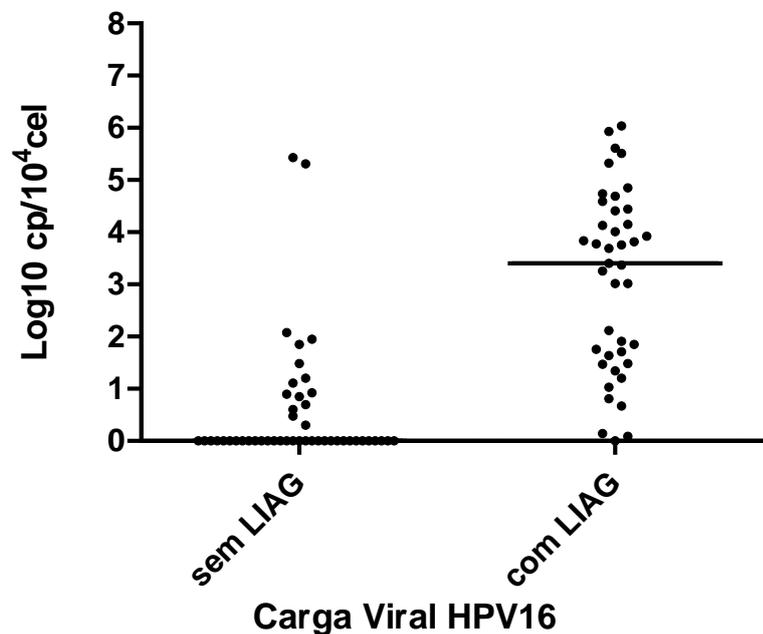


Figura 23 - Mediana e dispersão da carga viral específica do HPV 16 em mulheres sem e com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de Julho de 2006 a Janeiro de 2009.

A tabela 9 mostra a análise das médias, medianas e desvios padrões da carga viral do HPV 16 por grupo de idade em mulheres com LIAG. A média da carga viral para as mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos foi $1,72 \pm 1,86 \log_{10} \text{ cp}/10^4$ células, a mediana foi $1,20 \log_{10} \text{ cp}/10^4$ células. No grupo de mulheres com idade igual ou superior a 35 anos, a média da carga viral foi de $1,73 \pm 2,08 \log_{10} \text{ cp}/10^4$ células, a mediana foi $0,71 \log_{10} \text{ cp}/10^4$ células. Não houve diferença estatística em relação à análise da carga viral do HPV 16 entre os dois grupos de idade. A figura 24 mostra a distribuição das medianas e dispersão da carga viral específica do HPV 16 por grupo de idade em mulheres com LIAG.

Tabela 9 - Análise das médias, medianas e desvios padrões da carga viral do HPV 16 em \log_{10} cp/ 10^4 células por grupo de idade em mulheres com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.

<i>Grupo de Idade</i>	<i>Valor Absoluto (n)</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Mediana</i>
≤ 30 anos	26	1,72	1,86	1,20
≥ 35 anos	15	1,73	2,08	0,71

$p = 0,34$

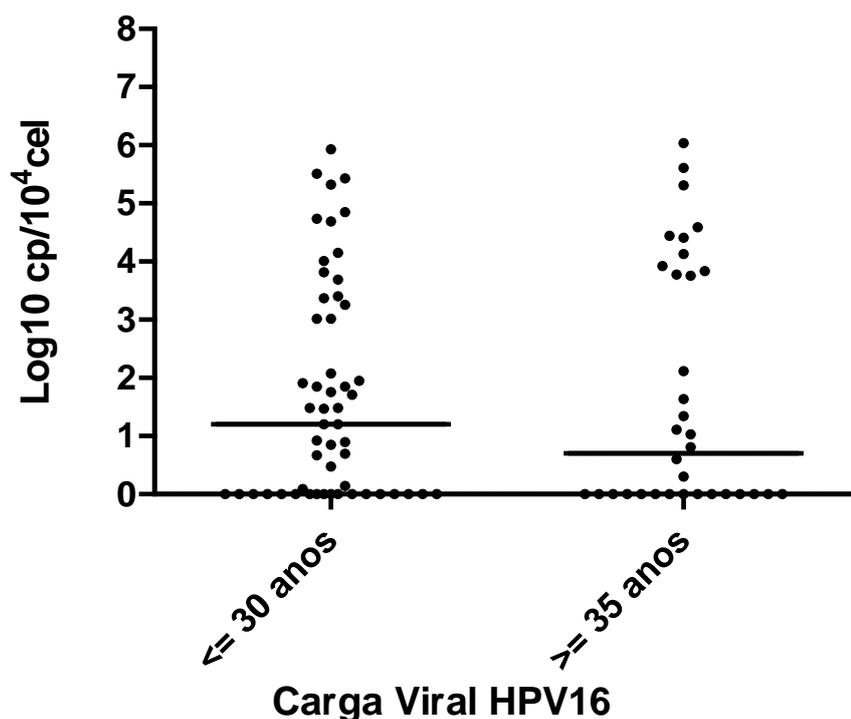


Figura 24 - Mediana e dispersão da carga viral específica do HPV 16 por grupo de idade em mulheres com LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de Julho de 2006 a Janeiro de 2009.

6.7 Desempenho dos Métodos Moleculares no Diagnóstico da LIAG

Foi avaliado o desempenho dos métodos moleculares LA, CH 2 e PCR em tempo real (RT-PCR) para carga viral total do HPV e específica para HPV 16. Foram analisadas a sensibilidade, especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN) de cada teste utilizando como “padrão ouro” o exame histopatológico. O *cut-off* utilizado para o método da CH 2 foi igual a 1pg/mL (segundo as especificações do fabricante) e para PCR em tempo real de $1 \log_{10} \text{ cp}/10^4 \text{ células}$ (limite de sensibilidade). Os testes LA, CH 2, RT-PCR para carga viral total e específica para HPV 16 apresentaram sensibilidades de: 95,0% (IC - 81,8% a 99,1%), 96,0% (IC - 77,7% a 99,8%), 90,2% e 87,8%, respectivamente, a melhor especificidade e VPP foi encontrada na RT-PCR para carga viral do HPV 16 (82,9% e 81,8%) (tabela 10).

Foi observado que das 41 pacientes com LIAG, apenas duas (4,9%) não tiveram o genótipo do HPV identificado pelo teste LA. A carga viral total foi negativa ($0,95 \log_{10} \text{ cp}/10^4 \text{ células}$) em uma das mulheres e positiva em outra e a carga viral específica para o HPV 16 foi positiva em ambas. Foi observado também que estas duas pacientes apresentaram positividade no teste da CH 2.

Tabela 10 - Análise do desempenho dos métodos moleculares no diagnóstico de LIAG na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009.

Método / Desempenho (%)	Linear Array	CH 2	RT-PCR CV TOTAL	RT-PCR CV HPV 16
Sensibilidade	95,0	96,0	90,2	87,8
Especificidade	23,3	63,9	44,6	82,9
VPP	53,5	64,9	58,7	81,8
VPN	83,3	95,8	84,0	88,6

VII DISCUSSÃO

Os programas de rastreamento do câncer de colo uterino baseados na avaliação de amostras citológicas têm reduzido a incidência e taxas de mortalidade do câncer cervical em países onde estes programas foram implementados há anos e de forma abrangente (Baseman e Koutsky, 2005). Existe uma grande preocupação com a melhoria destes programas desde que a colpocitologia oncótica vem sofrendo nos últimos anos uma série de críticas devido às taxas de resultados falso- negativos, que variam de 5% a 70%, e falso- positivos, de 10% a 30% (Santos *et al.*, 2003). Apesar de critérios anátomo-patológicos para lesões cervicais serem bem estabelecidos (Reagan e Patten, 1962; Richart, 1973; Crum, 1997), existe variação significativa intra e interobservadores (Stoler e Schiffman, 2001; Franco, 2003). Quando se considera os dois métodos diagnósticos (citológico e histopatológico), a concordância entre eles é variável, sendo sua reprodutibilidade inferior a 60% (Moscicki, 2005). Neste estudo, a correlação entre o diagnóstico citológico e histopatológico foi de 46,6% (41/88). Valor semelhante (49% e 50%) foi encontrado por Heatley e Bury e por Lonky *et al.* (Heatley e Bury, 1998; Lonky *et al.*, 1999). No Brasil, outros autores encontraram melhor correlação cito-histológica, variando de 53,3% a 63,8% (Collaço *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2003; Junior *et al.*, 2004; Monteiro *et al.*, 2006).

Neste trabalho, visando corroborar o diagnóstico histopatológico de LIAG foi realizada a técnica de IHQ para p16^{INK4a}. Estudos têm demonstrado que a expressão desta proteína tem sido associada com LIAG e câncer cervical, enquanto em tecidos normais e nas LIBG sua expressão é, geralmente, negativa ou baixa (Sano *et al.*, 1998; Sano *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2003; Cuzick *et al.*, 2006; Lakshmi *et al.*, 2009). O presente estudo demonstrou que em 100% das NIC 2, NIC 3 e carcinomas houve expressão desta proteína, estando de acordo com o descrito por outros autores (Murphy *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2005; Queiroz *et al.*, 2006b; Yildiz *et al.*, 2007; Godoy *et al.*, 2008; Schledermann *et al.*, 2008; Lakshmi *et al.*, 2009). Não foi observada associação estatisticamente significante entre intensidade da expressão da p16^{INK4a} e os graus histopatológicos de LIAG, em concordância com os resultados encontrados por Queiroz *et al.* e por Godoy *et al.* (Queiroz *et al.*, 2006a; Godoy *et al.*, 2008). Houve expressão moderada e forte em 86,4% das amostras com NIC 2, em 95,2% das NIC 3 e em 100% dos carcinomas. Apesar da p16^{INK4a} estar expressa em 100% das pacientes com LIAG, em duas amostras não foi possível a identificação do genótipo do HPV pela técnica Linear Array. Uma possível explicação para este fato é que estas duas amostras poderiam conter genótipos não identificados por esta técnica. A IHQ para p16^{INK4a} pode ser considerada um bom marcador no auxílio do diagnóstico histopatológico das LIAGs, principalmente em casos duvidosos.

O câncer cervical é a segunda causa mais comum de morte por câncer em mulheres em todo mundo, sendo mais freqüente em países em desenvolvimento. Virtualmente, o DNA do HPV pode ser detectado em todos os casos de carcinomas invasivos, entretanto, apenas a infecção pelo HPV não é suficiente para o desenvolvimento do câncer, sendo necessários outros co-fatores (Bosch e de Sanjose, 2003). No presente estudo foram analisadas algumas características sócio-demográficas e de comportamento sexual nos dois grupos de mulheres com diagnóstico de LIAG (com idade igual ou inferior a 30 anos e com idade igual ou superior a 35 anos), tais como: escolaridade, tabagismo, uso de ACO, idade do início da atividade sexual (sexarca), número total de parceiros, paridade e DSTs. Dentre os co-fatores analisados, o nível de escolaridade, o uso de ACO e a paridade diferiram entre os dois grupos analisados. O nível de escolaridade foi maior no grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos (85%) do que no grupo com idade igual ou superior a 35 anos (20%). Este fato representa um maior grau de instrução das mulheres mais jovens, talvez refletido no maior acesso a informações sobre o uso de ACO, fato observado em mais da metade (54,2%) das mulheres deste grupo; em mulheres com idade igual ou superior a 35 anos, apenas 13,3% faziam uso de ACO. Em relação à paridade, no grupo com idade igual ou superior a 35 anos, 80% das mulheres tinham 3 ou mais filhos, contrastando com o grupo com idade igual ou inferior a 30 anos no qual não foi observado nenhuma mulher com 3 ou mais filhos. Como eventos que, naturalmente, se acumulam ao longo da vida das mulheres, espera-se realmente que mulheres mais velhas tenham uma

história reprodutiva mais rica revelada por um número maior de gestações em relação a mulheres mais jovens. Outra explicação possível é como as mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos tinham um maior nível de escolaridade, o acesso a informações sobre planejamento familiar e a própria busca em um mercado de trabalho mais exigente, pode ter feito com que estas mulheres tenham retardado o desejo de ter filhos.

Já está bem estabelecido que a infecção pelo HPV seja um evento comum em mulheres jovens e a maioria regride espontaneamente. Entretanto, vários estudos têm relatado um aumento na incidência de LIE em adolescentes e mulheres jovens com idade até 30 anos. Em 1977, Hein *et al.* já haviam observado o desenvolvimento de LIE em adolescentes com menos de dois anos de história de atividade sexual (Hein *et al.*, 1977). Utagawa *et al.* estudando a prevalência LIE em adolescentes e mulheres adultas na cidade de São Paulo, observaram que durante o período de nove anos (1987-1995) as LIE triplicaram no grupo de mulheres adultas e quase quadruplicaram no grupo de adolescentes estudadas, sugerindo a inclusão de adolescentes sexualmente ativas em programas de rastreamento cervical (Utagawa *et al.*, 1998). Monteiro *et al.* em um estudo sobre a incidência e tipos de alterações citopatológicas cervicais em adolescentes acompanhadas em serviço público entre 1993 e 2002 no Rio de Janeiro, demonstraram que a incidência de alterações citopatológicas é alta no início da atividade sexual, observaram ainda que 57% dos casos de LIAG ocorreram nos primeiros dois anos de atividade sexual, sugerindo com isso,

ser importante a inclusão das adolescentes sexualmente ativas no Programa de Controle do Câncer de Colo Uterino (Monteiro *et al.*, 2006). Coppell *et al.* observaram um aumento na incidência de LIAG entre pacientes com 20 a 34 anos de idade, sugerindo também que o rastreamento deveria ser mais freqüente no grupo de mulheres jovens (Coppell *et al.*, 2000). Moscicki *et al.* em um estudo de acompanhamento de adolescentes e mulheres jovens, observaram que a maioria das mulheres jovens (60% a 75%) que apresentaram positividade para HPV eliminaram o vírus em 20 a 30 meses, entretanto, 33 mulheres evoluíram para LIAG (Moscicki *et al.*, 1998). Em um estudo realizado por Koutsky *et al.* foi encontrada uma incidência cumulativa de 28% de LIAG em mulheres positivas para DNA-HPV depois de dois anos de seguimento (Koutsky *et al.*, 1992). No leste da Inglaterra, foi observada uma incidência muito alta de NIC 3/ Carcinoma *in situ* em mulheres jovens entre 20 e 30 anos (> 400 por 100.000), na Islândia, também foi observada uma incidência bastante alta de NIC 3 nesta mesma faixa etária (> 600 por 100.000) (Bosch e de Sanjose, 2003). No presente estudo, foi observada uma maior prevalência de LIAG no grupo de mulheres com idade inferior a 30 anos (63,4%) em relação ao grupo de mulheres com idade igual ou superior a 35 anos (36,6%), estando de acordo com os estudos anteriormente citados. Este aumento crescente no diagnóstico de lesões precursoras do colo uterino em mulheres adolescentes e muito jovens parece ser multifatorial, e pode ser atribuído à imaturidade do sistema imunológico sistêmico e local (Trato Genital Inferior), incluindo a falta de secreção de progesterona cíclica na puberdade como resultado de ciclos

anovulatórios, imaturidade do colo uterino, caracterizado exposição do epitélio cilíndrico na ectocérvice com conseqüente metaplasia, ao número de parceiros sexuais, à precocidade da primeira relação sexual, a baixa incidência de métodos de barreira e pela elevada prevalência da infecção pelo HPV neste grupo de idade (Moscicki *et al.*, 1998; Ludicke *et al.*, 2001; Kahn *et al.*, 2002; Kjaer *et al.*, 2002; Longatto-Filho *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005; Moscicki, 2005; Wright *et al.*, 2005). Em 2005, Winer *et al.* observaram que metade dos casos de NIC 2 e NIC 3 confirmados pela biópsia ocorreram em até 14 meses da infecção incidente por HPV, dando suporte a hipótese de que as LIAG são frequentemente uma manifestação precoce da infecção pelo HPV em mulheres jovens, contrariando a teoria de que seja necessário ocorrer infecção prolongada para a progressão de LIAG (Winer *et al.*, 2005). O presente estudo corrobora esta hipótese que talvez possa explicar a alta ocorrência de LIAG confirmada pelo exame histopatológico em mulheres jovens. Parece existir nas adolescentes, um aumento da suscetibilidade da cérvice uterina à infecção pelo HPV, fato este relacionado à presença de um percentual maior de células metaplásicas no colo uterino em relação a mulheres adultas. As células metaplásicas possuem elevada taxa de mitose, sendo capazes de dar suporte à replicação do HPV (Moscicki, 2005). Além disso, a menor produção de muco cervical, que pode atuar como uma barreira protetora contra agentes infecciosos, associada a uma maior área de ectopia cervical em adolescentes, são fatores biológicos de risco para infecção pelos agentes patogênicos, inclusive o HPV. A deficiência da resposta imune também pode favorecer estas infecções (Longatto-Filho *et*

al., 2003). Entretanto, Wright *et al.* demonstraram que o padrão de desenvolvimento das LIAGs é similar entre adolescentes e adultos (Wright *et al.*, 2005). Em 2008, Pedrosa *et al.* demonstraram no Rio de Janeiro, a presença de LIAG em 0,8% das adolescentes estudadas (Pedrosa *et al.*, 2008). Na literatura, este percentual varia de 0,3% a 1,3%. Essa variação possivelmente é consequência das características da população avaliada nos estudos, da diversidade das técnicas de coleta utilizadas e, sobretudo, da diferença nos critérios diagnósticos entre laboratórios.

Utilizando a técnica Linear Array para detecção dos genótipos do HPV, este estudo mostrou que 92,7% das pacientes com LIAG foram HPV positivas. No grupo sem LIAG a positividade para HPV foi de 70,2%. A alta porcentagem de amostras positivas para HPV em amostras com LIAG está de acordo com Milutin Gasperov *et al.* que também encontraram uma alta positividade (86,7%) para HPV em amostras de mulheres com LIAG em Zagreb, Croácia e com estudos de meta-análise por todo o mundo (Clifford *et al.*, 2003b; Smith *et al.*, 2007; Milutin Gasperov *et al.*, 2008). O Linear Array é uma técnica de genotipagem que possui uma alta sensibilidade e reprodutibilidade na identificação dos genótipos do HPV (Campos *et al.*, 2005; van Hamont *et al.*, 2006). Os métodos de genotipagem são essenciais no entendimento da prevalência, co-infecção com outros genótipos, persistência, detecção de novas infecções, re-infecções e desenvolvimento de vacinas. Além disso, é possível correlacionar o (s) genótipo (s) detectado (s) com carga viral e grau ou risco de progressão da lesão. Ensaio com

sensibilidades altas para diferentes genótipos co-existentes podem ser utilizados para averiguar a hipótese de que a infecção por múltiplos genótipos está associada com o risco aumentado de LIE na mesma amostra cervical (Coutlee *et al.*, 2006; Gillio-Tos *et al.*, 2006). Contudo, a utilidade prática da genotipagem para rastreamento e estimativa de risco irá depender não somente da performance clínica dos testes como também do custo-benefício (Castle *et al.*, 2008b). Deve-se ressaltar, que o Linear Array é concebido pelo fabricante (Roche) como um teste a ser utilizado após a detecção do HPV em um exame de triagem para qual o fabricante tem o kit Amplicor HPV.

Diferentemente das LIBGs, o desenvolvimento das LIAGs requer infecção persistente pelo HPV (Moscicki *et al.*, 1998). A persistência da infecção por grupos oncogênicos do HPV é capaz de interferir no controle da replicação celular, acarretando modificações intra-epiteliais que podem originar alterações neoplásicas ou invasoras. Dos tipos oncogênicos, o HPV 16 parece ser o mais persistente e é responsável por 40 a 60% dos carcinomas invasivos em todo mundo (Munoz *et al.*, 2003), seguido pelo HPV 18 (10 a 12%), HPV 31 (4%) e 45 (5%) (Bosch e de Sanjose, 2003). Rodriguez *et al.* em um estudo de acompanhamento por mais de 10 anos em Guanacaste, Costa Rica, observaram que a persistência pelo HPV 16 pode causar um desenvolvimento precoce de NIC 3 em mulheres jovens (Rodriguez *et al.*, 2007). No presente estudo, foi observada a prevalência do HPV 16 em todos os graus histopatológicos. De acordo com Yoshida *et al.*, o

HPV 16 é o genótipo mais freqüentemente detectado entre os genótipos oncogênicos em LIE de mulheres jovens, sugerindo que a infecção pelo HPV 16 é um fator de risco importante para LIAG, mesmo em pacientes com idade menor que 30 anos (Yoshida *et al.*, 2008). Porras *et al.* em um estudo recente na Costa Rica, compararam os genótipos de HPV entre mulheres jovens e mulheres mais velhas com LIAG e observaram que as LIAGs em mulheres jovens estavam mais significativamente associadas ao HPV 16 do que em mulheres mais velhas, sugerindo ser o HPV 16 mais carcinogênico do que os outros genótipos de HPV (Porras *et al.*, 2009).

No presente estudo, os cinco genótipos mais prevalentes nas 41 pacientes com LIAG, em ordem decrescente foram: HPV 16, HPV 35, HPV 56, HPV 45 e HPV 70. Smith *et al.* em um estudo de meta-análise com 7.094 casos de LIAG e 14.595 casos de carcinomas cervicais invasivos, demonstraram que os cinco genótipos mais prevalentes em mulheres com LIAG foram: HPV 16, HPV 31, HPV 33, HPV 58, HPV 18 (Smith *et al.*, 2007). No presente estudo, o HPV 18 foi encontrado em apenas 7,5% das amostras com LIAG. Este resultado foi abaixo do esperado, visto que este genótipo juntamente com o HPV 16 é responsável por cerca de 70% dos carcinomas cervicais em todo mundo. Entretanto, um estudo de meta-análise realizado por Clifford *et al.* demonstrou que a distribuição entre carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma varia significativamente, com o HPV 16 predominando nos carcinomas escamosos e o HPV 18 nos adenocarcinomas; as razões para esta especificidade ainda são desconhecidas (Bosch e de Sanjose, 2003; Clifford *et al.*, 2003a). Neste

estudo, foi encontrado o predomínio do HPV 31 em relação ao HPV 18, fato também observado por Cuschieri *et al.* (Cuschieri *et al.*, 2004). O HPV 70 foi achado inesperadamente em um percentual alto em LIAG, além de ser encontrado em associação com o HPV 16 em um dos carcinomas. Este achado está de acordo com Sabol *et al.* que também encontraram este genótipo em uma frequência alta em amostras com LIAG (Sabol *et al.*, 2008). Este genótipo é considerado como não oncogênico, todavia, maiores estudos epidemiológicos são necessários para talvez possibilitar sua classificação entre os genótipos oncogênicos. No presente estudo, o HPV 45 foi encontrado entre os cinco genótipos mais prevalentes, estando de acordo com a literatura, que descreve este genótipo sendo um dos cinco mais comuns em carcinomas cervicais invasivos (de Sanjose *et al.*, 2007).

Neste estudo, os genótipos mais prevalentes nas 47 mulheres sem LIAG em ordem decrescente foram: HPV 16, HPV 31, HPV 56, HPV 61 e HPV CP6108. Dentre estas pacientes, 36 tiveram diagnóstico histopatológico de cervicite crônica ou metaplasia escamosa e 11 apresentaram diagnóstico histopatológico de LIBG. Clifford *et al.* demonstraram que os genótipos mais prevalentes em mulheres com LIBG foram: HPV 16, HPV 31, HPV 51, HPV 53, HPV 56, HPV 52, HPV 18, HPV 66, HPV 56 e HPV 58 (Clifford *et al.*, 2003b). Os três genótipos mais frequentes do presente estudo estão de acordo com esta meta-análise anteriormente citada. De Sanjose *et al.* em outro estudo de meta-análise, demonstraram que no mundo todo, os genótipos mais prevalentes em mulheres com diagnóstico citológico normal foram: HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 58 e HPV 52, demonstrando que o

HPV 16 é o mais frequente mesmo em mulheres sem anormalidades citológicas (de Sanjose *et al.*, 2007). No Brasil, existem poucos trabalhos que avaliaram a distribuição genotípica de HPVs utilizando os métodos mais apropriados, baseados em PCR e hibridização reversa. Em um estudo conduzido por Queiroz *et al.* em Salvador, Bahia, foram selecionadas 55 pacientes com ZTA e resultado citológico negativo para neoplasia ou com algum grau de atipia. Deste total, 20 pacientes eram HIV positivos e 35 HIV negativos; foi demonstrado que os genótipos mais prevalentes em pacientes HIV negativos foram o HPV 16, 58, 52, 31, 6 e 53 (Queiroz *et al.*, 2004). Estes resultados diferem em relação aos do presente estudo, exceto para a detecção do HPV 16, genótipo mais prevalente a nível mundial. Uma possível explicação para este fato é que foram utilizados ensaios diferentes para detecção dos genótipos, além disso, a população alvo daquele estudo também foi distinta. No Rio Grande do Sul, Paesi *et al.* avaliaram 256 mulheres com diagnóstico citológico anormal e observaram a prevalência dos seguintes genótipos: HPV 16, HPV 58, HPV 33, HPV 11 e HPV 18 (Paei *et al.*, 2009). No Rio de Janeiro, Oliveira *et al.* detectaram a prevalência do HPV 16, HPV 6, HPV 18, HPV 11, HPV 35, HPV 58 e HPV 33 em 238 mulheres atendidas no Serviço de Patologia Cervical do Hospital Universitário em Niterói (Oliveira *et al.*, 2008). Em 2006, Tozetti *et al.* demonstraram que os genótipos mais prevalentes em 87 mulheres atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, foram: HPV 6/11, HPV 66, HPV 45, HPV 18 e HPV 16, sendo este último, o sexto genótipo mais prevalente (Tozetti *et al.*, 2006). Rabelo-Santos *et al.*

observaram em Goiânia, a prevalência do genótipo HPV 16, seguido pelo HPV 33, HPV 18 e HPV 31 em 74 amostras de LIAG e câncer invasivo (Rabelo-Santos *et al.*, 2003). Em um estudo conduzido nos EUA, Wheeler *et al.* demonstraram que os genótipos predominantes em carcinomas invasivos foram: HPV 16, HPV 18 e HPV 45; em carcinomas *in situ*, os genótipos predominantes foram: HPV 16, HPV 31 e HPV 33 (Wheeler *et al.*, 2009). Na Itália, Gargiulo *et al.* encontraram a prevalência do HPV 16 em 61,2% das amostras, seguido pelo HPV 52, HPV 18 e HPV 31 em mulheres com diagnóstico citológico anormal (Gargiulo *et al.*, 2007). Em um estudo recente no Japão, Chan *et al.* avaliando mulheres com carcinoma cervical escamoso, encontraram a prevalência do HPV 16 em 61,2% das amostras, seguido pelo HPV 18, HPV 52 e HPV 58, sugerindo que a distribuição dos genótipos pode mudar ao longo do tempo, mesmo na mesma área estudada (Chan *et al.*, 2009). O presente estudo corrobora a existência de variações regionais na distribuição tipo-específica de certos genótipos do HPV. Segundo Chan *et al.*, estas diferenças podem refletir uma tendência geográfica ao uso de ensaios para detecção deste vírus, variando a sensibilidade do teste para detectar um genótipo específico; entretanto, o conhecimento das discrepâncias na habilidade dos *primers* em amplificar certos genótipos, pode ser levado em consideração, mas não explica completamente as diferenças geográficas observadas em diversos estudos (Chan *et al.*, 2006; de Sanjose *et al.*, 2007).

Neste estudo foi detectada a presença de dois genótipos adicionais em mulheres sem LIAG: HPV 73 e HPV 61. O primeiro é considerado

oncogênico e o segundo não oncogênico. Em um estudo de meta-análise, Clifford *et al.* observaram que o HPV 73 foi o 16º genótipo mais prevalente em mulheres com carcinoma escamoso invasivo (Clifford *et al.*, 2003a). Este achado reforça a importância da vigilância dos genótipos, visto que em caso de persistência, poderá haver uma possível evolução para LIAG ou mesmo câncer invasivo. Existe uma expectativa que a introdução da vacinação possa provocar um aumento da prevalência destes genótipos hoje considerados raros, que ocupariam o “nicho” atualmente dominado pelo HPV 16 e os outros genótipos vacinais.

No presente estudo, observou-se que todas as mulheres com LIAG tinham pelo menos um genótipo oncogênico, independente da idade. De acordo com Schlecht *et al.*, as LIE persistem mais tempo e progridem mais rapidamente em mulheres com infecção por HPVs oncogênicos em relação a mulheres com infecções por genótipos não oncogênicos ou sem HPV (Schlecht *et al.*, 2003a). Kjaer *et al.* observaram que a infecção pelos HPVs oncogênicos é um bom preditor para o desenvolvimento subsequente de LIAG em mulheres jovens (Kjaer *et al.*, 2002).

Um fato interessante observado neste estudo foi a alta taxa de infecção múltipla tanto no grupo de mulheres com LIAG (76,3%) como no grupo sem LIAG (66,7%), estes resultados estão de acordo com Rousseau *et al.* que demonstraram uma alta prevalência de co-infecção entre mulheres com anormalidades citológicas (Rousseau *et al.*, 2003). Estudos longitudinais mostram que a ocorrência de mais de um genótipo do HPV é

um fato comum e que ocorre mais frequentemente do que o esperado (Woodman *et al.*, 2007). Fife *et al.* observaram uma alta prevalência de infecção múltipla (85,3%) em mulheres com LIE e sugeriram que os genótipos de HPV 51, 52, 56 e 58 estão entre os que podem contribuir com o HPV 16 para produzir LIE ou câncer (Fife *et al.*, 2001). No Brasil, estudos relatam prevalências de infecções múltiplas por HPV variando de 5,1% a 33,4% (Eluf-Neto *et al.*, 1994; Campos *et al.*, 2005; Tozetti *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008; Paesi *et al.*, 2009). Todavia, esta prevalência aumenta para em torno de 50% em indivíduos HIV positivos (Levi *et al.*, 2002; Queiroz *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2005). Vale ressaltar que estas diferentes prevalências das infecções múltiplas estão relacionadas com a técnica utilizada em cada trabalho e na escolha do perfil da população a ser estudada.

A relação entre infecção por múltiplos genótipos e risco para LIE é muito controversa na literatura. Alguns autores têm relatado que infecções por múltiplos genótipos de HPV estão associadas a um maior risco de progressão da doença ou LIE (Morrison *et al.*, 1991; Sasagawa *et al.*, 2001; Bachtiry *et al.*, 2002; van der Graaf *et al.*, 2002; Sabol *et al.*, 2008); enquanto outros autores não têm observado aumento no risco de LIE ou câncer cervical entre mulheres com infecções por múltiplos genótipos de HPV em relação aquelas que têm infecção por um só genótipo (Herrero *et al.*, 2000; Bosch *et al.*, 2002; Gargiulo *et al.*, 2007). Alguns genótipos de HPV podem interagir ou atuar sinergisticamente no desenvolvimento ou progressão da lesão (Trottier *et al.*, 2006). Na literatura, há uma falta de

consenso sobre a extensão e implicações das infecções por múltiplos genótipos do HPV. Estudos de história natural mostram um risco aumentado para aquisição de novos genótipos do HPV em mulheres já infectadas comparando-as com aquelas que são HPV negativas (Liaw *et al.*, 2001; Rousseau *et al.*, 2001). Segundo Woodman *et al.*, a detecção seqüencial de novos genótipos do HPV poderia ser um resultado da aquisição de diferentes parceiros sexuais, embora a transmissão por um mesmo parceiro não possa ser excluída, apesar de parecer improvável (Woodman *et al.*, 2007). Uma explicação alternativa, é que mais de um genótipo de HPV poderia ter sido transmitido simultaneamente e que sua detecção seqüencial pode ser uma consequência de ciclos de vida independentes. Se a co-infecção confere algum benefício de sobrevivência mútua, então a eliminação de um dos genótipos do HPV poderia ter um efeito benéfico inesperado na história natural dos outros.

No presente trabalho, foi detectada uma maior prevalência de infecção múltipla em mulheres com LIAG em relação ao grupo sem LIAG, observando-se que quanto maior foi o número de genótipos, maior foi a presença de LIAG. Estes resultados contrastam com os encontrados por outros autores que demonstraram que a infecção múltipla é mais freqüente entre mulheres com LIBG do que com LIAG (Rousseau *et al.*, 2003; Herrero *et al.*, 2005; Gargiulo *et al.*, 2007). Portanto, nossos dados corroboram a teoria de que a infecção múltipla confere um maior risco, ou é um marcador de LIAG.

Em relação aos genótipos oncogênicos do HPV, foi observado neste estudo que embora o grupo de mulheres com LIAG apresentasse um maior número destes genótipos quando comparado com o grupo sem LIAG, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Uma possível explicação pode ser devido ao fato do número de amostras neste estudo ter sido pequeno. Sasagawa et al. demonstraram que os genótipos oncogênicos incluídos nos casos de infecção múltipla, aumentaram de acordo com o grau das lesões cervicais (Sasagawa *et al.*, 2001).

No presente estudo, foi observada uma maior prevalência de infecção múltipla no grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos (87,5%) em relação ao grupo de mulheres com idade igual ou superior a 35 anos (52,2%). Este resultado está de acordo com Cuschieri *et al.* que demonstraram que a infecção múltipla é mais prevalente em mulheres mais jovens (Cuschieri *et al.*, 2004). Este fato pode provavelmente, deve estar associado há uma maior transmissão dos múltiplos genótipos do HPV através de uma maior atividade sexual. Entretanto, no que se refere a prevalência de infecção múltipla, estes autores encontraram uma prevalência menor (40,4%) em pacientes com LIAG do que a encontrada neste estudo.

No presente estudo, foi observada a presença de quatro carcinomas, três pertencentes ao grupo de mulheres com idade igual ou superior a 35 anos e um pertencente ao grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos. Nascimento *et al.* comparando a prevalência de alterações colposcópico-histológicas em adolescentes (13 a 19 anos) e mulheres jovens adultas

(20 a 24 anos) identificaram dois casos de carcinoma microinvasor, sendo um em cada grupo, e três casos de carcinoma invasor no grupo de mulheres jovens adultas (Nascimento *et al.*, 2005). Um relato de caso recente feito por Gonçalves *et al.* descreveu a ocorrência de carcinoma microinvasor do colo uterino em uma paciente de 14 anos de idade com menarca aos 10 anos e sexarca aos 12 anos (Goncalves *et al.*, 2009). O presente estudo está de acordo com estes dois trabalhos que demonstram que apesar do carcinoma de colo uterino ser um evento raro na adolescência e em mulheres jovens, a incidência de LIE é crescente em idades cada vez menores.

Todos os quatro carcinomas detectados no presente estudo continham o HPV 16 associado a algum dos outros tipos de HPV: HPV 45, HPV 56, HPV 70 e HPV 84. Este achado está de acordo com a literatura que relata ser o HPV 16 responsável por 40 a 60% dos casos de câncer no mundo (Bosch e de Sanjose, 2003). Em 2005, Schiffman *et al.* verificaram que um terço das mulheres com infecção persistente pelo HPV 16 desenvolvem NIC 3 ou câncer em cinco anos de seguimento (Schiffman *et al.*, 2005). Em um estudo de meta-análise, Clifford *et al.* demonstraram que o HPV 16 é o genótipo predominante nos carcinomas cervicais invasivos em todo o mundo, exceto na Ásia, onde os genótipos HPV 58 e HPV 52 foram os mais frequentes; os genótipos HPV 45, HPV 56 e HPV 70, ocuparam a 3^a, 10^a e 18^a posições na prevalência em carcinomas cervicais invasivos(Clifford *et al.*, 2003a); os dados no presente estudo estão de acordo com esta meta-análise, onde estes três genótipos também estavam associados aos carcinomas. O genótipo HPV 84 encontrado em associação

com o HPV 16 neste estudo é considerado de risco indeterminado para o câncer cervical. Gargiulo *et al.* demonstraram uma alta prevalência deste genótipo em amostras de câncer cervical, entretanto, devido ao pequeno tamanho amostral, futuras análises são necessárias para estabelecer o risco da associação deste genótipo (Gargiulo *et al.*, 2007).

Em suma, a escolha do método para genotipagem é essencial na identificação das infecções múltiplas. Utilizando-se metodologias mais sensíveis como a utilizada neste estudo, a probabilidade de detecção de múltiplos genótipos se torna maior. Esta informação é relevante devido ao fato de que genótipos-específicos do HPV podem proporcionar riscos relativos diferentes para o câncer. Além disso, a identificação dos genótipos do HPV que estão mais comumente associados ao câncer cervical em diferentes regiões, tem implicações nas estratégias de prevenção do câncer incluindo o desenvolvimento de novas vacinas.

A carga viral cérvico-vaginal do HPV tem sido proposta como um importante marcador para detecção de LIAG ou câncer (Gravitt *et al.*, 2007). Neste estudo, foi utilizada a PCR em tempo real para quantificação da carga viral do HPV. Esta técnica fornece medidas exatas do número de cópias iniciais do DNA alvo nas amostras medindo continuamente a fluorescência liberada durante a formação de produtos da PCR (Lefevre *et al.*, 2003). Para padronização, foram utilizados os *primers* SPF10 modificados que amplificam um fragmento de 65 pb da região L1 do HPV permitindo a identificação de cerca de 40 genótipos de HPV de acordo com Payan *et al.*

(2007). Foi demonstrada neste estudo, uma alta sensibilidade do teste ($1 \log_{10} \text{ cp}/10^4 \text{ células}$), estando de acordo com a encontrada por este mesmo autor (Payan *et al.*, 2007). No presente estudo, a carga viral total foi indetectável em 21 amostras no grupo sem LIAG e em quatro amostras no grupo com LIAG. Este fato pode ter ocorrido devido à baixa quantidade de cópias do vírus. A média da carga viral total no grupo sem LIAG foi $1,99 \pm 2,18 \log_{10} \text{ cp}/10^4 \text{ células}$; no grupo com LIAG, a média para NIC 2 foi $4,03 \pm 1,54 \log_{10} \text{ cp}/10^4 \text{ células}$ e para NIC 3 ou carcinoma a média foi $3,70 \pm 1,65 \log_{10} \text{ cp}/10^4 \text{ células}$, observando-se diferença estatisticamente significativa nos valores de carga viral total entre os grupos com e sem LIAG. Andersson *et al.* encontraram valores de carga viral para HPVs oncogênicos em NIC 1 de $0,82 \log_{10} \text{ cp}/\text{células}$; em NIC 2 de $1,05 \log_{10} \text{ cp}/\text{células}$ e para NIC 3, de $0,69 \log_{10} \text{ cp}/\text{células}$ (Andersson *et al.*, 2005). Estes autores não encontraram diferença estatisticamente significativa entre as médias de carga viral entre os 3 graus de NIC, discordando dos achados do presente estudo. Entretanto, Broccolo *et al.* em um estudo transversal realizado na Itália, observaram associação entre aumento da carga viral total e severidade das lesões, estando de acordo com os dados obtidos neste estudo (Broccolo *et al.*, 2009).

No presente estudo, observou-se que a carga viral total não diferiu entre os dois grupos de idade com LIAG. Xu *et al.* em um estudo comparando carga viral e LIAG demonstraram que em pacientes jovens (≤ 22 anos) a carga viral foi mais alta do que em mulheres mais velhas, diferindo dos resultados encontrados neste estudo (Xu *et al.*, 2009). No

presente estudo, foi observada associação entre número de genótipos e carga viral total apenas no grupo de mulheres sem LIAG. Comparando por grupo de idade, não foi observada uma associação entre número de genótipos e carga viral total em mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos. No grupo de mulheres com idade igual ou superior a 35 anos, houve tendência à associação. Schlecht *et al.* demonstraram que entre as mulheres HPV positivas, a carga viral parece ter efeito na incidência das LIBGs e LIAGs e é independente do grupo de idade e do genótipo do HPV (Schlecht *et al.*, 2003b).

Em relação à carga viral específica para HPV 16, foi observado que no grupo sem LIAG, a carga viral foi indetectável em 83% das amostras. Este fato pode ter ocorrido devido à baixa quantidade de cópias do vírus presente nas amostras em que este genótipo foi encontrado. A média da carga viral foi $0,53 \pm 1,18 \log_{10} \text{ cp}/10^4$ células. Em mulheres com LIAG, a média de carga viral do HPV 16 em mulheres com NIC 2 foi $2,75 \pm 1,92 \log_{10} \text{ cp}/10^4$ células, em mulheres com NIC 3 ou carcinoma, foi $3,47 \pm 1,40 \log_{10} \text{ cp}/10^4$ células. Broccolo *et al.* encontraram uma média de carga viral do HPV 16 de $4,38 \log_{10} \text{ cp}/10^4$ células em mulheres com LIAG, valor um pouco acima do encontrado neste estudo (Broccolo *et al.*, 2009). Hesselink *et al.* encontraram uma mediana de 5 cp/células, equivalente a $4,70 \log_{10} \text{ cp}/10^4$ células, para HPV 16 em pacientes com \geq NIC 2 (Hesselink *et al.*, 2009). Pretet *et al.* encontraram valores de cargas virais variando de $5,6 \times 10^3$ a $8,4 \times 10^7$ cp/mL e demonstraram que cargas virais mais altas que 10^7 cp/mL

podem contribuir para evolução de NIC 2 e NIC 3, este valor é correspondente a 100 pg/mL no teste da Captura Híbrida 2 (Pretet *et al.*, 2004). Peitsaro *et al.* observaram que a rápida progressão, em 1 ou 2 anos, de lesões sem NIC ou NIC 2 para NIC 3, esteve associada com uma alta carga viral de formas integradas do HPV (Peitsaro *et al.*, 2002). Foi observado no presente estudo, que no grupo com LIAG cinco amostras tiveram carga viral indetectável para HPV 16, sendo que duas delas tiveram o genótipo HPV 16 identificado pela técnica Linear Array. Este fato pode ter ocorrido pelo baixo número de cópias do vírus nestas duas amostras.

Estudos recentes têm sugerido que a carga viral do HPV, especialmente do HPV 16, pode ser um possível biomarcador molecular na história natural da infecção pelo HPV. O presente estudo corrobora os achados de vários autores que têm demonstrado uma associação entre aumento da carga viral do HPV 16 e aumento da severidade das LIE cervicais (Ylitalo *et al.*, 2000; Peitsaro *et al.*, 2002; van Duin *et al.*, 2002; Dalstein *et al.*, 2003; Schlecht *et al.*, 2003b; Moberg *et al.*, 2004; Moberg *et al.*, 2005; Carcopino *et al.*, 2006; Cricca *et al.*, 2007; Gravitt *et al.*, 2007; Saunier *et al.*, 2008; Xi *et al.*, 2008). Entretanto, outros estudos não têm observado esta associação (Andersson *et al.*, 2005; Castle *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2006). A comparação direta entre os trabalhos realizados para determinação da carga viral do HPV é complexa, pois, ainda não existe um procedimento padronizado da técnica de PCR em tempo real. Três situações são relevantes: A) a origem do material é diferente nos diversos trabalhos B) diferentes métodos para detecção do HPV, são utilizados: PCR MY09/11

seguido por ELISA, *Nested* PCR, PCR em tempo real utilizando SYBR Green, PCR em tempo real utilizando TaqMan e PCR em tempo real consenso. C) os resultados são expressos de diferentes formas: cópias por células, cópias por ng de DNA, cópias por mL e qualitativamente. Desta forma, o valor da carga viral calculado é provavelmente dependente dos procedimentos utilizados para quantificar o DNA do HPV e ainda está restrita a laboratórios de pesquisa; o valor do *cut-off* precisa ser definido (Franco e Coutlee, 2009). Isso pode explicar a grande variação dos valores obtidos para um dado grau de lesão em diferentes estudos (Saunier *et al.*, 2008). Além disso, grande parte dos estudos que relata a quantificação da carga viral é do tipo caso-controle ou transversal, incluindo o nosso; em ambos os modelos o tempo de aquisição e a duração da infecção pelo HPV não pode ser determinado, limitando a associação entre carga viral e desenvolvimento da LIE cervical (Flores *et al.*, 2006). Neste estudo não foi observada diferença estatística entre carga viral do HPV 16 e os dois grupos de idade com LIAG, estando de acordo com os resultados encontrados por Tabora *et al.* e Yoshida *et al.* (Tabora *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2008).

Em suma, a padronização dos procedimentos de carga viral para HPV com um painel de controle é necessária para uma melhor comparação entre os diferentes estudos (Quint *et al.*, 2006; Saunier *et al.*, 2008). Até o momento, não é possível afirmar se cargas virais mais altas são a causa ou a consequência do desenvolvimento de LIAGs e de acordo com os dados deste e de outros estudos, não há diferença na carga viral de LIAGs em

mulheres mais jovens e mais velhas, não sendo este o fator que leva ao raro desenvolvimento de LIAGs em jovens.

Avaliando o desempenho dos métodos moleculares no diagnóstico de LIAG, foi observado que os testes moleculares LA, CH2, RT-PCR para carga viral total e específica para HPV 16, apresentaram sensibilidades elevadas: 95,0% (IC - 81,8% a 99,1%), 96,0% (IC - 77,7% a 99,8%), 90,2% e 87,8%, respectivamente. Sarian *et al.* avaliando o desempenho da carga viral do HPV por CH 2 na detecção de LIAGs em 309 mulheres com resultados anormais na colpocitologia oncológica, observaram uma sensibilidade de 90%, especificidade de 49%, VPP de 68% e VPN de 81% no ponto de corte de 1 RLU (Sarian *et al.*, 2003). Pretet *et al.* avaliando a carga viral por CH 2 e RT-PCR encontraram uma boa correlação entre estas duas técnicas (Pretet *et al.*, 2004). De Antonio *et al.* comparando a performance dos testes LA e CH 2 para detecção de HPVs oncogênicos em 218 amostras cervicais, encontraram uma concordância de 91,3% entre os métodos, indicando que ambos são sensíveis para detecção do HPV em amostras cervicais, fato também observado neste estudo (de Antonio *et al.*, 2008).

Interessantemente no presente estudo, duas mulheres com diagnóstico histopatológico de cervicite crônica apresentaram positividade para todos os métodos moleculares analisados; este fato chama a atenção para a necessidade de acompanhamento destas mulheres que provavelmente terão grandes chances de desenvolver NIC.

Em duas pacientes com LIAG, o genótipo do HPV não foi identificado pelo teste LA, entretanto, nos outros métodos moleculares foi observado positividade, com exceção da carga viral total que foi negativa ($0,95 \log_{10}$ cp/ 10^4 células) em uma das pacientes; porém este valor ficou muito próximo do limite de detecção do teste ($1 \log_{10}$ cp/ 10^4 células). Este fato deve ter ocorrido, provavelmente, a uma falha de detecção do vírus pelo teste LA.

Concluindo, enquanto os métodos LA e a CH2 foram mais sensíveis no diagnóstico de LIAG, a RT-PCR apresentou melhor especificidade. O real valor deles na prática clínica, só poderá ser validado em estudos com um número maior de pacientes.

VIII CONCLUSÕES

- A concordância entre os exames citológicos e histopatológicos foi de 46,6%;
- Dentre os co-fatores analisados, a escolaridade, o uso de anticoncepcional oral e paridade diferiram nos dois grupos de idade com LIAG;
- A IHQ para p16^{INK4a} pode ser considerada um bom marcador no auxílio do diagnóstico histopatológico das LIAGs;
- Foi observada uma maior prevalência de LIAG em mulheres mais jovens;
- Os genótipos mais prevalentes nas mulheres com LIAG foram: HPV 16, HPV 35, HPV 56, HPV 45 e HPV 70; no grupo sem LIAG foram: HPV 16, HPV 31, HPV 56, HPV 61 e HPV CP6108;
- A carga viral total foi maior em mulheres com LIAG em relação a mulheres sem LIAG;
- Houve associação entre aumento da carga viral específica para HPV 16 e aumento da severidade das lesões intra-epiteliais;
- A carga viral total e específica do HPV 16 não diferiram entre os dois grupos de idade com LIAG;
- Os métodos LA e a CH2 foram mais sensíveis no diagnóstico de LIAG e a RT-PCR apresentou melhor especificidade.

IX ANEXOS

ANEXO A

Universidade Federal da Bahia
Hospital Universitário Prof. Edgard Santos

Serviço de Infectologia/Laboratório de Retrovirus
 Serviço de Ginecologia/Laboratório de Citopatologia
 Rua João das Botas, s/n - Canela 40110-160 Salvador - Bahia - Brasil
 Tel.: (71) 3339-6210 FAX: (71) 3247-2756 e-mail - labretro@hupes.ufba.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Participação em Protocolo de Pesquisa

A. Propósito e Revisão Geral

Os pesquisadores Conceição Queiroz, Karina Serravalle, André Ramos e Ana Gabriela Travassos do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Adriana Bruno e Rosana Almeida da Clínica IDEM e José Eduardo Levi, da Universidade de São Paulo, estão desenvolvendo uma pesquisa denominada: **“Influência da carga viral do HPV e de co-fatores epidemiológicos no desenvolvimento de lesão intra-epitelial de alto grau em mulheres jovens em Salvador, Bahia.”** A infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) não é suficiente para causar câncer, sendo necessários outros fatores, como a idade, número de parceiros sexuais, idade da primeira relação sexual, fumo e outras doenças, em particular, causada pelo HIV. É conhecido que a infecção pelo HPV em mulheres abaixo de 30 anos seja passageira, entretanto, algumas destas pacientes progredem para lesão de alto grau, provavelmente devido à associação com outros co-fatores. Nossa hipótese é que mulheres com idade abaixo de 30 anos que desenvolvam lesão de alto grau tenham infecção por alguns tipos virais que causam o câncer e nelas a carga viral possa estar elevada, com maior persistência, aliados a outros co-fatores. Este trabalho tem como objetivo principal comparar o tipo de HPV e a carga viral das pacientes com idade abaixo de 30 anos, que apresentem diagnóstico de lesão de alto grau, com aquelas acima desta faixa etária. Para tanto, vamos analisar amostras do colo do seu útero e amostras de sangue.

B. Procedimentos

Caso concorde em participar desta pesquisa terei uma amostra de 5 mL, aproximadamente 01 colher de sopa, do meu sangue colhida através de punção venosa, utilizando material estéril, para a realização do exame que irá detectar o vírus HIV e raspado do útero utilizando escova estéril para exames relacionados ao objetivo que vamos investigar.

C. Riscos e Desconfortos

Nenhuma intervenção que ameace a minha vida será feita. Apenas a retirada do sangue, cujo risco é mínimo e inclui desconforto temporário da picada de agulha e queimor, raramente hematoma e infecção e o procedimento de raspado cervical habitualmente utilizado no exame para prevenção do câncer de colo de útero. As medidas habituais para as coletas serão tomadas para que isso não aconteça.

D. Benefícios

Este estudo não prevê benefícios diretos para você. No entanto, esperamos que as informações provenientes deste, ajudem no tratamento de futuros pacientes.

E. Custos

Não haverá nenhum custo relacionado à participação no estudo. Desta forma, não pagarei por nenhum procedimento usado neste protocolo. Da mesma forma, não pagarei pelos exames que serão feitos já que parte dos mesmos são proporcionados pela própria instituição responsável.

F. Reembolso

Não receberei nenhum reembolso por participar nesse protocolo de pesquisa.

G. Confidencialidade

O sigilo e a confidencialidade dos dados serão garantidos pelo investigador

H. Questões

Recebi informações suficientes para participar deste estudo, explicada por _____, e quaisquer de minhas perguntas me foram respondidas. Caso tenha alguma dúvida a respeito desta pesquisa devo entrar em contato com os Biólogos Karina Serravalle (71) 8864-1037, André Ramos no número (71) 3339-6347 ou Dra. Conceição Queiroz (71) 9967-8869. Se persistirem minhas dúvidas, poderei entrar em contato com o Dr. Antônio Barata, coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Clímério de Oliveira/UFBA, pelo telefone (71) 3203-2740.

I. Consentimento

Minha participação neste estudo é voluntária e eu posso me recusar a participar ou me retirar a qualquer momento, sem penalidades, sem afetar meu atendimento presente ou futuro no hospital, ou sem perda dos benefícios aos quais, de outra forma, teria direito. Eu recebi uma cópia deste consentimento.

Caso concorde em participar deste protocolo de pesquisa, devo assinar abaixo:

Data	Paciente
Data	Pessoa que obteve o consentimento
Data	Testemunha

ANEXO B

1

DATA:

A. IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____ Nº. estudo: _____
 DN: / / Idade: Cor: E. civil: Naturalidade: REGISTRO: _____
 Escolaridade: Profissão: Ocupação: _____
 Endereço: _____ TEL: _____

B. GINECOLOGIA

Queixa:

HMA:

Menarca: Ciclos posteriores: Ciclos atuais: U.M:

Primeiro coito: Orgasmo: Nº parceiros: No último ano:

Frequência coital: Coito anal:

Método anticoncepcional:

Uso de preservativo: Antes: Nunca: Ocasional: Sempre: Atualmente:

Gesta: Para: Aborto: Espontâneo: Provocado:

Parto normal: Cesareana: 1º parto: Último:

Aleitamento:

Tabagismo: Quantidade:

Drogas:

Transfusão de sangue e derivados:

Doenças anteriores:

DST:

Cirurgias:

C. DADOS DO PARCEIRO

Portador do HIV () AIDS () Não sabe () Óbito ().....

Usuário de drogas ().....Bissexual ()

D. DADOS SOBRE A PROLE

HIV () AIDS () Não sabe ()

DADOS CLINICO-LABORATORIAIS;

Portador do HIV () AIDS () Diagnóstico Elisa () em _____ confirmado:

Infecção oportunista:

Outras patologias associadas:

Internamentos:

Medicamentos:

EXAME GINECOLÓGICO

EXAMES COMPLEMENTARES (Data, método)

ANEXO C

**Universidade Federal da Bahia**

Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos
Rua Augusto Viana, s/n - Canela - CEP: 40.110-060 - Salvador - Bahia
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP
Tel.: (71) 3339-6394 FAX: (71) 3339-6228

PARECER

Protocolo CEP: 001/2007

FR: 123815

Projeto de Pesquisa: "Projeto HPV-Bahia: Estudo Prospectivo de pacientes com lesão intra-epitelial e câncer cervical utilizando biomarcadores em mulheres no Estado da Bahia."

Pesquisador Responsável: Profa. Conceição Maria Passos de Queiroz

O projeto é classificado na área de Ciências da Saúde, grupo I e tem como objetivos: Testar novo sistema de coleta de amostra cervical e validar marcadores biológicos no diagnóstico de lesões pré-cancerosas do colo uterino, identificar os genótipos e a carga viral de HPV, descrever o perfil epidemiológico da população estudada (em particular, verificar as possíveis causas de Lesão Intra-Epitelial de Alto Grau, NIC2 e NIC3, em paciente abaixo de 30 anos de idade)

A pesquisadora propõe um estudo multicêntrico com início previsto para abril de 2007 envolvendo uma amostragem de 300 mulheres a serem identificadas em diversos. Ambulatórios de patologia Cervical do Estado da Bahia. A estrutura do protocolo apresenta boa revisão de literatura sobre a relevância do tema e a utilidade de se realizar este estudo. Mostra-se bastante detalhado nas explicações de como será efetuada a pesquisa e a preocupação com o compromisso de manter sigilo acerca de dados pessoais obtidos.

O parecer é que trata-se de projeto bem elaborado, eticamente adequado e de grande relevância científica, não envolvendo riscos relevantes aos participantes.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado

Salvador, 09 de abril de 2007.

Maria Cristina T. Cangussu
Dr.ª Maria Cristina Teixeira Cangussu
Coordenadora do Comitê de Ética do Complexo HUPES

ANEXO D

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 05/12/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 1044/07, intitulado: "COMPARAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE HPV EM MULHERES NA FAIXA ETÁRIA MENOR QUE 30 E MAIOR QUE 35 ANOS COM LESÃO INTRA-EPITELIAL DE ALTO GRAU." apresentado pelo Departamento de Moléstias Infecciosas, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dr. José Eduardo Levi**

Pesquisador (a) Executante: **Karina Serravalle**

CAPPesq, 07 de Dezembro de 2007



Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovidio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

X REFERÊNCIAS

Andersson, S., H. Safari, M. Mints, I. Lewensohn-Fuchs, U. Gyllensten e B. Johansson. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer*. 2005, 92(12):2195-200.

Anttila, T., P. Saikku, P. Koskela, A. Bloigu, J. Dillner, I. Ikaheimo, E. Jellum, M. Lehtinen, P. Lenner, T. Hakulinen, A. Narvanen, E. Pukkala, S. Thoresen, L. Youngman e J. Paavonen. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA*. 2001, 285(1):47-51.

Bachtiary, B., A. Obermair, B. Dreier, P. Birner, G. Breitenecker, T. H. Knocke, E. Selzer e R. Potter. Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Int J Cancer*. 2002, 102(3):237-43.

Bafverstedt, B. Condylomata acuminata--past and present. *Acta Derm Venereol*. 1967, 47(5):376-81.

Barron, B. A. e R. M. Richart. A statistical model of the natural history of cervical carcinoma based on a prospective study of 557 cases. *J Natl Cancer Inst*. 1968, 41(6):1343-53.

Baseman, J. G. e L. A. Koutsky. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005, 32 Suppl 1(S16-24).

Bernard, H. U., S. Y. Chan, M. M. Manos, C. K. Ong, L. L. Villa, H. Delius, C. L. Peyton, H. M. Bauer e C. M. Wheeler. 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.

Bernard, H. U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005, 32 Suppl 1(S1-6).

Bosch, F. X., M. M. Manos, N. Munoz, M. Sherman, A. M. Jansen, J. Peto, M. H. Schiffman, V. Moreno, R. Kurman e K. V. Shah. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995, 87(11):796-802.

Bosch, F. X., A. Lorincz, N. Munoz, C. J. Meijer e K. V. Shah. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002, 55(4):244-65.

Bosch, F. X. e S. De Sanjose. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003, 31):3-13.

Boyer, S. N., D. E. Wazer e V. Band. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* 1996, 56(20):4620-4.

Bradbeer, C. Is infection with HIV a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia? *Lancet*. 1987, 2(8570):1277-8.

Broccolo, F., S. Chiari, A. Piana, P. Castiglia, T. Dell'anna, R. Garcia-Parra, A. Maneo, A. Villa, E. B. Leone, P. Perego, A. Maida, C. Mangioni e C. E. Cocuzza. Prevalence and viral load of oncogenic human papillomavirus types associated with cervical carcinoma in a population of North Italy. *J Med Virol*. 2009, 81(2):278-87.

Brown, D. R., M. L. Shew, B. Qadadri, N. Neptune, M. Vargas, W. Tu, B. E. Juliar, T. E. Breen e J. D. Fortenberry. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis*. 2005, 191(2):182-92.

Bustin, S. A. A-Z of Quantitative PCR. California. 2006

Campos, R. R., V. H. Melo, D. M. Castilho e P. F. N. Cynthia. Prevalence of human papillomavirus and its genotypes in the uterine cervix of HIV-infected and non-infected women. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005, 27(5):248-56.

Carcopino, X., M. Henry, D. Benmoura, A. S. Fallabregues, H. Richet, L. Boubli e C. Tamalet. Determination of HPV type 16 and 18 viral load in cervical smears of women referred to colposcopy. *J Med Virol*. 2006, 78(8):1131-40.

Castellsague, X., F. X. Bosch e N. Munoz. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res*. 2002, 89(2):191-9.

Castellsague, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008, 110(3 Suppl 2):S4-7.

Castle, P. E., M. Schiffman, R. D. Burk, S. Wacholder, A. Hildesheim, R. Herrero, M. C. Bratti, M. E. Sherman e A. Lorincz. Restricted cross-reactivity of hybrid capture 2 with nononcogenic human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002, 11(11):1394-9.

Castle, P. E., M. Schiffman, D. R. Scott, M. E. Sherman, A. G. Glass, B. B. Rush, J. E. Schussler, S. Wacholder e A. T. Lorincz. Semiquantitative human papillomavirus type 16 viral load and the prospective risk of cervical precancer and cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005, 14(5):1311-4.

Castle, P. E., J. Dockter, C. Giachetti, F. A. Garcia, M. K. McCormick, A. L. Mitchell, E. B. Holladay e D. P. Kolk. A cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer. *Clin Cancer Res.* 2007, 13(9):2599-605.

Castle, P. E., P. E. Gravitt, D. Solomon, C. M. Wheeler e M. Schiffman. Comparison of linear array and line blot assay for detection of human papillomavirus and diagnosis of cervical precancer and cancer in the atypical squamous cell of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion triage study. *J Clin Microbiol.* 2008a, 46(1):109-17.

Castle, P. E., C. Porras, W. G. Quint, A. C. Rodriguez, M. Schiffman, P. E. Gravitt, P. Gonzalez, H. A. Katki, S. Silva, E. Freer, L. J. Van Doorn, S.

Jimenez, R. Herrero e A. Hildesheim. Comparison of two PCR-based human papillomavirus genotyping methods. *J Clin Microbiol.* 2008b, 46(10):3437-45.

Cavalcanti, S. M., F. C. Deus, L. G. Zardo, I. C. Frugulhetti e L. H. Oliveira. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil: a retrospective study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996, 91(4):433-40.

United States Cancer Statistics. C. D. C. P.-. Cdc. 2005.

Chan, P. K., T. H. Cheung, A. O. Tam, K. W. Lo, S. F. Yim, M. M. Yu, K. F. To, Y. F. Wong, J. L. Cheung, D. P. Chan, M. Hui e M. Ip. Biases in human papillomavirus genotype prevalence assessment associated with commonly used consensus primers. *Int J Cancer.* 2006, 118(1):243-5.

Chan, P. K., W. C. Ho, M. Y. Yu, W. M. Pong, A. C. Chan, A. K. Chan, T. H. Cheung, M. C. Wong, K. F. To e H. K. Ng. Distribution of human papillomavirus types in cervical cancers in Hong Kong: current situation and changes over the last decades. *Int J Cancer.* 2009, 125(7):1671-7.

Chow, L. T. e T. R. Broker. In vitro experimental systems for HPV: epithelial raft cultures for investigations of viral reproduction and pathogenesis and for genetic analyses of viral proteins and regulatory sequences. *Clin Dermatol.* 1997, 15(2):217-27.

Chow, V. T., E. Loh, W. M. Yeo, S. Y. Tan e R. Chan. Identification of multiple genital HPV types and sequence variants by consensus and nested type-specific PCR coupled with cycle sequencing. *Pathology*. 2000, 32(3):204-8.

Clifford, G. M., J. S. Smith, M. Plummer, N. Munoz e S. Franceschi. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003a, 88(1):63-73.

Clifford, G. M., J. S. Smith, T. Aguado e S. Franceschi. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003b, 89(1):101-5.

Collaço, L. M., F. F. Tuon, M. F. Soares, J. Totsugui, L. F. Torres e A. P. Pinto. Correlação cito-histológica em 326 pacientes submetidas a cirurgia a de alta frecuencia (CAF) no programa de Prevenção de Câncer Ginecológico do Estado do Paraná. *J Bras Patol*. 2000, 36(191-7).

Coppell, K., C. Paul e B. Cox. An evaluation of the National Cervical Screening Programme Otago site. *N Z Med J*. 2000, 113(1104):48-51.

Coutlee, F., D. Rouleau, P. Petignat, G. Ghattas, J. R. Kornegay, P. Schlag, S. Boyle, C. Hankins, S. Vezina, P. Cote, J. Macleod, H. Voyer, P. Forest, S. Walmsley e E. Franco. Enhanced detection and typing of human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGM1 primers and the Linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol*. 2006, 44(6):1998-2006.

Cricca, M., A. M. Morselli-Labate, S. Venturoli, S. Ambretti, G. A. Gentilomi, G. Gallinella, S. Costa, M. Musiani e M. Zerbini. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecol Oncol.* 2007, 106(3):549-57.

Crum, C. P. C., E.S.; Lee, K. R. . Pathology of Early Cervical Neoplasia. Comtemporary Issues in Surgical Pathology. New York. 1997. 288 p.

Cuschieri, K. S., H. A. Cubie, M. W. Whitley, A. L. Seagar, M. J. Arends, C. Moore, G. Gilkisson e E. Mcgoogan. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol.* 2004, 57(1):68-72.

Cuzick, J., M. H. Mayrand, G. Ronco, P. Snijders e J. Wardle. Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening. *Vaccine.* 2006, 24 Suppl 3(S3/90-7).

Dalstein, V., D. Riethmuller, J. L. Pretet, K. Le Bail Carval, J. L. Sautiere, J. P. Carbillet, B. Kantelip, J. P. Schaal e C. Mouglin. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer.* 2003, 106(3):396-403.

Dalstein, V., S. Merlin, C. Bali, M. Saunier, R. Dachez e C. Ronsin. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J Virol Methods.* 2009, 156(1-2):77-83.

De Antonio, J. C., A. Fernandez-Olmos, M. Mercadillo, M. L. Lindemann e F. B. Mochales. Detection of high-risk human papillomavirus by two molecular techniques: hybrid capture and linear array. *J Virol Methods*. 2008, 149(1):163-6.

De Roda Husman, A. M., J. M. Walboomers, A. J. Van Den Brule, C. J. Meijer e P. J. Snijders. 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 (Pt 4)(1057-62.

De Sanjose, S., M. Diaz, X. Castellsague, G. Clifford, L. Bruni, N. Munoz e F. X. Bosch. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007, 7(7):453-9.

De Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard e H. Zur Hausen. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004, 324(1):17-27.

Deacon, J. M., C. D. Evans, R. Yule, M. Desai, W. Binns, C. Taylor e J. Peto. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer*. 2000, 83(11):1565-72.

Dockter, J., A. Schroder, C. Hill, L. Guzinski, J. Monsonego e C. Giachetti. Clinical performance of the APTIMA HPV Assay for the detection of high-risk HPV and high-grade cervical lesions. *J Clin Virol*. 2009, 45 Suppl 1(S55-61.

Doorbar, J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005, 32 Suppl 1(S7-15).

Duensing, S. e K. Munger. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer.* 2004, 109(2):157-62.

Durst, M., L. Gissmann, H. Ikenberg e H. Zur Hausen. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983, 80(12):3812-5.

Eluf-Neto, J., M. Booth, N. Munoz, F. X. Bosch, C. J. Meijer e J. M. Walboomers. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer.* 1994, 69(1):114-9.

Fife, K. H., H. M. Cramer, J. M. Schroeder e D. R. Brown. Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. *J Med Virol.* 2001, 64(4):550-9.

Flores, R., M. Papenfuss, W. T. Klimecki e A. R. Giuliano. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2006, 118(5):1187-93.

Franco, E. L. Chapter 13: Primary screening of cervical cancer with human papillomavirus tests. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003, 31):89-96.

Franco, E. L. e F. Coutlee. Prognostic value of measuring load of human papillomavirus DNA in cervical samples: an elusive target. *J Natl Cancer Inst.* 2009, 101(3):131-3.

Frazer, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2004, 4(1):46-54.

Gargiulo, F., M. A. De Francesco, C. Schreiber, G. Ciravolo, F. Salinaro, B. Valloncini e N. Manca. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res.* 2007, 125(2):176-82.

Giannini, S. L., E. Hanon, P. Moris, M. Van Mechelen, S. Morel, F. Dessy, M. A. Fourneau, B. Colau, J. Suzich, G. Losonksy, M. T. Martin, G. Dubin e M. A. Wettendorff. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine.* 2006, 24(33-34):5937-49.

Gillio-Tos, A., L. De Marco, V. Ghisetti, P. J. Snijders, N. Segnan, G. Ronco e F. Merletti. Human papillomavirus typing with GP5+/6+ polymerase chain reaction reverse line blotting and with commercial type-specific PCR kits. *J Clin Virol.* 2006, 36(2):126-32.

Godoy, A. E., J. Mandelli, F. H. Oliveira, S. Calegari, L. B. Moura e E. P. Serafini. p16INK4 expression in precursor lesions of squamous cell cervical cancer related to the presence of HPV-DNA. *Braz J Med Biol Res.* 2008, 41(7):583-8.

Goldschmidt, H. e A. M. Kligman. Experimental inoculation of humans with ectodermotropic viruses. *J Invest Dermatol.* 1958, 31(3):175-82.

Goncalves, C. V., S. M. Quintana, A. C. Marcolin, G. Duarte, J. S. Costa, F. Karam e M. S. Bianchi. Microinvasive carcinoma of the uterine cervix in a 14-year-old adolescent: case report and literature review. *Sao Paulo Med J.* 2009, 127(2):105-7.

Gravitt, P. E., C. L. Peyton, R. J. Apple e C. M. Wheeler. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol.* 1998, 36(10):3020-7.

Gravitt, P. E., C. L. Peyton, T. Q. Alessi, C. M. Wheeler, F. Coutlee, A. Hildesheim, M. H. Schiffman, D. R. Scott e R. J. Apple. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000, 38(1):357-61.

Gravitt, P. E., R. D. Burk, A. Lorincz, R. Herrero, A. Hildesheim, M. E. Sherman, M. C. Bratti, A. C. Rodriguez, K. J. Helzlsouer e M. Schiffman. A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003, 12(6):477-84.

Gravitt, P. E., M. B. Kovacic, R. Herrero, M. Schiffman, C. Bratti, A. Hildesheim, J. Morales, M. Alfaro, M. E. Sherman, S. Wacholder, A. C. Rodriguez e R. D. Burk. High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int J Cancer*. 2007, 121(12):2787-93.

Guimaraes, M. C., M. A. Goncalves, C. P. Soares, J. S. Bettini, R. A. Duarte e E. G. Soares. Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Histochem Cytochem*. 2005, 53(4):509-16.

Harper, D. M., E. L. Franco, C. M. Wheeler, A. B. Moscicki, B. Romanowski, C. M. Roteli-Martins, D. Jenkins, A. Schuind, S. A. Costa Clemens e G. Dubin. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet*. 2006, 367(9518):1247-55.

Heatley, M. K. e J. P. Bury. The correlation between the grade of dyskaryosis on cervical smear, grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) on punch biopsy and the final histological diagnosis on cone biopsies of the cervix. *Cytopathology*. 1998, 9(2):93-9.

Hein, K., K. Schreiber, M. I. Cohen e L. G. Koss. Cervical cytology: the need for routine screening in the sexually active adolescent. *J Pediatr*. 1977, 91(1):123-6.

Herrero, R., A. Hildesheim, C. Bratti, M. E. Sherman, M. Hutchinson, J. Morales, I. Balmaceda, M. D. Greenberg, M. Alfaro, R. D. Burk, S. Wacholder, M. Plummer e M. Schiffman. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst.* 2000, 92(6):464-74.

Herrero, R., P. E. Castle, M. Schiffman, M. C. Bratti, A. Hildesheim, J. Morales, M. Alfaro, M. E. Sherman, S. Wacholder, S. Chen, A. C. Rodriguez e R. D. Burk. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis.* 2005, 191(11):1796-807.

Hesselink, A. T., J. Berkhof, D. A. Heideman, N. W. Bulkman, J. E. Van Tellingen, C. J. Meijer e P. J. Snijders. High-risk human papillomavirus DNA load in a population-based cervical screening cohort in relation to the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer.* 2009, 124(2):381-6.

Ho, G. Y., R. D. Burk, S. Klein, A. S. Kadish, C. J. Chang, P. Palan, J. Basu, R. Tachezy, R. Lewis e S. Romney. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1995, 87(18):1365-71.

Ho, G. Y., R. Bierman, L. Beardsley, C. J. Chang e R. D. Burk. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 1998, 338(7):423-8.

IARC, I. A. R. C.-. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, v.64. 1995

IARC, I. A. R. C.-. IARC Handbooks Cancer Prevention. Lyon, v.10. 2005. 302 p.

Iftner, T. e L. L. Villa. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003, 31):80-8.

INCA. Estimativa 2008. Incidência de Câncer no Brasil. I. N. D. Câncer. 2007.

Jones, D. L., R. M. Alani e K. Munger. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 1997, 11(16):2101-11.

Junior, J. E., J. R. Cavalcante, R. O. Santiago e D. S. Silvia. Citologia Oncótica, colpocópia e histologia no diagnóstico de lesões epiteliais do colo uterino. *NewsLab.* 2004, 126-32.

Kahn, J. A., S. L. Rosenthal, P. A. Succop, G. Y. Ho e R. D. Burk. The interval between menarche and age of first sexual intercourse as a risk factor for subsequent HPV infection in adolescent and young adult women. *J Pediatr.* 2002, 141(5):718-23.

Kjaer, S. K., A. J. Van Den Brule, G. Paull, E. I. Svare, M. E. Sherman, B. L. Thomsen, M. Suntum, J. E. Bock, P. A. Poll e C. J. Meijer. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *Bmj*. 2002, 325(7364):572.

Klaes, R., T. Friedrich, D. Spitkovsky, R. Ridder, W. Rudy, U. Petry, G. Dallenbach-Hellweg, D. Schmidt e M. Von Knebel Doeberitz. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*. 2001, 92(2):276-84.

Kleter, B., L. J. Van Doorn, J. Ter Schegget, L. Schrauwen, K. Van Krimpen, M. Burger, B. Ter Harmsel e W. Quint. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol*. 1998, 153(6):1731-9.

Koutsky, L. A., K. K. Holmes, C. W. Critchlow, C. E. Stevens, J. Paavonen, A. M. Beckmann, T. A. Derouen, D. A. Galloway, D. Vernon e N. B. Kiviat. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med*. 1992, 327(18):1272-8.

Kraus, I., T. Molden, R. Holm, A. K. Lie, F. Karlsen, G. B. Kristensen e H. Skomedal. Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 in the majority of cervical carcinomas. *J Clin Microbiol*. 2006, 44(4):1310-7.

Kurman, R. J., K. H. Shah, W. D. Lancaster e A. B. Jenson. Immunoperoxidase localization of papillomavirus antigens in cervical dysplasia and vulvar condylomas. *Am J Obstet Gynecol.* 1981, 140(8):931-5.

Lakshmi, S., P. Rema e T. Somanathan. p16ink4a is a surrogate marker for high-risk and malignant cervical lesions in the presence of human papillomavirus. *Pathobiology.* 2009, 76(3):141-8.

Lee, J. O., A. A. Russo e N. P. Pavletich. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature.* 1998, 391(6670):859-65.

Lefevre, J., C. Hankins, K. Pourreaux, H. Voyer e F. Coutlee. Real-time PCR assays using internal controls for quantitation of HPV-16 and beta-globin DNA in cervicovaginal lavages. *J Virol Methods.* 2003, 114(2):135-44.

Levi, J. E., B. Kleter, W. G. Quint, M. C. Fink, C. L. Canto, R. Matsubara, I. Linhares, A. Segurado, B. Vanderborght, J. E. Neto e L. J. Van Doorn. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2002, 40(9):3341-5.

Levi, J. E., S. Fernandes, A. F. Tateno, E. Motta, L. P. Lima, J. Eluf-Neto e C. S. Pannuti. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecol Oncol.* 2004, 92(1):225-31.

Leykauf, K., M. Salek, H. Schluter, W. D. Lehmann e A. Alonso. Identification of membrane proteins differentially expressed in human papillomavirus type 16 E5-transfected human keratinocytes by nanoelectrospray ionization mass spectrometry. *J Gen Virol.* 2004, 85(Pt 6):1427-31.

Liaw, K. L., A. Hildesheim, R. D. Burk, P. Gravitt, S. Wacholder, M. M. Manos, D. R. Scott, M. E. Sherman, R. J. Kurman, A. G. Glass, S. M. Anderson e M. Schiffman. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis.* 2001, 183(1):8-15.

Lie, A. K., B. Risberg, B. Borge, B. Sandstad, J. Delabie, R. Rimala, M. Onsrud e S. Thoresen. DNA- versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2005, 97(3):908-15.

Liu, X. S., I. Abdul-Jabbar, Y. M. Qi, I. H. Frazer e J. Zhou. Mucosal immunisation with papillomavirus virus-like particles elicits systemic and mucosal immunity in mice. *Virology.* 1998, 252(1):39-45.

Lo, K. W., S. W. Yeung, T. H. Cheung, N. S. Siu, T. Kahn e Y. F. Wong. Quantitative analysis of human papillomavirus type 16 in cervical neoplasm: a study in Chinese population. *J Clin Virol.* 2005, 34(1):76-80.

Longatto-Filho, A., D. Etlinfer, N. S. Gomes, S. V. Cruz e M. J. Cavaliere. Frequency of abnormal uterine cervix smears from adolescents and adult women:review of 308,630 cases. *Rev Inst. Adolfo Lutz.* 2003, 62(1):31-34.

Longworth, M. S. e L. A. Laimins. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004, 68(2):362-72.

Lonky, N. M., M. Sadeghi, G. W. Tsadik e D. Petitti. The clinical significance of the poor correlation of cervical dysplasia and cervical malignancy with referral cytologic results. *Am J Obstet Gynecol.* 1999, 181(3):560-6.

Lorincz, A. T. Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J Obstet Gynaecol Res.* 1996a, 22(6):629-36.

Lorincz, A. T. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1996b, 23(3):707-30.

Lorincz, A. T., P. E. Castle, M. E. Sherman, D. R. Scott, A. G. Glass, S. Wacholder, B. B. Rush, P. E. Gravitt, J. E. Schussler e M. Schiffman. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet.* 2002, 360(9328):228-9.

Lowy, D. R. e J. T. Schiller. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest.* 2006, 116(5):1167-73.

Ludicke, F., A. Stalberg, P. Vassilakos, A. L. Major e A. Campana. High- and intermediate-risk human papillomavirus infection in sexually active adolescent females. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2001, 14(4):171-4.

Maiman, M. Cervical neoplasia in women with HIV infection. *Oncology (Williston Park)*. 1994, 8(8):83-9; discussion 89, 93-4.

Manos, M. M., Y. Ting, D. K. Wright, A. J. Lewis, T. R. Broker e S. M. Wollnsky. Use of polimerase chain reaction amplification for the detection of Genital human papilloviruses. *Cancer Cell*. 1989, 7(209-14).

Mantovani, F. e L. Banks. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. 2001, 20(54):7874-87.

Massad, L. S., M. Schneider, H. Watts, T. Darragh, O. Abulafia, E. Salzer, L. I. Muderspach, M. Sidawy e S. Melnick. Correlating Papanicolaou Smear, Colposcopic Impression, and Biopsy: Results from the Women's Interagency HIV Study. *J Low Genit Tract Dis*. 2001, 5(4):212-218.

Massad, L. S. e Y. C. Collins. Strength of correlations between colposcopic impression and biopsy histology. *Gynecol Oncol*. 2003, 89(3):424-8.

Miller, A. B., S. Nazeer, S. Fonn, A. Brandup-Lukanow, R. Rehman, H. Cronje, R. Sankaranarayanan, V. Koroltchouk, K. Syrjanen, A. Singer e M. Onsrud. Report on consensus conference on cervical cancer screening and management. *Int J Cancer*. 2000, 86(3):440-7.

Milutin Gasperov, N., I. Sabol, M. Matovina, S. Spaventi e M. Grce. Detection and typing of human papillomaviruses combining different methods: polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, line probe assay and sequencing. *Pathol Oncol Res*. 2008, 14(4):355-63.

Moberg, M., I. Gustavsson e U. Gyllensten. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer*. 2004, 112(5):854-9.

Moberg, M., I. Gustavsson, E. Wilander e U. Gyllensten. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer*. 2005, 92(5):891-4.

Molden, T., J. F. Nygard, I. Kraus, F. Karlsen, M. Nygard, G. B. Skare, H. Skomedal, S. O. Thoresen e B. Hagmar. Predicting CIN2+ when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-proofer and consensus PCR: A 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. *Int J Cancer*. 2005, 114(6):973-6.

Molijn, A., B. Kleter, W. Quint e L. J. Van Doorn. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*. 2005, 32 Suppl 1(S43-51).

Monteiro, D. L., A. J. Trajano, K. S. Da Silva e F. B. Russomano. Pre-invasive cervical disease and uterine cervical cancer in Brazilian adolescents: prevalence and related factors. *Cad Saude Publica*. 2006, 22(12):2539-48.

Moreno, V., F. X. Bosch, N. Munoz, C. J. Meijer, K. V. Shah, J. M. Walboomers, R. Herrero e S. Franceschi. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002, 359(9312):1085-92.

Morrison, E. A., G. Y. Ho, S. H. Vermund, G. L. Goldberg, A. S. Kadish, K. F. Kelley e R. D. Burk. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int J Cancer*. 1991, 49(1):6-13.

Moscicki, A. B., S. Shiboski, J. Broering, K. Powell, L. Clayton, N. Jay, T. M. Darragh, R. Brescia, S. Kanowitz, S. B. Miller, J. Stone, E. Hanson e J. Palefsky. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr*. 1998, 132(2):277-84.

Moscicki, A. B., S. Shiboski, N. K. Hills, K. J. Powell, N. Jay, E. N. Hanson, S. Miller, K. L. Canjura-Clayton, S. Farhat, J. M. Broering e T. M. Darragh. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet*. 2004, 364(9446):1678-83.

Moscicki, A. B. Impact of HPV infection in adolescent populations. *J Adolesc Health*. 2005, 37(6 Suppl):S3-9.

Moscicki, A. B., M. Schiffman, S. Kjaer e L. L. Villa. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*. 2006, 24 Suppl 3(S3/42-51).

Mulvany, N. J., D. G. Allen e S. M. Wilson. Diagnostic utility of p16INK4a: a reappraisal of its use in cervical biopsies. *Pathology*. 2008, 40(4):335-44.

Munger, K., J. R. Basile, S. Duensing, A. Eichten, S. L. Gonzalez, M. Grace e V. L. Zacny. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*. 2001, 20(54):7888-98.

Munger, K., A. Baldwin, K. M. Edwards, H. Hayakawa, C. L. Nguyen, M. Owens, M. Grace e K. Huh. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004, 78(21):11451-60.

Munoz, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol*. 2000, 19(1-2):1-5.

Munoz, N., S. Franceschi, C. Bosetti, V. Moreno, R. Herrero, J. S. Smith, K. V. Shah, C. J. Meijer e F. X. Bosch. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002, 359(9312):1093-101.

Munoz, N., F. X. Bosch, S. De Sanjose, R. Herrero, X. Castellsague, K. V. Shah, P. J. Snijders e C. J. Meijer. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003, 348(6):518-27.

Munoz, N., F. X. Bosch, X. Castellsague, M. Diaz, S. De Sanjose, D. Hammouda, K. V. Shah e C. J. Meijer. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer*. 2004, 111(2):278-85.

Munoz, N., X. Castellsague, A. B. De Gonzalez e L. Gissmann. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006, 24 Suppl 3(S3/1-10).

Murphy, N., M. Ring, A. G. Killalea, V. Uhlmann, M. O'donovan, F. Mulcahy, M. Turner, E. Mcguinness, M. Griffin, C. Martin, O. Sheils e J. J. O'leary. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol*. 2003, 56(1):56-63.

Murphy, N., M. Ring, C. C. Heffron, B. King, A. G. Killalea, C. Hughes, C. M. Martin, E. Mcguinness, O. Sheils e J. J. O'leary. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2005, 58(5):525-34.

Nascimento, M. I., E. S. Pires, D. Q. Gil, G. G. Nunes, V. Balboa, F. V. Stasiaki e A. A. Cunha. Characteristics of a group of adolescents with suspected cervical intraepithelial neoplasia. *Rev Bras Ginecol*. 2005, 27(10):619-26.

Nelson, J. H., G. A. Hawkins, K. Edlund, M. Evander, L. Kjellberg, G. Wadell, J. Dillner, T. Gerasimova, A. L. Coker, L. Pirisi, D. Petereit e P. F. Lambert. A novel and rapid PCR-based method for genotyping human papillomaviruses in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2000, 38(2):688-95.

Oliveira, L. H., M. L. Rosa e S. M. Cavalcanti. Patterns of genotype distribution in multiple human papillomavirus infections. *Clin Microbiol Infect*. 2008, 14(1):60-5.

Oriel, J. D. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis.* 1971, 47(1):1-13.

Ostor, A. G. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol.* 1993, 12(2):186-92.

Paesi, S., E. P. Serafini, F. Barea, S. R. Madi e S. Echeverrigaray. High prevalence of human papillomavirus type 58 in patients with cervical pre-malignant lesions in southern Brazil. *J Med Virol.* 2009, 81(7):1270-5.

Parkin, D. M. e F. Bray. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine.* 2006, 24 Suppl 3(S3/11-25).

Payan, C., A. Ducancelle, M. H. Aboubaker, J. Caer, M. Tapia, A. Chauvin, D. Peyronnet, E. Le Hen, Z. Arab, M. C. Legrand, A. Tran, E. Postec, F. Tourmen, M. Avenel, C. Malbois, M. A. De Brux, P. Descamps e F. Lunel. Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx4000 and LightCycler general real-time PCR systems. *J Clin Microbiol.* 2007, 45(3):897-901.

Pedrosa, M. L., I. E. Mattos e R. J. Koifman. [Cervical intraepithelial lesions in adolescents: cytological findings from 1999 to 2005 in Rio de Janeiro, Brazil]. *Cad Saude Publica.* 2008, 24(12):2881-90.

Peitsaro, P., B. Johansson e S. Syrjanen. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol.* 2002, 40(3):886-91.

Poppe, W. A., P. S. Ide, M. P. Drijkoningen, J. M. Lauweryns e F. A. Van Assche. Tobacco smoking impairs the local immunosurveillance in the uterine cervix. An immunohistochemical study. *Gynecol Obstet Invest.* 1995, 39(1):34-8.

Porras, C., A. C. Rodriguez, A. Hildesheim, R. Herrero, P. Gonzalez, S. Wacholder, R. D. Burk e M. Schiffman. Human papillomavirus types by age in cervical cancer precursors: predominance of human papillomavirus 16 in young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009, 18(3):863-5.

Pretet, J. L., V. Dalstein, S. Monnier-Benoit, S. Delpeut e C. Mougin. High risk HPV load estimated by Hybrid Capture II correlates with HPV16 load measured by real-time PCR in cervical smears of HPV16-infected women. *J Clin Virol.* 2004, 31(2):140-7.

Queiroz, C., A. G. Travassos, E. Studart, J. B. Araujo Filho, C. K. Sarno e C. C. Pinheiro. Prevalence of human Papilloma Virus in HIV-positive and HIV-negative patients in the State of Bahia: a pilot study. *Braz J Infect Dis.* 2004, 8(5):356-62.

Queiroz, C., T. C. Silva, V. A. Alves, L. L. Villa, M. C. Costa, A. G. Travassos, J. B. Filho, E. Studart, T. Cheto e L. A. De Freitas. Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions. *Pathol Res Pract.* 2006a, 202(10):731-7.

Queiroz, C., T. C. Silva, V. A. Alves, L. L. Villa, M. C. Costa, A. G. Travassos, J. B. Filho, E. Studart, T. Cheto e L. A. De Freitas. P16(INK4a) expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract.* 2006b, 202(2):77-83.

Quint, W. G., S. R. Pagliusi, N. Lelie, E. M. De Villiers e C. M. Wheeler. Results of the first World Health Organization international collaborative study of detection of human papillomavirus DNA. *J Clin Microbiol.* 2006, 44(2):571-9.

Rabelo-Santos, S. H., L. Zeferino, L. L. Villa, J. P. Sobrinho, R. G. Amaral e A. V. Magalhaes. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiania, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003, 98(2):181-4.

Rama, C. H., C. M. Roteli-Martins, S. F. Derchain, A. Longatto-Filho, R. C. Gontijo, L. O. Sarian, K. Syrjanen e J. M. Aldrighi. [Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical cancer]. *Rev Saude Publica.* 2008, 42(1):123-30.

Reagan, J. W. e S. F. Patten, Jr. Dysplasia: a basic reaction to injury in the uterine cervix. *Ann N Y Acad Sci.* 1962, 97(662-82).

Richart, R. M. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu.* 1973, 8(301-28).

Rodriguez, A. C., R. Burk, R. Herrero, A. Hildesheim, C. Bratti, M. E. Sherman, D. Solomon, D. Guillen, M. Alfaro, R. Viscidi, J. Morales, M. Hutchinson, S. Wacholder e M. Schiffman. The natural history of human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia among young women in the Guanacaste cohort shortly after initiation of sexual life. *Sex Transm Dis.* 2007, 34(7):494-502.

Rosenblatt, C., E. R. Wroclawsky, A. M. Locon e E. A. G. Pereyra. HPV na Prática Clínica. 2005

Rousseau, M. C., J. S. Pereira, J. C. Prado, L. L. Villa, T. E. Rohan e E. L. Franco. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. *J Infect Dis.* 2001, 184(12):1508-17.

Rousseau, M. C., L. L. Villa, M. C. Costa, M. Abrahamowicz, T. E. Rohan e E. Franco. Occurrence of cervical infection with multiple human papillomavirus types is associated with age and cytologic abnormalities. *Sex Transm Dis.* 2003, 30(7):581-7.

Sabol, I., M. Salakova, J. Smahelova, M. Pawlita, M. Schmitt, N. M. Gasperov, M. Grce e R. Tachezy. Evaluation of different techniques for identification of human papillomavirus types of low prevalence. *J Clin Microbiol.* 2008, 46(5):1606-13.

Sakaguchi, M., Y. Fujii, H. Hirabayashi, H. E. Yoon, Y. Komoto, T. Oue, T. Kusafuka, A. Okada e H. Matsuda. Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers: an immunohistochemical study. *Int J Cancer*. 1996, 65(4):442-5.

Sano, T., T. Oyama, K. Kashiwabara, T. Fukuda e T. Nakajima. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol*. 1998, 153(6):1741-8.

Sano, T., N. Masuda, T. Oyama e T. Nakajima. Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia. *Pathol Int*. 2002, 52(5-6):375-83.

Santos, A. L. F., S. F. M. Derchain, E. B. Calverte, M. R. Martins, R. M. Dufloth e E. Z. Martinez. Performace of cervical cytology with review by different observers and hybrid capture II in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia grades 2 and 3. *Cad Saude Publica*. 2003, 19(4):1029-37.

Santos, N. S. O. Introdução a Virologia Humana. Rio de Janeiro. 2002. 254 p.

Sarian, L. O. Z., A. L. F. Santos, S. F. M. Derchain, P. G. Figueiredo e S. S. Morais. Viral load of human papillomavirus as a predictor of the severity of cervical lesions in women with atypical cells at a pap smear. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2003, 25(5):365-370.

Sasagawa, T., W. Basha, H. Yamazaki e M. Inoue. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001, 10(1):45-52.

Saslow, D., C. D. Runowicz, D. Solomon, A. B. Moscicki, R. A. Smith, H. J. Eyre e C. Cohen. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. *CA Cancer J Clin.* 2002, 52(6):342-62.

Saunier, M., S. Monnier-Benoit, F. Mauny, V. Dalstein, J. Briolat, D. Riethmuller, B. Kantelip, E. Schwarz, C. Mouglin e J. L. Pretet. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol.* 2008, 46(11):3678-85.

Schiffman, M. e S. K. Kjaer. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003, 31):14-9.

Schiffman, M., R. Herrero, R. Desalle, A. Hildesheim, S. Wacholder, A. C. Rodriguez, M. C. Bratti, M. E. Sherman, J. Morales, D. Guillen, M. Alfaro, M. Hutchinson, T. C. Wright, D. Solomon, Z. Chen, J. Schussler, P. E. Castle e R. D. Burk. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology.* 2005, 337(1):76-84.

Schiffman, M., P. E. Castle, J. Jeronimo, A. C. Rodriguez e S. Wacholder. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007, 370(9590):890-907.

Schiffman, M. H., H. M. Bauer, R. N. Hoover, A. G. Glass, D. M. Cadell, B. B. Rush, D. R. Scott, M. E. Sherman, R. J. Kurman, S. Wacholder e Et Al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1993, 85(12):958-64.

Schlecht, N. F., R. W. Platt, E. Duarte-Franco, M. C. Costa, J. P. Sobrinho, J. C. Prado, A. Ferenczy, T. E. Rohan, L. L. Villa e E. L. Franco. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 2003a, 95(17):1336-43.

Schlecht, N. F., A. Trevisan, E. Duarte-Franco, T. E. Rohan, A. Ferenczy, L. L. Villa e E. L. Franco. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2003b, 103(4):519-24.

Schledermann, D., B. T. Andersen, K. Bisgaard, M. Dohse, D. Ejersbo, B. Hoelund, P. Horal, M. Lindh e W. Ryd. Are adjunctive markers useful in routine cervical cancer screening? Application of p16(INK4a) and HPV-PCR on ThinPrep samples with histological follow-up. *Diagn Cytopathol.* 2008, 36(7):453-9.

Schmitt, F. C., A. Longatto-Filho, A. Valent e P. Vielh. Molecular techniques in cytopathology practice. *J Clin Pathol.* 2008, 61(3):258-67.

Sesab, S. S. E. B.-. Câncer no Estado da Bahia - Perfil da Morbimortalidade: 45 p. 2004.

Sherman, M. E., S. S. Wang, C. M. Wheeler, L. Rich, P. E. Gravitt, R. Tarone e M. Schiffman. Determinants of human papillomavirus load among women with histological cervical intraepithelial neoplasia 3: dominant impact of surrounding low-grade lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003, 12(10):1038-44.

Smith, J. S., L. Lindsay, B. Hoots, J. Keys, S. Franceschi, R. Winer e G. M. Clifford. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer.* 2007, 121(3):621-32.

Solomon, D., D. Davey, R. Kurman, A. Moriarty, D. O'connor, M. Prey, S. Raab, M. Sherman, D. Wilbur, T. Wright, Jr. e N. Young. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama.* 2002, 287(16):2114-9.

Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975, 98(3):503-17.

Stevens, M. P., S. M. Garland e S. N. Tabrizi. Human papillomavirus genotyping using a modified linear array detection protocol. *J Virol Methods.* 2006, 135(1):124-6.

Stevens, M. P., S. M. Garland, E. Rudland, J. Tan, M. A. Quinn e S. N. Tabrizi. Comparison of the Digene Hybrid Capture 2 assay and Roche AMPLICOR and LINEAR ARRAY human papillomavirus (HPV) tests in detecting high-risk HPV genotypes in specimens from women with previous abnormal Pap smear results. *J Clin Microbiol.* 2007, 45(7):2130-7.

Stoler, M. H. e M. Schiffman. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *Jama*. 2001, 285(11):1500-5.

Sun, X. W., T. V. Ellerbrock, O. Lungu, M. A. Chiasson, T. J. Bush e T. C. Wright, Jr. Human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive women. *Obstet Gynecol*. 1995, 85(5 Pt 1):680-6.

Syrjanen, K. Papillomavirus Infections in Human Pathology. Chichester Wiley. 2000. 615 p.

Syrjanen, K., I. Shabalova, N. Petrovichev, V. Kozachenko, T. Zakharova, J. Pajanidi, J. Podistov, G. Chemeris, L. Sozaeva, E. Lipova, I. Tsidaeva, O. Ivanchenko, A. Pshepurko, S. Zakharenko, R. Nerovjna, L. Kljukina, O. Erokhina, M. Branovskaja, M. Nikitina, V. Grunberga, A. Grunberg, A. Juschenko, R. Santopietro, M. Cintonino, P. Tosi e S. Syrjanen. Oral contraceptives are not an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia or high-risk human papillomavirus infections. *Anticancer Res*. 2006, 26(6C):4729-40.

Syrjanen, S. e M. Puranen. Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000, 11(2):259-74.

Tabora, N., A. Ferrera, J. M. Bakkers, L. F. Massuger e W. J. Melchers. High HPV 16 viral load is associated with increased cervical dysplasia in Honduran women. *Am J Trop Med Hyg*. 2008, 78(5):843-6.

Tarkowski, T. A., E. H. Koumans, M. Sawyer, A. Pierce, C. M. Black, J. R. Papp, L. Markowitz e E. R. Unger. Epidemiology of human papillomavirus infection and abnormal cytologic test results in an urban adolescent population. *J Infect Dis.* 2004, 189(1):46-50.

Thomas, D. B., R. M. Ray, A. Koetsawang, N. Kiviat, J. Kuypers, Q. Qin, R. L. Ashley e S. Koetsawang. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. I. Risk factors for invasive cervical carcinomas with human papillomavirus types 16 and 18 DNA. *Am J Epidemiol.* 2001, 153(8):723-31.

Thomas, M., D. Pim e L. Banks. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene.* 1999, 18(53):7690-700.

Tozetti, I. A., I. D. Scapulatempo, V. L. Kawski, A. W. Ferreira e J. E. Levi. Multiple types of human papillomavirus in cervical samples in women in Campo Grande, MS, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2006, 10(5):309-10.

Travassoli, F. A. e P. Devilee. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs. Lyon: IARC Press 2003. 432 p.

Trottier, H., S. Mahmud, M. C. Costa, J. P. Sobrinho, E. Duarte-Franco, T. E. Rohan, A. Ferenczy, L. L. Villa e E. L. Franco. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006, 15(7):1274-80.

Tuon, F. F., M. S. Bittencourt, M. A. Panichi e A. P. Pinto. [Sensibility and specificity of cytology and colposcopy exams with the histological evaluation of cervical intraepithelial lesions]. *Rev Assoc Med Bras.* 2002, 48(2):140-4.

Utagawa, M. L., S. M. Pereira, M. J. Cavaliere, M. Y. Maeda, L. W. Shih e N. K. Shirata. Cervical intraepithelial neoplasia in adolescents: study of cytological findings between 1987 and 1995 in Sao Paulo State-Brazil. *Arch Gynecol Obstet.* 1998, 262(1-2):59-64.

Van Der Graaf, Y., A. Molijn, H. Doornewaard, W. Quint, L. J. Van Doorn e J. Van Den Tweel. Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. *Am J Epidemiol.* 2002, 156(2):158-64.

Van Duin, M., P. J. Snijders, H. F. Schrijnemakers, F. J. Voorhorst, L. Rozendaal, M. A. Nobbenhuis, A. J. Van Den Brule, R. H. Verheijen, T. J. Helmerhorst e C. J. Meijer. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer.* 2002, 98(4):590-5.

Van Hamont, D., M. A. Van Ham, J. M. Bakkers, L. F. Massuger e W. J. Melchers. Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol.* 2006, 44(9):3122-9.

Villa, L. L., L. Sichero, P. Rahal, O. Caballero, A. Ferenczy, T. Rohan e E. L. Franco. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol.* 2000, 81(Pt 12):2959-68.

Villa, L. L., R. L. Costa, C. A. Petta, R. P. Andrade, K. A. Ault, A. R. Giuliano, C. M. Wheeler, L. A. Koutsky, C. Malm, M. Lehtinen, F. E. Skjeldestad, S. E. Olsson, M. Steinwall, D. R. Brown, R. J. Kurman, B. M. Ronnett, M. H. Stoler, A. Ferenczy, D. M. Harper, G. M. Tamms, J. Yu, L. Lupinacci, R. Railkar, F. J. Taddeo, K. U. Jansen, M. T. Esser, H. L. Sings, A. J. Saah e E. Barr. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* 2005, 6(5):271-8.

Villa, L. L., K. A. Ault, A. R. Giuliano, R. L. Costa, C. A. Petta, R. P. Andrade, D. R. Brown, A. Ferenczy, D. M. Harper, L. A. Koutsky, R. J. Kurman, M. Lehtinen, C. Malm, S. E. Olsson, B. M. Ronnett, F. E. Skjeldestad, M. Steinwall, M. H. Stoler, C. M. Wheeler, F. J. Taddeo, J. Yu, L. Lupinacci, R. Railkar, R. Marchese, M. T. Esser, J. Bryan, K. U. Jansen, H. L. Sings, G. M. Tamms, A. J. Saah e E. Barr. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine.* 2006, 24(27-28):5571-83.

Villa, L. L. Overview of the clinical development and results of a quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) vaccine. *Int J Infect Dis.* 2007, 11 Suppl 2(S17-25).

Walboomers, J. M. e C. J. Meijer. Do HPV-negative cervical carcinomas exist? *J Pathol.* 1997, 181(3):253-4.

Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer e N. Munoz. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999, 189(1):12-9.

Werness, B. A., A. J. Levine e P. M. Howley. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990, 248(4951):76-9.

Wheeler, C. M., W. C. Hunt, N. E. Joste, C. R. Key, W. G. Quint e P. E. Castle. Human papillomavirus genotype distributions: implications for vaccination and cancer screening in the United States. *J Natl Cancer Inst*. 2009, 101(7):475-87.

Winer, R. L., N. B. Kiviat, J. P. Hughes, D. E. Adam, S. K. Lee, J. M. Kuypers e L. A. Koutsky. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis*. 2005, 191(5):731-8.

Winkelstein, W., Jr. Smoking and cancer of the uterine cervix: hypothesis. *Am J Epidemiol*. 1977, 106(4):257-9.

Woodman, C. B., S. I. Collins e L. S. Young. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007, 7(1):11-22.

Wright, J. D., A. B. Pinto, M. A. Powell, D. W. Lu, F. Gao e K. R. Pinto. Atypical squamous cells of undetermined significance in girls and women. *Obstet Gynecol*. 2004, 103(4):632-8.

Wright, J. D., R. M. Davila, K. R. Pinto, D. F. Merritt, R. K. Gibb, J. S. Rader, D. G. Mutch, F. Gao e M. A. Powell. Cervical dysplasia in adolescents. *Obstet Gynecol*. 2005, 106(1):115-20.

Wright, T. C., Jr., J. T. Cox, L. S. Massad, J. Carlson, L. B. Twiggs e E. J. Wilkinson. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol.* 2003, 189(1):295-304.

Xi, L. F., N. B. Kiviat, D. A. Galloway, X. H. Zhou, J. Ho e L. A. Koutsky. Effect of cervical cytologic status on the association between human papillomavirus type 16 DNA load and the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *J Infect Dis.* 2008, 198(3):324-31.

Xu, Y., J. Dotto, Y. Hui, K. Lawton, K. Schofield e P. Hui. High grade cervical intraepithelial neoplasia and viral load of high-risk human papillomavirus: significant correlations in patients of 22 years old or younger. *Int J Clin Exp Pathol.* 2009, 2(2):169-75.

Yang, B. H., F. I. Bray, D. M. Parkin, J. W. Sellors e Z. F. Zhang. Cervical cancer as a priority for prevention in different world regions: an evaluation using years of life lost. *Int J Cancer.* 2004, 109(3):418-24.

Yildiz, I. Z., A. Usubutun, P. Firat, A. Ayhan e T. Kucukali. Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. *Pathol Res Pract.* 2007, 203(6):445-9.

Ylitalo, N., A. Josefsson, M. Melbye, P. Sorensen, M. Frisch, P. K. Andersen, P. Sparen, M. Gustafsson, P. Magnusson, J. Ponten, U. Gyllensten e H. O. Adami. A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. *Cancer Res.* 2000, 60(21):6027-32.

Yoshida, T., T. Sano, T. Kanuma, N. Owada, S. Sakurai, T. Fukuda e T. Nakajima. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the type distribution, viral load, and physical status of human papillomavirus in liquid-based cytology samples from cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer.* 2008, 18(1):121-7.

Zerfass, K., D. Spitkovsky, A. Schulze, S. Joswig, B. Henglein e P. Jansen-Durr. Adenovirus E1A activates cyclin A gene transcription in the absence of growth factors through interaction with p107. *J Virol.* 1996, 70(4):2637-42.

Zur Hausen, H., W. Meinhof, W. Scheiber e G. W. Bornkamm. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer.* 1974, 13(5):650-6.

Zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002, 2(5):342-50.